

ANTICUERPOS ANTI-TIGIT Y MÉTODOS DE USO**LISTADO DE SECUENCIAS**

5 La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se
presentó de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la
presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia de
ASCII, creada el jueves, 22 de septiembre de 2016, se denomina 50474-
120W03_Sequence_Listing_9_22_16_ST25 y tiene un tamaño de 209,318
10 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-TIGIT
15 (inmunoreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM) y métodos para
utilizarlos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Las enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario (por ejemplo,
cáncer) son la manifestación o consecuencia de vías biológicas
complejas, que en fisiología normal son fundamentales para responder a
agravio o lesión, iniciando la reparación del agravio, y montar
defensas innatas y adquiridas. La enfermedad o patología ocurre cuando
25 estas vías fisiológicas normales provocan agravio o lesión adicional
que está relacionado directamente con la intensidad de la respuesta
(por ejemplo, como una consecuencia de la regulación anormal o
estimulación excesiva) o como una reacción a sí misma.

30 Aunque, a menudo, la génesis de dichas enfermedades involucra vías de
etapas múltiples y, a menudo, múltiples vías o sistemas biológicos
diferentes, la intervención en puntos críticos en una o más de dichas

vías puede tener un efecto terapéutico o de mejoría. La intervención terapéutica se puede producir ya sea por antagonismo de una vía o proceso perjudicial o por estímulo de una vía o proceso beneficioso.

- 5 Se conocen muchas enfermedades inmunitarias y se han estudiado en profundidad. Dichas enfermedades incluyen cáncer (neoplasia), enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario, enfermedades inflamatorias con mediación no inmunitaria, enfermedades infecciosas y enfermedades de inmunodeficiencia.

10

Los linfocitos T (células T) son componentes importantes de la respuesta inmunitaria de mamíferos. Los linfocitos T reconocen antígenos asociados con una molécula codificada por genes en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés).

- 15 El antígeno se puede mostrar junto con moléculas de MHC en la superficie de las células que presentan antígeno (APC, por sus siglas en inglés), células infectadas con virus, células cancerígenas, injertos, etc. El sistema de linfocitos T elimina dichas células alteradas que representan un riesgo a la salud del mamífero
- 20 hospedador. Los linfocitos T incluyen linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T cooperadores se extienden ampliamente luego del reconocimiento de un complejo de MHC y antígeno en una APC. Además, los linfocitos T cooperadores secretan una variedad de citocinas, (es decir, linfocinas), que cumplen una función
- 25 central en la activación de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos y una variedad de otras células que participan en la respuesta inmunitaria.

- 30 Los linfocitos T de regulación (Treg) representan un subconjunto de los linfocitos T cooperadores que cumplen una función en la inhibición de respuestas inmunitarias autorreactivas y se suelen observar en sitios de inflamación crónica, tales como en tejido tumoral. Los Treg

se definen fenotípicamente mediante expresión de superficie celular elevada de CD25, CLTA4, GITR, y neuropilina-1 (NRP-1), y se encuentran bajo el control del factor de transcripción FOXP3. Los Treg realizan su función supresora en linfocitos T activados a través de mecanismos dependientes de contacto y producción de citocina. Los Treg también modulan respuestas inmunitarias mediante interacción directa con ligandos en células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés), tal como ligación de CD40L e interacción de CTLA4 con moléculas B7 en DC que provoca la inducción de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Las DC son APC profesionales capaces de inducir inmunidad o tolerancia contra autoantígenos o antígenos no autoantígenos. Los Treg con DC expandidas suprimen las respuestas de aloreactividad *in vitro*, y cuando se transfieren de forma adoptiva, los Treg apropiados inhibieron diabetes en ratones NODscid o asma inducida de forma experimental. Las interacciones específicas de ligandos en DC con Treg también pueden derogar su función supresora, tal como la unión de GITR en ratones, lo que sugiere que DC puede tener un papel pluralístico para modular la función de Treg.

Las moléculas CTLA4 y GITR son representativas de ligandos definidos dentro de las superfamilias de TNF y CD28-B7 de moléculas co-estimuladoras/-inhibidoras, respectivamente. Estas moléculas están altamente expresadas en Treg pero típicamente están reguladas por incremento en linfocitos T activados. Más recientemente, una proteína denominada TIGIT (para el inmunoreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM) se identificó como una proteína unida a la superficie celular específicamente expresada en linfocitos T que poseen un dominio IgV, un dominio transmembrana, y dos motivos inhibidores de tirosina inmunoreceptora (ITIM). TIGIT mostró ser particularmente expresado en subconjuntos de linfocitos T de memoria y Treg, así como linfocitos NK. Dado que existe una necesidad insatisfecha de nuevos terapéuticos y métodos de tratamiento de trastornos relacionados con

el sistema inmunitario y particularmente tipos de cáncer, en la presente se describen composiciones terapéuticas inesperadamente eficaces, tal como los anticuerpos anti-TIGIT y composiciones de estos, y métodos de tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunitario y tipos de cáncer, que implican modular la interacción de TIGIT con sus compañeros de unión.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT (inmunoreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM) y variantes de estos con propiedades mejoradas, que incluye, por ejemplo, afinidad de unión, reactividad cruzada, farmacocinética y/o expresión. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT y variantes de estos que poseen, por ejemplo, afinidad de unión elevada respecto a TIGIT humano; reactividad cruzada entre TIGIT humano, TIGIT de mono cynomolgus (cyno), y/o TIGIT de conejo; propiedades de depuración deseable en cynomolgus; y propiedades bioquímicas y biofísicas que confieren a los anticuerpos y variantes de estos con estabilidad elevada.

En un aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo que se une específicamente a TIGIT humano, donde el anticuerpo se une a un epítipo en TIGIT humano que comprende uno o más residuos de aminoácidos Ser78, Ser80, y Lys82 de TIGIT humano. En una modalidad, el epítipo comprende residuos de aminoácidos Ser80 y Lys82 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítipo comprende residuos de aminoácidos Ser78, Ser80 y Lys82 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítipo comprende además el residuo de aminoácido Ala67 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítipo también comprende uno o más residuos de aminoácidos adicionales seleccionados del grupo que consiste en Glu60, Leu65 e Ile68 de TIGIT humano. En otra modalidad,

el epítopo también comprende uno o más residuos de aminoácidos adicionales seleccionados del grupo que consiste en Gln56, Asn70, Leu73 y His111 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítopo también comprende uno o más residuos de aminoácidos adicionales seleccionados del grupo que consiste en Thr55, Asn58, Asp63, Gln64, His76, Ile77, y Pro79 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítopo consiste en residuos de aminoácidos Thr55, Gln56, Asn58, Glu60, Asp63, Gln64, Leu65, Ala67, Ile68, Asn70, Leu73, His76, Ile77, Ser78, Pro79, Ser80, Lys82 y His111 de TIGIT humano.

10

En otro aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo que se une específicamente a TIGIT humano, donde el anticuerpo se une a un epítopo en TIGIT humano que comprende uno o más residuos de aminoácidos Thr55, Ser80, y Lys82 de TIGIT humano. En una modalidad, el epítopo comprende el residuo de aminoácido Lys82 de TIGIT humano.

15

En otra modalidad, el epítopo comprende residuos de aminoácidos Thr55, Ser80 y Lys82 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítopo comprende además el residuo de aminoácido Gln56 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítopo comprende además el residuo de aminoácido Ile77

20

o Pro79 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítopo comprende además los residuos de aminoácidos Ile77 y Pro79 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítopo comprende además el residuo de aminoácido Asn58 o Glu60 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítopo comprende además los residuos de aminoácido Asn58 y Glu60 de TIGIT humano. En

25

otra modalidad, el epítopo también comprende uno o más residuos de aminoácidos adicionales seleccionados del grupo que consiste en Leu65, Ile68, Leu73, His76, Ser78 y His111 de TIGIT humano. En otra modalidad, el epítopo comprende además los residuos de aminoácido Leu65, Ile68, Leu73, His76, Ser78 y His111 de TIGIT humano. En aun

30

otra modalidad, el epítopo consiste en Thr55, Gln56, Asn58, Glu60, Leu65, Ile68, Leu73, His76, Ile77, Ser78, Pro79, Ser80, Lys82 y His111 de TIGIT humano.

En otro aspecto, la invención muestra un anticuerpo que se une específicamente a TIGIT humano, donde el anticuerpo comprende un paratopo que comprende uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos de la región variable de cadena pesada Asn32, Tyr52, Arg52b, Phe53, Lys54, Tyr56, Asp58, Tyr99, Asp100, Leu100a, Leu100b y Ala100c y los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Tyr27d, Tyr92, Ser93, Thr94 y Phe96. En una modalidad, el paratopo consiste en los residuos de aminoácidos de región variable de cadena pesada Asn32, Tyr52, Arg52b, Phe53, Lys54, Tyr56, Asp58, Tyr99, Asp100, Leu100a, Leu100b y Ala100c y los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Tyr27d, Tyr92, Ser93, Thr94 y Phe96. En cualquiera de los aspectos antemencionados, el anticuerpo puede ser capaz de unirse a TIGIT de conejo.

En otro aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo que se une específicamente a TIGIT humano, donde el anticuerpo se une a un epítipo en TIGIT humano que comprende uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln53, His111 y Tyr113 de TIGIT humano. En algunas modalidades, el epítipo comprende además Gln56 de TIGIT humano. En algunas modalidades, el epítipo comprende además Glu60, Leu65, Ile68, Asn70, Leu73 y His76 de TIGIT humano.

En otro aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo que se une específicamente a TIGIT humano, donde el anticuerpo comprende las siguientes seis regiones hipervariables (HVR): un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SNSAAWN (SEQ ID NO: 1); una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KTYRFRKWYSDYAVSVKG (SEQ ID NO: 2); una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESTTYDLLAGPFDY (SEQ ID NO: 3); una HVR-L1 que comprende la secuencia

de aminoácidos de KSSQTVLYSSNNKKYLA (SEQ ID NO: 4); una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WASTRES (SEQ ID NO: 5); y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQYYSTPFT (SEQ ID NO: 6). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las

5 siguientes regiones marco (FR) de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO: 7); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGQPPLLIIY (SEQ ID NO: 8); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

10 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO: 9); y una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGPGTKVEIK (SEQ ID NO: 10). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de X_1 VQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVS (SEQ ID

15 NO: 11), donde X_1 es Q o E; una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQSPSRGLEWLG (SEQ ID NO: 12); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTR (SEQ ID NO: 13); y una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 14). En algunas modalidades, el anticuerpo

20 comprende además las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVS (SEQ ID NO: 15); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQSPSRGLEWLG (SEQ ID NO: 12); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTR (SEQ ID NO: 13); y

25 una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 14). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

30 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVS (SEQ ID NO: 16); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQSPSRGLEWLG (SEQ ID NO: 12); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTR (SEQ ID NO: 13); y una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14). En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de unirse a TIGIT de conejo.

5

En otro aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo que se une específicamente a TIGIT humano, donde el anticuerpo comprende las siguientes seis HVR: un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SYPMN (SEQ ID NO: 17); una HVR-H2 que comprende la

10 secuencia de aminoácidos de WINTNTGNPTYVQGFTG (SEQ ID NO: 18); una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGGHTYDSYAFDV (SEQ ID NO: 19); una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQVISSSLA (SEQ ID NO: 20); una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASTLQS (SEQ ID NO: 21); y una HVR-L3 que comprende la

15 secuencia de aminoácidos de QHLHGYPX₁N (SEQ ID NO: 22), donde X₁ es C o S. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende los siguientes seis HVR: un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SYPMN (SEQ ID NO: 17); una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINTNTGNPTYVQGFTG (SEQ ID NO: 18); una HVR-H3 que comprende la

20 secuencia de aminoácidos de TGGHTYDSYAFDV (SEQ ID NO: 19); una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQVISSSLA (SEQ ID NO: 20); una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASTLQS (SEQ ID NO: 21); y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHLHGYPN (SEQ ID NO: 23). En algunas modalidades, el

25 anticuerpo comprende además las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGSDLKKPGASVRVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 24); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGHGLEWMG (SEQ ID NO: 25); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

30 RFVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 26); y una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 27). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las siguientes seis

HVR: una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SYPMN (SEQ ID NO: 17); una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINTNTGNPTYVQGFTG (SEQ ID NO: 18); una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGGHTYDSYAFDV (SEQ ID NO: 19); una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQVISSSLA (SEQ ID NO: 20); una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASTLQS (SEQ ID NO: 21); y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHLHGYPCN (SEQ ID NO: 28). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QVQLVQSGSDLKKPGASVRVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 29); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGHGLEWMG (SEQ ID NO: 25); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 26); y una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTMTVTSS (SEQ ID NO: 27). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPTFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 30); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQNPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 31); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFVITYYC (SEQ ID NO: 32); y una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 33).

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo que se une específicamente al TIGIT humano, donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 o 35; (b) una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; o c) una región variable de cadena pesada como en (a) y una región variable de cadena ligera como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende a) una región variable

de cadena pesada (VH) que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34; (b) una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; o c) una región variable de cadena pesada como en (a) y una región variable de cadena ligera como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35; (b) una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; o c) una región variable de cadena pesada como en (a) y una región variable de cadena ligera como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de unirse a TIGIT de conejo.

15

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo que se une específicamente al TIGIT humano, donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; (b) una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38; o c) una región variable de cadena pesada como en (a) y una región variable de cadena ligera como en (b).

20

En aun otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo que se une específicamente al TIGIT humano, donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39; (b) una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; o c) una región variable de cadena pesada como en (a) y una región variable de cadena ligera como en (b).

25

30

En cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, el anticuerpo puede ser capaz de unirse a ambos TIGIT humano y TIGIT de mono cynomolgus (cyno), pero no TIGIT murino. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a TIGIT humano con una Kd de alrededor de 10 nM o menos y TIGIT cyno con una Kd de alrededor de 10 nM o menos. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a TIGIT humano con una Kd de alrededor de 0.1 nM a alrededor de 1 nM y TIGIT cyno con una Kd de alrededor de 0.5 nM a alrededor de 1 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a TIGIT humano con una Kd de alrededor de 0.1 nM o menos y TIGIT cyno con una Kd de alrededor de 0.5 nM o menos.

En cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de antagonista o un anticuerpo agonista.

En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista se une específicamente a TIGIT e inhibe o bloquea la interacción de TIGIT con el receptor de poliovirus (PVR). En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista inhibe la señalización intracelular mediada por unión de TIGIT a PVR. En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista inhibe o bloquea la unión de TIGIT humano a PVR humano con un valor IC50 de 10 nM o menos. En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista inhibe o bloquea la unión de TIGIT humano a PVR humano con un valor IC50 de 1 nM a alrededor de 10 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista inhibe o bloquea la unión de TIGIT cyno a PVR cyno con un valor IC50 de 50 nM o menos. En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista inhibe o bloquea la unión de TIGIT cyno a PVR cyno con un valor IC50 de 1 nM a alrededor de 50 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista inhibe o bloquea la unión de TIGIT cyno a PVR cyno con un valor IC50 de 1 nM a alrededor de 5 nM.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista se une específicamente

- a TIGIT y estimula la interacción de PVR con CD226 o CD96. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista se une específicamente a TIGIT y estimula la interacción de PVR con CD226 y CD96. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista se une específicamente a TIGIT y estimula la interacción de PVR humano con CD226 humano y CD96 humano. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista se une específicamente a TIGIT y estimula la interacción de PVR cyno con CD226 cyno y CD96 cyno.
- 5 En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que compete por la unión a TIGIT con un anticuerpo de cualquiera de los aspectos anteriores.
- En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de cualquiera de los aspectos anteriores.
- 15 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, el anticuerpo es monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo es humano, humanizado o quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una depuración luego de la administración (por ejemplo, inyección, por ejemplo, inyección intravenosa) de menos que alrededor de 10 ml/kg/día (por ejemplo, alrededor de 3 ml/kg/día a alrededor de 10 ml/kg/día). En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una depuración de alrededor de 3 ml/kg/día a alrededor de 8 ml/kg/día. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo es a un mamífero (por ejemplo, un mono, tal como un mono cynomolgus, o un humano). En algunas modalidades, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a TIGIT. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, fragmento variable
- 20
- 25
- 30

de cadena simple (scFv) y (Fab')₂. En determinadas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de clase de IgG. En algunas modalidades, el anticuerpo de clase de IgG es un anticuerpo de subclase de IgG1. En algunas modalidades, un anticuerpo descrito en la presente puede ser para ser utilizado como un medicamento. En algunas modalidades, un anticuerpo descrito en la presente puede ser para ser utilizado para tratar o demorar la evolución de un cáncer en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer no microcítico, un cáncer microcítico, un cáncer celular renal, un cáncer colorrectal, un cáncer de ovarios, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un carcinoma gástrico, un cáncer de vejiga, un cáncer esofágico, un mesotelioma, un melanoma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de tiroides, un sarcoma, un cáncer de próstata, un glioblastoma, un cáncer cervical, un carcinoma tímico, una leucemia, un linfoma, una mieloma, micosis fungoide, un cáncer de células de Merkel y una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, un anticuerpo descrito en la presente puede ser para ser utilizado para tratar o demorar la evolución de mieloma múltiple (MM). En algunas modalidades, un anticuerpo descrito en la presente puede ser para ser utilizado para tratar o demorar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por el agotamiento de linfocitos T. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en infección aguda no resuelta, infección crónica, e inmunidad de tumor. En algunas modalidades, un anticuerpo descrito en la presente puede ser para ser utilizado para aumentar, mejorar o estimular una función o respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita.

En otro aspecto, la invención presenta un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido aislado) que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente. En otro aspecto, la invención presenta un vector (por ejemplo, un vector de expresión) que comprende el polinucleótido para la expresión del anticuerpo. En otro aspecto, la invención presenta células hospedadoras que comprenden los vectores y/o polinucleótidos anteriores. En algunas modalidades, la célula hospedadora es una eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero). En algunas modalidades, la célula eucariota es una célula 293, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de levadura o una célula vegetal. En algunas modalidades, la célula hospedadora es una célula procariota. En algunas modalidades, la célula procariota es *E. coli*.

En otro aspecto, la invención presenta un método para la producción de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores precedentes (por ejemplo, vectores de expresión) en un medio de cultivo. En algunas modalidades, el método además comprende recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora o el medio de cultivo. En algunas modalidades, la célula hospedadora es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero, por ejemplo, una célula 293, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de levadura o una célula vegetal. En algunas modalidades, la célula hospedadora es una célula procariota. En algunas modalidades, la célula procariota es *E. coli*.

En otro aspecto, la invención muestra un inmunoconjugado que comprende cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente y un agente (por ejemplo, un agente terapéutico, por ejemplo, un agente citotóxico).

En otro aspecto, la invención se caracteriza por tener una composición

que comprende un anticuerpo descrito en la presente. En algunas modalidades, la composición comprende además un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición es para uso diagnóstico (por ejemplo, para detectar niveles de expresión de TIGIT, por ejemplo, niveles de expresión de proteína TIGIT). En algunas modalidades, la composición es una composición farmacéutica. En algunas modalidades, la composición además comprende un antagonista de unión al eje PD-1 o un agente terapéutico adicional.

10

En otro aspecto, la invención muestra el uso de un anticuerpo descrito en la presente en la elaboración de un medicamento para tratar o demorar la evolución de un cáncer en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer no microcítico, un cáncer microcítico, un cáncer celular renal, un cáncer colorrectal, un cáncer de ovarios, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un carcinoma gástrico, un cáncer de vejiga, un cáncer esofágico, un mesotelioma, un melanoma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de tiroides, un sarcoma, un cáncer de próstata, un glioblastoma, un cáncer cervical, un carcinoma tímico, una leucemia, un linfoma, una mieloma, micosis fungoide, un cáncer de células de Merkel y una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, el mieloma es MM. En algunas modalidades, el medicamento se formula para administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, mediante implante, mediante inhalación, en forma intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

25

30

En otro aspecto, la invención muestra el uso de un anticuerpo descrito en la presente en la elaboración de un medicamento para tratar o demorar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, la

enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por el agotamiento de linfocitos T. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en infección aguda no resuelta, infección crónica, e inmunidad de tumor. En algunas modalidades, el medicamento se formula para administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, mediante implante, mediante inhalación, en forma intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

En otro aspecto, la invención muestra el uso de un anticuerpo descrito en la presente en la elaboración de un medicamento para aumentar, potenciar o estimular una respuesta inmunitaria o función en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el medicamento se formula para administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, mediante implante, mediante inhalación, en forma intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

En otro aspecto, la invención muestra un método para tratar o demorar la evolución de un cáncer en un sujeto, el método que comprende administrarle a un sujeto una cantidad eficaz de cualquiera uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o más) de los anticuerpos descritos en la presente, tratando de este modo o demorando la evolución del cáncer en el sujeto. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer no microcítico, un cáncer microcítico, un cáncer celular renal, un cáncer colorrectal, un cáncer de ovarios, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un carcinoma gástrico, un cáncer de vejiga, un cáncer esofágico, un mesotelioma, un melanoma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de tiroides, un

sarcoma, un cáncer de próstata, un glioblastoma, un cáncer cervical, un carcinoma tímico, una leucemia, un linfoma, una mieloma, micosis fungoide, un cáncer de células de Merkel y una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, el mieloma es MM.

5

En otro aspecto, la invención muestra un método para tratar o demorar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un sujeto, el método que comprende administrarle a un sujeto una cantidad eficaz de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o más) de los anticuerpos descritos en la presente, tratando de este modo o demorar la evolución de la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en el sujeto. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por el agotamiento de linfocitos T. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en infección aguda no resuelta, infección crónica, e inmunidad de tumor.

10

15

20

25

30

En otro aspecto, la invención muestra un método para aumentar, potenciar o estimular una respuesta inmunitaria o función en un sujeto, que comprende administrarle a un sujeto una cantidad eficaz de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o más) de los anticuerpos descritos en la presente, de este modo aumentando, potenciando o estimulando una respuesta inmunitaria o función en el sujeto. En algunas modalidades, el método comprende además administrarle al sujeto un antagonista de unión al eje PD-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje PD-1 se administra antes o después de la administración del anticuerpo. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje PD-1 se administra junto con el anticuerpo. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de PD-1 se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-1, un antagonista

de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje PD-1 es un antagonista de unión a PD-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión a ligandos. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), CT-011 (pidilizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consta de: MPDL3280A (atezolizumab), YW243.55.S70, MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab), y MSB0010718C (avelumab). En algunas modalidades, el anticuerpo es MPDL3280A. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L2 es un anticuerpo anti-PD-L2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

En algunas modalidades, cualquiera de los métodos de tratamiento descritos anteriormente pueden comprender además administrar al sujeto un agonista de unión OX40. En algunas modalidades, el agonista de unión a OX40 se administra antes o después de la administración del anticuerpo y/o el antagonista de unión al eje PD-1. En algunas

modalidades, el agonista de unión a OX40 se administra junto con el anticuerpo y/o el antagonista de unión al eje PD-1. En algunas modalidades, el agonista de unión a OX40 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo agonista de OX40, un fragmento de agonista de OX40L, un receptor oligomérico de OX40 y una inmunoadhesina de OX40. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 elimina las células que expresan OX40 humano. En algunas modalidades, las células que expresan OX40 humano son linfocitos T efectores CD4+. En algunas modalidades, las células que expresan OX40 humano son linfocitos T reguladores (Treg). En algunas modalidades, la eliminación se produce mediante ADCC y/o fagocitosis. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 se une a OX40 humano con una afinidad menor o igual a alrededor de 1 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 se une a OX40 humano con una afinidad menor o igual a alrededor de 0,45 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 se une a OX40 humano con una afinidad menor o igual a alrededor de 0,4 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 se une a OX40 humano con un EC50 menor o igual a 0.3 µg/ml. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 se une a OX40 humano con un EC50 menor o igual a 0.2 µg/ml. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 aumenta la proliferación de linfocitos T efectores CD4+ y/o aumenta la producción de citocinas por parte de los linfocitos T efectores CD4+ en comparación con la proliferación y/o la producción de citocinas antes del tratamiento con el anticuerpo agonista de OX40. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 aumenta la proliferación de linfocitos T de memoria y/o producción de citocinas por parte de un linfocito T de la memoria. En algunas modalidades, la producción de citocina es producción de IFN-γ. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 inhibe la función de Treg. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 inhibe la supresión de Treg de la función de linfocitos T efectores (por ejemplo, la proliferación

de los linfocitos T efectores y/o la producción de citocinas). En algunas modalidades, el linfocito T efector es un linfocito T efector CD4+. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 aumenta la transducción de señal de OX40 en una célula objetivo que expresa OX40. En algunas modalidades, la transducción de señal de OX40 se detecta controlando la señalización de NFkB corriente abajo. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende un polipéptido Fc de IgG1 variante que comprende una mutación que elimina la unión a células efectoras humanas y tiene menos actividad con respecto a un anticuerpo agonista OX40 que comprende una parte de Fc de IgG1 de secuencia natural. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende un polipéptido de Fc de IgG1 variante que comprende una mutación DANA. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 278, 279 o 280, (ii) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 281, 282, 283, 284, 285 o 286 y (iii) un HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 287, 288, o 289; y (b) un dominio VL que comprende (i) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290, (ii) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 291, y (iii) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298 o 299. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 278; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 281; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 287; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 291, y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de la SEQ ID NO: 292. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende (a) HVR-H1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 278; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 281; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 287; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290;

5 (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 291; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de la SEQ ID NO: 297. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 278; (b) HVR-H2 que comprende la

10 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 281; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 287; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 291, y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se

15 selecciona de la SEQ ID NO: 298. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende una secuencia VH que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 300-325. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende una secuencia VH que tiene al menos 90 % de

20 identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 300. En algunas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 300. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende una VH que comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de: (a) HVR-H1

25 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 278, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 281 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 287. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende una secuencia VL que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con

30 la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 326-351. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende una VL que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 326. En algunas modalidades, se sustituyó, se insertó y/o se eliminó un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 326. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende una VL que comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de

5 (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 291; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 292. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende (a) una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 300; (b) una

10 secuencia VL de la SEQ ID NO: 326; o (c) una secuencia VH tal como en (a) y una secuencia VL tal como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende (a) una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 319; (b) una secuencia VL de la SEQ ID NO: 345; o (c) una secuencia VH tal como en (a) y una secuencia VL tal como en (b). En

15 algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende (a) una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 320; (b) una secuencia VL de la SEQ ID NO: 346; o (c) una secuencia VH tal como en (a) y una secuencia VL tal como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 es el anticuerpo L106, anticuerpo ACT35, MEDI6469, o MEDI0562. En

20 algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 es un anticuerpo de IgG1 de longitud completa. En algunas modalidades, la inmunoadhesina de OX40 es una proteína OX40-Fc trimérica.

En algunas modalidades, cualquiera de los métodos de tratamientos

25 descritos anteriormente pueden además comprender administrar al sujeto un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales. En algunas modalidades, el uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo que consiste en PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4 y

30 CD96. En algunas modalidades, cualquiera de los métodos de tratamiento descritos anteriormente pueden comprender además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, el agente

terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. En algunas modalidades, el anticuerpo se administra por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implante, por inhalación, por vía
5 intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

En otro aspecto, la invención muestra un kit que comprende cualquiera uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o más) de los anticuerpos
10 descritos en la presente y el prospecto que comprende las instrucciones para utilizar el anticuerpo para tratar o demorar la evolución de un cáncer en un sujeto. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer no microcítico, un cáncer microcítico, un cáncer celular renal, un cáncer colorrectal, un
15 cáncer de ovarios, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un carcinoma gástrico, un cáncer de vejiga, un cáncer esofágico, un mesotelioma, un melanoma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de tiroides, un sarcoma, un cáncer de próstata, un glioblastoma, un cáncer cervical, un carcinoma tímico, una leucemia, un linfoma, una
20 mieloma, micosis fungoide, un cáncer de células de Merkel y una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. En algunas modalidades, el mieloma es MM.

En otro aspecto, la invención muestra un kit que comprende cualquiera
25 uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o más) de los anticuerpos descritos en la presente y un prospecto que comprende las instrucciones para utilizar el anticuerpo para tratar o demorar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un sujeto. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el
30 sistema inmunitario está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por el agotamiento de linfocitos T. En

algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en infección aguda no resuelta, infección crónica, e inmunidad de tumor. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

5

En otro aspecto, la invención muestra un kit que comprende cualquiera uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o más) de los anticuerpos descritos en la presente y un prospecto que comprende las instrucciones para aumentar, mejorar o estimular una función o respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

La FIGURA 1A es un diagrama esquemático de un ensayo de unión CHO-TIGIT.

20

La Figura 1B es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de unión al CHO-TIGIT descrito en la Figura 1A utilizando células CHO que expresan TIGIT humano y los anticuerpos anti-TIGIT derivados de OMT indicados a variadas concentraciones, según se analizó mediante FACS.

25

La Figura 1C es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de unión al CHO-TIGIT descrito en la Figura 1A utilizando células CHO que expresan TIGIT de mono cynomolgus (cyno) y los anticuerpos anti-TIGIT derivados de OMT indicados a variadas concentraciones, según se analizó mediante FACS.

30

La Figura 1D es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de unión al CHO-TIGIT descrito en la Figura 1A utilizando células CHO que expresan TIGIT humano y los anticuerpos anti-TIGIT derivados de SD

indicados a variadas concentraciones, según se analizó mediante FACS.

La Figura 1E es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de unión al CHO-TIGIT descrito en la Figura 1A utilizando células CHO que expresan TIGIT cyno y los anticuerpos anti-TIGIT derivados de SD indicados a variadas concentraciones, según se analizó mediante FACS.

La Figura 2A es una gráfica que muestra la unión de los anticuerpos anti-TIGIT derivados de OMT a linfocitos T de CD4 humano como una función de concentración de anticuerpo.

La Figura 2B es una gráfica que muestra la unión de los anticuerpos anti-TIGIT derivados de OMT a linfocitos T de CD8 humano como una función de concentración de anticuerpo.

La Figura 2C es una gráfica que muestra la unión de los anticuerpos anti-TIGIT derivados de SD a linfocitos T de CD4 humano como una función de concentración de anticuerpo.

La Figura 2D es una gráfica que muestra la unión de los anticuerpos anti-TIGIT derivados de SD a linfocitos T de CD8 humano como una función de concentración de anticuerpo.

La Figura 3A es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo ELISA de bloqueo utilizando placas recubiertas con proteína de fusión de PVR-Fc humano, TIGIT humano, y los anticuerpos anti-TIGIT indicados (10A7 y 4.1D3.Q1E en formato Fab o IgG) o control de Fab anti-CSF1, como una función de concentración anticuerpo/Fab.

La Figura 3B es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo ELISA de bloqueo utilizando placas recubiertas con proteína de fusión de PVR-Fc cyno, TIGIT cyno, y los anticuerpos anti-TIGIT indicados

(10A7 y 4.1D3.Q1E en formato Fab o IgG) o control de Fab anti-CSF1, como una función de concentración anticuerpo/Fab.

La Figura 3C es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo ELISA de bloqueo utilizando placas recubiertas con proteína de fusión de PVR-Fc murino, TIGIT murino, y los anticuerpos anti-TIGIT indicados (10A7 y 4.1D3.Q1E en formato Fab o IgG) o control de Fab anti-CSF1, como una función de concentración anticuerpo/Fab.

La Figura 3D es una tabla que muestra los resultados de los ensayos de ELISA de bloqueo descritos en las Figuras 3A-3C.

La FIGURA 4A es un diagrama esquemático de un ensayo de bloqueo de PVR CHO-TIGIT.

La Figura 4B es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de bloqueo de PVR CHO-TIGIT descrito en la Figura 4A utilizando células CHO que expresan TIGIT humano y los anticuerpos anti-TIGIT derivados de OMT indicados a variadas concentraciones, según se analizó mediante FACS.

La Figura 4C es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de bloqueo de PVR CHO-TIGIT descrito en la Figura 4A utilizando células CHO que expresan TIGIT cyno y los anticuerpos anti-TIGIT derivados de OMT indicados a variadas concentraciones, según se analizó mediante FACS.

La Figura 4D es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de bloqueo de PVR CHO-TIGIT descrito en la Figura 4A utilizando células CHO que expresan TIGIT humano y los anticuerpos anti-TIGIT derivados de SD indicados a variadas concentraciones, según se analizó mediante FACS.

La Figura 4E es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de bloqueo de PVR CHO-TIGIT descrito en la Figura 4A utilizando células CHO que expresan TIGIT cyno y los anticuerpos anti-TIGIT derivados de SD indicados a variadas concentraciones, según se analizó mediante FACS.

La Figura 5A es una gráfica que muestra la depuración farmacocinética de los anticuerpos anti-TIGIT indicados en cyno luego de la administración intravenosa de 10 mg/kg como una función de concentración de suero ($\mu\text{g/ml}$) en función del tiempo (días).

La Figura 5B es una tabla que muestra los valores de depuración calculados para cada anticuerpo evaluado en los experimentos de depuración farmacocinética en la Figura 5A.

La Figura 5C es una gráfica que muestra la depuración farmacocinética de anticuerpos anti-TIGIT h10A7.K4G3 y 4.1D3 en cyno luego de la administración intravenosa de 10 mg/kg como una función de concentración de suero ($\mu\text{g/ml}$) en función del tiempo (días; d0-d7).

La Figura 5D es una tabla que muestra los valores de depuración calculados para los anticuerpos anti-TIGIT h10A7.K4G3 y 4.1D3 evaluados en los experimentos de depuración farmacocinética en la Figura 5C.

La Figura 6A es una representación de la estructura de cristal del 4.1D3 Fab unido a TIGIT humano, con las regiones 4.1D3 de cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) indicadas y distinguidas por color.

La Figura 6B es una representación de la estructura de cristal del

4.1D3 Fab unido a TIGIT humano, superimpuesto con la estructura PVR-TIGIT conocida (PDB 3UDW), que muestra que el anticuerpo 4.1D3 y PVR tienen sitios de unión que se superponen para TIGIT.

- 5 La Figura 6C es una representación de la estructura de cristal del 4.1D3 Fab unido a TIGIT humano, con la ubicación relativa del sitio de unión de PVR indicado. También se indicó la ubicación relativa del bucle 72-79 de TIGIT.
- 10 Las Figuras 6D y 6E son representaciones de la estructura de cristal del 4.1D3 Fab unido a TIGIT humano de diferentes vistas, que identifican determinados residuos de contacto de 4.1D3 (residuos paratopos) y TIGIT (residuos epítopos). Los residuos empacados indicados en la Figura 6E fueron identificados como residuos
- 15 epitópicos funcionalmente importantes por mutagénesis de barrido de alanina.

- La Figura 7A es una gráfica que muestra los valores K_D (nM) para cada uno de los anticuerpos anti-TIGIT identificados para el mutante de
- 20 barrido de alanina de TIGIT humano.

- La Figura 7B es una gráfica que muestra los valores K_D (nM) para cada uno de los anticuerpos anti-TIGIT identificados para el mutante de barrido de alanina de TIGIT humano, normalizado contra el objetivo
- 25 TIGIT humano de tipo salvaje. Los mutantes de barrido de alanina de TIGIT que tuvieron como resultado una disminución de 1 a 10 veces o mayor que 10 veces en afinidad de unión están indicados por sombreado gris claro y gris oscuro, respectivamente.

- 30 La Figura 7C es una cinta que representa la estructura TIGIT humana con residuos identificados como importantes para el reconocimiento de 10A7 mediante mutagénesis de barrido de alanina indicado y

representado como esferas.

La Figura 7D es una cinta que representa la estructura TIGIT humana con residuos identificados como importantes para el reconocimiento de h1A5 mediante mutagénesis de barrido de alanina indicado y representado como esferas.

La Figura 7E es una cinta que representa la estructura TIGIT humana con residuos identificados como importantes para el reconocimiento de 4.1D3 mediante mutagénesis de barrido de alanina indicado y representado como esferas.

La Figura 7F es una cinta que representa la estructura TIGIT humana con residuos identificados como importantes para el reconocimiento de 7.4A3 mediante mutagénesis de barrido de alanina indicado y representado como esferas.

La Figura 7G es una cinta que representa la estructura TIGIT humana con residuos identificados como importantes para el reconocimiento de 4.1A4 mediante mutagénesis de barrido de alanina indicado y representado como esferas.

La Figura 7H es una cinta que representa la estructura TIGIT humana con residuos identificados como importantes para el reconocimiento de h6B2 mediante mutagénesis de barrido de alanina indicado y representado como esferas.

La Figura 7I es una cinta que representa la estructura TIGIT humana con residuos identificados como importantes para el reconocimiento de h7E7 mediante mutagénesis de barrido de alanina indicado y representado como esferas.

La Figura 8 es una representación de la estructura de cristal del 1A5 Fab unido a TIGIT humano, con las regiones 1A5 de cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) indicadas y distinguidas por color.

- 5 La Figura 9 es una representación de las estructuras de cristal de los complejos 4.1D3-TIGIT, 1A5-TIGIT y 10A7-TIGIT, superimpuestos unos sobre los otros con respecto a TIGIT, mostrando que los tres anticuerpos anti-TIGIT se unen a TIGIT humano en epítomos no idénticos.

10

La Figura 10A es una representación de la estructura de cristal del 10A7 Fab unido a TIGIT humano, con las regiones 10A7 de cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) indicadas y distinguidas por color.

- 15 La Figura 10B es una representación de la estructura de cristal del 10A7 Fab unido a TIGIT humano, con la ubicación relativa del sitio de unión de PVR indicado. También se indicó la ubicación relativa del bucle 72-79 de TIGIT.

- 20 La Figura 11 es una serie de representaciones de los anticuerpos 4.1D3 (lado izquierdo superior), 10A7 (medio al centro), y 1A5 (lado derecho inferior) y la ubicación relativa de los residuos Ser78, Ser80 y Lys82 de TIGIT humano. Las estructuras indican que los residuos Ser78, Ser80 y Lys82 de TIGIT humano son residuos epitópicos clave para 4.1D3, pero
- 25 no para 10A7 o 1A5, donde estos tres residuos están ubicados a una distancia más alejada del sitio de unión al anticuerpo.

- La Figura 12 es una serie de gráficas que muestran expresión de CD45, PD-1, TIGIT y CD226 en linfocitos T CD4+ y CD8+ aislados de la médula
- 30 ósea de pacientes con mieloma múltiple (MM) (fila superior) y expresión de PD-1, TIGIT y CD226 en linfocitos T CD4+ y CD8+ aislados de la sangre periférica de pacientes sanos (fila inferior), evaluado

por citometría de flujo multicolor.

La Figura 13 es una serie de gráficas de citometría de flujo (izquierda) y gráficas que acompañan (derecha) que muestran que TIGIT y PD-1 están coexpresadas en linfocitos T CD4+ y CD8+ en la médula ósea de pacientes con MM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 I. Técnicas generales

Las técnicas y los procedimientos descritos o indicados en la presente son entendidos y utilizados comúnmente en general por parte de los expertos en la técnica mediante el uso de metodología convencional, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente usadas descritas en Sambrook et ál., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3.^a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et ál. eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual* y *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et ál., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et

ál., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et ál., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

II. Definiciones

Las expresiones "TIGIT" o "inmunoreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM", tal como se usan en la presente, hacen referencia a cualquier TIGIT natural de cualquier fuente vertebrada, lo que incluye mamíferos como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo ratas y ratones), a menos que se especifique de otro modo. TIGIT también se conoce en la técnica como DKFZp667A205, FLJ39873, proteína 9 que contiene dominio inmunoglobulina y V-set, proteína 3 que contiene dominio transmembrana y V-set, VSIG9, VSTM3, y WUCAM. El término abarca TIGIT sin procesar de "longitud completa" (por ejemplo, TIGIT humano de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 352), así como cualquier forma de TIGIT que es resultado del procesamiento en la célula (por ejemplo, TIGIT humano procesado sin una secuencia señal, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 353). El término también comprende las variantes de TIGIT de fuente natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un TIGIT humano de ejemplo se puede encontrar con el número de registro UniProt Q495A1.

Los términos "anticuerpo anti-TIGIT" y "un anticuerpo que se une específicamente a TIGIT" se refieren a un anticuerpo que puede unirse a TIGIT con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a TIGIT. En una modalidad, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-TIGIT a una proteína no-TIGIT no relacionada es menor que alrededor de 10% de la unión del anticuerpo a TIGIT tal como se calculó, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas modalidades, un anticuerpo que se une a TIGIT tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0.1\text{ nM}$, $\leq 0.01\text{ nM}$, o $\leq 0.001\text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, desde 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, desde 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas modalidades, un anticuerpo anti-TIGIT se une a un epítipo de TIGIT que se conserva entre TIGIT de diferentes especies o un epítipo en TIGIT que permite la reactividad de especies cruzadas, tal como un epítipo que comprende residuos de aminoácidos Ser78, Ser80, y Lys82.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas de cadena simple, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')_2 , y Fv). En la presente, el término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza de forma intercambiable con "anticuerpo".

El término "aislado" cuando se usa para describir los diversos anticuerpos descritos en la presente, significa un anticuerpo identificado y separado y/o recuperado de una célula o un cultivo celular del cual se expresó. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que generalmente interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del polipéptido y pueden incluir

enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas modalidades, un anticuerpo se purifica hasta más del 95 % o el 99 % de pureza como se determina, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF, por sus siglas en inglés), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para acceder a una reseña de los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman et ál., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007). En modalidades preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta un grado suficiente que permita obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos interna o de extremo N mediante el uso de un secuenciador de vaso giratorio o (2) hasta lograr homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción o no, utilizando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye anticuerpos *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido o está presente. No obstante, generalmente el polipéptido aislado se prepara mediante al menos una etapa de purificación.

La unidad básica de anticuerpos de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y contiene 10 sitios de unión al antígeno, al tiempo que los anticuerpos IgA comprenden de 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas que se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de alrededor de 150,000 daltons. Cada cadena L está enlazada a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están enlazadas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes de

disulfuro intracatenarios separados en intervalos regulares. Cada cadena H tiene un dominio variable (V_H) en el extremo N seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ , y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene un dominio variable (V_L) en el extremo N seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que residuos aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El apareamiento de un V_H con un V_L forma un sitio de unión al antígeno simple. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos véase, por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 8ª Edición, Daniel P. Sites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6. La cadena L de cualquier especie de vertebrados puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, según las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Es posible asignar las inmunoglobulinas a clases o isotipos diferentes en función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H). Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, con cadenas pesadas denominadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases en función de diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H , por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo hace referencia a los dominios de extremo amino de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera pueden designarse como " V_H " y " V_L ", respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (con respecto a los otros anticuerpos de la misma clase) y

contienen los sitios de unión al antígeno.

El término "variable" hace referencia a que determinados segmentos de los dominios variables difieren en gran medida en secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. No obstante, la variabilidad no se distribuye de forma uniforme en toda la extensión de los dominios variables. En su lugar, se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR, por su sigla en inglés) tanto en los dominios variables de cadena ligera como en los de cadena pesada. Las partes mejor conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada uno de los dominios variables de cadenas pesada y ligera naturales comprende cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. Las regiones FR mantienen las HVR en cada cadena en su posición y próximas, y contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos junto con las HVR de la otra cadena (vea Kabat et ál., *Sequences of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tal como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Un "anticuerpo de bloqueo" o un "anticuerpo antagonista" es uno que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno que une. En algunas modalidades, los anticuerpos bloqueadores o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Los anticuerpos anti-TIGIT de la invención pueden bloquear la señalización a través de PVR, PVRL2, y/o PVRL3 de forma

tal que restauran una respuesta funcional por parte de los linfocitos T (por ejemplo, proliferación, producción de citosina, destrucción de células objetivo) de un estado disfuncional a una estimulación del antígeno.

5

Un "anticuerpo agonista" o "anticuerpo de activación" es uno que potencia o inicia la señalización mediante el antígeno al que se une. En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas provocan o activan la señalización sin la presencia del ligando natural. Los anticuerpos agonistas OX40 de la invención pueden aumentar la proliferación de linfocitos T de memoria, aumentar la producción de citocina mediante linfocitos T de memoria, inhibir la función celular Treg y/o inhibir la supresión celular de Treg de la función de linfocitos T efectores, tal como la proliferación de linfocitos T efectores y/o producción de citocina.

10

15

Un "epítopo" es la parte del antígeno al cual el anticuerpo se une específicamente. Para un antígeno de polipéptido, el epítopo es generalmente una parte de péptido de alrededor de 4-15 residuos de aminoácidos, que pueden ser contiguos o no contiguos.

20

Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" como un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más, y en cambio, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más. En la presente se proporciona un ejemplo de ensayo de competición.

25

Por "paratopo" se entiende la parte de un anticuerpo que se une de forma selectiva al epítopo de un antígeno. El paratopo típicamente incluye aminoácidos de las cadenas VH y VL del anticuerpo y, en particular, de la región de HVR del anticuerpo.

30

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en la presente, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones postransduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un único sitio antigénico. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que comúnmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque los sintetiza el cultivo de hibridomas y no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos considerablemente homogénea y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo a través de ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas que incluyen, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et ál., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling et ál. en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinantes (vea, por ejemplo, patente estadounidense n.º 4 816 567), tecnologías de expresión en fagos (vea, por ejemplo, Clackson et ál., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et ál., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et ál., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et ál., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et ál., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a los humanos en animales que tienen una parte o la totalidad de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican las secuencias de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et ál., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et ál., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); patente estadounidense n.º 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016; Marks et ál., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et ál., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et ál., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

La expresión "anticuerpo no conjugado" hace referencia a un anticuerpo que no se encuentra conjugado a un resto citotóxico o un radiomarcador.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completo" se utilizan de forma intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, a diferencia de un fragmento de anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadena pesada y ligera que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de una secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de una secuencia de nativa humana) o una variantes de secuencia de aminoácidos de estos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo

intacto, preferentemente, la región variable y/o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales (vea la patente estadounidense 5 641 870, Ejemplo 2; Zapata et ál., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de los anticuerpos produjo dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, cuya designación refleja la capacidad de cristalizarse fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a antígeno. El tratamiento de un anticuerpo con pepsina produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab con enlaces disulfuro con diferente actividad de unión al antígeno y que mantiene la capacidad de reticulación de antígenos. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab en que tienen algunos residuos adicionales en el extremo C del dominio C_{H1} que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se utiliza en la presente para Fab', en el cual el o los residuos de cisteína de los dominios constantes contienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las partes de extremo carboxi de ambas cadenas H que se mantienen juntas mediante disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante las secuencias en la región Fc, la región que también es reconocida por los receptores

de Fc (FcR) que se encuentran en determinados tipos de células.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión al antígeno. Este
5 fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación fuerte, no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que contribuyen los residuos aminoácidos para la unión al antígeno y otorgan especificidad de unión
10 al antígeno al anticuerpo. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor a todo el lugar de unión.

15 “Fv de cadena simple”, abreviado también como “sFv” o “scFv”, son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido sFv también comprende un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada
20 para unión al antígeno. Vea una reseña sobre sFv de Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tomo 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

Los “fragmentos funcionales” de los anticuerpos de la invención
25 comprenden una parte de un anticuerpo intacto que generalmente incluye la unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que retiene la capacidad de unión a FcR o tiene una capacidad modificada. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de
30 cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "diacuerpos" hace referencia a fragmentos de anticuerpos pequeños preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (vea el párrafo anterior) con enlazadores cortos (alrededor de 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L , de forma que se logre apareamiento entre cadenas y no dentro de la cadena de los dominios V, lo que resulta en un fragmento bivalente, es decir, un fragmento con dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "de cruzamiento" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos se encuentran presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen de forma más detallada, por ejemplo, en EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen, de específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las cadenas son idénticas u homólogas a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente estadounidense n.º 4 816 567, Morrison et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos PRIMATIZED® cuya región de unión al antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, mediante la inmunización de monos macacos con un antígeno de interés. Tal como se utiliza en la presente, un "anticuerpo humanizado" se utiliza como un subconjunto de "anticuerpos quiméricos".

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo,

murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una modalidad, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la cual los residuos de una HVR (definida en la presente más adelante) del receptor se remplazan con residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano, que tiene la especificidad, la afinidad y/o la capacidad deseada. En algunos casos, los residuos marco ("FR") de inmunoglobulina humana se remplazan con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el desempeño de los anticuerpos, tal como afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos de los bucles hipervariables corresponden a los de una secuencia de inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones de FR pueden incluir una o más sustituciones de residuo de FR individuales que mejoren el rendimiento del anticuerpo, tal como afinidad de unión, isomerización, inmunogenicidad, etc. La cantidad de dichas sustituciones de aminoácidos en la FR no suele ser mayor de 6 en la cadena H y no suele ser mayor de 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado también comprenderá, opcionalmente, al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Vea más detalles, por ejemplo, Jones et ál., *Nature* 321:522-525 (1986), Riechmann et ál., *Nature* 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Ver también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) y la patente

estadounidense n.º 6 982 321 y 7 087 409.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha producido mediante cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos, tal como se describe en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante varias técnicas conocidas en la técnica, lo que incluye genotecas de expresión en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et ál., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También se encuentran disponibles métodos para preparar anticuerpos monoclonales humanos descritos en Cole et ál., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et ál., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Ver también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Es posible preparar los anticuerpos humanos mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a una exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos fueron desactivados, por ejemplo, xenorratones inmunizados (vea, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6 075 181 y 6 150 584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Vea también, por ejemplo, Li et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) respecto a los anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

Las expresiones "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usan en la presente, hacen referencia a las regiones de dominio variable de un anticuerpo que son hipervariables en cuanto a secuencia y/o que forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en

la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 expresan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular juega un rol extraordinario al conferir una buena especificidad a los anticuerpos. Veá, por ejemplo, Xu et ál., *Immunity* 13:37-45 (2000);
 5 Johnson y Wu en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos camélidos de origen natural que consisten únicamente en una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Veá, por ejemplo, Hamers-Casterman et ál., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff
 10 et ál., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Se utiliza una cantidad de descripciones de HVR y se encuentran comprendidas en la presente. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de
 15 secuencia y son las más comúnmente utilizadas (Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Servicio de Salud Pública, Institutos nacionales de la salud, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en vez a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM
 20 representan un punto intermedio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan en el software de realización de modelos de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se describen a
 25 continuación.

Bucle Kabat AbM Chothia Contacto

L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55

30

L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeración Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

10

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas", tal como sigue a continuación: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. Los residuos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat et ál., *supra*, para cada una de dichas definiciones.

15

Las expresiones "numeración de residuo de dominio variable según Kabat" o "numeración de posición de aminoácido según Kabat", y variaciones de estas, hacen referencia al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et ál., *supra*. Al usar este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento o una inserción de una FR o una HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir la inserción de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) luego del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) luego del residuo FR de cadena pesada 82. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con

20

25

30

una secuencia de numeración de Kabat "estándar".

Los residuos de "marco" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable que no son residuos de HVR tal como se definen en la presente.

Un "marco de consenso humano" o "marco humano aceptor" es un marco que representa los residuos aminoácidos más comunes en una selección de secuencias marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Los ejemplos para VL incluyen que el subgrupo puede ser un subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV según Kabat et ál., *supra*. Adicionalmente, en el caso de VH, el subgrupo puede ser subgrupo I, subgrupo II o subgrupo III de acuerdo con Kabat et ál., *supra*. De forma alternativa, se puede derivar de lo anterior un marco de consenso humano con residuos particulares, tales como cuando se selecciona un residuo de marco humano con base en su homología al marco donante mediante la alineación de la secuencia de marco donante con una variedad de diversas secuencias marco humanas. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de este, o puede contener cambios en secuencias de aminoácidos preexistentes. En algunas modalidades, la cantidad de cambios de aminoácidos preexistentes es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos.

Un "marco de consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo

III variable pesado de Kabat et ál. Supra. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos del marco de consenso de subgrupo III de VH comprende cada una de las siguientes secuencias en su totalidad o al menos en parte: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (HC-FR1) (SEQ ID NO: 229);

5 WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2) (SEQ ID NO: 230);

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3) (SEQ ID NO: 232); y

WGQGTLLVTVSA (HC-FR4) (SEQ ID NO: 232).

Un "marco de consenso kappa I de VL" comprende la secuencia de

10 consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I variable ligero de Kabat et ál. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos del marco de consenso del subgrupo I de VH comprende cada una de las siguientes secuencias en su totalidad o al menos en parte:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (LC-FR1) (SEQ ID NO: 233); WYQQKPGKAPKLLIY

15 (LC-FR2) (SEQ ID NO: 234); GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (LC-FR3) (SEQ ID NO: 235); y FGQGTKVEIKR (LC-FR4) (SEQ ID NO: 236).

"Una modificación de aminoácido" en una posición especificada, por ejemplo, de la región Fc, hace referencia a la sustitución o

20 eliminación del residuo especificado o la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. La inserción "adyacente" a un residuo especificado significa inserción a uno a dos residuos de este. La inserción puede ser hacia el extremo N o el extremo C con respecto al residuo especificado. La modificación de

25 aminoácido preferida en la presente es una sustitución.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por

30 ejemplo, un antígeno, por ejemplo, TIGIT). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en la presente, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1

entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X respecto a su compañera Y puede estar representada generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede calcularse usando métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en la presente. A continuación se describen modalidades específicas ilustrativas y de ejemplo para medir la afinidad de unión.

Un "anticuerpo madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más de sus HVR que resulta en una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno en comparación con un anticuerpo original que carece de dichas alteraciones. En una modalidad, el anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades de nivel nanomolar o incluso picomolar por el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et ál., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante transposiciones de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de marco y/o HVR se describe, por ejemplo, en: Barbas et ál. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et ál. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et ál. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et ál., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et ál, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Tal como se usan en la presente, las expresiones "se une", "se une de manera específica" o es "específico/a para" hacen referencia a interacciones que se pueden medir y reproducir, tales como la unión entre un objetivo y un anticuerpo, lo cual determina la presencia del objetivo en presencia de una población heterogénea de moléculas que incluye moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une en forma específica a un objetivo (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une dicho objetivo con mayor afinidad, avidez,

facilidad y/o durante más tiempo que a otros objetivos. En una modalidad, el grado de unión de un anticuerpo a un objetivo no relacionado es de menos de alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo al objetivo medido, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas modalidades, un anticuerpo que se une de manera específica a un objetivo tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0.1 \text{ nM}$. En determinadas modalidades, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo en una proteína que se conserva entre proteínas de diferentes especies. En otra modalidad, la unión específica puede incluir la unión exclusiva, aunque no necesariamente. El término tal como se utiliza en la presente se puede exhibir, por ejemplo, mediante una molécula que tiene una K_d para el objetivo de 10^{-4} M o menor, alternativamente 10^{-5} M o menor, alternativamente 10^{-6} M o menor, alternativamente 10^{-7} M o menor, alternativamente 10^{-8} M o menor, alternativamente 10^{-9} M o menor, alternativamente 10^{-10} M o menor, alternativamente 10^{-11} M o menor, alternativamente 10^{-12} M o menor o una K_d en el intervalo de 10^{-4} M a 10^{-6} M o 10^{-6} M a 10^{-10} M o 10^{-7} M a 10^{-9} M . Tal como lo apreciarán los expertos en la técnica, los valores de K_d y afinidad están relacionados a la inversa. Una gran afinidad con respecto a un antígeno se mide mediante un valor de K_d bajo. En una modalidad, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo del polipéptido.

Tal como se usa en la presente, el término "inmuno adhesina" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que no es el reconocimiento y

sitio de unión al antígeno de un anticuerpo (es decir, "heterólogo") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina normalmente es una secuencia de aminoácido contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse de cualquiera inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2 (que incluye IgG2A e IgG2B), IgG-3, o IgG-4, IgA (que incluye IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen, preferentemente, la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en la presente en el lugar de al menos una región variable dentro de una molécula Ig. En una modalidad particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra CH2 y CH3 o bisagra CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Vea también información sobre la producción de fusiones de inmunoglobulina en la patente estadounidense n.º 5 428 130 expedida el 27 de junio de 1995. Por ejemplo, las inmuno adhesinas útiles para la terapia de combinación en la presente incluyen polipéptidos que comprenden las partes de unión extracelular o a OX40 de OX40L o las partes de unión extracelular o a OX40L de OX40, fusionadas a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina, tal como OX40 ECD - Fc, o un OX40L ECD - Fc. Las combinaciones de inmuno adhesina de Fc de Ig y ECD de receptores de la superficie celular son, en ocasiones, denominadas receptores solubles.

Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" hacen referencia a un polipéptido que tiene dos partes unidas entre sí de forma covalente, donde cada una de las partes es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como la actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una propiedad química o física simple, tal como unión a una molécula objetivo, catálisis de una reacción, etc. Las dos partes pueden unirse directamente mediante una unión de péptidos

simple o a través de un enlazador peptídico, pero se encuentra en un marco de lectura una con respecto a la otra.

La expresión "región Fc" se utiliza en la presente para definir una
5 región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que
incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. A
pesar de que los límites de la región Fc de una cadena pesada de
inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada IgG
humana se define generalmente como que se extiende desde un residuo
10 aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo
de esta. Es posible eliminar la lisina del extremo C (residuo 447
conforme al sistema de numeración EU) de la región Fc, por ejemplo,
durante la producción o purificación del anticuerpo o mediante la
modificación recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena
15 pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de
anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con
todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin
residuos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tienen una
mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones de Fc de
20 la secuencia natural para utilizar en los anticuerpos de la invención
incluyen IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 humana.

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región
Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia
25 natural. Además, un FcR preferido es uno que une un anticuerpo IgG (un
receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y
FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas empalmadas, de forma
alternativa, de estos receptores, receptores FcγRII incluyen FcγRIIA
(un receptor de activación) y FcγRIIB (un receptor de inhibición), que
30 tiene secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente
en los dominios citoplasmáticos de estos. El receptor de activación
FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptores con base

en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en el inmunoreceptor tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico. (ver M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). Los FcR se analizan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel et ál., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas et ál., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluidos los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en la presente.

- 10 Las "células efectoras humanas" hacen referencia a leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En determinadas modalidades, las células expresan al menos FcγRIII y realizan una o más funciones efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica
- 15 (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de un origen natural, por ejemplo, de la sangre.

- "Funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a Clq y citotoxicidad dependiente de complementos (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés);
- 25 fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de las células B); y activación de las células B.

- Las expresiones "sustancialmente reducido" o "sustancialmente diferente", tal como se utilizan en la presente, indican un grado
- 30 suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (en

general, uno asociado con una molécula y el otro, con una molécula de comparación o referencia) de forma tal que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre ambos valores es estadísticamente significativa en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre estos dos valores es, por ejemplo, mayor de alrededor de 10 %, mayor de alrededor de 20 %, mayor de alrededor de 30 %, mayor de alrededor de 40 % y/o mayor de alrededor de 50 % en función del valor de la molécula de referencia o comparación.

10

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", tal como se usa en la presente, indica un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de forma que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores tendría poca o ninguna importancia estadística y/o biológica en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre estos dos valores es, por ejemplo, menor de alrededor de 50 %, menor de alrededor de 40 %, menor de alrededor de 30 %, menor de alrededor de 20 % y/o menor de alrededor de 10 % en función del valor de referencia o comparación.

20

El término "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza, parcial o totalmente, la actividad biológica de un polipéptido natural descrito en la presente. De manera similar, el término "agonista" se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido natural descrito en la presente. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de

25

30

polipéptidos naturales, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner un polipéptido en contacto con una molécula candidata agonista o antagonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido.

Tal como se usa en la presente, un "anticuerpo antagonista" de una molécula objetivo se refiere a un anticuerpo que interfiere con el funcionamiento normal de la molécula objetivo, ya sea al disminuir la transcripción o traducción del ácido nucleico codificado por la molécula objetivo, o al inhibir o bloquear la actividad de la molécula objetivo, o ambos. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista de TIGIT se puede considerar un anticuerpo o un fragmento de unión a anti-TIGIT de este, que interfiere con el funcionamiento normal de TIGIT, ya sea mediante la reducción de la transcripción o la traducción de un ácido nucleico que codifica TIGIT como mediante la inhibición o bloqueo de la actividad del polipéptido de TIGIT, o ambas. Un experto en la técnica comprenderá que, en algunos casos, un anticuerpo antagonista de TIGIT puede antagonizar una actividad de TIGIT sin afectar otra actividad de TIGIT. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista de TIGIT deseable para utilizar en determinados métodos de la presente es un anticuerpo antagonista de TIGIT que antagoniza la actividad de TIGIT en respuesta a una de interacción con PVR, interacción con PVRL3 o interacción con PVRL2, por ejemplo, que no afecta cualquiera de las otras interacciones de TIGIT o lo hace en mínima medida.

Las expresiones "antagonista de TIGIT" y "antagonista de actividad de TIGIT o expresión de TIGIT" se utilizan de forma intercambiable y hacen referencia a un compuesto que interfiere con el funcionamiento normal de TIGIT, ya sea mediante la reducción de la transcripción o la traducción de un ácido nucleico que codifica TIGIT como mediante la

inhibición o bloqueo de la actividad del polipéptido de TIGIT, o ambas. Ejemplos de antagonistas de TIGIT incluyen, de modo no taxativo, polinucleótidos antisentido, ARN interferente, ARN catalítico, quimeras de ARN y ADN, aptámeros específicos para TIGIT, anticuerpos anti-TIGIT, fragmentos de unión a TIGIT de anticuerpos anti-TIGIT, moléculas pequeñas de unión a TIGIT, péptidos de unión a TIGIT y otros polipéptidos que se unen específicamente a TIGIT (lo que incluye, de modo no taxativo, fragmentos de unión a TIGIT de uno o más ligandos de TIGIT, opcionalmente fusionados a uno o más dominios adicionales), de forma que la interacción entre el antagonista de TIGIT y TIGIT resulta en una reducción o cese de expresión o actividad de TIGIT. Un experto en la técnica comprenderá que, en algunos casos, un antagonista de TIGIT puede antagonizar una actividad de TIGIT sin afectar otra actividad de TIGIT. Por ejemplo, un antagonista de TIGIT deseable para utilizar en determinados de los métodos de la presente es un antagonista de TIGIT que antagoniza la actividad de TIGIT en respuesta a una de interacción con PVR, interacción con PVRL3 o interacción con PVRL2, por ejemplo, que no afecta cualquiera de las otras interacciones de TIGIT o lo hace en mínima medida.

20

Las expresiones "antagonista de PVR" y "antagonista de actividad de PVR o expresión de PVR" se utilizan de forma intercambiable y hacen referencia a un compuesto que interfiere con el funcionamiento normal de PVR, ya sea mediante la reducción de la transcripción o la traducción de un ácido nucleico que codifica PVR como mediante la inhibición o bloqueo de la actividad del polipéptido de PVR, o ambas. Ejemplos de antagonistas de PVR incluyen, de modo no taxativo, polinucleótidos antisentido, ARN interferente, ARN catalítico, quimeras de ARN y ADN, aptámeros específicos para PVR, anticuerpos anti-PVR, fragmentos de unión a PVR de anticuerpos anti-PVR, moléculas pequeñas de unión a PVR, péptidos de unión a PVR y otros polipéptidos que se unen específicamente a PVR (lo que incluye, de modo no

25

30

taxativo, fragmentos de unión a PVR de uno o más ligandos de PVR, opcionalmente fusionados a uno o más dominios adicionales), de forma que la interacción entre el antagonista de PVR y PVR resulta en una reducción o cese de expresión o actividad de PVR. Un experto en la técnica comprenderá que, en algunos casos, un antagonista de PVR puede antagonizar una actividad de PVR sin afectar otra actividad de PVR. Por ejemplo, un antagonista de PVR deseable para utilizar en determinados de los métodos de la presente es un antagonista de PVR que antagoniza la actividad de PVR en respuesta a la interacción de TIGIT sin impactar las interacciones de PVR-CD96 y/o PVR-CD226

El término "antagonista de unión al eje PD-1" se refiere a una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión al eje PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión para retirar la disfunción de células T que resulta de la señalización en el eje de señalización de PD-1, con el resultado de la restauración o potenciación de la función de las células T (por ejemplo, proliferación, producción de citocinas, destrucción de células objetivo). Tal como se usa en la presente, un antagonista de la unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

El término "antagonista de unión a PD-1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales que resultan de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, como PD-L1, PD-L2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, fragmentos de unión al antígeno de estos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen,

bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal que es el resultado de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En una modalidad, un antagonista de unión a PD-1 reduce la señal de estimulación conjunta negativa mediada por proteínas de la superficie celular o a través de estas, expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, al mejorar las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab) descrito en la presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab) descrito en la presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab) descrito en la presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MEDI-0680 (AMP-514) descrito en la presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es el PDR001 que se describe en la presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es el REGN2810 que se describe en la presente. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es el BGB-108 que se describe en la presente.

La expresión "antagonista de unión a PD-L1" hace referencia a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales que surge de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunas modalidades, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión a antígenos de este, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con

la transducción de señal que es el resultado de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, como PD-1, B7-1. En una modalidad, un antagonista de unión de PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por proteínas de superficie celular o a través de estas, expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, mejorar las respuestas efectoras ante el reconocimiento de antígenos). En algunas modalidades, un antagonista de unión de PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70 descrito en la presente. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105 descrito en la presente. En aun otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A (atezolizumab) descrito en la presente. En aun otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 (durvalumab) descrito en la presente. En incluso otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es el YW243.55.S70 que se describe en la presente. En aun otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MSB0010718C (avelumab) descrito en la presente.

El término "antagonista de unión a PD-L2" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales que resultan de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, como PD-1. En algunas modalidades, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión de PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunas modalidades, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos de unión al anticuerpo de este, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señal lo que tiene como resultado la interacción de

- PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1. En una modalidad, un antagonista de unión a PD-L2 reduce la señal de estimulación conjunta negativa mediada a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciar las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunas modalidades, un antagonista de unión de PD-L2 es una inmunoadhesina.
- El término "OX40", tal como se usa en la presente, hace referencia a cualquier OX40 natural de cualquier origen vertebrado, incluidos los mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término comprende OX40 "de longitud completa" sin procesar, así como cualquier forma de OX40 que resulte del procesamiento en la célula. El término también comprende las variantes de OX40 de fuente natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de OX40 humano se establece en la SEQ ID NO: 354.
- La "activación de OX40" hace referencia a la activación del receptor OX40. En términos generales, la activación de OX40 produce transducción de señal.
- El término "aptámero" hace referencia a una molécula de ácido nucleico que es capaz de unirse a una molécula objetivo, tal como un polipéptido. Por ejemplo, un aptámero de la invención puede unirse específicamente a un polipéptido de TIGIT o a una molécula en una vía de señalización que modula la expresión o actividad de TIGIT. La generación y uso terapéutico de aptámeros se establecen satisfactoriamente en la técnica. Véanse por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5 475 096 y la eficacia terapéutica de MACUGEN®

(Eyetechn, Nueva York) para el tratamiento de degeneración macular vinculada a la edad.

5 El término "disfunción", en el contexto de una disfunción inmunitaria, hace referencia a un estado de menor capacidad de respuesta inmunitaria a la estimulación antigénica.

10 El término "disfuncional", tal como se usa en la presente, también incluye la refracción o la falta de respuesta ante el reconocimiento de antígenos, específicamente, la capacidad afectada de traducir el reconocimiento de antígenos en funciones efectoras de linfocitos T en ubicaciones posteriores, tales como la proliferación, la producción de citocinas ((por ejemplo, interferón gamma) y/o la destrucción de células objetivoobjetivo.

15

La "citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC", por sus siglas en inglés, hace referencia a una forma de citotoxicidad en la cual la inmunoglobulina secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos NK, neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan de manera específica a una célula objetivo con el antígeno y, posteriormente, destruyan la célula diana con citotoxinas. Las principales células para mediar ADCC, linfocitos NK, solamente expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en las patentes estadounidenses n.º 5,500,362 o 5,821,337 o la patente estadounidense n.º 6,737,056 (Presta)- Las células efectoras útiles para tales

20

25

30

ensayos incluyen PBMC y linfocitos NK. De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, (por ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes *et ál.* *PNAS (EUA)* 95:652-656 (1998). En los

5 ejemplos en la presente se brinda un ejemplo de ensayo para evaluar la actividad de ADCC.

El término "anergia" hace referencia al estado de indiferencia a la estimulación de antígenos que resulta de señales incompletas o

10 insuficientes suministradas a través del receptor de linfocitos T (por ejemplo, aumento de Ca^{2+} intracelular en ausencia de activación por ras). La anergia de linfocitos T también puede ser consecuencia de la estimulación con antígenos en ausencia de coestimulación, lo que resulta en que la célula se vuelva refractaria a la posterior

15 activación por el antígeno, incluso en el contexto de la coestimulación. El estado de falta de respuesta puede ser anulado con frecuencia por la presencia de interleucina-2 (IL-2). Los linfocitos T anérgicos no se someten a una expansión clonal y/o adquieren funciones efectoras.

20 "Potenciar la función de los linfocitos T" significa inducir, provocar o estimular que un linfocito T efector o de memoria tenga una función biológica renovada, sostenida o amplificada. Los ejemplos de mejora de las funciones de linfocitos T incluyen: una mayor secreción de

25 interferón γ y por parte de los linfocitos T efectores CD8^+ , una mayor secreción de interferón γ y por parte de los linfocitos T efectores y/o de memoria CD4^+ , una mayor proliferación de linfocitos T efectores y/o de memoria CD4^+ , una mayor proliferación de linfocitos T efectores CD8^+ , una mayor capacidad de respuesta a antígenos (por ejemplo,

30 eliminación), con respecto a los niveles anteriores a la intervención. En una modalidad, el nivel de mejora es de al menos 50 %, de manera alternativa, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 % o 200 %. Un

experto en la técnica conoce la manera de medir dicha mejora.

El término "agotamiento" hace referencia al agotamiento de linfocitos T como un estado de disfunción de los linfocitos T que surge a partir de la señalización de TCR sostenida que se produce durante muchas infecciones crónicas y el cáncer. Se diferencia de la anergia en que no surge a través de una señalización deficiente o incompleta, sino a partir de una señalización sostenida. Es definido por una función efectora débil, una expresión sostenida de receptores inhibidores y un estado de transcripción diferente de aquel de los linfocitos T de memoria o efectores funcionales. El agotamiento previene el control óptimo de infecciones y tumores. El agotamiento puede ser el resultado tanto de vías reguladoras negativas extrínsecas (por ejemplo, citocinas inmunorreguladoras) como de vías celulares reguladoras (coestimuladoras) negativas intrínsecas (PD-1, B7-H3, B7-H4, etc.).

La "mejora de la función de linfocitos T" significa que induce, causa o estimula un linfocito T para que presente una función biológica amplificada o sostenida, o renueva o reactiva linfocitos T agotados o inactivos. Los ejemplos de mejora de la función de linfocitos T incluyen: aumento de secreción de γ -interferón de linfocitos T CD8⁺, aumento de proliferación, aumento de capacidad de respuesta del antígeno (por ejemplo, viral, patógena o eliminación de tumores) con respecto a dichos niveles antes de la intervención. En una modalidad, el nivel de mejora es de al menos 50 %, alternativamente, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 %, 200 %. Un experto en la técnica conoce la manera de medir dicha mejora.

Un "trastorno disfuncional de linfocitos T" es un trastorno o una afección de linfocitos T caracterizados por la reducción de la capacidad de respuesta a la estimulación antigénica. En una modalidad particular, un trastorno disfuncional de linfocitos T es un trastorno

que se encuentra específicamente asociado con señalización disminuida inadecuada a través de OX40 y/o OX40L. En otra modalidad, un trastorno disfuncional de linfocitos T es uno en el que los linfocitos T son anérgicos o tienen una capacidad reducida de secreción de citocinas, proliferación o cumplimiento con la actividad citolítica. En un aspecto específico, la reducción de la capacidad de respuesta resulta en el control ineficaz de un patógeno o un tumor que expresa un inmunógeno. Los ejemplos de trastornos disfuncionales de linfocitos T caracterizados por una disfunción de los linfocitos T incluyen infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

"Inmunidad tumoral" hace referencia al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento inmunitario y la eliminación. Por lo tanto, como concepto terapéutico, la inmunidad tumoral es "tratada" cuando dicha evasión es atenuada y los tumores son reconocidos y atacados por el sistema inmunitario. Los ejemplos de reconocimiento tumoral incluyen la unión a tumores, la reducción de tumores y la eliminación de tumores.

"Inmunogenicidad" hace referencia a la capacidad de una sustancia particular de provocar una respuesta inmunitaria. Los tumores son inmunogénicos y la mejora de la inmunogenicidad tumoral ayuda a que la respuesta inmunitaria elimine las células tumorales. Ejemplos para aumentar la inmunogenicidad de tumor incluyen, de modo no taxativo, el tratamiento con un agonista de unión OX40 (por ejemplo, anticuerpos agonistas anti-OX40) y un inhibidor TIGIT (por ejemplo, anticuerpos de bloqueo anti-TIGIT).

"Respuesta sostenida" hace referencia al efecto sostenido en la reducción del crecimiento tumoral luego de interrumpirse un tratamiento. Por ejemplo, el tamaño del tumor puede seguir siendo el mismo o más pequeño en comparación con el tamaño al principio de la

fase de administración. En algunas modalidades, la respuesta sostenida tiene una duración al menos igual a la duración del tratamiento, al menos 1,5 veces, 2,0 veces, 2,5 veces o 3,0 veces la extensión del tratamiento.

5

"Portadores", tal como se usa en la presente, incluye portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se exponen a estos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo un portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con pH amortiguado.

10

Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; polipéptido de peso molecular bajo (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como la polivinilpirrolidinona; aminoácidos tales como la glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares alcohólicos tales como el manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como el sodio y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

15

20

25

30

Un "prospecto" hace referencia a instrucciones incluidas en los empaques comerciales de los medicamentos que comúnmente contienen información sobre las indicaciones comúnmente incluidas en los empaques comerciales de los medicamentos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones, otros medicamentos a ser combinados con el producto empacado y/o advertencias relacionadas con el uso de dicho medicamento.

Tal como se usa en la presente, el término "tratamiento" hace referencia a una intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo o la célula que se está tratando durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la reducción de la tasa de evolución de la enfermedad, la mejora o mitigación del estado de la enfermedad y la remisión o el pronóstico mejorado. Por ejemplo, se considera que se "trata" a un individuo con éxito si se mitigan o eliminan uno o más síntomas asociados al cáncer que incluyen, de modo no taxativo, la reducción de la proliferación (o destrucción) de células cancerosas, la reducción de síntomas producidos por la enfermedad, la mejora de la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, la reducción de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, el retraso de la evolución de la enfermedad y/o la extensión de la supervivencia de los individuos.

Tal como usa en la presente, "el retraso de la evolución" de una enfermedad significa diferir, dificultar, enlentecer, demorar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (tal como cáncer). Esta demora puede tener extensiones de tiempo variables, dependiendo del historial de la enfermedad y/o el individuo en tratamiento. Como es evidente para el experto en la técnica, un retraso suficiente o considerable puede implicar efectivamente la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, se puede retrasar un cáncer en etapa avanzada, como el desarrollo de metástasis.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "reducir o inhibir la recidiva del cáncer" significa que se reduce o inhibe la recidiva del tumor o cáncer o la evolución del tumor o cáncer.

Tal como se utiliza en la presente, "cáncer" y "canceroso" describen o

hacen referencia a la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos, así como los tumores latentes o micrometastasis. Los ejemplos de cáncer incluyen, de modo taxativo, carcinoma, mieloma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de tales tipos de cáncer incluyen mieloma múltiple (MM), cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (que incluye cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (que incluye cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de linfocitos (que incluyen linfoma no Hodgkin (NHL) folicular/bajo grado; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de célula no escindida pequeña de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células de manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica, y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociado con facomatosis, edema (tal como aquel asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs.

30

El término "tumor" hace referencia a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y toda célula y

tejido precanceroso y canceroso. Los términos "cáncer", "canceroso" y "trastorno de proliferación celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes, tal como se indica en la presente.

5

Tal como se usa en la presente, "metástasis" significa la propagación del cáncer desde su sitio principal a otras partes del cuerpo. Las células cancerosas pueden separarse de un tumor primario, penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circular a través del torrente sanguíneo y crecer en un foco distante (metástasis) en tejidos normales en otro punto en el cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial sujeto a la separación de las células tumorales del tumor primario, a su desplazamiento a través del torrente sanguíneo y a su detención en un punto distante. En el nuevo punto, las células establecen un suministro sanguíneo y pueden crecer para formar una masa potencialmente letal. Tanto las vías moleculares estimuladoras como inhibitoras en la célula tumoral regulan este comportamiento y también resultan significativas las interacciones entre la célula tumoral y las células hospedadoras en el punto distante.

20

Una "cantidad eficaz" es al menos la concentración mínima necesaria para realizar una mejora o prevención medible de un trastorno particular. Una cantidad eficaz en la presente puede variar en función de factores como la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente, así como la capacidad del anticuerpo de producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz es también una cantidad en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento. Para el uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados como eliminación o reducción del riesgo, disminución de la gravedad o retraso del inicio de la enfermedad, incluidos síntomas

25

30

bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la enfermedad. Para el uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos como

5 la reducción de uno o más síntomas de la enfermedad, la mejora de la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, la disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, la mejora del efecto de otro medicamento tal como mediante la selección de objetivos, el retraso del avance de la enfermedad y/o la

10 prolongación de la supervivencia. En el caso de cáncer o de tumores, una cantidad eficaz del fármaco puede tener efecto de reducción de la cantidad de células cancerosas, reducción del tamaño tumoral, inhibición (es decir, enlentecer en cierta medida o, preferiblemente, detener) de la infiltración de células cancerosas en órganos

15 periféricos, inhibición (es decir, enlentecer en cierta medida o, preferiblemente, detener) metástasis tumorales, inhibición en cierta medida del crecimiento tumoral y/o alivio en cierta medida de uno o más de los síntomas asociados al trastorno. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones. A efectos de la

20 presente invención, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico de forma directa o indirecta. Tal como se comprende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no

25 en conjunto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, se puede considerar una "cantidad eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos y un único agente se puede considerar suministrado en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes adicionales, se puede lograr o se logra un

30 resultado deseable.

Tal como se utiliza en la presente, "en conjunción con" hace

referencia a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. En ese sentido, "en conjunción con" hace referencia a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

Tal como se usa en la presente, "sujeto" o "individuo" significa un mamífero, incluido, de modo no taxativo, un ser humano o un mamífero no humano, como un bobino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. En la presente, los pacientes también son sujetos.

Un "agente quimioterapéutico" incluye compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), disulfiram, galato de epigallocatequina, salinosporamida A, carfilzomib, 17-AAG (geldanamicina), radicicol, lactato deshidrogenasa A (LDH-A), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), sunitib (SUTENT®, Pfizer/Sugen), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), finasunato (VATALANIB®, Novartis), oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, Rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), Lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafamib (SCH 66336), sorafenib (NEXAVAR®, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, agentes de alquilación tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (específicamente, bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (lo cual incluye topotecán e irinotecán); briostatina; calistatina; CC-

1065 (lo cual incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente, criptoficina 1 y criptoficina 8); adrenocorticosteroides (que incluyen prednisona y prednisolona); acetato de ciproterona; 5 α -reductasas que incluyen finasterida y dutasterida); vorinostat, romidepsina, panobinostat, ácido valproico, mocetinostat dolastatina; aldesleucina, duocarmicina de talco (lo cual incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clomafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina γ 1I y caliqueamicina ω 1I (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 1994 33:183-186); dinemicina, que incluye dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® (doxorrubicina), morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato,

pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos
 5 tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; agentes antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno;
 10 edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido
 15 podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenas (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina;
 20 dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), ABRAXANE® (libre de Cremofor), formulaciones de nanopartículas de paclitaxel modificadas genéticamente con albúmina
 25 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y TAXOTERE® (docetaxel, doxetaxel; Sanofi-Aventis); clorambucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE®
 30 (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides

tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El agente quimioterapéutico también incluye (i) agentes anti hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM, por su sigla en inglés), incluidos, por ejemplo, tamoxifeno (incluido NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regulan la producción de estrógenos en las glándulas adrenales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; buserelina, tripterelina, acetato de medroxi progesterona, dietilestilbestrol, premarina, fluoximesterona, todo ácido transretionico, fenretinida, así como troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de proteína cinasa; (v) inhibidores de cinasa lipídica; (vi) oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (vii) ribozimas como inhibidores de la expresión del VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas como las vacunas para terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®.; PROLEUKIN® rIL-2; un inhibidor de topoisomerasa 1 como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH y (ix) sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El agente quimioterapéutico también incluye anticuerpos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG®, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa) y el conjugado de anticuerpo y fármaco, ozogamicina de gentuzumab (MYLOTARG®, Wyeth). Otros anticuerpos monoclonales humanizados con potencial terapéutico como agentes en combinación con los compuestos de la invención incluyen: apolizumab, aselizumab, 10 atlizumab, bapineuzumab, bivatuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gentuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, 15 matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resivizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, 20 tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, tucotuzumab celmoleucina, tucusituzumab, umavizumab, urtoxazumab, ustekinumab, visilizumab y la antiinterleucina 12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories) que es un anticuerpo de IgG1 λ de secuencia recombinante 25 exclusivamente humana y de longitud completa modificado genéticamente para reconocer la proteína p40 de interleucina 12.

Los agentes quimioterapéuticos también incluyen "inhibidores de EGFR", que hace referencia a compuestos que se unen o interactúan de otra 30 manera de forma directa con EGFR y previenen o reducen su actividad de señalización y, de manera alternativa, se indica como un "antagonista de EGFR". Los ejemplos de esos agentes incluyen anticuerpos y

moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (remitirse a la patente estadounidense n.º 4,943, 533, Mendelsohn et ál.) y

5 variantes de estos, como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reformado (H225) (remitirse a WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo completamente humano dirigido a EGFR (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante tipo II (patente estadounidense n.º 5,212,290); anticuerpos humanizados y

10 quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la patente estadounidense n.º 5,891,996 y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, como ABX-EGF o Panitumumab (remitirse a WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto et ál. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo de EGFR humanizado dirigido contra

15 EGFR que compite con el EGF y con TGF-alfa por la unión a EGFR (EMD/Merck); un anticuerpo de EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos completamente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6. 3 y E7.6. 3 y se describe en US 6,235,883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et ál., J.

20 Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, de manera de generar un inmunoconjugado (ver, por ejemplo, EP659,439A2, patente de Merck GmbH). Los antagonistas de EGFR incluyen moléculas pequeñas tales como los compuestos descritos en las patentes estadounidenses n.º: 5,616,582,

25 5,457,105, 5,475,001, 5,654,307, 5,679,683, 6,084,095, 6,265,410, 6,455,534, 6,521,620, 6,596,726, 6,713,484, 5,770,599, 6,140,332, 5,866,572, 6,399,602, 6,344,459, 6,602,863, 6,391,874, 6,344,455, 5,760,041, 6,002,008 y 5,747,498, así como las siguientes publicaciones PCT: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016 y WO99/24037.

30 Los antagonistas de EGFR de molécula pequeña específicos incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals);

PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butinamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Pfizer); AG1571 (SU 5271; Pfizer); inhibidores dobles de tirosina cinasa EGFR/HER2, como lapatinib (TYKERB®, GSK572016 o N-[3-cloro-4-[(3 fluorofenil)metoxi]fenil]-6[5[[[2metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina).

Los agentes quimioterapéuticos también incluyen "inhibidores de tirosina cinasa" que incluyen los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo precedente; inhibidor de tirosina cinasa HER2 de moléculas pequeñas, tal como TAK165, disponible en Takeda; CP-724,714, un inhibidor selectivo oral del receptor de tirosina cinasas de ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores dobles de HER, tal como EKB-569 (disponible en Wyeth) que en forma preferencial une a EGFR pero inhibe las células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR; lapatinib (GSK572016; disponible en Glaxo-SmithKline), un inhibidor de tirosina cinasas HER2 y EGFR oral; PKI-166 (disponible en Novartis); inhibidores de pan-HER, tal como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1, tal como el agente antisentido ISIS-5132 disponible en ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidas a HER, tal como mesilato de imatinib (GLEEVEC®, disponible en Glaxo SmithKline); inhibidores de tirosina

cinasas con múltiples objetivos, tal como sunitinib (SUTENT®, disponible en Pfizer); inhibidores del receptor de tirosina cinasas de VEGF, tal como vatalanib (PTK787/ZK222584, disponible en Novartis/Schering AG); inhibidor de cinasa I regulada extracelular de MAPK CI-1040 (disponible en Pharmacia); quinazolinas, tal como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidinas; curcumina (diferuloilmetano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos nitrotiofenos; PD-0183805 (Warner-Lambers); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen al ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente estadounidense n.º 5 804 396); trifostinas (patente estadounidense n.º 5 804 396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER, tal como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de imatinib (GLEEVEC®); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Pfizer); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®) o tal como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: patente estadounidense n.º 5,804,396; WO 1999/09016 (American Cyanamid); WO 1998/43960 (American Cyanamid); WO 1997/38983 (Warner Lambert); WO 1999/06378 (Warner Lambert); WO 1999/06396 (Warner Lambert); WO 1996/30347 (Pfizer, Inc); WO 1996/33978 (Zeneca); WO 1996/3397 (Zeneca) y WO 1996/33980 (Zeneca).

Los agentes terapéuticos también incluyen dexametasona, interferones, colchicina, metoprina, ciclosporina, anfotericina, metronidazol, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, amifostina, trióxido arsénico, asparaginasa, BCG vivo, bevacuzimab, bexaroteno, cladribina, clofarabina, darbepoyetina alfa, denileucina, dexrazoxano, epoyetina

- alfa, elotinib, filgrastim, acetato de histrelina, ibritumomab, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, lenalidomida, levamisol, mesna, metoxsaleno, nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvequina, palifermina, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim,
- 5 pemetrexed disódico, plicamicina, porfímero sódico, quinacrina, rasburicasa, sargramostim, temozolomida, VM-26, 6-TG, toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, zoledronato, y ácido zoledrónico y sales farmacéuticamente aceptables de estos.
- 10 Los agentes quimioterapéuticos también incluyen hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, acetato de cortisona, pivalato de tixocortol, acetónido de triamcinolona, alcohol de triamcinolona, mometasona, amcinonida, budesonida, desonida, fluocinonida, acetónido de fluocinolona, betametasona, fosfato sódico de betametasona,
- 15 dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, fluocortolona, hidrocortisona-17-butirato, hidrocortisona-17-valerato, dipropionato de aclometasona, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, prednicarbato, clobetasona-17-butirato, clobetasol-17-propionato, caproato de fluocortolona, pivalato de fluocortolona y
- 20 acetato de fluprednidenol; péptidos antiinflamatorios selectivos inmunitarios (AINEim) tales como fenilalanina-glutamina-glicina (FEG) y su forma D-isomérica (feG) (IMULAN BioTherapeutics, LLC); fármacos antirreumáticos tales como azatioprina, ciclosporina (ciclosporina A), D-penicilamina, sales de oro, hidroxiclороquina,
- 25 leflunomideminociclina, sulfasalazina, bloqueadores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) tales como etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade), adalimumab (Humira), certolizumab pegol (Cimzia), golimumab (Simponi), bloqueadores de Interleucina 1 (IL-1) tales como anakinra (Kineret), bloqueadores de la coestimulación de
- 30 linfocitos T tales como abatacept (Orencia), bloqueadores de Interleucina 6 (IL-6) tales como tocilizumab (ACTEMERA®); bloqueadores de Interleucina 13 (IL-13) tales como lebrikizumab; bloqueadores de

Interferón alfa (IFN) tales como rontalizumab; bloqueadores de integrina Beta 7 tales como rhuMAb Beta 7; bloqueadores de la vía de IgE tales como el cebador Anti-M1; bloqueadores de LTa3 homotrimérico secretado y LTa1/ β 2 heterotrimérico unido a la membrana tales como

5 Anti-linfotoxina alfa (LTa); isótopos radiactivos (por ejemplo, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radioactivos de Lu); diversos agentes de investigación tales como tioplatino, PS-341, fenilbutirato, ET-18-OCH₃ o inhibidores de la farnesil transferasa (L-739749, L-744832); polifenoles tales como

10 quercetina, resveratrol, piceatanol, galato de epigalocatequina, teaflavinas, flavanoles, procianidinas, ácido betulínico y derivados de estos; inhibidores de la autofagia, tales como cloroquina; delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); podofilotoxina; tegafur (UFTORAL®); bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); y receptor

20 del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R, por sus siglas en inglés); vacunas tales como la vacuna THERATOPE®; perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor del proteosoma (por ejemplo, PS341); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersén sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de la farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASARTM) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida,

25 doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovorina.

30

Los agentes quimioterapéuticos también incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos con efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios. Los AINE incluyen inhibidores no selectivos de la enzima ciclooxigenasa. Los ejemplos específicos de AINE incluyen aspirina, derivados de ácido propiónico, tales como ibuprofeno, fenoprofeno, quetoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina y naproxeno, derivados de ácido acético, tales como indometacina, sulindac, etodolac, diclofenac, derivados de ácido enólico, tales como piroxicam, meloxicam, tenoxicam, droxicam, lornoxicam e isoxicam, derivados de ácido fenámico, tales como ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido tolfenámico e inhibidores de COX-2, tales como celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib, rofecoxib, rofecoxib y valdecoxib. Los AINE pueden indicarse para el alivio sintomático de afecciones tales como artritis reumatoide, osteoartritis, artropatías inflamatorias, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, gota aguda, dismenorrea, dolor óseo metastásico, dolor de cabeza y migraña, dolor posoperatorio, dolor leve a moderado debido a inflamación y lesión tisular, pirexia, íleo y cólico renal.

Tal como se utiliza en la presente, el término "citocinas" hace referencia, de forma genérica, a proteínas liberadas por un grupo de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares o que tienen un efecto autócrino en las células que producen las proteínas. Los ejemplos de dichas citocinas incluyen linfocinas, monocinas; interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A-F, IL-18 a IL-29 (tal como IL-23), IL-31, lo que incluye PROLEUKIN® rIL-2; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β , TGF- β 1-3; y otros factores de polipéptidos que incluyen un factor de inhibición de leucemia (LIF, por sus siglas en inglés), factor

neurotrófico ciliar (CNTF, por sus siglas en inglés), citosina similar a CNTF (CLC, por sus siglas en inglés), cardiotrofina (CT, por sus siglas en inglés) y ligando kit (KL, por sus siglas en inglés).

- 5 Tal como se utiliza en la presente, el término "quimiocina" hace referencia a factores solubles (por ejemplo, citosinas) que tienen la capacidad de inducir selectivamente la quimiotaxis y la activación de leucocitos. También desencadenan procesos de angiogénesis, inflamación, curación de heridas y tumorigénesis. Los ejemplos de
- 10 quimiocinas incluyen IL-8, un homólogo humano de un quimioatrayente de queratinocito (KC, por sus siglas en inglés) murino.

- "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el
- 15 porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar cualquier
- 20 sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible al público, tal como el software BLAST, BLAST-
- 25 2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para alinear las secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, a los efectos de la presente, los valores del % de
- 30 identidad de secuencia de aminoácidos se generan mediante el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por

Genentech, Inc. y el código fuente se presentó con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde se encuentra registrada con el n.º de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa

5 ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, lo que incluye UNIX V4.0D digital. Todos los

10 parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra

15 una secuencia de aminoácidos B dada (que se puede expresar de manera alternativa como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como se indica a continuación:

20

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias

25 ALIGN-2 en la alineación de A y B de ese programa, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de

30 identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos que se usan en la presente se

obtienen tal como se describió en el párrafo inmediatamente anterior con el programa informático ALIGN-2.

5 La frase "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser química y/o toxicológicamente compatible con los otros ingredientes comprendidos en una formulación y/o el mamífero que se trata con estos.

10 Tal como se utiliza en la presente, "administrar" se refiere a un método para administrar una dosis de un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo anti-TIGIT de la invención o un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-TIGIT de la invención) o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-TIGIT de la invención) a
15 un sujeto. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en la presente se pueden administrar, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intravítrea (por ejemplo, mediante inyección intravítrea), por gotas para los ojos, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal,
20 intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intratecal, intranasal, intravaginal, intrarectal, tópica, intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravascular, mucosa, intrapericárdica, infraumbilical, intraocular, intraorbital, oral, tópica, transdérmica, por inhalación, por inyección, por
25 implantación, por infusión, por infusión continua, por infusión localizada que baña las células objetivo directamente, mediante un catéter, mediante lavado, en cremas, o en composiciones lipídicas. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en la presente también pueden administrarse de forma sistémica o local. El método de
30 administración puede variar dependiendo de diversos factores (por ejemplo, el compuesto o composición administrada y la gravedad de la afección, enfermedad o trastorno que se trata).

El término "vector", tal como se utiliza en la presente, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al cual se enlazó. Un tipo de vector es un "plásmido", lo que hace referencia a un bucle de ADN de doble cadena circular al que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector fágico. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Determinados vectores pueden replicarse de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped luego de la introducción en la célula huésped y, de esa forma, se replican junto con el genoma huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que se encuentran unidos de forma operativa. Se hace referencia a dichos vectores en la presente como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores recombinantes" o "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante se suelen encontrar en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar de manera intercambiable.

La expresión "alrededor de", tal como se utiliza en la presente, se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "alrededor de" un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) modalidades que se orientan a ese valor o parámetro en sí.

III. Ejemplos de anticuerpos anti-TIGIT

La invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT útiles para tratar o demorar la evolución del cáncer o una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario (por ejemplo, un trastorno disfuncional de linfocitos T) en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

En un ejemplo, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, o 3 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Ser78, Ser80 y Lys82 de TIGIT humano. Por ejemplo, en algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Ser80 y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Ser78 y Ser80. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Ser78 y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Ser78, Ser80 y Lys82.

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye además de Ser78, Ser80 y/o Lys82, residuo de Ala67 de TIGIT humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78 y Ala67; Ser80 y Ala67; Lys82 y Ala67; Ser78, Ser80, y Ala67; Ser78, Lys82, y Ala67; Ser80, Lys82, y Ala67; o Ser78, Ser80, Lys82, y Ala67.

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye, además de Ser78, Ser80, y/o Lys82, uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 1, 2, o 3 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Glu60,

Leu65, e Ile68 de TIGIT humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78 y Glu60; Ser80 y Glu60; Lys82 y Glu60; Ser78 y Leu65; Ser80 y Leu65; Lys82 y Leu65; Ser78 e Ile68; Ser80 e Ile68; Lys82 e Ile68. En algunos

5 casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78, Ser80, y Glu60; Ser78, Ser80, y Leu65; Ser78, Ser80, e Ile68; Ser80, Lys82, y Glu60; Ser80, Lys82, y Leu65; Ser80, Lys82, e Ile68; Ser78, Lys82, y Glu60; Ser78, Lys82, y Leu65; Ser78, Lys82, e Ile68. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a

10 un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78, Ser80, Lys82, y Glu60; Ser78, Ser80, Lys82, y Leu65; Ser78, Ser80, Lys82, e Ile68. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Glu60, Leu65, y Ser78; Glu60, Leu65, y Ser80; Glu60, Leu65, y Lys82; Leu65, Ile68, y Ser78; Leu65, Ile68, y Ser80; Leu65, Ile68, y Lys82; Glu60, Ile68, y Ser78; Glu60, Ile68, y Ser80; Glu60, Ile68, y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Glu60, Leu65, Ile68, y Ser78; Glu60, Leu65, Ile68, y Ser80; Glu60, Leu65, Ile68, y Lys82. En algunos

15 casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Glu60, Leu65, Ser78, y Ser80; Glu60, Leu65, Ser78, y Lys82; Glu60, Leu65, Ser80, y Lys82; Leu65, Ile68, Ser78, y Ser80; Leu65, Ile68, Ser78, y Lys82; Leu65, Ile68, Ser80, y Lys82; Leu65, Glu60, Ser78, y Ser80; Leu65, Glu60, Ser78, y Lys82; Leu65, Glu60, Ser80, y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Glu60, Leu65, Ser78, Ser80, e Lys82; Leu65, Ile68, Ser78, Ser80, e Lys82; Glu60, Leu65, Ser78, Ser80, e Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78, Ser80, Glu60, Leu65, e Ile68; Ser78, Lys82, Glu60, Leu65, e Ile68; Ser80, y Lys82, Glu60,

20 Leu65, e Ile68. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78, Ser80, Lys82, Glu60, Leu65 e Ile68.

25

30

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye, además de Ser78, Ser80, y Lys82, uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Gln56, Asn70, Leu73 y His111 de TIGIT humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78, Ser80, Lys82, y Gln56; Ser78, Ser80, Lys82, y Asn70; Ser78, Ser80, Lys82, y Leu73; Ser78, Ser80, Lys82, y His111. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78, Ser80, Lys82, Gln56, y Asn70; Ser78, Ser80, Lys82, Gln56, y Leu73; Ser78, Ser80, Lys82, Gln56, y His111; Ser78, Ser80, Lys82, Asn70, y Leu73; Ser78, Ser80, Lys82, Asn70, y His111; Ser78, Ser80, Lys82, Leu73, y His111. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78, Ser80, Lys82, Gln56, Asn70, y Leu73; Ser78, Ser80, Lys82, Gln56, Asn70, y His111; Ser78, Ser80, Lys82, Gln56, Leu73, y His111; Ser78, Ser80, Lys82, Asn70, Leu73, y His111. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Ser78, Ser80, Lys82, Gln56, Asn70, Leu73, y His111. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye, además de Ser78, Ser80, y/o Lys82, uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 1, 2, o 3 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Thr55, Asn58, Asp63, Gln64, His76, Ile77 y Pro79 de TIGIT humano.

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Thr55, Gln56, Asn58, Glu60, Asp63, Gln64, Leu65, Ala67, Ile68, Asn70, Leu73, His76, Ile77, Ser78, Pro79, Ser80, Lys82 y His111 de TIGIT humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que consiste en residuos de aminoácidos Thr55, Gln56, Asn58, Glu60,

Asp63, Gln64, Leu65, Ala67, Ile68, Asn70, Leu73, His76, Ile77, Ser78, Pro79, Ser80, Lys82 y His111 de TIGIT humano.

- En otro ejemplo, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, o 3 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Thr55, Ser80 y Lys82 de TIGIT humano. Por ejemplo, en algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye el residuo de aminoácido Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Ser80 y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Thr55 y Ser80. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Thr55 y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Thr55, Ser80 y Lys82.
- En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye además de Thr55, Ser80 y/o Lys82, residuo de Gln56 de TIGIT humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Thr55 y Gln56; Ser80 y Gln56; Lys82 y Gln56; Thr55, Ser80, y Gln56; Thr55, Lys82, y Gln56; Ser80, Lys82, y Gln56; o Thr55, Ser80, Lys82, y Gln56.

- En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye, además de Thr55, Ser80, y/o Lys82, uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 1, 2, o 3 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Asn58, Glu60, Ile77 y Pro79 de TIGIT humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que

incluye Thr55 y Asn58; Thr55 y Glu60; Ser80 y Asn58; Ser80 y Glu60; Lys82 y Asn58; Lys82 y Glu60; Thr55 e Ile77; Ser80 e Ile77; Lys82 e Ile77; Thr55 y Pro79; Ser80 y Pro79; Lys82 y Pro79. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que

5 incluye Thr55, Ser80, y Asn58; Thr55, Ser80, y Glu60; Thr55, Ser80, e Ile77; Thr55, Ser80, y Pro79; Ser80, Lys82, y Asn58; Ser80, Lys82, y Glu60; Ser80, Lys82, e Ile77; Ser80, Lys82, y Pro79; Thr55, Lys82, y Asn58; Thr55, Lys82, y Glu60; Thr55, Lys82, e Ile77; Thr55, Lys82, y Pro79. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un

10 epítipo en TIGIT humano que incluye Thr55, Ser80, Lys82, y Asn58; Thr55, Ser80, Lys82, y Glu60; Thr55, Ser80, Lys82, e Ile77; Thr55, Ser80, Lys82, y Pro79. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Asn58, Ile77, y Thr55; Glu60, Ile77, y Thr55; Asn58, Ile77, y Ser80; Glu60, Ile77, y Ser80;

15 Asn58, Ile77, y Lys82; Glu60, Ile77, y Lys82; Ile77, Pro79, y Thr55; Ile77, Pro79, y Ser80; Ile77, Pro79, y Lys82; Glu60, Pro79, y Thr55; Asn58, Pro79, y Ser80; Glu60, Pro79, y Ser80; Asn58, Pro79, y Lys82; Glu60, Pro79, y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Asn58, Ile77, Pro79, y

20 Thr55; Glu60, Ile77, Pro79, y Thr55; Asn58, Ile77, Pro79, y Ser80; Glu60, Ile77, Pro79, y Ser80; Asn58, Ile77, Pro79, y Lys82; Glu60, Ile77, Pro79, y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Asn58, Ile77, Thr55, y Ser80; Glu60, Ile77, Thr55, y Ser80; Asn58, Ile77, Thr55, y Lys82;

25 Glu60, Ile77, Thr55, y Lys82; Asn58, Ile77, Ser80, y Lys82; Glu60, Ile77, Ser80, y Lys82; Ile77, Pro79, Thr55, y Ser80; Ile77, Pro79, Thr55, y Lys82; Ile77, Pro79, Ser80, y Lys82; Ile77, Asn58, Thr55, y Ser80; Ile77, Glu60, Thr55, y Ser80; Ile77, Asn58, Thr55, y Lys82; Ile77, Asn58, Thr55, y Lys82; Ile77, Glu60, Thr55, y Lys82; Ile77,

30 Asn58, Ser80, y Lys82; Ile77, Glu60, Ser80, y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Asn58, Ile77, Thr55, Ser80, y Lys82; Glu60, Ile77, Thr55,

Ser80, y Lys82; Ile77, Pro79, Thr55, Ser80, y Lys82; Asn58, Ile77, Thr55, Ser80, y Lys82; Glu60, Ile77, Thr55, Ser80, y Lys82. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Thr55, Ser80, Asn58, Ile77, y Pro79; Thr55, Ser80, Glu60, Ile77, y Pro79; Thr55, Lys82, Asn58, Ile77, y Pro79; Thr55, Lys82, Glu60, Ile77, y Pro79; Ser80, Lys82, Asn58, Ile77, y Pro79; y Ser80, Lys82, Glu60, Ile77, y Pro79. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Thr55, Ser80, Lys82, Glu60, Ile77 y Pro79. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Thr55, Ser80, Lys82, Asn58, Ile77 y Pro79. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Thr55, Asn58, Glu60, Ile77, Pro79, Ser80, y Lys82.

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye, además de Thr55, Ser80 y Lys82, uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Leu65, Ile68, Leu73, His76, Ser78, y His111 o comprende además los residuos de aminoácidos Leu65, Ile68, Leu73, His76, Ser78 y His111 de TIGIT humano.

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Thr55, Gln56, Asn58, Glu60, Leu65, Ile68, Leu73, His76, Ile77, Ser78, Pro79, Ser80, Lys82 y His111 de TIGIT humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que consiste en los residuos de aminoácidos Thr55, Gln56, Asn58, Glu60, Leu65, Ile68, Leu73, His76, Ile77, Ser78, Pro79, Ser80, Lys82 y His111 de TIGIT humano.

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT descritos

anteriormente pueden incluir un paratopo que incluye uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 residuos de aminoácidos) que se selecciona del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos de región variable de cadena pesada Asn32, Tyr52, Arg52b, Phe53, Lys54, Tyr56, Asp58, Tyr99, Asp100, Leu100a, Leu100b y Ala100c y/o uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Tyr27d, Tyr92, Ser93, Thr94 y Phe96.

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT pueden incluir un paratopo que consiste en los residuos de aminoácidos de región variable de cadena pesada Asn32, Tyr52, Arg52b, Phe53, Lys54, Tyr56, Asp58, Tyr99, Asp100, Leu100a, Leu100b y Ala100c y los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Tyr27d, Tyr92, Ser93, Thr94 y Phe96.

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-TIGIT de la invención realiza contactos únicos con aminoácidos de TIGIT humano a una distancia de 4.5 Angstroms, 3.7 Angstroms, 3.5 Angstroms, 3.25 Angstroms, 3.00 Angstroms, 2.75 Angstroms, o menos. En determinadas modalidades, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo que consiste en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos del TIGIT humano a una distancia de 4.5 Angstroms, 3.7 Angstroms, 3.5 Angstroms, 3.25 Angstroms, 3.00 Angstroms, 2.75 Angstroms o menos. En una modalidad, el anticuerpo anti-TIGIT de la invención entra en contacto único con aminoácidos del TIGIT humano a una distancia de 3.7 Angstroms o menos. En determinadas modalidades, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo que consiste en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos del TIGIT humano a una distancia de 3,7 Angstroms o menos.

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT anteriores incluyen al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SNSAAWN (SEQ ID NO: 1; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KTYRFRKWYSDYAVSVKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESTTYDLLAGPFDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KSSQTVLYSSNNKKYLA (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WASTRES (SEQ ID NO: 5); y/o (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQYYSTPFT (SEQ ID NO: 6), o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT incluye (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SNSAAWN (SEQ ID NO: 1; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KTYRFRKWYSDYAVSVKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESTTYDLLAGPFDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KSSQTVLYSSNNKKYLA (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WASTRES (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQYYSTPFT (SEQ ID NO: 6), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 4.1D3 y derivados de este (por ejemplo, 4.1D3.Q1E). En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT puede tener un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 34 o 35 y/o un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 36. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT puede tener un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de

5 identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 34 y/o un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de

10 secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 36. En un caso particular, el anticuerpo anti-TIGIT puede ser 4.1D3.Q1E, o un derivado o relativo clonal de este. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT puede tener un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de

15 identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 35 y/o un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de

20 secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 36. En un caso particular, el anticuerpo anti-TIGIT puede ser 4.1D3, o un derivado o relativo clonal de este.

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos,

25 tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO: 7); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGQPPLLIIY (SEQ ID NO: 8); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

30 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO: 9); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGPGTKVEIK (SEQ ID NO: 10), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más

variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 7-10. En algunos casos, por ejemplo, el anticuerpo comprende además un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO: 7); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGQPPNLLIY (SEQ ID NO: 8); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO: 9); y una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGPGTKVEIK (SEQ ID NO: 10), tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT 4.1D3.Q1E y 4.1D3.

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de VQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS (SEQ ID NO: 11), donde X₁ es Q o E; una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQSPSRGLEWLG (SEQ ID NO: 12); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTR (SEQ ID NO: 13); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 11-14. El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS (SEQ ID NO: 15); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQSPSRGLEWLG (SEQ ID NO: 12); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTR (SEQ ID NO: 13); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14),

o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 12-15. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS (SEQ ID NO: 15); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQSPSRGLEWLG (SEQ ID NO: 12); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTR (SEQ ID NO: 13); y una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14), tal como la poseída por el anticuerpo 4.1D3.Q1E. En otro caso, por ejemplo, el anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS (SEQ ID NO: 16); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQSPSRGLEWLG (SEQ ID NO: 12); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTR (SEQ ID NO: 13); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 12-14 y 16. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS (SEQ ID NO: 16); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQSPSRGLEWLG (SEQ ID NO: 12); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTR (SEQ ID NO: 13); y una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14), tal como la poseída por el anticuerpo 4.1D3.

En otro ejemplo, la invención proporciona los anticuerpos anti-TIGIT que se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, o 3 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Gln53, His111, y Tyr113 de TIGIT humano. Por ejemplo, en algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos His111 y Tyr113. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Gln53 y His111. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Gln53 y Tyr113. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye los residuos de aminoácidos Gln53, His111 y Tyr113.

15

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye además de Gln53, His111 y/o Tyr113, residuo de Gln56 de TIGIT humano. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53 y Gln56; His111 y Gln56; Tyr113 y Gln56; Gln53, His111, y Gln56; Gln53, Tyr113, y Gln56; His111, Tyr113, y Gln56; o Gln53, His111, Tyr113, y Gln56.

20

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye, además de Gln53, His111, Tyr113, y/o Gln56, y uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Glu60, Leu65, Ile68, Asn70, Leu73, y His76 de TIGIT humano. Por ejemplo, en algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, y Glu60; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, y Leu65; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, e Ile68; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, y Asn70; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, y His76.

25

30

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, y Leu65; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, e Ile68; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, y Asn70; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60 y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, e Ile68; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, y Asn70; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Ile68, y Asn70; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Ile68, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Ile68, y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Asn70, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Asn70 y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu73, y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, Ile68, y Asn70; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, Ile68, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, Ile68 y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Ile68, Asn70, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Ile68, Asn70 y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Ile68, Asn70, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, Ile68, Asn70, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, Ile68, Asn70, y His76; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Ile68, Asn70, Leu73 y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Glu60, Leu65, Ile68, Asn70, Leu73 y His76.

- En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, e Ile68; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, y Asn70; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, y His76.
- En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Ile68, y Asn70; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Ile68, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Ile68, y Asn70; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Ile68, y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Asn70, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Asn70 y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Leu73, y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Ile68, Asn70, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Ile68, Asn70 y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu65, Ile68, Asn70, Leu73, y His76.
- En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Ile68 y Asn70; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Ile68, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Ile68 y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Ile68, Asn70, y Leu73; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Ile68, Asn70, y His76; Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Ile68, Leu73 y His76. En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en

TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Ile68, Asn70, Leu73, y His76.

En algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en
 5 TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Asn70, y Leu73;
 Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Asn70 y His76. En algunos casos, los
 anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en TIGIT humano que
 incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Asn70, Leu73, y His76. En
 algunos casos, los anticuerpos anti-TIGIT se unen a un epítipo en
 10 TIGIT humano que incluye Gln53, His111, Tyr113, Gln56, Leu73, y His76.

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT del ejemplo
 precedente incluyen al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR
 seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de
 15 aminoácidos de SYPMN (SEQ ID NO: 17; (b) una HVR-H2 que comprende la
 secuencia de aminoácidos de WINTNTGNPTYVQGFTG (SEQ ID NO: 18); (c) una
 HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGGHTYDSYAFDV (SEQ
 ID NO: 19); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos
 de RASQVISSSLA (SEQ ID NO: 20); (e) una HVR-L2 que comprende la
 20 secuencia de aminoácidos de AASTLQS (SEQ ID NO: 21); y/o (f) una HVR-
 L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHLHGYPX₁N (SEQ ID NO:
 22), donde X₁ es C o S, o una combinación de una o más de las HVR
 anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos
 alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con
 25 cualquiera de las SEQ ID NO: 17-22. En algunos casos, cualquiera de
 los anticuerpos anti-TIGIT anteriores del ejemplo precedente puede
 incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de
 SYPMN (SEQ ID NO: 17; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de
 aminoácidos de WINTNTGNPTYVQGFTG (SEQ ID NO: 18); (c) una HVR-H3 que
 30 comprende la secuencia de aminoácidos de TGGHTYDSYAFDV (SEQ ID NO:
 19); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

RASQVISSSLA (SEQ ID NO: 20); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASTLQS (SEQ ID NO: 21); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHLHGYPX₁N (SEQ ID NO: 22), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 7.4A3 y derivados de este (por ejemplo, 7.4A3.C96S.Q1E). En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT puede incluir (a) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SYPMN (SEQ ID NO: 17; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINTNTGNPTYVQGFTG (SEQ ID NO: 18); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGGHTYDSYAFDV (SEQ ID NO: 19); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQVISSSLA (SEQ ID NO: 20); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASTLQS (SEQ ID NO: 21); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHLHGYPN (SEQ ID NO: 23), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 7.4A3.C96S.Q1E. En otros casos, el anticuerpo anti-TIGIT puede incluir (a) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SYPMN (SEQ ID NO: 17; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINTNTGNPTYVQGFTG (SEQ ID NO: 18); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGGHTYDSYAFDV (SEQ ID NO: 19); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQVISSSLA (SEQ ID NO: 20); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASTLQS (SEQ ID NO: 21); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHLHGYPN (SEQ ID NO: 28), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 7.4A3.

25

En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT puede tener un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 37 y/o un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 38 y/o un dominio CH1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 39 y/o un dominio CL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 40.

30

- 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 38. En un caso particular, el anticuerpo anti-TIGIT puede ser 7.4A3.C96S.Q1E, o un derivado o relativo clonal de este. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT puede tener un dominio VH que
- 5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 39 y/o un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de
- 10 secuencia (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con, o la secuencia de, las SEQ ID NO: 40. En un caso particular, el anticuerpo anti-TIGIT puede ser 7.4A3, o un derivado o relativo clonal de este.
- 15 En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de región variable de cadena ligera: un DIQLTQSPTFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 30); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQNPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 31); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de
- 20 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFVITYYC (SEQ ID NO: 32); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 33), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 30-
- 25 33, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 7.4A3 y derivados de este (por ejemplo, 7.4A3.C96S.Q1E).

- En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos,
- 30 tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGSDDLKKPGASVRVSKASGYTFT (SEQ ID NO: 24) o a la secuencia de

aminoácidos de QVQLVQSGSDLKKPGASVRVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 29); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGHGLEWMG (SEQ ID NO: 25); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFVFSLDTSVNTAYLQISSSLKAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 26); y/o una FR-H4 que

5 comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTMTVTSS (SEQ ID NO: 27), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 24-27

10 y 29. El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGSDLKKPGASVRVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 24); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGHGLEWMG (SEQ ID NO:

15 25); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFVFSLDTSVNTAYLQISSSLKAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 26); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTMTVTSS (SEQ ID NO: 27), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 24-

20 27. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGSDLKKPGASVRVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 24); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGHGLEWMG (SEQ ID NO:

25 25); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFVFSLDTSVNTAYLQISSSLKAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 26); y una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTMTVTSS (SEQ ID NO: 27), tal como la poseída por el anticuerpo 7.4A3.C96S.Q1E En otro caso, por

30 ejemplo, el anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGSDLKKPGASVRVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 29); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGHGLEWMG (SEQ ID NO: 25); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFVFSLDTSVNTAYLQISSSLKAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 26); y/o una FR-H4 que

5 comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 27), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 25-27

10 y 29. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QVQLVQSGSDLKKPGASVRVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 29); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGHGLEWMG (SEQ ID NO: 25); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

15 RFVFSLDTSVNTAYLQISSSLKAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 26); y una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 27), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 7.4A3.

En otro ejemplo, la invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que

20 incluyen al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NYPMN (SEQ ID NO: 41); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINTNTGSPAYAQDFTE (SEQ ID NO: 42); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TAITSVYHFDY (SEQ

25 ID NO: 43); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 44); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GATTLQS (SEQ ID NO: 45); y/o (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QKLNSHPX₁S (SEQ ID NO: 46), donde X₁ es C, S, o Y, o una combinación de una o más de las HVR

30 anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con

cualquiera de las SEQ ID NO: 41-46. En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT anteriores del ejemplo precedente puede incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NYPMN (SEQ ID NO: 41; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINTNTGSPAYAQDFTE (SEQ ID NO: 42); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TAITSVYHFDY (SEQ ID NO: 43); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 44); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GATTLQS (SEQ ID NO: 45); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QKLNSHPX₁S (SEQ ID NO: 46), donde X₁ es C, S, o Y, tal como poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 4.1A4 y derivados de estos (por ejemplo, 4.1A4.C96S.Q1E y 4.1A4.C96Y.Q1E). En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT puede incluir (a) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NYPMN (SEQ ID NO: 41; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINTNTGSPAYAQDFTE (SEQ ID NO: 42); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TAITSVYHFDY (SEQ ID NO: 43); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 44); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GATTLQS (SEQ ID NO: 45); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QKLNSHPCS (SEQ ID NO: 47), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 4.1A4. En otros casos, el anticuerpo anti-TIGIT puede incluir (a) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NYPMN (SEQ ID NO: 41; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINTNTGSPAYAQDFTE (SEQ ID NO: 42); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TAITSVYHFDY (SEQ ID NO: 43); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 44); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GATTLQS (SEQ ID NO: 45); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QKLNSHPSS (SEQ ID NO: 48), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 4.1A4.C96S.Q1E. En otros casos, el anticuerpo

anti-TIGIT puede incluir (a) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NYPMN (SEQ ID NO: 41); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WINTNTGSPAYAQDFTE (SEQ ID NO: 42); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TAITSVYHFDY (SEQ ID NO: 43); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQGISSYLA (SEQ ID NO: 44); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GATTLQS (SEQ ID NO: 45); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QKLNSHPYS (SEQ ID NO: 49), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 4.1A4.C96Y.Q1E.

10

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 56); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPRVLIY (SEQ ID NO: 57); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSESGTEFTLTISSLQPEDLATYYC (SEQ ID NO: 58); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 56-59, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 4.1A4 y derivados de este (por ejemplo, 1A4.C96S.Q1E y 1A4.C96Y.Q1E).

25

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁VQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTLT (SEQ ID NO: 50), donde X₁ es E o Q; una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGRGLEWMG (SEQ ID NO: 51); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 52); y/o una FR-H4 que

30

comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 53), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 50-53. El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTLT (SEQ ID NO: 54); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGRGLEWMG (SEQ ID NO: 51); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 52); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 53), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 51-54, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 4.1A4. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTLT (SEQ ID NO: 55); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGRGLEWMG (SEQ ID NO: 51); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 52); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 53), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 51-53 y 55, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 1A4.C96S.Q1E o 1A4.C96Y.Q1E.

En otro ejemplo, la invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que

incluyen al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de TYGMGVS (SEQ ID NO: 68; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SIWWNGNTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 69); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGGAVITWFAY (SEQ ID NO: 70); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KASQSVGKNIA (SEQ ID NO: 71); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de YASNRYT (SEQ ID NO: 72); y/o (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHIYNPYP (SEQ ID NO: 73), o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 68-73. En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT anteriores del ejemplo precedente puede incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de TYGMGVS (SEQ ID NO: 68; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SIWWNGNTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 69); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGGAVITWFAY (SEQ ID NO: 70); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KASQSVGKNIA (SEQ ID NO: 71); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de YASNRYT (SEQ ID NO: 72); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHIYNPYP (SEQ ID NO: 73), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat6B2 y derivados de estos (por ejemplo, h6B2.L1H1, h6B2.L2H1, h6B2.L1H2, h6B2.L1H3, h6B2.L1H4, h6B2.L1H5 y h6B2.L2H5).

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁IX₂MTQSPX₃SX₄SX₅SVGDRVTX₆X₇C (SEQ ID NO: 88), donde X₁ es D o N; X₂ es Q o V; X₃ es K o S; X₄ es L o M; X₅ es A o I; X₆ es I o M; y X₇ es N

o T; una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGX₁X₂PKLLIY (SEQ ID NO: 89), donde X₁ es K o Q y X₂ es A o S; una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPX₁RFX₂GX₃GSGTDFTX₄TIX₅X₆X₇QX₈EDX₉AX₁₀X₁₁YC (SEQ ID NO: 90), donde X₁ es D o S; X₂ es S o T; X₃ es G o S; X₄ es F o L; X₅ es N o S; X₆ es S o T; X₇ es L o V; X₈ es A o P; X₉ es A o I; X₁₀ es F o T; y X₁₁ es F o Y; y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGX₁GTKX₂EIK (SEQ ID NO: 91), donde X₁ es Q o T y X₂ es L o V, o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 88-91, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat6B2 y derivados de estos (por ejemplo, h6B2.L1H1, h6B2.L2H1, h6B2.L1H2, h6B2.L1H3, h6B2.L1H4, h6B2.L1H5 y h6B2.L2H5). El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NIVMTQSPKSMSISVGDRVMTMNC (SEQ ID NO: 92); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 93); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPDRFTGGSGTDFTLTINTVQAEDAAFFYC (SEQ ID NO: 94); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGTGTKLEIK (SEQ ID NO: 95), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 92-95, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat6B2. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 96); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKSPKLLIY (SEQ ID NO: 97); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSQLQPEDIATYYC (SEQ ID NO: 99);

y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 100), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 96-97 y 99-100, tal como las poseídas por los anticuerpos anti-TIGIT h6B2.L1H1, h6B2.L1H2, h6B2.L1H3, h6B2.L1H4 y h6B2.L1H5. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 96); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 98); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSSLQPEDIATYYC (SEQ ID NO: 99); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 100), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 96 y 98-100, tal como las poseídas por los anticuerpos anti-TIGIT h6B2.L2H1 y h6B2.L2H5.

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁VX₂LKESGPX₃X₄X₅X₆PX₇X₈TLX₉LTCX₁₀FSGFSL (SEQ ID NO: 74), donde X₁ es E o Q; X₂ es S o T; X₃ es A o G; X₄ es I o L; X₅ es L o V; X₆ es K o Q; X₇ es S o T; X₈ es H o Q; X₉ es S o T; y X₁₀ es S o T; una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPX₁X₂KX₃LEWLA (SEQ ID NO: 75), donde X₁ es P o S; X₂ es E o G; y X₃ es A o G; una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTX₁X₂KDX₃SX₄X₅QX₆X₇LX₈X₉TX₁₀X₁₁DX₁₂X₁₃DTATYYCAH (SEQ ID NO: 76), donde X₁ es I o V; X₂ es S o T; X₃ es A o T; X₄ es K o N; X₅ es D o N; X₆ es A o V; X₇ es F o V; X₈ es N o T; X₉ es M o V; X₁₀ es N o S; X₁₁ es M o V; X₁₂

es P o T; y X₁₃ es T o V; y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 74-77, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat6B2 y derivados de estos (por ejemplo, h6B2.L1H1, h6B2.L2H1, h6B2.L1H2, h6B2.L1H3, h6B2.L1H4, h6B2.L1H5 y h6B2.L2H5). El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QVSLKESGPGILQPSHTLSLTCSFSGFSLS (SEQ ID NO: 78); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPSEKGLEWLA (SEQ ID NO: 79); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTVSKDASNDQAFNLNVTSDTTDTATYYCAH (SEQ ID NO: 80); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 77-80, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat6B2. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS (SEQ ID NO: 81); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO: 82); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTVTKDASKNQAVLTMNMDPVDATYYCAH (SEQ ID NO: 83); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 77 y 81-83, tal como las poseídas por los anticuerpos anti-TIGIT

h6B2.L1H1 y h6B2.L2H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS (SEQ ID NO: 81); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO: 82); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLITKDKASKNQAVLTMTNMDPVDATATYYCAH (SEQ ID NO: 84); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 77), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 77, 81-82, y 84, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h6B2.L1H2. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS (SEQ ID NO: 81); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO: 82); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTVTKDTSKNQAVLTMTNMDPVDATATYYCAH (SEQ ID NO: 85); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 77), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 77, 81-82, y 85, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h6B2.L1H3. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS (SEQ ID NO: 81); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO: 82); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTVTKDASKNQVLTMTNMDPVDATATYYCAH (SEQ ID NO: 86); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 77), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más

variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 77, 81-82, y 85, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h6B2.L1H4. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS (SEQ ID NO: 81); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO: 82); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAH (SEQ ID NO: 87); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 77), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 77, 81-82, y 87, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h6B2.L1H5 y h6B2.L2H5.

En otro ejemplo, la invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que incluyen al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de TYGMGVS (SEQ ID NO: 110; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SIWWNGNTYYNPSLRS (SEQ ID NO: 111); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGGAVITWFAY (SEQ ID NO: 112); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KASQSVGKNIA (SEQ ID NO: 113); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de YASNRYT (SEQ ID NO: 114); y/o (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHIYNPYP (SEQ ID NO: 115), o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID

- NO: 110-115. En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT anteriores del ejemplo precedente puede incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de TYGMGVS (SEQ ID NO: 110; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SIWWNGNTYYNPSLRS (SEQ ID NO: 111); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TGGAVITWFAY (SEQ ID NO: 112); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KASQSVGKNIA (SEQ ID NO: 113); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de YASNRYT (SEQ ID NO: 114); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QHIYNPYP (SEQ ID NO: 115), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat10A5 y derivados de estos (por ejemplo, h10A5.L1H1; h10A5.L2H1; h10A5.L3H1; h10A5.L4H1; h10A5.L1H2; h10A5.L1H3; h10A5.L1H4; y h10A5.L4H4).
- En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de $X_1IVMTQSPX_2X_3X_4SX_5SX_6GX_7RX_8TX_9X_{10}C$ (SEQ ID NO: 129), donde X_1 es E o N; X_2 es A o K; X_3 es S o T; X_4 es L o M; X_5 es I o V; X_6 es I o P; X_7 es D o E; X_8 es A o V; X_9 es L o M; y X_{10} es N o S; una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKX₁GQX₂PX₃LLIY (SEQ ID NO: 130), donde X_1 es P o T; X_2 es A o S; y X_3 es Q o R; una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GX₁PX₂RFX₃GX₄GSGTX₅FTLTIX₆SX₇QX₈EDX₉AX₁₀X₁₁YC (SEQ ID NO: 131), donde X_1 es I o V; X_2 es A o D; X_3 es S o T; X_4 es G o S; X_5 es D o E; X_6 es N o S; X_7 es L o V; X_8 es A o S; X_9 es A o F; X_{10} es F o V; y X_{11} es F o Y; y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGX₁GTKX₂EIK (SEQ ID NO: 132), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 129-132, tal como la poseída por el

anticuerpo anti-TIGIT rat10A5 y derivados de estos (por ejemplo, h10A5.L1H1; h10A5.L2H1; h10A5.L3H1; h10A5.L4H1; h10A5.L1H2; h10A5.L1H3; h10A5.L1H4; y h10A5.L4H4). El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NIVMTQSPKSMSISIGDRVMTMNC (SEQ ID NO: 133); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKTGQSPQQLLIY (SEQ ID NO: 134); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPDRFTGGGSGTDFTLTINSVQAEDAAFFYC (SEQ ID NO: 135); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGTGTKLEIK (SEQ ID NO: 136), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 133-136, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat10A5. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO: 137); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGQSPRLLIY (SEQ ID NO: 138); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO: 140); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 142), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 137-138, 140, y 142, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h10A5.L1H1, h10A5.L1H2, h10A5.L1H3, y h10A5.L1H4. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO: 137); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 139); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO: 140); y/o una FR-L4

que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 142), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 137, 139-140, y 142, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h10A5.L2H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO: 137); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGQSPRLLIY (SEQ ID NO: 138); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO: 141); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 142), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 137-138 y 141-142, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h10A5.L3H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO: 137); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 139); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC (SEQ ID NO: 141); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 142), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 137, 139 y 141-142, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h10A5.L4H1 y h10A5.L4H4.

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁VX₂LKESGPX₃X₄X₅X₆PX₇X₈TLX₉LTCX₁₀FSGFSLT (SEQ ID NO: 116), donde X₁ es E o Q; X₂ es S o T; X₃ es A o G; X₄ es I o L; X₅ es L o V; X₆ es K o Q; X₇ es S o T; X₈ es H o Q; X₉ es S o T; y X₁₀ es S o T; una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPX₁X₂KX₃LEWLA (SEQ ID NO: 117), donde X₁ es P o S; X₂ es E o G; y X₃ es A o G; una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTX₁X₂KDTSX₃X₄QX₅X₆LX₇X₈TX₉X₁₀DX₁₁X₁₂DTATYYCAH (SEQ ID NO: 118), donde X₁ es I o V; X₂ es S o T; X₃ es K o N; X₄ es D o N; X₅ es A o V; X₆ es F o V; X₇ es N o T; X₈ es M o V; X₉ es N o S; X₁₀ es M o V; X₁₁ es P o T; y X₁₂ es T o V; y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 119), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 116-119, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat10A5 y derivados de estos (por ejemplo, h10A5.L1H1; h10A5.L2H1; h10A5.L3H1; h10A5.L4H1; h10A5.L1H2; h10A5.L1H3; h10A5.L1H4; y h10A5.L4H4). El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QVSLKESGPGILQPSHTLSLTCSFSGFSLT (SEQ ID NO: 120); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPSEKGLEWLA (SEQ ID NO: 121); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTVSKDTSNDQAFLNVTSVDTTDTATYYCAH (SEQ ID NO: 122); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 119), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 116-119, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat10A5 y derivados de estos (por ejemplo, h10A5.L1H1; h10A5.L2H1; h10A5.L3H1; h10A5.L4H1; h10A5.L1H2; h10A5.L1H3; h10A5.L1H4; y h10A5.L4H4).

97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 119-122, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat10A5. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLT (SEQ ID NO: 123); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO: 124); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTVTKDTSKNQAVLTMTNMDPVDATATYYCAH (SEQ ID NO: 125); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 119), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 119 y 123-125, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h10A5.L1H1, h10A5.L2H1, h10A5.L3H1, y h10A5.L4H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLT (SEQ ID NO: 123); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO: 124); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTITKDTSKNQAVLTMTNMDPVDATATYYCAH (SEQ ID NO: 126); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 119), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 119, 123-124, y 126, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h10A5.L1H2. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLT (SEQ ID NO: 123); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO: 124); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLTVTKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCAH (SEQ ID NO: 127); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 119),

- o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 119, 123-124, y 127, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h10A5.L1H3. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLT (SEQ ID NO: 123); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO: 124); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RLITKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAH (SEQ ID NO: 128); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 119), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 119, 123-124, y 128, tal como la poseída por los anticuerpos h10A5.L1H4 y h10A5.L4H4.
- En otro ejemplo, la invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que incluyen al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EYSIY (SEQ ID NO: 153; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de RIDPKNGRTYYVDKFKN (SEQ ID NO: 154); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYGFYFDF (SEQ ID NO: 155); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KGSQNVNKYLV (SEQ ID NO: 156); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de NTDNLQS (SEQ ID NO: 157); y/o (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de YQYNNGFT (SEQ ID NO: 158), o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 119, 123-124, y 128, tal como la poseída por los anticuerpos h10A5.L1H4 y h10A5.L4H4.

97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 153-158. En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT anteriores del ejemplo precedente puede incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EYSIY (SEQ ID NO: 153; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de RIDPKNGRTYYVDKFKN (SEQ ID NO: 154); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYGFYFDF (SEQ ID NO: 155); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KGSQNVNKYLV (SEQ ID NO: 156); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de NTDNLQS (SEQ ID NO: 157); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de YQYNNGFT (SEQ ID NO: 158) tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat7E7 y derivados de este (por ejemplo, h7E7.L1H1, h7E7.L2H1, h7E7.L3H1, h7E7.L4H1, h7E7.L5H1, h7E7.L1H2, h7E7.L1H3, h7E7.L1H4, h7E7.L1H5, h7E7.L1H6, h7E7.L1H7, h7E7.L1H8, h7E7.L1H9, h7E7.L5H9 y 7E7.L5aH9a).

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de $X_1IX_2LTQSPSX_3LSASVGDRVTX_4X_5C$ (SEQ ID NO: 180), donde X_1 es D o N; X_2 es H o Q; X_3 es F o L; X_4 es I o L; y X_5 es S o T; una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de $WYQQKX_1GX_2APKLLIY$ (SEQ ID NO: 181), donde X_1 es L o P; y X_2 es E o K; una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de $GX_1PSRFSGSGSGTX_2X_3TLTISSLQPEDX_4ATYX_5C$ (SEQ ID NO: 182), donde X_1 es I o V; X_2 es D o E; X_3 es F o Y; X_4 es A o F; y X_5 es F o Y ; y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGX_1GTKX_2EIK (SEQ ID NO: 183), donde X_1 es Q o S; y X_2 es L o V, o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 180-183, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat7E7 y

derivados de este (por ejemplo, h7E7.L1H1, h7E7.L2H1, h7E7.L3H1, h7E7.L4H1, h7E7.L5H1, h7E7.L1H2, h7E7.L1H3, h7E7.L1H4, h7E7.L1H5, h7E7.L1H6, h7E7.L1H7, h7E7.L1H8, h7E7.L1H9, h7E7.L5H9 y 7E7.L5aH9a). El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos

5 una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NIHLTQSPSLLSASVGDRVTLSC (SEQ ID NO: 184); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKLGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 185); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

10 GIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYFC (SEQ ID NO: 186); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 187), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 184-

15 187, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat7E7. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 188); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 189); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GIPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYFC (SEQ ID NO: 190); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 196), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de

25 identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 188-190 y 196, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h7E7.L1H1, h7E7.L1H2, h7E7.L1H3, h7E7.L1H4, h7E7.L1H5, h7E7.L1H6, h7E7.L1H7, h7E7.L1H8 y h7E7.L1H9. En algunos casos, el anticuerpo

30 anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 188); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 189); una

FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYFC (SEQ ID NO: 191); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 196), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 188-189, 191 y 196, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h7E7.L2H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 188); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 189); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GIPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYFC (SEQ ID NO: 192); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 196), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 188-189, 192 y 196, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h7E7.L3H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 188); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 189); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GIPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 193); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 196), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 188-189, 193 y 196, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h7E7.L4H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1

- que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 188); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 189); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 194); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 196), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 188-189, 194 y 196, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h7E7.L5H1 y h7E7.L5H9. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 188); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 189); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 195); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 196), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 188-189 y 195-196, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 7E7.L5aH9a.
- En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos uno, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLX₁QSGX₂EX₃X₄X₅PGASVKX₆SCKAX₇GYTFT (SEQ ID NO: 159), donde X₁ es Q o V; X₂ es A o P; X₃ es L o V; X₄ es K o Q; X₅ es K o R; X₆ es L o V; y X₇ es S o T; una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVX₁QX₂PX₃QX₄LEX₅X₆G (SEQ ID NO: 160), donde X₁ es K o R; X₂ es A o R; X₃ es G o K; X₄ es R o S; X₅ es I o W; y X₆ es I o M; una FR-H3 que

comprende la secuencia de aminoácidos de RX₁TX₂TX₃DTSX₄X₅TAYMX₆LSSLX₇SED₈TAX₉YX₁₀R (SEQ ID NO: 161), donde X₁ es A o V; X₂ es I o L; X₃ es A o R; X₄ es A o S; X₅ es N o S; X₆ es E o Q; X₇ es R o T; X₈ es T o V; X₉ es F o Y; y X₁₀ es A o T; y/o una FR-H4

5 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGX₁X₂VTX₃SS (SEQ ID NO: 162), donde X₁ es T o V; X₂ es L o M; y X₃ es A o V, o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %

10 de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 159-162, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat7E7 y derivados de este (por ejemplo, h7E7.L1H1, h7E7.L2H1, h7E7.L3H1, h7E7.L4H1, h7E7.L5H1, h7E7.L1H2, h7E7.L1H3, h7E7.L1H4, h7E7.L1H5, h7E7.L1H6, h7E7.L1H7, h7E7.L1H8, h7E7.L1H9, h7E7.L5H9 y 7E7.L5aH9a). El anticuerpo anti-

15 TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLQQSGPELQRPGLSVKLSCKATGYTFT (SEQ ID NO: 163); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVKQRPQSLEIIG (SEQ ID NO:

20 164); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTADTSSNTAYMQLSSLTSED₈TATYFCTR (SEQ ID NO: 165); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGVMTASS (SEQ ID NO: 166), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad

25 de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 163-166, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat7E7. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID

30 NO: 167); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 168); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTADTSASTAYMELSSLRSED₈TAVYFCTR (SEQ ID NO: 172);

y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167-138, 172 y 179, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h7E7.L1H1, h7E7.L2H1, h7E7.L3H1, h7E7.L4H1 y h7E7.L5H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 167); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEWIG (SEQ ID NO: 169); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCTR (SEQ ID NO: 172); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167, 169, 172 y 179, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h7E7.L1H2. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 167); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEIMG (SEQ ID NO: 170); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCTR (SEQ ID NO: 172); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167, 170, 172 y 179, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h7E7.L1H3. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 167); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 168); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RVTLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCTR (SEQ ID NO: 173); y/o una FR-H4 que

5 comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167-

10 168, 173 y 179, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h7E7.L1H4. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 167); una FR-H2 que

15 comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 168); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCTR (SEQ ID NO: 174); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad

20 de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167-168, 174 y 179, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h7E7.L1H5. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

25 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 167); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 168); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCTR (SEQ ID NO: 175); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179),

30 o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167-168, 175 y 179, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h7E7.L1H5. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167-168, 175 y 179, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h7E7.L1H6. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

5 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 167); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 168); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR (SEQ ID NO: 176); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179),

10 o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167-168, 176 y 179, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT

15 h7E7.L1H7. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 167); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 168); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

20 RATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 177); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167-

25 168, 177 y 179, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h7E7.L1H8. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 167); una FR-H2 que

30 comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEWMG (SEQ ID NO: 171); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 178); y/o una FR-H4 que

comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167, 171 y 178-179, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h7E7.L1H9 y h7E7.L5H9. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 167); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEIMG (SEQ ID NO: 170); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 178); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 167, 170 y 178-179, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 7E7.L5aH9a.

20

En otro ejemplo, la invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que incluyen al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EHSIY (SEQ ID NO: 215; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de RIDPKNGRTYFVDKFKN (SEQ ID NO: 216); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IDGFYFDF (SEQ ID NO: 217); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KGSQNVNKKYLV (SEQ ID NO: 218); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de STDNLQS (SEQ ID NO: 219); y/o (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de YQYNNNGFT (SEQ ID NO: 220), o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad

30

de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 215-220. En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT anteriores del ejemplo precedente puede incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EHSIY (SEQ ID NO: 215; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de RIDPKNGRTYFVDKFKN (SEQ ID NO: 216); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de IDGFYFDF (SEQ ID NO: 217); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de KGSQNVNKYLV (SEQ ID NO: 218); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de STDNLQS (SEQ ID NO: 219); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de YQYNNGFT (SEQ ID NO: 220), tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat15C8 y derivados de estos (por ejemplo, h15C8.L1H1, h15C8.L2H1, h15C8.L3H1, h15C8.L4H1, h15C8.L5H1, h15C8.L1H2, h15C8.L1H3, h15C8.L1H4, h15C8.L1H5, h15C8.L1H6, h15C8.L1H7, h15C8.L1H8, h15C8.L1H9, h15C8.L5H9 y 5C8.L5aH9a).

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁IX₂LTQSPSX₃LSASVGDRVTX₄X₅C (SEQ ID NO: 243), donde X₁ es D o N; X₂ es H o Q; X₃ es F o L; X₄ es I o L; y X₅ es S o T; una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKX₁GX₂APKLLIY (SEQ ID NO: 244), donde X₁ es L o P y X₂ es E o K; una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GX₁PSRFSGSGSGTX₂X₃TLTISSLQPEDX₄ATYX₅C (SEQ ID NO: 245), donde X₁ es I o V; X₂ es D o E; X₃ es F o Y; X₄ es A o F; y X₅ es F o Y ; y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGX₁GTX₂EIK (SEQ ID NO: 246), donde X₁ es Q o S y X₂ es L o V, o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 243-

246, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat15C8 y derivados de estos (por ejemplo, h15C8.L1H1, h15C8.L2H1, h15C8.L3H1, h15C8.L4H1, h15C8.L5H1, h15C8.L1H2, h15C8.L1H3, h15C8.L1H4, h15C8.L1H5, h15C8.L1H6, h15C8.L1H7, h15C8.L1H8, h15C8.L1H9, h15C8.L5H9 y 5C8.L5aH9a). El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena ligera: una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de NIHLTQSPSLLSASVGDRVTLSLSC (SEQ ID NO: 247); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKLGEAPKLLIY (SEQ ID NO: 248); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYFC (SEQ ID NO: 249); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 250), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 247-250, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat15C8. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 251); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 252); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GIPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYFC (SEQ ID NO: 253); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 259), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 251-253 y 259, tal como la poseída por los anticuerpos anti-TIGIT h15C8.L1H1, h15C8.L1H2, h15C8.L1H3, h15C8.L1H4, h15C8.L1H5, h15C8.L1H6, h15C8.L1H7, h15C8.L1H8 y h15C8.L1H9. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 251); una FR-L2 que

comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 252); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYFC (SEQ ID NO: 254); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 259),

5 o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 251-252, 254 y 259, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT

10 h15C8.L2H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 251); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 252); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

15 GIPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYFC (SEQ ID NO: 255); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 259), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 251-252, 255 y 259, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT

20 h15C8.L3H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 251); una FR-L2 que comprende la

25 secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 252); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GIPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 256); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 259), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más

30 variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 251-

252, 256 y 259, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L4H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 251); una FR-L2 que comprende la

5 secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 252); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 257); y/o una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTVKVEIK (SEQ ID NO: 259), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más

10 variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 251-252, 257 y 259, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L5H1 y h15C8.L5H9. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT

15 incluye un FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 251); una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 252); una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 258); y/o una FR-L4 que

20 comprende la secuencia de aminoácidos de FGQGTVKVEIK (SEQ ID NO: 259), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 251-

25 252 y 258-259, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 5C8.L5aH9a.

En algunos casos, el anticuerpo comprende además al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena

30 pesada: FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLX₁QSGX₂EX₃X₄X₅PGASVKX₆SCKASGYTFT (SEQ ID NO: 221), donde X₁ es Q o V; X₂ es A o P; X₃ es L o V; X₄ es K o Q; X₅ es K o R; y X₆ es L o V;

una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WX₁X₂QX₃PX₄QX₅LEX₆X₇G (SEQ ID NO: 222), donde X₁ es L o V; X₂ es K o R; X₃ es A o R; X₄ es G o K; X₅ es R o S; X₆ es I o W; y X₇ es I o M; una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RX₁TX₂TX₃X₄TSX₅X₆TAYMX₇LSSLX₈SED₉YX₁₀CAR (SEQ ID NO: 223), donde X₁ es A o V; X₂ es I o L; X₃ es R o T; X₄ es D o N; X₅ es A o S; X₆ es N o S; X₇ es E o Q; X₈ es R o T; X₉ es I o V; y X₁₀ es F o Y; y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGX₁X₂VTX₃SS (SEQ ID NO: 224), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 221-224, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat15C8 y derivados de estos (por ejemplo, h15C8.L1H1, h15C8.L2H1, h15C8.L3H1, h15C8.L4H1, h15C8.L5H1, h15C8.L1H2, h15C8.L1H3, h15C8.L1H4, h15C8.L1H5, h15C8.L1H6, h15C8.L1H7, h15C8.L1H8, h15C8.L1H9, h15C8.L5H9 y 5C8.L5aH9a). El anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de región variable de cadena pesada: una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLQQSGPELQRPGLSVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 225); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WLKQRPQSLEIIG (SEQ ID NO: 226); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTTNTSSNTAYMQLSSLTSED₉TAIYFCAR (SEQ ID NO: 227); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGVMTASS (SEQ ID NO: 228), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 225-228, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT rat15C8. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de

WLRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 230); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTTDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCAR (SEQ ID NO: 235); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229-230, 235 y 242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L1H1, h15C8.L2H1, h15C8.L3H1, h15C8.L4H1 y h15C8.L5H1. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 231); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTTDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCAR (SEQ ID NO: 235); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229, 231, 235 y 242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L1H2. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WLRQAPGQRLEWIG (SEQ ID NO: 232); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTTDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCAR (SEQ ID NO: 235); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229, 232, 235 y 242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT

h15C8.L1H3. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WLRQAPGQRLEIMG (SEQ ID NO: 233); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTDTASTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 235); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229, 233, 235 y 242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L1H4. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WLRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 230); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RVTLTDTASTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 236); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229-230, 236 y 242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L1H5. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WLRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 230); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATITDTASTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 237); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más

variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229-230, 237 y 242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L1H6. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WLRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 230); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 238); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229-230, 238 y 242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L1H7. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WLRQAPGQRLEIIG (SEQ ID NO: 230); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATLTTDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 239); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229-230, 239 y 242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L1H8. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WVRQAPGQRLEWVG (SEQ ID NO:

234); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 240); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229, 234, 240 y 242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT h15C8.L1H9 y h15C8.L5H9. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye un FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 229); una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de WLRQAPGQRLEIMG (SEQ ID NO: 233); una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RATITTDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 241); y/o una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos de WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 242), o una combinación de una o más de las FR anteriores y una o más variantes de estas que tienen al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con cualquiera de las SEQ ID NO: 229, 233 y 241-242, tal como la poseída por el anticuerpo anti-TIGIT 5C8.L5aH9a.

Los anticuerpos anti-TIGIT también se proporcionan que incluyen una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 60, 62, 66, 101, 103, 104, 105, 106, 107, 145, 146, 147, 148, 197, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 213, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, o 276. También se proporcionan los anticuerpos anti-TIGIT que incluyen una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 61, 63, 64, 67, 102, 108, 109, 144, 149, 150, 151, 152, 198, 208, 209, 210, 211, 212, 214, 261, 271, 272, 273, 274, 275, o 277.

- 5 En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 60, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 61. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 62, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 63. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 64. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 66, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 67. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

5 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 101, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 102. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región

10 variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 103, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo,

15 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 108. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia

20 de, SEQ ID NO: 104, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 108. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al

25 menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 105, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

30 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 108. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %,

o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 106, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 108. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 107, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 109. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 143, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 144. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 145, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 149. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 145, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo,

91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 150. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 145, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 151. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 145, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 152. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 147, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 149. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 148, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 149. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región

variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 148, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 %

5 (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 152. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96

10 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 197, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 198. En algunos casos, el anticuerpo

15 anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 199, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94

20 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 208. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

25 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 200, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 208. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región

30 variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO:

201, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 208. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye

5 una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 202, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 %

10 (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 208. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con,

15 o la secuencia de, SEQ ID NO: 203, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 208. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de

20 cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 204, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %)

25 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 208. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO:

30 205, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia

de, SEQ ID NO: 208. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 206, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 208. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 207, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 208. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 207, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 212. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 199, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 209. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96

%, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 199, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con,

5 o la secuencia de, SEQ ID NO: 210. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con,

10 o la secuencia de, SEQ ID NO: 199, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 211. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

15 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 199, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 212. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

20 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 213, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 214. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96

25 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 214. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96

30 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 260, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 %

(por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 261. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 %

5 (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 262, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

10 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 271. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

15 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 263, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

20 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 264, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

25 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 271. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

30 identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 265, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de

identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 271. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al

menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 266, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 271. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 267, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 271. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 268, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 271. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 269, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 271. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 270, y una región variable de cadena

ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 271. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de

5 cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 270, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID

10 NO: 275. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 262, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 272. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por

15 ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 262, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con,

20 o la secuencia de, SEQ ID NO: 273. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 262, y una región variable de cadena

25 ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 274. En

30

algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 262, y una

5 región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 275. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT incluye una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %,

10 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 276, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90 % (por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 %), o al menos 95 % (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia

15 de, SEQ ID NO: 277.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TIGIT, donde el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las modalidades que se proporcionan anteriormente y una VL como en cualquiera de las

20 modalidades que se proporcionan anteriormente, donde uno o ambas secuencias de dominio variable incluyen modificaciones postraduccionales.

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT descritos

25 anteriormente pueden ser capaces de unirse a TIGIT de conejo, además de TIGIT humano. En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT descritos anteriormente pueden ser capaces de unirse a TIGIT humano y TIGIT de mono cynomolgus (cyno). En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT descritos anteriormente pueden ser

30 capaces de unirse a TIGIT humano, TIGIT cyno y TIGIT de conejo. En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT descritos anteriormente (por ejemplo, 4.1D3 o un derivado de estos) pueden ser

capaces de unirse a TIGIT humano, TIGIT cyno, TIGIT de conejo, pero no TIGIT murino.

5 En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT se une a TIGIT humano con una Kd de alrededor de 10 nM o inferior y TIGIT cyno con una Kd de alrededor de 10 nM o inferior (por ejemplo, se une a TIGIT humano con una Kd de alrededor de 0.1 nM a alrededor de 1 nM y TIGIT cyno con una Kd de alrededor de 0.5 nM a alrededor de 1 nM, por ejemplo, se une a TIGIT humano con una Kd de alrededor de 0.1 nM o inferior y TIGIT cyno con una Kd de alrededor de 0.5 nM o inferior).

15 En algunas modalidades, el anticuerpo de anti-TIGIT es un anticuerpo antagonista. El anticuerpo antagonista puede unirse específicamente a TIGIT e inhibir o bloquear la interacción de TIGIT con el receptor de poliovirus (PVR) (por ejemplo, el anticuerpo antagonista inhibe la señalización intracelular mediada por unión a TIGIT a PVR). En algunos casos, el anticuerpo antagonista inhibe o bloquea la unión de TIGIT humano a PVR humano con un valor IC50 de 10 nM o menor (por ejemplo, 1 nM a alrededor de 10 nM). En algunos casos, el anticuerpo antagonista 20 inhibe o bloquea la unión de TIGIT cyno a PVR cyno con un valor IC50 de 50 nM o menor (por ejemplo, 1 nM a alrededor de 50 nM, por ejemplo, 1 nM a alrededor de 5 nM).

25 En otras modalidades, el anticuerpo anti-TIGIT puede ser un anticuerpo agonista. El anticuerpo agonista puede unirse específicamente a TIGIT y estimular la interacción de PVR con CD226 o CD96. Por ejemplo, el anticuerpo agonista puede unirse específicamente a TIGIT y estimular la interacción de PVR con CD226 y CD96 (por ejemplo, une TIGIT humano y estimula la interacción de PVR humano con CD226 humano y CD96 humano y/o une TIGIT cyno y estimula la interacción de PVR cyno con CD226 30 cyno y CD96 cyno).

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo aislado que compite por unirse a TIGIT con cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT que se describen anteriormente. En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-TIGIT descrito anteriormente.

Un anticuerpo anti-TIGIT de acuerdo con cualquiera de las modalidades que anteceden es un anticuerpo monoclonal, que comprende un anticuerpo quimérico, humano o humanizado. En una modalidad, un anticuerpo anti-TIGIT es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo de IgG intacto (por ejemplo, un anticuerpo de IgG1 intacto) u otra clase o isotipo de anticuerpo definido en la presente.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-TIGIT de acuerdo con cualquiera de las modalidades que anteceden puede incorporar cualquiera de las características, solas o combinadas, tal como se describen en las Secciones 1 a 7 a continuación.

20

1. Afinidad de anticuerpos

En determinadas modalidades, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-TIGIT) proporcionado en la presente tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0.1\text{ nM}$, $\leq 0.01\text{ nM}$, o $\leq 0.001\text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En una modalidad, la K_d se mide mediante un ensayo de unión a antígenos con radioetiquetado (RIA). En una modalidad, se realiza un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión de una solución de Fab con un antígeno

30

se mide al equilibrar Fab con una concentración mínima de un antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de un antígeno no marcado, capturando luego el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpos anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9.6), y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante entre dos y cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620) se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125}I] con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherentes con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et ál., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés se incuba luego durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar por un período más largo (por ejemplo, alrededor de 65 horas) para asegurar de que se alcance el equilibrio. A partir de allí, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Luego se retira la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0.1% en PBS. Una vez secas las placas, se agregan 150 µl/pocillo de centelleante (MICROSCINT-20™; Packard) y se realiza el conteo de las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que producen menos o el equivalente de 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra modalidad, la K_d se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmones superficiales BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo que usa un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En una modalidad, se

activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato con *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, a 5 µg/ml (~ 0.2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore® Evaluation Software versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensograma de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación (K_d) como la relación k_{off}/k_{on} . Ver, por ejemplo, Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera $10^6 M^{-1}s^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial que antecede, la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de desactivación fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso banda) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno de 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según lo medido en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con parada de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ de 8000 series (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la

presente es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, de modo no taxativo, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos que se describirán a continuación. Para ver una reseña sobre determinados fragmentos de anticuerpos, ver Hudson et ál. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para acceder a una reseña sobre fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tomo 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315, (1994); véase también WO 93/16185; y las patentes estadounidenses n.º 5,571,894 y 5,587,458. Por una discusión sobre fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida aumentada in vivo, véase la patente estadounidense N.º 5,869,046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et ál. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson et ál. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas modalidades, un anticuerpo de dominio sencillo es un anticuerpo de dominio sencillo humano (Domantis, Inc., Waltham, MA, EUA, vea, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,248,516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos pueden elaborarse mediante diversas técnicas, que incluyen, de modo no taxativo, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción mediante células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se

describe en la presente.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

5 En determinadas modalidades, un anticuerpo que se proporciona en la presente es un anticuerpo quimérico. Se describen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4,816,567 y Morrison et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no
10 humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "con conmutación de clase" donde se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos
15 quiméricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de este.

En determinadas modalidades, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en humanos, mientras que mantiene la
20 especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano original. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables donde las HVR, por ejemplo, CDR (o porciones de estas) derivan de un anticuerpo no humano y FR (o porciones de estas) derivan de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado
25 opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante humana. En algunas modalidades, algunos residuos de las FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del cual derivan los residuos de las HVR), por ejemplo,
30 para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de un anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para elaborarlos se resumen

en, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen de manera adicional, por ejemplo, en Riechmann et ál., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes estadounidenses n.º 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321 y 7,087,409; Kashmiri et ál., *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de regiones de determinación de la especificidad (SDR, por sus siglas en inglés)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "revestimiento"); Dall'Acqua et ál., *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe la "trasposición de FR"); y Osbourn et ál., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et ál., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen la estrategia de "selección orientada" para trasponer FR).

Las regiones marco humanas que pueden utilizarse para humanización incluyen, de modo no taxativo: regiones marco que se seleccionan usando el método de "mejor ajuste" (ver, por ejemplo, Sims et ál. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco que derivan de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et ál. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco humanas maduras (con mutación somática) o regiones marco de línea germinal humana (remitirse, por ejemplo, a Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco derivadas de la examinación de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca et ál., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok et ál., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden

producir mediante el uso de diversos métodos conocidos en la técnica. En términos generales, se describen los anticuerpos humanos en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

5

Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos intactos humanos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición de antígenos. Estos animales contienen normalmente la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulina humana, los cuales remplazan los loci de inmunoglobulina endógena o están presentes de forma extracromosómica o integrados de forma aleatoria en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena se encuentran generalmente inactivados. Se pueden encontrar una reseña de los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos en Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,075,181 y 6,150,584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente estadounidense n.º 5,770,429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente estadounidense n.º 7,041,870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales pueden modificarse de forma adicional mediante, por ejemplo, una combinación con una región constante humana diferente.

25

Los anticuerpos humanos también se pueden elaborar mediante métodos basados en hibridoma. Se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984), Brodeur et ál., *Monoclonal Antibody*

30

Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987) y Boerner et ál., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) También se describen anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de células B humanas en Li et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describen hibridomas humano-humano). También se describe la tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Los anticuerpos humanos pueden generarse también mediante el aislamiento de las secuencias de dominio variable del clon de Fv que se seleccionan de bibliotecas de expresión en fagos derivados de humanos. Estas secuencias de dominio variable se pueden combinar luego con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos.

5. Anticuerpos derivados de bibliotecas

Los anticuerpos de la invención se pueden aislar mediante análisis de genotecas de combinación para determinar los anticuerpos con la o las actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conocen diversos métodos para generar genotecas de expresión en fagos y analizar dichas genotecas para determinar anticuerpos con las características de unión deseadas. Dichos métodos se analizan, por ejemplo, en Hoogenboom et ál. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et ál., ed.,

- Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty et ál., *Nature* 348:552-554; Clackson et ál., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et ál., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et ál., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et ál., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et ál., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004).
- 5
- 10 En determinados métodos de expresión en fagos, se clonan repertorios de genes de VH y VL por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y se recombinan de forma aleatoria en bibliotecas de fagos que luego pueden analizarse para determinar fagos de unión a antígenos, como se describe en Winter et
- 15 ál., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Típicamente los fagos presentan fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv de cadena simple (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan al inmunógeno anticuerpos de alta afinidad sin que sea necesaria la construcción de hibridomas. De manera
- 20 alternativa, el repertorio sin inmunización puede clonarse (por ejemplo, a partir de un humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para un amplio espectro de xenoantígenos y autoantígenos sin ningún tipo de inmunización, tal como se describe en Griffiths et ál., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas sin
- 25 inmunización también pueden elaborarse de forma sintética al clonar segmentos génicos V sin reorganización a partir de células madre, y mediante el uso de cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr la reorganización *in vitro*, tal como se describe en Hoogenboom
- 30 y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente estadounidense n.º 5,750,373, y las

publicaciones de patentes estadounidenses n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

- 5 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humano o fragmentos de anticuerpo humano en la presente.

6. *Anticuerpos multiespecíficos*

10

En cualquiera de los aspectos anteriores, los anticuerpos anti-TIGIT (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de estos, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) proporcionada en la presente puede ser anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos

15

multiespecíficos pueden ser anticuerpos monoclonales con especificidades de unión con respecto a al menos dos puntos diferentes. En determinadas modalidades, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes en TIGIT. En determinadas modalidades, una de las especificidades de unión es para TIGIT y la

20

otra es para cualquier otro antígeno (por ejemplo, una segunda molécula biológica, por ejemplo, un antígeno de superficie celular, por ejemplo, un antígeno de tumor). Por consiguiente, un anticuerpo anti-TIGIT biespecífico puede tener especificidades de unión para TIGIT y una segunda molécula biológica, tal como una PD-1, PD-L1, PD-L2, OX40, PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4, o CD96. Los

25

anticuerpos biespecíficos también pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

30

En otras modalidades, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de TIGIT, OX40, PD-1, PD-L1, PD-L2. En determinadas modalidades, una de las especificidades de unión es para TIGIT y la otra es para cualquier otro antígeno (por ejemplo, una

segunda molécula biológica, tal como OX40). En otras modalidades, el anticuerpo biespecífico puede tener especificidad de unión para TIGIT y PD-L1; TIGIT y PD-L2; TIGIT y PD-1; TIGIT y CTLA-4; TIGIT y LAG3; TIGIT y TIM3; TIGIT y BTLA; TIGIT y VISTA; TIGIT y B7H4; o TIGIT y CD96, donde el anticuerpo biespecífico es preferentemente un anticuerpo antagonista para TIGIT y un anticuerpo antagonista para su segundo objetivo. En otras modalidades, el anticuerpo biespecífico puede tener especificidad de unión para TIGIT y CD226; TIGIT y CD28; TIGIT y CD27; TIGIT y CD137; TIGIT y HVEM; TIGIT y GITR; TIGIT y MICA; TIGIT y ICOS; TIGIT y NKG2D; o TIGIT y 2B4, donde el anticuerpo biespecífico es preferentemente un anticuerpo antagonista para TIGIT y para su segundo objetivo. En otras modalidades, el anticuerpo biespecífico puede tener especificidad de unión para TIGIT que no es de naturaleza antagonista (es decir, el anticuerpo biespecífico no actúa como un antagonista TIGIT).

Las técnicas para generar anticuerpos multiespecíficos incluyen, de modo no taxativo, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (ver Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker et ál., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y modificación de "botón en ojal" (remitirse, por ejemplo, a la patente estadounidense n.º 5,731,168). Se puede utilizar la modificación de "botón en ojal" de anticuerpos multiespecíficos para generar un primer brazo que contiene un botón y un segundo brazo que contiene el ojal al el cual se puede unir el botón del primer brazo. El botón de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un grupo anti-TIGIT en una modalidad. De manera alternativa, el botón de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un grupo anti-TIGIT en una modalidad. También se pueden modificar anticuerpos multiespecíficos utilizando tecnología de cruzamiento de inmunoglobulina (también conocido como intercambio de dominio Fab o

formato CrossMab) (ver por ejemplo, WO2009/080253; Schaefer et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:11187-11192 (2011)). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden elaborarse mediante el diseño de efectos de direccionamiento electroestático para generar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (WO 2009/089004A1); la reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,676,980, y Brennan et ál., *Science*, 229: 81 (1985)); el uso de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Kostelny et ál., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); el uso de tecnología de "diacuerpos" para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y el uso de dímeros de Fv de cadena simple (sFv) (ver, por ejemplo Gruber et ál., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et ál. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

En la presente también se incluyen anticuerpos modificados genéticamente con tres o más sitios de unión a antígenos funcionales, que incluyen "anticuerpos Octopus" (ver, por ejemplo, US 2006/0025576A1).

Los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de estos, también pueden incluir un "FAB de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a TIGIT así como también a otro antígeno diferente (por ejemplo, una segunda molécula biológica) (ver, por ejemplo, US 2008/0069820).

7. Variantes de anticuerpos

30

En determinadas modalidades, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención. Tal como se

describe en detalle en la presente, anticuerpos anti-TIGIT se pueden optimizar basándose en propiedades estructurales y funcionales deseadas. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones adecuadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de residuos y/o inserciones en estos y/o sustituciones de estos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución puede realizarse para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, la unión a antígenos.

15 *I. Variantes de sustitución, inserción y eliminación*

En determinadas modalidades, se proporcionan variantes de anticuerpos que presentan una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las HVR y las FR.

20 Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 con el título "sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más considerables en la Tabla 1 con el título "ejemplos de sustituciones" y tal como se describe más adelante con respecto a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y analizar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, mantenimiento/mejora de unión a antígenos, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC mejorados.

30

Tabla 1. Sustituciones de aminoácidos de ejemplo y preferidas

Residuo	Sustituciones	Sustituciones
Original	de ejemplo	preferidas
		.
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala

5	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
	Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
10	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
15	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
20	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

25

30

Se pueden agrupar los aminoácidos de acuerdo con propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

- Un tipo de variante sustitutiva implica la sustitución de uno o más residuos de regiones hipervariables de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para estudios más detallados tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, aumento de afinidad, disminución de inmunogenicidad) en comparación con el anticuerpo original y/o mantendrán sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Un ejemplo de variante sustitutiva es un anticuerpo madurado por afinidad, el cual puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de maduración por afinidad basada en la visualización de fagos tales como aquellas que se describen en la presente. Brevemente, se mutan uno o más

residuos de HVR y se presentan los anticuerpos variantes en fagos y se realiza un análisis en busca de una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

- 5 Se pueden generar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Tales alteraciones pueden realizarse en "puntos de interés" de HVR es decir, residuos codificados por codones que experimentan una mutación a una frecuencia alta durante el proceso de maduración somática (ver, por
- 10 ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o residuos que entran en contacto con el antígeno, donde la variante resultante VH o VL se evalúa para determinar la afinidad de unión. La maduración de afinidad mediante construcción y nueva selección de genotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et
- 15 ál. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas modalidades de la maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para su maduración mediante cualquiera de los diversos métodos (por ejemplo, PCR susceptible a errores, trasposición
- 20 de cadena o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Posteriormente, se crea una segunda genoteca. Luego se examina la genoteca para identificar cualesquiera variantes de anticuerpos con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se distribuyen de forma aleatoria
- 25 varios residuos HVR (por ejemplo, 4-6 residuos por vez). Los residuos HVR implicados en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, mediante la utilización de mutagénesis por barrido de alanina o modelado. En particular CDR-H3 y CDR-L3 son elegidos como objetivo.

30

En determinadas modalidades, pueden ocurrir sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o más HVR siempre que tales alteraciones

no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno. Por ejemplo, las alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras que se proporcionan en la presente) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión pueden generarse en las HVR. Estas alteraciones pueden, por ejemplo, estar fuera de los residuos que entran en contacto con el antígeno en las HVR. En determinadas modalidades de las secuencias VH y VL variantes provistas anteriormente, cada HVR o bien se encuentra sin alteraciones o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

10

Un método útil para identificar residuos o regiones de un anticuerpo que pueden elegirse como objetivos para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" tal como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, un residuo o

15

grupo de residuos objetivo (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) son identificados y reemplazados por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en

20

las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De manera alternativa o adicional, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo identifica los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos limitantes pueden elegirse como

25

objetivo o eliminarse como candidatos para sustitución. Se pueden analizar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas o no.

30

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que varían en cuanto a longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como también inserciones intrasecuencia de un único o de múltiples residuos

de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones en extremos incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo de extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a los extremos N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en suero.

II. Variantes de glicosilación

En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) se pueden alterar para aumentar o disminuir la medida en que el anticuerpo se glicosila. La adición o eliminación de sitios de glicosilación a un anticuerpo anti-TIGIT de la invención se puede lograr de forma conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o elimine uno o más sitios de glicosilación.

En los casos en que el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a este puede modificarse. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamíferos típicamente comprenden un oligosacárido ramificado y de doble antena que se une generalmente por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright et ál. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como también una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido de dos antenas. En algunas modalidades, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención pueden realizarse para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

En una modalidad, se proporcionan variantes de anticuerpos anti-TIGIT que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida

(directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en ese anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad promedio de fucosa dentro de la

5 cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) según se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tal como se describe en WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de

10 asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse aproximadamente en ± 3 aminoácidos antes o después de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Tales

15 variantes de fucosilación pueden tener mejor función de ADCC. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "defucosilados" o "deficientes de fucosa" incluyen: US

20 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et ál. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech.*

25 *Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 con deficiencia en fucosilación proteica (Ripka et ál. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente estadounidense n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams et ál.,

30 especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares desactivadas, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO desactivadas (ver, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.*

87: 614 (2004); Kanda, Y. et ál., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

Además se proporcionan variantes de anticuerpos anti-TIGIT con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, donde un oligosacárido con dos antenas unido a la región Fc del anticuerpo es bisecado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen en, por ejemplo, WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); patente estadounidense n.º 6.602.684 (Umana et al.); y US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpos se describen en, por ejemplo, WO 1997/30087 (Patel et ál.); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

III. Variantes de la región Fc

En determinadas modalidades, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), lo que genera de este modo una variante de región Fc (ver, por ejemplo, US 2012/0251531). La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En determinadas modalidades, la invención contempla una variante de anticuerpo anti-TIGIT con algunas pero no todas las funciones efectoras, lo cual la convierte en una opción conveniente para

aplicaciones en las que es importante la semivida del anticuerpo *in vivo*, pero determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la

5 reducción o eliminación de las de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión al receptor Fc (FcR) se pueden realizar para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto, probablemente carece de actividad ADCC), pero mantiene la capacidad de unión a FcRn. Las principales células para mediar células

10 ADCC, NK, solamente expresan Fc(RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se describen los ejemplos no taxativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una

15 molécula de interés en la patente estadounidense n.º 5 500 362 (ver, por ejemplo, Hellstrom, I. et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (ver Bruggemann, M. et ál., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De manera alternativa, se pueden emplear

20 métodos de ensayos no radiactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad CytoTox 96® no radiactivo (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de

25 sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y células destructoras naturales (NK, por sus siglas en inglés). De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-

30 656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a Clq para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a Clq y, por lo

tanto, carece de actividad CDC. Ver, por ejemplo, ELISA de unión a Clq y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación de complementos, se puede realizar un ensayo con CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro et ál, *J. Immunol. J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et ál. *Blood*. 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie *Blood*. 103:2738-2743 (2004)). También se pueden realizar determinaciones de unión a FcRn y eliminación/semivida *in vivo* de utilizando métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Petkova S.B. et ál. *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

10

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen los que tienen sustitución de uno o más residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patentes estadounidenses N.º 6,737,056 y 8,219,149). Dichos mutantes de Fc incluyen los mutantes de Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el mutante Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patente estadounidense n.º 7,332,581 y 8,219,149).

15

En determinadas modalidades, la prolina en la posición 329 de una región Fc humana de tipo salvaje en el anticuerpo se sustituye con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande para destruir el sándwich de prolina dentro de la interfaz de receptor de Fc/Fc.gamma. que se forma entre la prolina 329 de la Fc y los residuos de triptófano Trp 87 y Trp 110 de FcγRIII (Sondermann et ál.: *Nature* 406, 267-273 (20 Jul. 2000)). En determinadas modalidades, el anticuerpo comprende al menos una sustitución de aminoácido adicional. En una modalidad, la sustitución de aminoácido adicional es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S, y aun en otra modalidad la al menos una sustitución de aminoácido adicional es L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humano o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humano (ver por ejemplo, US 2012/0251531), y aun en otra modalidad la al menos una sustitución de aminoácido adicional es L234A

20

25

30

y L235A y P329G de la región Fc de IgG1 humano.

Se describen determinadas variantes de anticuerpos con unión a FcR mejorada o disminuida. (Ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,737,056; WO 2004/056312, y Shields et ál., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

En determinadas modalidades, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunas modalidades, se realizan modificaciones en la región Fc que dan como resultado la unión a Clq modificada (es decir, ya sea mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente de complementos (CDC), por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense n.º 6,194,551, WO 99/51642, e Idusogie et ál. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternal al feto (Guyer et ál., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et ál., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et ál.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ella que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las que tienen sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo de la región Fc 434 (patente estadounidense n.º 7,371,826).

Ver también Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); patente

estadounidense N°. 5,648,260; patente estadounidense N°. 5,624,821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

- 5 En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) comprende una región Fc que comprende una mutación N297G.

- 10 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TIGIT (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) comprende uno o más dominios constantes de cadena pesada, donde el o los dominios constantes de cadena pesada se seleccionan de un primer dominio CH1 (CH1₁), un primer dominio CH2 (CH2₁), un primer dominio CH3 (CH3₁), un
- 15 segundo dominio CH1 (CH1₂), segundo dominio CH2 (CH2₂) y un segundo dominio CH3 (CH3₂). En algunos casos, al menos uno del o de los dominios constantes de cadena pesada se empareja con otro dominio constante de cadena pesada. En algunos casos, cada uno de los dominios CH3₁ y CH3₂ comprende una protuberancia o cavidad y la protuberancia o
- 20 cavidad en el dominio CH3₁ se puede colocar en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH3₂. En algunos casos, los dominios CH3₁ y CH3₂ se encuentran en una interferencia entre dicha protuberancia y cavidad. En algunos casos, cada uno de los dominios CH2₁ y CH2₂ comprende una protuberancia o cavidad y la
- 25 cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH2₂. En otros casos, los dominios CH2₁ y CH2₂ se encuentran en una interferencia entre dicha protuberancia y cavidad. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIGIT es un anticuerpo de IgG1.

30

IV. Variantes de anticuerpos modificados genéticamente con cisteína

En determinadas modalidades, puede ser deseable crear anticuerpos modificados genéticamente con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los cuales uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modalidades particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, se ubican grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros restos, por ejemplo restos de fármacos o restos fármaco-enlazadores, para crear un inmunoconjugado, tal como se describe adicionalmente en el presente. En determinadas modalidades, uno cualquiera o más de los siguientes residuos se puede sustituir con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de cadena pesada. Los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7,521,541.

V. Derivados de anticuerpos

En determinadas modalidades, un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) proporcionado en la presente puede modificarse adicionalmente para contener restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y se encuentran disponibles con facilidad. Los restos adecuados para la obtención del anticuerpo incluyen, de modo no taxativo, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no taxativos de polímeros solubles en agua incluyen, de modo no taxativo, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímeros de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil

pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propopilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de estos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener 5 ventajas de fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, en caso de unión de más de un polímero, estos pueden ser la misma molécula o moléculas diferentes. En general, la cantidad y/o el tipo 10 de polímeros utilizados para la derivación se puede determinar en función de consideraciones que incluyen, de modo no taxativo, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se desea mejorar, si el derivado de anticuerpo se utilizará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

15

En otra modalidad, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteináceo que se pueden calentar selectivamente por exposición a radiación. En una modalidad, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 20 (2005)). La radiación se puede producir a cualquier longitud de onda e incluye, de modo no taxativo, longitudes de onda que no dañan las células comunes, pero que calientan el resto no proteináceo a una temperatura a la que se destruyen las células próximas al resto no proteico del anticuerpo.

25

I. Composiciones y métodos recombinantes

Los anticuerpos anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) se puede producir utilizando 30 composiciones y métodos recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4,816,567, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En una

modalidad, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-TIGIT descrito en el presente. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otra modalidad, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una modalidad adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En dicha modalidad, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una modalidad, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una modalidad, se proporciona un método para elaborar un anticuerpo anti-TIGIT, donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se describió anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o medio de cultivo de células hospedadoras).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-TIGIT, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, tal como se describió anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Tal ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas

de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de
5 vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o
eucariotas descritas en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos se
pueden producir en bacterias, en particular cuando no son necesarias
la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de
10 fragmentos y polipéptidos de anticuerpos en bacterias, véanse, por
ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5,648,237, 5,789,199 y
5,840,523. (Remitirse también a Charlton, *Methods in Molecular
Biology*, tomo. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003),
páginas 245-254, que describe la expresión de fragmentos de
15 anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se
puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción
soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los
hongos filamentosos o la levadura son huéspedes de clonación o de
20 expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos,
incluyendo cepas de hongos y levadura cuyas vías de glicosilación se
han "humanizado", dando lugar a la producción de un anticuerpo con un
patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Ver Gerngross,
Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), y Li et ál., *Nat. Biotech.* 24:210-
25 215 (2006).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo
glicosilado también derivan de organismos multicelulares
(invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de
30 invertebrados incluyen las células de plantas e insectos. Se han
identificado numerosas cepas de baculovirus que pueden utilizarse
junto con células de insectos, particularmente para la transfección de

células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar como hospedadores los cultivos celulares vegetales. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden utilizar células de vertebrados como hospedadoras. Por ejemplo, se pueden utilizar líneas celulares de mamíferos que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles son las líneas de células CV1 de riñón de mono transformadas mediante SV40 (COS-7); la línea embrionaria renal humana (293 o células 293, tal como se describe, por ejemplo, en Graham et ál., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, por sus siglas en inglés), células de riñón caninas (MDCK; células de hígado de rata y búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), tumor de mama de ratón (MMT 060562), células TRI, tal como se describe, por ejemplo, en Mather et ál., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas células CHO DHFR- (Urlaub et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una reseña de determinadas líneas celulares hospedadoras de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, ver, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

II. Inmunoconjugados

La invención proporciona también inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de estas) o isótopos radioactivos.

En una modalidad, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) donde un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos que incluyen, de modo no taxativo, un maitansinoide (véanse las patentes estadounidenses n.º 5,208,020, 5,416,064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco de monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes estadounidenses n.º 5,635,483 y 5,780,588, y 7,498,298); una dolastatina; una caliqueamicina o un derivado de esta (véanse las patentes estadounidenses n.º 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 y 5,877,296; Hinman et ál., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993) y Lode et ál., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (vea Kratz et ál., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et ál., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et ál., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et ál., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et ál., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002) y la patente estadounidense n.º 6,630,579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

- En otra modalidad, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-TIGIT como se describe en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) conjugado con una toxina
- 5 enzimáticamente activa o un fragmento de esta, incluyendo, de modo no taxativo, cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas
- 10 diantina, proteínas *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidores de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.
- 15 En otra modalidad, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-TIGIT tal como se describe en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Se encuentra a disposición una variedad de isótopos radiactivos para la producción de
- 20 radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, tc99m o I123 , o una etiqueta de rotación para imagenología por resonancia magnética
- 25 nuclear (NMR) (también denominada imagenología por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.
- 30 Los conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico pueden realizarse utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato

(SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído),
 5 compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina
 10 se puede preparar tal como se describe en Vitetta et ál., *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético etiquetado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Ver W094/11026. El enlazador puede ser un "enlazador
 15 escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lábil a ácidos, un enlazador sensible a la peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari et ál., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992), patente estadounidense n.º 5,208,020).

20

Los inmunoconjugados o ADC en la presente contemplan expresamente, pero no se limitan a dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, de modo no taxativo, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS,
 25 sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EUA).

30 **III. Métodos y composiciones para diagnóstico y detección**

En determinadas modalidades, cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT

de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) es útil para detectar la presencia de TIGIT en una muestra biológica. Tal como se usa en la presente, el término "detectar" abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En determinadas modalidades, una muestra biológica comprende una célula o un tejido.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo anti-TIGIT para uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de TIGIT en una muestra biológica. En determinadas modalidades, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-TIGIT tal como se describe en la presente en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-TIGIT a TIGIT, y detectar si se formó un complejo entre el anticuerpo anti-TIGIT y TIGIT. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*.

En determinadas modalidades, se proporcionan anticuerpos anti-TIGIT etiquetados. Las etiquetas incluyen, de modo no taxativo, etiquetas o restos que se detectan directamente (tales como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, electrodensas, quimioluminiscentes y radiactivas), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los ejemplos de etiquetas incluyen, de modo no taxativo, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , and ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos térreos poco comunes o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense N° 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas, por ejemplo, oxidasas de glucosa, oxidasas de

galactosa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tal como uricasa y oxidasa xantina, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de salto, etiquetas bacteriófagas, radicales libres estables y similares.

IV. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) se preparan mediante la mezcla de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de composiciones liofilizadas o soluciones acuosas. Por lo general, los portadores farmacéuticamente aceptables no son tóxicos para quienes los reciben en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, de modo no taxativo: soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA, azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como

sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables de la presente incluyen adicionalmente agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas de hialouronidasa activa neutral soluble (SHASEGP, por su sigla en inglés), por ejemplo, glicoproteínas de hialouronidasa PH-20 humanas solubles, como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinados SHASEGP de ejemplo y métodos de uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las patentes estadounidenses n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, un SHASEGP se combina con una o más glicosaminoglicanasas adicionales tales como condroitinasas.

En algunos casos, una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-TIGIT proporcionado en la presente puede además incluir un antagonista de unión al eje PD-1, tal como un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1, y un antagonista de unión a PD-L2.

En algunos casos, una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-TIGIT proporcionado en la presente puede además incluir un agonista de unión OX40, tal como un anticuerpo agonista OX40, un fragmento agonista OX40L, un receptor oligomérico OX40 y una inmunoadhesina OX40.

En algunos casos, una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-TIGIT proporcionado en la presente puede incluir además un agente terapéutico adicional, tal como un agente quimioterapéutico o un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios (por ejemplo, PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4, y/o CD96).

En otras modalidades, una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-TIGIT puede incluir además (a) un antagonista de unión al eje PD-1 y un agonista de unión a OX40; (b) un antagonista de unión al eje PD-1 y un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico); (c) un antagonista de unión al eje PD-1 y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales (por ejemplo, PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4, y/o CD96); (d) un agonista de unión a OX40 y un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico); (e) un agonista de unión a OX40 y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales (por ejemplo, PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4, y/o CD96); (f) un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales (por ejemplo, PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4, y/o CD96); (g) un antagonista de unión al eje PD-1, un agonista de unión a OX40 y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales (por ejemplo, PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4, y/o CD96). Opcionalmente, la composición farmacéutica incluirá uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones de anticuerpo liofilizado de ejemplo se describen en la patente estadounidense n.º 6,267,958. Las composiciones de anticuerpo acuoso incluyen aquellas descritas en la patente estadounidense n.º 6,171,586 y WO2006/044908, las composiciones de esta última incluyen un amortiguador histidina-acetato.

La composición de la presente también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo,

puede desearse proporcionar además un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento y/o un agente antihormonal, como los que se describen arriba en la presente). Esos ingredientes activos se encuentran presentes de manera adecuada en combinación en cantidades eficaces a los efectos previstos.

Los ingredientes activos pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices se encuentran en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las composiciones que se han de usar para la administración *in vivo* por lo general son estériles. La esterilización se puede lograr fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

V. Métodos terapéuticos

Cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) se puede

utilizar en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TIGIT para su uso como un medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) para utilizar en el tratamiento o retrasar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un sujeto. En determinadas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIGIT para utilizar en un método para tratar un sujeto que tiene una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario que está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En otras modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario es una infección viral. En determinadas modalidades, la infección viral es una infección viral crónica. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por respuesta disminuida a la estimulación antigénica. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por anergia de linfocitos T o la capacidad reducida para secretar citocinas, proliferar o ejecutar la actividad citolítica. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por el agotamiento de linfocitos T. En algunas modalidades, los linfocitos T son linfocitos T CD4+ y CD8+. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T incluye una infección aguda no curada, una infección crónica e inmunidad tumoral.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) para tratar o retrasar la evolución de un cáncer en un sujeto. En determinadas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer no microcítico, un cáncer microcítico, un cáncer celular renal, un cáncer colorrectal, un cáncer de ovarios, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un carcinoma gástrico, un

cáncer de vejiga, un cáncer esofágico, un mesotelioma, un melanoma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de tiroides, un sarcoma, un cáncer de próstata, un glioblastoma, un cáncer cervical, un carcinoma tímico, una leucemia, un linfoma, una mieloma (por ejemplo, mieloma múltiple (MM)), micosis fungoide, un cáncer de células de Merkel y una neoplasia maligna hematológica. Por lo tanto, es posible tratar una variedad de cánceres o retrasar su evolución. En algunas modalidades, el individuo puede tener cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo). En otras modalidades, el individuo puede tener

10 cáncer pancreático (por ejemplo, adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)). En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer pulmonar no microcítico. El cáncer pulmonar no microcítico puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer pulmonar de células pequeñas. El cáncer pulmonar de

15 células pequeñas puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer de células renales. El cáncer pulmonar de células renales puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer colorrectal. El cáncer

20 colorrectal puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de mama. El cáncer de mama puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas

25 modalidades, el individuo tiene cáncer pancreático. El cáncer pancreático puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un carcinoma gástrico. El carcinoma gástrico puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de

30 vejiga. El cáncer de vejiga puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de esófago. El cáncer de esófago puede encontrarse en una etapa inicial o

etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene mesotelioma. El mesotelioma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene melanoma. El melanoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de cabeza y cuello. El cáncer de cabeza y cuello puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de tiroides. El cáncer de tiroides puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene sarcoma. El sarcoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de próstata. El cáncer de próstata puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene glioblastoma. El glioblastoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de cuello de útero. El cáncer de cuello de útero puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un carcinoma tímico. El carcinoma tímico puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene leucemia. La leucemia puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene linfomas. El linfoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un mieloma (por ejemplo, MM). El mieloma (por ejemplo, MM) puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene micosis fungoide. La micosis fungoide puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer de células de Merkel. El cáncer de células de Merkel puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene neoplasia maligna hematológica. La neoplasia maligna hematológica puede encontrarse en una etapa temprana o etapa tardía.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) para utilizar al aumentar, potenciar o estimular una

5 respuesta inmunitaria o función en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, la función o respuesta inmunitaria aumenta, se potencia y/o estimula al activar las células efectoras (por ejemplo, células T, por ejemplo, células CD8+ y/o células CD4+), expandir (aumentar) una población de células efectoras y/o destruir células

10 objetivo (por ejemplo, células tumorales objetivo) en el sujeto. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4 y/o CD8 en el individuo presentan actividad aumentada o potenciada de cebado, activación, proliferación, liberación de citocina y/o citolítica con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades,

15 se eleva la cantidad de linfocitos T CD4 y/o CD8 con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades, se eleva la cantidad de linfocitos T CD4 y/o CD8 activados con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4 y/o CD8 se caracterizan por la producción de

20 linfocitos T CD4 y/o CD8 que producen γ -IFN⁺ y/o actividad citolítica potenciada con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4 y/o CD8 T exhiben liberación aumentada de citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IFN- γ , TNF- α e interleucinas. En algunas modalidades de

25 los métodos de la presente invención, el linfocitos T CD4 y/o CD8 es un linfocito T de memoria efectora. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4 y/o CD8 de memoria efectora se caracterizan por la producción de linfocitos T CD4 y/o CD8 que producen γ -IFN⁺ y/o actividad citolítica mejorada. En algunas modalidades, el linfocito T

30 CD4 y/o CD8 de memoria efectora se caracteriza por la expresión de CD44^{elevado} CD62L^{bajo}. En algunas modalidades, el cáncer elevó los niveles de infiltración de linfocitos T.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo anti-TIGIT puede ser para utilizar en combinación con un antagonista TIGIT diferente, un antagonista de unión al eje PD-1, un agonista de unión a OX40, un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales, y/o un agente terapéutico adicional, tal como un agente terapéutico, tal como un agente quimioterapéutico, como se describe en detalle en la presente.

- 10 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) en la fabricación o preparación de un medicamento. En una modalidad, el medicamento es para tratar o retrasar la evolución de un cáncer. En modalidades adicionales, el
- 15 medicamento es para tratar o demorar la evolución de un cáncer no microcítico, un cáncer microcítico, un cáncer celular renal, un cáncer colorrectal, un cáncer de ovarios, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un carcinoma gástrico, un cáncer de vejiga, un cáncer esofágico, un mesotelioma, un melanoma, un cáncer de cabeza y cuello,
- 20 un cáncer de tiroides, un sarcoma, un cáncer de próstata, un glioblastoma, un cáncer cervical, un carcinoma tímico, una leucemia, un linfoma, una mieloma, micosis fungoide, un cáncer de células de Merkel o una neoplasia maligna hematológica. Por lo tanto, es posible tratar una variedad de cánceres o retrasar su evolución. En algunas
- 25 modalidades, el individuo puede tener cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo). En otras modalidades, el individuo puede tener cáncer pancreático (por ejemplo, adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)). En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer pulmonar no microcítico. El cáncer pulmonar no microcítico
- 30 puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer pulmonar de células pequeñas. El cáncer pulmonar de células pequeñas puede encontrarse en

una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer de células renales. El cáncer pulmonar de células renales puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer colorrectal. El

5 cáncer colorrectal puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de mama. El

10 cáncer de mama puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer pancreático. El cáncer pancreático puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un carcinoma gástrico. El carcinoma gástrico puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene

15 cáncer de vejiga. El cáncer de vejiga puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de esófago. El cáncer de esófago puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene mesotelioma. El mesotelioma puede encontrarse en una etapa inicial o

20 etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene melanoma. El melanoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de cabeza y cuello. El cáncer de cabeza y cuello puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de

25 tiroides. El cáncer de tiroides puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene sarcoma. El sarcoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de próstata. El cáncer de próstata puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En

30 algunas modalidades, el individuo tiene glioblastoma. El glioblastoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de cuello de útero. El cáncer

de cuello de útero puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un carcinoma tímico. El carcinoma tímico puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene leucemia.

- 5 La leucemia puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene linfomas. El linfoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un mieloma (por ejemplo, MM). El mieloma (por ejemplo, MM) puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene micosis fungoide. La micosis fungoide puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer de células de Merkel. El cáncer de células de Merkel puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene neoplasia maligna hematológica. La neoplasia maligna hematológica puede encontrarse en una etapa temprana o etapa tardía.
- 10
- 15

- En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) en la elaboración de un medicamento para tratar o retrasar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario es una infección viral. En determinadas modalidades, la infección viral es una infección viral crónica. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por respuesta disminuida a la estimulación antigénica. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por anergia de linfocitos T o la capacidad reducida para secretar citocinas, proliferar o ejecutar la actividad
- 20
- 25
- 30

citolítica. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por el agotamiento de linfocitos T. En algunas modalidades, los linfocitos T son linfocitos T CD4+ y CD8+. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T incluye una infección aguda no curada, una infección crónica e inmunidad tumoral.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) en la elaboración de un medicamento para utilizar al aumentar, potenciar o estimular una respuesta inmunitaria o función en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, la función o respuesta inmunitaria aumenta, se potencia y/o estimula al activar las células efectoras (por ejemplo, células T, por ejemplo, células CD8+ y/o células CD4+), expandir (aumentar) una población de células efectoras y/o destruir células objetivo (por ejemplo, células tumorales objetivo) en el sujeto. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4 y/o CD8 en el individuo presentan actividad aumentada o potenciada de cebado, activación, proliferación, liberación de citocina y/o citolítica con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades, se eleva la cantidad de linfocitos T CD4 y/o CD8 con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades, se eleva la cantidad de linfocitos T CD4 y/o CD8 activados con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4 y/o CD8 se caracterizan por la producción de linfocitos T CD4 y/o CD8 que producen γ -IFN⁺ y/o actividad citolítica potenciada con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4 y/o CD8 T exhiben liberación aumentada de citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IFN- γ , TNF- α e interleucinas. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, el linfocito T CD4 y/o CD8 es un

linfocito T de memoria efectora. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4 y/o CD8 de memoria efectora se caracterizan por la producción de linfocitos T CD4 y/o CD8 que producen γ -IFN⁺ y/o actividad citolítica mejorada. En algunas modalidades, el linfocito T CD4 y/o CD8 de memoria efectora se caracteriza por la expresión de CD44^{elevado} CD62L^{bajo}. En algunas modalidades, el cáncer elevó los niveles de infiltración de linfocitos T.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el medicamento se puede formular para utilizar en combinación con un antagonista TIGIT diferente, un antagonista de unión al eje PD-1, un agonista de unión a OX40, un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales, y/o un agente terapéutico adicional, tal como un agente terapéutico, tal como un agente quimioterapéutico, como se describe en detalle en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o demorar la evolución de un cáncer en un sujeto, el método que comprende administrarle a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), tratando de este modo o demorando la evolución del cáncer en el sujeto. En determinadas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer no microcítico, un cáncer microcítico, un cáncer celular renal, un cáncer colorrectal, un cáncer de ovarios, un cáncer de mama, un cáncer pancreático, un carcinoma gástrico, un cáncer de vejiga, un cáncer esofágico, un mesotelioma, un melanoma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de tiroides, un sarcoma, un cáncer de próstata, un glioblastoma, un cáncer cervical, un carcinoma tímico, una leucemia, un linfoma, una mieloma, micosis fungoide, un cáncer de células de Merkel y una neoplasia maligna hematológica. Por lo tanto, es posible tratar una variedad de cánceres o retrasar su evolución. En algunas

modalidades, el individuo puede tener cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo). En otras modalidades, el individuo puede tener cáncer pancreático (por ejemplo, adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)). En algunas modalidades, el individuo tiene un

5 cáncer pulmonar no microcítico. El cáncer pulmonar no microcítico puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer pulmonar de células pequeñas. El cáncer pulmonar de células pequeñas puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo

10 tiene un cáncer de células renales. El cáncer pulmonar de células renales puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer colorrectal. El cáncer colorrectal puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de ovario.

15 El cáncer de ovario puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de mama. El cáncer de mama puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer pancreático. El cáncer pancreático puede encontrarse en una etapa inicial o etapa

20 tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un carcinoma gástrico. El carcinoma gástrico puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de vejiga. El cáncer de vejiga puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene

25 cáncer de esófago. El cáncer de esófago puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene mesotelioma. El mesotelioma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene melanoma. El melanoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En

30 algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de cabeza y cuello. El cáncer de cabeza y cuello puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de

tiroides. El cáncer de tiroides puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene sarcoma. El sarcoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de próstata. El cáncer de próstata puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene glioblastoma. El glioblastoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene cáncer de cuello de útero. El cáncer de cuello de útero puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un carcinoma tímico. El carcinoma tímico puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene leucemia. La leucemia puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene linfomas. El linfoma puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un mieloma (por ejemplo, MM). El mieloma (por ejemplo, MM) puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene micosis fungoide. La micosis fungoide puede encontrarse en una etapa inicial o en una etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene un cáncer de células de Merkel. El cáncer de células de Merkel puede encontrarse en una etapa inicial o etapa tardía. En algunas modalidades, el individuo tiene neoplasia maligna hematológica. La neoplasia maligna hematológica puede encontrarse en una etapa temprana o etapa tardía.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o demorar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un sujeto, el método que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), tratando de este modo o demorando la evolución de la

enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en el sujeto. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunas modalidades, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario es una infección viral. En determinadas modalidades, la infección viral es una infección viral crónica. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por respuesta disminuida a la estimulación antigénica. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por anergia de linfocitos T o la capacidad reducida para secretar citocinas, proliferar o ejecutar la actividad citolítica. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por el agotamiento de linfocitos T. En algunas modalidades, los linfocitos T son linfocitos T CD4+ y CD8+. En algunas modalidades, el trastorno disfuncional de linfocitos T incluye una infección aguda no curada, una infección crónica e inmunidad tumoral.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para aumentar, potenciar o estimular una respuesta inmunitaria o función en un sujeto, que comprende administrarle a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), de este modo aumentando, potenciando o estimulando una respuesta inmunitaria o función en el sujeto. En algunas modalidades, la función o respuesta inmunitaria aumenta, se potencia y/o estimula al activar las células efectoras (por ejemplo, células T, por ejemplo, células CD8+ y/o células CD4+), expandir (aumentar) una población de células efectoras y/o destruir células objetivo (por ejemplo, células tumorales objetivo) en el sujeto. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, los linfocitos T CD4 y/o CD8 en el individuo presentan actividad aumentada o potenciada de cebado, activación, proliferación, liberación de citocina y/o citolítica con respecto a

antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, se eleva la cantidad de linfocitos T CD4 y/o CD8 con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, se eleva la cantidad de linfocitos T CD4 y/o CD8 activados con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, los linfocitos T CD4 y/o CD8 se caracterizan por la producción de linfocitos T CD4 y/o CD8 que producen γ -IFN⁺ y/o actividad citolítica potenciada con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, los linfocitos T CD4 y/o CD8 exhiben liberación aumentada de citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IFN- γ , TNF- α e interleucinas. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, el linfocito T CD4 y/o CD8 es un linfocito T de memoria efectora. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, los linfocitos T CD4 y/o CD8 de memoria efectora se caracterizan por la producción de linfocitos T CD4 y/o CD8 que producen γ -IFN⁺ y/o actividad citolítica mejorada. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, el linfocito T CD4 y/o CD8 de memoria efectora se caracterizan por tener la expresión de CD44^{elevada} CD62L^{baja}. En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, el cáncer tiene niveles elevados de infiltración de linfocitos T.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo anti-TIGIT puede ser para la administración en combinación con un antagonista TIGIT diferente, un antagonista de unión al eje PD-1, un agonista de unión a OX40, un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales, y/o un agente terapéutico adicional, tal como un agente terapéutico, tal como un agente quimioterapéutico, como se describe en detalle en la presente.

En algunas modalidades, el antagonista TIGIT diferente (segundo) puede ser un antagonista de la actividad y/o la expresión de TIGIT, tal como un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un
5 fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor. En algunas modalidades, el antagonista TIGIT es un anticuerpo anti-TIGIT diferente o fragmento de unión al antígeno de este (por ejemplo, uno que se une a un epítipo
10 diferente en TIGIT que o no se superpone o solo se superpone parcialmente con el epítipo reconocido por el anticuerpo anti-TIGIT de la invención que se utiliza). En algunas modalidades, el antagonista TIGIT es un ácido nucleico inhibidor seleccionado de un polinucleótido antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico y una quimera de
15 ARN y ADN.

En algunas modalidades, el antagonista TIGIT puede ser un agente que modula la actividad y/o expresión CD226. Por ejemplo, un agente que modula la expresión CD226 y/o actividad que es capaz de aumentar y/o
20 estimular la actividad y/o expresión de CD226; aumentar y/o estimular la interacción de CD226 con PVR, PVRL2, y/o PVRL3; y aumentar y/o estimular la señalización intracelular mediada por CD226 a PVR, PVRL2 y/o PVRL3. Tal como se usa en la presente, un agente es capaz de aumentar y/o estimular la expresión de CD226 y/o actividad incluye, de
25 modo no taxativo, agentes que aumentan y/o estimulan la actividad y/o expresión de CD226. Tal como se usa en la presente, un agente que es capaz de aumentar y/o estimular la interacción de CD226 con PVR, PVRL2, y/o PVRL3 incluye, de modo no taxativo, agentes que aumentan y/o estimulan la interacción de CD226 con PVR, PVRL2 y/o PVRL3. Tal
30 como se usa en la presente, un agente que es capaz de aumentar y/o estimular la señalización intracelular mediada por la unión de CD226 a PVR, PVRL2, y/o PVRL3 incluye, de modo no taxativo, agentes que aumentan y/o estimulan la señalización intracelular mediada por unión

de CD226 a PVR, PVRL2, y/o PVRL3.

En algunas modalidades, el agente que modula la actividad y/o expresión de CD226 se selecciona de un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT, un antagonista de la actividad y/o la expresión de PVR, un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVR, un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL2, un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL3, un agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR, un agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL2, un agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL3, y combinaciones de estos.

En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor. En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT es un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión al antígeno de este (por ejemplo, uno que se une a un epítipo diferente en TIGIT que o no se superpone o solo se superpone parcialmente con el epítipo reconocido por el anticuerpo anti-TIGIT de la invención que se utiliza). En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT es un ácido nucleico inhibidor seleccionado de un polinucleótido antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico y una quimera de ARN y ADN.

En algunas modalidades, el antagonista de la actividad y/o la expresión de PVR es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor. En algunas

modalidades, el antagonista de la actividad y/o la expresión de PVR se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor.

5

En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVR es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor.

- 10 En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVR se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor. En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la
- 15 interacción de TIGIT con PVRL2 se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor. En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL3 se selecciona de un
- 20 inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor.

- 25 En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor. En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por
- 30 la unión de TIGIT a PVR se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de inhibición y un polipéptido

inhibidor. En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL2 se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un
5 ácido nucleico de inhibición y un polipéptido inhibidor. En algunas modalidades, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL3 se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o un fragmento de unión al antígeno de este, un aptámero, un ácido nucleico de
10 inhibición y un polipéptido inhibidor.

Otros antagonistas de TIGIT que se pueden utilizar en combinación con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención incluyen los anticuerpos anti-TIGIT y las composiciones que contienen tales anticuerpos
15 descritos en WO 2009/126688, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

En algunos casos, los métodos proporcionados en la presente incluyen la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de unión al
20 eje PD-1, antes de, posterior a, o junto con un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (y, opcionalmente, uno o más agentes adicionales, tal como un segundo antagonista TIGIT diferente, un agonista de unión a OX40, un agentes quimioterapéutico, etc.). El antagonista de unión al eje PD-1 se puede seleccionar del grupo que consiste en un antagonista
25 de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

En algunas modalidades del aspecto anterior, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-1. En algunas
30 modalidades, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión a ligandos. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En

algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 tanto a PD-L1 como a PD-L2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), CT-011 (pidilizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108.

En otras modalidades del aspecto anterior, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo se selecciona del grupo que consta de: MPDL3280A (atezolizumab), YW243.55.S70, MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab), y MSB0010718C (avelumab).

En otras modalidades del aspecto anterior, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L2 es un anticuerpo. En algunas modalidades, el antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

En líneas generales, la cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de unión al eje PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1) se puede administrar a un humano se encontrará en el rango de alrededor de 0.01 a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal del paciente en una o más administraciones. En algunas modalidades, por ejemplo, el antagonista (por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-L1) se administra en una dosis de alrededor de 0.01 a alrededor de 45 mg/kg,

alrededor de 0.01 a alrededor de 40 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 35 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 30 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 25 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 20 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 15 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 10 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 5 mg/kg, o alrededor de 0.01 a alrededor de 1 mg/kg administrado a diario, por ejemplo. En algunas modalidades, el antagonista (por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-L1) se administra a 15 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación.

10 En una modalidad, un antagonista de unión al eje PD-1 (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1) se administra a una dosis de alrededor de 100 mg, alrededor de 200 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 400 mg, alrededor de 500 mg, alrededor de 600 mg, alrededor de 700 mg, alrededor de 800 mg, alrededor de 900 mg, alrededor de 1000 mg, alrededor de 1100 mg, alrededor de 1200 mg, alrededor de 1300 mg, alrededor de 1400 mg, o alrededor de 1500 mg. En algunas modalidades, un antagonista de unión al eje PD-1 (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1) se administra a una dosis de alrededor de 800 mg a alrededor de 850 mg cada dos semanas. En algunas modalidades, un antagonista de unión al eje PD-1 (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1) se administra a una dosis de alrededor de 840 mg cada dos semanas. La dosis se puede administrar como una sola dosis o como múltiples dosis (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tales como infusiones. La dosis del anticuerpo administrado en un tratamiento de combinación se puede reducir en comparación con un solo tratamiento. En algunas modalidades, por ejemplo, el método para tratar o retrasar la evolución de cáncer de mama metastásico o avanzado localmente en un individuo comprende un régimen de dosificación que comprende ciclos de tratamiento, donde al individuo se le administra, en los días 1 y 15 de cada ciclo, un antagonista de unión al eje de PD-1 humano (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1) a una dosis de alrededor de 840 mg, donde cada ciclo es de 28 días (es decir, cada ciclo se repite cada 28 días). La evolución de

este tratamiento se controla fácilmente mediante técnicas convencionales.

5 En algunas modalidades, el agonista de unión a OX40 incluye, por ejemplo, un anticuerpo agonista de OX40 (por ejemplo, un anticuerpo agonista anti-OX40 humano), un fragmento agonista de OX40L, un receptor oligomérico de OX40 y una inmunoadhesina de OX40.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 agota las células que expresan OX40 humano (por ejemplo, linfocitos T efectores CD4+, linfocitos T CD8+, y/o células Treg), por ejemplo, mediante ADCC y/o fagocitosis. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 se une a OX40 humano con una afinidad de menos que o igual a alrededor 1 nM (por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 0.5 nM, por ejemplo, 15 menos que o igual a alrededor de 0.45 nM, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 0.4 nM, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 0.3 nM). En algunas modalidades, la afinidad de unión del anticuerpo agonista OX40 se determina mediante un radioinmunoensayo.

20 En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 se une a OX40 humano y OX40 de cynomolgus. En modalidades adicionales, la unión a OX40 humano y OX40 cynomolgus se determina utilizando un ensayo FACS. En algunas modalidades, la unión a OX40 humano tiene un EC50 de menos que o igual a alrededor de 1 µg/ml (por ejemplo, menos que o igual a 25 alrededor de 0.7 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 0.5 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 0.4 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 0.3 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 0.2 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 0.1 µg/ml). En algunas modalidades, la unión a 30 OX40 cynomolgus tiene un EC50 de menos que o igual a alrededor de 3 µg/ml (por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 2 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 1.7 µg/ml, por ejemplo,

menos que o igual a alrededor de 1.5 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 1.4 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 1.3 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 1.2 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 1.1 µg/ml, por ejemplo, menos que o igual a alrededor de 1.0 µg/ml).

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 aumenta la proliferación de linfocitos T efectores CD4+ y/o aumenta la producción de citocinas por parte de los linfocito T efectores CD4+ en comparación con la proliferación y/o la producción de citocinas antes del tratamiento con el anticuerpo agonista de OX40. En algunas modalidades, la citocina es IFN-γ.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 aumenta la proliferación de linfocitos T de memoria y/o una mayor producción de citocinas por parte de las células de la memoria. En algunas modalidades, la citocina es IFNγ.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 inhibe la supresión de Treg de la función de linfocitos T efectores. En algunas modalidades, la función de los linfocitos T efectores es la proliferación de linfocitos T efectores y/o la producción de citocinas. En algunas modalidades, el linfocito T efector es un linfocito T efector CD4+.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 aumenta la transducción de señal de OX40 en una célula objetivo que expresa OX40. En algunas modalidades, la transducción de señal de OX40 se detecta controlando la señalización de NFκB corriente abajo.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 es estable luego del tratamiento a 40°C durante una a cuatro semanas, por ejemplo, una

semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 es estable después del tratamiento a 40 °C durante dos semanas.

- 5 En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende un polipéptido Fc de IgG1 variante que comprende una mutación que elimina la unión a células efectoras humanas, tiene menos actividad con respecto a un anticuerpo agonista OX40 que comprende una parte de Fc de IgG1 de secuencia natural. En algunas modalidades, el anticuerpo
- 10 agonista de OX40 comprende una parte de Fc variante que comprende una mutación DANA.

En algunas modalidades, la reticulación del anticuerpo es necesaria para la función del anticuerpo antagonista anti-OX40 humano.

15

- En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 278, 279 o 280, (ii) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 281, 282, 283,
- 20 284, 285 o 286 y (iii) un HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 287, 288, o 289; y (b) un dominio VL que comprende (i) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290, (ii) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 291, y (iii) un HVR-L3 que
- 25 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298 o 299. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 278; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 281; (c) HVR-H3
- 30 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 287; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:

- 291; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de la SEQ ID NO: 292. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 278; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 281; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 287; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 291; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de la SEQ ID NO: 297. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 278; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 281; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 287; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 291; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de la SEQ ID NO: 298.
- En otras modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende una secuencia VH que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 300-325. Por ejemplo, el anticuerpo agonista OX40 comprende una secuencia VH que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 300 (por ejemplo, donde un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o eliminados en la SEQ ID NO: 300). Por lo tanto, en algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende una VH que comprende una, dos o tres HVR que se seleccionan de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 278, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 281 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 287.

En otras modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende una secuencia VL que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 326-351. Por ejemplo, el anticuerpo agonista OX40 comprende una VL que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 326 (por ejemplo, donde un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o eliminados en la SEQ ID NO: 326). Por lo tanto, en algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 comprende una VL que comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 290; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 291; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 292.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende (a) una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 300; (b) una secuencia VL de la SEQ ID NO: 326; o (c) una secuencia VH tal como en (a) y una secuencia VL tal como en (b).

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende (a) una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 319; (b) una secuencia VL de la SEQ ID NO: 345; o (c) una secuencia VH tal como en (a) y una secuencia VL tal como en (b).

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 comprende (a) una secuencia de VH de la SEQ ID NO: 320; (b) una secuencia VL de la SEQ ID NO: 346; o (c) una secuencia VH tal como en (a) y una secuencia VL tal como en (b).

También se contemplan específicamente los anticuerpos agonistas OX40, tal como un anticuerpo que comparte las mismas secuencias de HVR o

sustancialmente las mismas y/o secuencias VH y VL de los anticuerpos anti.OX40 descritos en la patente estadounidense n.º 7,550,140 y la publicación internacional n.º WO 2014/148895 y WO 2013/038191,, que se incorporan en la presente mediante esta referencia en su totalidad.

5

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 es L106 BD (producto de Pharmingen n.º 340420). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de región hipervariable (HVR) del anticuerpo L106 (producto de BD Pharmigen n.º 340420). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo L106 (producto de BD Pharmigen n.º 340420).

10

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista OX40 es ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, catálogo n.º 20073). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de región hipervariable (HVR) del anticuerpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, catálogo n.º 20073). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, catálogo n.º 20073).

20

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 es MEDI6469. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de región hipervariable (HVR) del anticuerpo MEDI6469. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo MEDI6469.

25

30

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 es MEDI0562. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres,

cuatro, cinco o seis secuencias de región hipervariable (HVR) del anticuerpo MEDI0562. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo MEDI0562.

5

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 es un anticuerpo agonista que se une al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos agonistas de OX40 previamente indicados.

- 10 En cualquiera de las modalidades anteriores, el anticuerpo agonista OX40 puede ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, anticuerpo IgG1) o un fragmento de anticuerpo.

- 15 Los agonistas de OX40 útiles en los métodos descritos en la presente no pretenden limitarse de forma alguna a anticuerpos. En la técnica se conocen y contemplan agonistas de OX40 no anticuerpos.

- 20 Tal como se describió anteriormente, OX40L (también conocido como CD134L) sirve como ligando de OX40. De esta forma, los agonistas que presentan parte o todo el OX40L pueden servir como agonistas de OX40. En algunas modalidades, el agonista de OX40 puede incluir uno o más dominios extracelulares de OX40L. Los ejemplos de dominios extracelulares de OX40L pueden incluir dominios de unión a OX40. En algunas modalidades, un agonista de OX40 puede ser una forma soluble de OX40L que incluye uno o más dominios extracelulares de OX40L pero carece de otros dominios insolubles de la proteína, por ejemplo, dominios transmembrana. En algunas modalidades, un agonista de OX40 es una proteína soluble que incluye uno o más dominios extracelulares de OX40L que pueden unirse a OX40L. En algunas modalidades, un agonista de OX40 puede enlazarse a otro dominio de proteína, por ejemplo, para aumentar su eficacia, semivida u otras características deseadas. En algunas modalidades, el agonista de OX40 puede incluir uno o más

dominios extracelulares de OX40L enlazados a un dominio Fc de inmunoglobulina.

5 En algunas modalidades, un agonista de OX40 puede ser una molécula oligomérica o multimérica. Por ejemplo, un agonista de OX40 puede incluir uno o más dominios (por ejemplo, un dominio de cremallera de leucina) que permita la oligomerización de proteínas. En algunas modalidades, el agonista de OX40 puede incluir uno o más dominios extracelulares de OX40L enlazados a uno o más dominios de cremallera
10 de leucina.

En algunas modalidades, un agonista de OX40 puede ser cualquiera de los agonistas de OX40 descritos en la patente europea n.º EP0672141 B1.

15 En algunas modalidades, un agonista de OX40 puede ser una proteína de fusión de OX40L trimérica. Por ejemplo, un agonista de OX40 puede incluir uno o más dominios extracelulares de OX40L enlazados a un dominio Fc de inmunoglobulina y un dominio de trimerización (incluido,
20 de modo no taxativo, un dominio de cremallera de isoleucina).

En algunas modalidades, un agonista de OX40 puede ser cualquiera de los agonistas de OX40 descritos en la publicación internacional n.º WO2006/121810, como una inmunoadhesina de OX40. En algunas
25 modalidades, la inmunoadhesina de OX40 puede ser una proteína OX40-Fc trimérica. En algunas modalidades, el agonista de OX40 es MEDI6383.

Tales terapias de combinación mencionadas anteriormente abarcan la administración combinada, donde el anticuerpo anti-TIGIT y el uno o
30 más agentes (por ejemplo, antagonista de unión al eje PD-1, agonista de unión a OX40, agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales, y/o agente terapéutico

adicional) están incluidos en las mismas formulaciones o en formulaciones separadas, y en la administración separada, donde la administración del anticuerpo anti-TIGIT de la invención puede ocurrir antes de, de forma simultánea y/o después de la administración del uno o más agentes (por ejemplo, antagonista de unión al eje de PD-1, agonista de unión a OX40, agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales y/o agente terapéutico adicional). En una modalidad, la administración del anticuerpo anti-TIGIT y la administración de uno o más de los agentes ocurren dentro de alrededor de un mes, o dentro de alrededor de una, dos o tres semanas, o dentro de alrededor de uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis días, de cada uno. Los anticuerpos anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) también se puede utilizar en combinación con terapia de radiación.

Un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (y/o cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, que incluye la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunas modalidades, el anticuerpo se administra mediante administración subcutánea. En algunas modalidades, un anticuerpo anti-TIGIT administrado mediante inyección subcutánea exhibe una respuesta menos tóxica en un paciente que el mismo anticuerpo anti-TIGIT administrado mediante inyección intravenosa. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tal como por vía intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En la presente se contemplan varias pautas de dosificación, que incluyen, de modo no taxativo, administraciones simples o múltiples durante varios

momentos, administración por bolo e infusión por pulso.

Los anticuerpos anti-TIGIT de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una manera coherente con la buena
5 práctica médica. Los factores que deberán considerarse en este contexto incluyen el trastorno particular que se esté tratando, el mamífero particular que se esté tratando, la condición médica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el cronograma
10 de administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, aunque no es necesario. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de
15 trastorno o tratamiento, y otros factores mencionados anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y mediante las mismas vías de administración como se describe en la presente, o alrededor de 1 a 99% de las dosificaciones descritas en la presente, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine de
20 forma empírica/clínicamente adecuada.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis apropiada de un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), cuando se usa
25 solo o en combinación con uno o más agentes adicionales (por ejemplo, antagonista de unión de eje de PD-1, agonista de unión a OX40, agente que disminuye o inhibe uno o más receptores co-inhibidores inmunitarios adicionales, y/o agente terapéutico adicional) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo utilizado, la
30 gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica y la respuesta al anticuerpo del paciente, y el

criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente en un momento o en una serie de tratamientos.

Como premisa general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-TIGIT que se administra a un humano se encontrará en el intervalo de alrededor de 0.01 a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea mediante una o más administraciones. En algunas modalidades, el anticuerpo utilizado es de alrededor de 0.01 a alrededor de 45 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 40 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 35 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 30 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 25 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 20 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 15 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 10 mg/kg, alrededor de 0.01 a alrededor de 5 mg/kg, o alrededor de 0.01 a alrededor de 1 mg/kg administrado a diario, por ejemplo. En una modalidad, un anticuerpo anti-TIGIT descrito en la presente se administra a un humano a una dosis de alrededor de 100 mg, alrededor de 200 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 400 mg, alrededor de 500 mg, alrededor de 600 mg, alrededor de 700 mg, alrededor de 800 mg, alrededor de 900 mg, alrededor de 1000 mg, alrededor de 1100 mg, alrededor de 1200 mg, alrededor de 1300 mg o alrededor de 1400 mg el día 1 en ciclos de 21 días. La dosis se puede administrar como una sola dosis o como múltiples dosis (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tales como infusiones. Por lo general, en el caso de administraciones repetidas durante varios días o más, según cuál sea la afección, el tratamiento generalmente se mantiene hasta que se produzca una eliminación deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosificación del anticuerpo generalmente se encuentra en el intervalo de alrededor de 0.05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de estas). Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por

ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente reciba de alrededor de dos a alrededor de veinte o, por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo anti-TIGIT). Se puede administrar una dosis de carga inicial mayor seguida por una o más dosis menores. Se puede controlar la evolución de esta terapia fácilmente mediante ensayos y técnicas convencionales.

En algunas modalidades, los métodos pueden comprender además una terapia adicional. La terapia adicional puede ser una terapia de radiación, cirugía, quimioterapia, terapia génica, terapia de ADN, terapia viral, terapia de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, terapia de anticuerpo monoclonal o una combinación de los anteriores. La terapia adicional puede ser en forma de terapia adyuvante o neoadyuvante. En algunas modalidades, la terapia adicional es la administración de un inhibidor enzimático de molécula pequeña o agente antimetastásico. En algunas modalidades, la terapia adicional es la administración de agentes que limitan los efectos secundarios (por ejemplo, agentes destinados a aminorar la aparición y/o gravedad de efectos secundarios del tratamiento, como agentes antieméticos, etc.). En algunas modalidades, la terapia adicional es terapia de radiación. En algunas modalidades, la terapia adicional es cirugía. En algunas modalidades, la terapia adicional es una combinación de radioterapia y cirugía. En algunas modalidades, la terapia adicional es radiación gamma. En algunas modalidades, la terapia adicional puede ser una administración separada de uno o más de los agentes terapéuticos descritos anteriormente.

VI. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación o un kit que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos que se

describieron anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado a recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden estar compuestos por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que, por sí misma o combinada con otra composición, es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o vial que tenga un tapón que pueda perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-TIGIT de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se utiliza en el tratamiento de la afección seleccionada. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición allí incluida, donde la composición comprende un anticuerpo de la invención y (b) un segundo recipiente con una composición allí incluida, donde la composición comprende otro agente citotóxico o terapéutico de otro modo. El artículo de fabricación en esta modalidad de la invención puede comprender además un prospecto que indique que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. De manera alternativa o adicional, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Adicionalmente, puede comprender otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, lo que incluye otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

En una modalidad, se proporciona un kit que incluye un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este,

por ejemplo, 4.1D3.Q1E) y un prospecto que comprende instrucciones para utilizar el anticuerpo anti-TIGIT para tratar o demorar la evolución del cáncer en un sujeto o para tratar o demorar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un sujeto.

- 5 En una modalidad relacionada, la invención muestra un kit que incluye un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), un antagonista de unión al eje PD-1 (por ejemplo, un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1, y un antagonista de unión a PD-L2), y un prospecto
- 10 que comprende instrucciones para utilizar el anticuerpo anti-TIGIT para tratar o demorar la evolución del cáncer en un sujeto o para tratar o demorar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un sujeto. En una modalidad relacionada, la invención muestra un kit que incluye un anticuerpo anti-TIGIT de la
- 15 invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), un agonista de unión a OX40 (por ejemplo, un anticuerpo agonista de OX40, un fragmento agonista de OX40L, un receptor oligomérico OX40, y una inmunoadhesina de OX40), y un prospecto que comprende instrucciones para utilizar el anticuerpo anti-TIGIT para
- 20 tratar o demorar la evolución del cáncer en un sujeto o para tratar o demorar la evolución de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un sujeto. En una modalidad relacionada, la invención muestra un kit que incluye un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E),
- 25 un antagonista de unión al eje PD-1 (por ejemplo, un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2), un agonista de unión a OX40 (por ejemplo, un anticuerpo agonista de OX40, un fragmento agonista de OX40L, un receptor oligomérico OX40, y una inmunoadhesina de OX40), y un
- 30 prospecto que comprende instrucciones para utilizar el anticuerpo anti-TIGIT para tratar o demorar la evolución del cáncer en un sujeto o para tratar o demorar la evolución de una enfermedad relacionada con

el sistema inmunitario en un sujeto. En cualquiera de las modalidades anteriores, el sujeto puede, por ejemplo, ser un ser humano. Se contempla de forma específica que cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT, agonistas de unión a OX40, y antagonistas de unión al eje PD-1 descritos en la presente se pueden incluir en el kit.

En aun otra modalidad, se proporciona un kit que incluye un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E) y un prospecto que comprende instrucciones para aumentar, mejorar o estimular una respuesta inmunitaria o función en un sujeto. En una modalidad relacionada, la invención muestra un kit que incluye un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), un antagonista de unión al eje PD-1 (por ejemplo, un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1, y un antagonista de unión a PD-L2), y un prospecto que comprende instrucciones para aumentar, mejorar o estimular una respuesta inmunitaria o función en un sujeto. En una modalidad relacionada, la invención muestra un kit que incluye un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), un agonista de unión a OX40 (por ejemplo, un anticuerpo agonista de OX40, un fragmento agonista de OX40L, un receptor oligomérico OX40, y una inmuno adhesina de OX40), y un prospecto que comprende instrucciones para utilizar el anticuerpo anti-TIGIT para aumentar, mejorar o estimular una respuesta inmunitaria o función en un sujeto. En una modalidad relacionada, la invención muestra un kit que incluye un anticuerpo anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, 4.1D3 o una variante de este, por ejemplo, 4.1D3.Q1E), un antagonista de unión al eje PD-1 (por ejemplo, un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2), un agonista de unión a OX40 (por ejemplo, un anticuerpo agonista de OX40, un fragmento agonista de OX40L, un receptor oligomérico OX40, y una inmuno adhesina de OX40), y

un prospecto que comprende instrucciones para utilizar el anticuerpo anti-TIGIT para aumentar, mejorar o estimular una respuesta inmunitaria o función en un sujeto. En cualquiera de las modalidades anteriores, el sujeto puede, por ejemplo, ser un ser humano. Se contempla de forma específica que cualquiera de los anticuerpos anti-TIGIT, agonistas de unión a OX40, y antagonistas de unión al eje PD-1 descritos en la presente se pueden incluir en el kit.

EJEMPLOS

La invención podrá ser comprendida adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, los que se proporcionan con fines ilustrativos y que no pretenden ser taxativos.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos anti-TIGIT

Ratas Sprague Dawley o ratas transgénicas OMT (Open Monoclonal Technology, Palo Alto, CA) se co-inmunizaron con una dosis inicial de forma subcutánea de 50 µg de proteína TIGIT humana (Genentech, Inc.) y 50 µg de proteína TIGIT de mono cynomolgus (cyno) (Genentech, Inc.) mezclada con adyuvante completo de Freund (BD, Franklin Lakes, NJ), seguido por 25 µg de proteína TIGIT humana y 25 µg de proteína TIGIT cyno diluida en PBS en múltiples sitios de forma subcutánea e intraperitoneal cada dos semanas.

Se cultivaron múltiples nódulos linfáticos tres días después de la última inmunización. Los linfocitos B de estas ratas se enriquecieron utilizando la selección negativa con anticuerpos biotinilados que se dirigen a linfocitos que no son B de rata (BD; eBioscience, San Diego, CA) y perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Miltenyi, San Diego, CA). La población de linfocitos B resultantes se fusionó con células de mieloma de ratón P3X63-Ag8U.1 (American Type Culture

Collection, Rockville, MD) mediante electrofusión (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Las células fusionadas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 7%, durante la noche en Medio C (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada), antes de la suspensión en Medio D semisólido (StemCell Technologies) con un IgG-FITC anti-rata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se colocaron en bandejas Omniwell (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY). Siete días después de colocarlas en placas, se seleccionaron colonias fluorescentes y se transfirieron a placas de cultivo de 96 pocillos (BD) que contienen Medio E (StemCell Technologies) usando un Clonepix FL (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA contra proteína TIGIT humana siete días luego de selección de colonia. Se recubrieron placas de 384 pocillos (Greiner Microton, Greiner Bio-One, Monroe, NC) con 1 µg/ml de proteína diluida en amortiguador de carbonato de sodio 0.05 M, pH 9.6, y se incubó durante la noche a 4°C. Luego los pocillos se bloquearon con 100 µl de PBS que contiene BSA al 0.5 % y Tween-20 al 0.5 % durante una hora a temperatura ambiente. Luego del lavado, los sobrenadantes y/o suero se agregaron a 50 µl y se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la detección de anticuerpos específicos, los anticuerpos IgG antirrata conjugados con peroxidasa de rábano picante (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) se diluyeron a una concentración optimizada en PBS que contiene BSA al 0.5 % y Tween-20 al 0.5 % y se agregó a 50 µl por pocillo luego del lavado, y las placas se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS 100 µl que contenían Tween-20 al 0.05 %. Se agregó 50 µl de sustrato de TMB (BioFX, Owings Mills, MD) y las placas se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente, seguido por la adición de 50 µl de solución de detención (BioFX), y luego se leyó a 630 nm. Las líneas celulares de hibridoma de unión a TIGIT humano se expandieron y cultivaron durante dos a cuatro días, luego se analizaron mediante ELISA contra TIGIT humano, TIGIT cyno, y proteínas de TIGIT de ratón (Genentech, Inc.). El sobrenadante de

líneas celulares de reacción cruzada humanas y cyno se cultivaron y purificaron mediante proteína G (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Se analizaron aproximadamente 500 clones. Del análisis, los clones 4.1D3, 7.4A3 y 4.1A4 se identificaron de la inmunización de ratas OMT, y los clones 1.6B2, 1.10A5, 1.7E7 y 1.15C8 se identificaron de la inmunización de ratas Sprague Dawley.

Ejemplo 2. Optimización de anticuerpos anti-TIGIT

10 A. Pulido de anticuerpo monoclonal anti-TIGIT derivado de rata OMT

Para evitar la formación de piroglutamato no deseado para los clones 4.1A4, 4.1D3 y 7.4A3 (también denominado como 1A4, 1D3 y 4A3, respectivamente) y para resolver el problema de residuos de cisteína no emparejados para los clones 4.1A4 y 7.4A3, se generaron las siguientes variantes de anticuerpo anti-TIGIT optimizado: 4.1A4.C96S.Q1E, 4.1A4.C96Y.Q1E, 4.1D3.Q1E, 7.4A3.C96S.Q1E, y 7.4A3.C96Y.Q1E (también denominado como 1A4.C96S.Q1E, 1A4.C96Y.Q1E, 1D3.Q1E, 4A3.C96S.Q1E, y 4A3.C96Y.Q1E, respectivamente). Tal como se describe más adelante en la Tabla 2, las afinidades de estas cinco variantes optimizadas para TIGIT de mono cynomolgus y humano luego se determinaron mediante resonancia de plasmones superficiales (SRP) (análisis BIACORE™) y se compararon con los de sus clones parentales respectivas.

25

Brevemente, un chip biosensor CM5 de serie S se activó con reactivos de clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del distribuidor (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ), y un kit de captura de anticuerpo humano se aplicó para acoplar IgG de Fc anti-humano de cabra para lograr aproximadamente 10,000 unidades de respuesta (RU, por sus siglas en inglés) en cada célula de flujo,

30

seguido por bloqueo de grupos sin reaccionar con etanolamina 1M.

Para las mediciones de cinética, cada clon se capturó para lograr aproximadamente 250 RU y una serie de 5 diluciones de antígeno de TIGIT (1.23 nM a 300 nM) se inyectó en amortiguador HBS-P (HEPES 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15M, tensioactivo al 0.005 % P20) a 25 °C (tasa de flujo: 30µl/min) sin regeneración entre inyecciones. Los sensogramas se registraron y evaluaron mediante BIAcore™ T200 Evaluation Software (versión 2.0) luego de la sustracción de la señal de célula de referencia. Las tasas de asociación (k_{on}) y tasas de disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir. Se calcula la constante de equilibrio de disociación (K_D) como la relación k_{off}/k_{on} .

Tabla 2. Mediciones de afinidad de BIAcore™ para variantes de anticuerpo 1A4, 1D3 y 4A3 derivado de rata de OMT contra TIGIT humano y cyno

mAb xTIGIT	TIGIT humano			TIGIT cyno		
	Kon (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	KD (nM)	Kon (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	KD (nM)
1A4	3.42	12.2	3.57	2.66	6.43	2.42
1A4.C96S.Q1E	12.5	367.9	29.4	13.4	169.1	12.6

1A4.C96Y.Q1E	-	-	>100	-	-	>100
1D3	38.4	16.4	0.43	6.21	20.7	3.33
1D3.Q1E	17.2	9.7	0.56	4.78	15.4	3.22
4A3	3.02	10.4	3.44	3.34	6.99	2.09
4A3.C96S.Q1E	2.88	8.56	2.97	2.76	5.56	2.01
4A3.C96Y.Q1E	3.72	364.7	98.0	3.95	140.5	35.6

Los clones 4.1A4.C96S.Q1E, 7.4A3.C96S.Q1E y 4.1D3.Q1E se consideraron como moléculas finales con afinidad de unión similar y aceptable para TIGIT humano y cyno mediante comparación con los clones parentales. Los análisis de BIACORE™ adicionales revelaron que el clon 4.1D3.Q1E, en particular, fue capaz de reaccionar de forma cruzada y unirse a TIGIT de conejo con afinidad nanomolar baja (Tabla 3).

Tabla 3. 4.1D3.Q1E es capaz de reaccionar de forma cruzada con TIGIT humano, cyno, y de conejo

Fuente	Clon	Análisis de cinética BIAcore		
		TIGIT humano	TIGIT cyno	TIGIT de conejo
		Afinidad monovalente (nM)		
OMT	4.1D3.Q1E	0.56	3.2	4.9
	7.4A3.Q1E.C96S	2.97	2.01	>500
de ratón	h1A5.L2H8	5.76	> 500	>500

B. Humanización de anticuerpos monoclonales anti-TIGIT derivados de rata SD

Los anticuerpos monoclonales 1.6B2, 1.10A5, 1.7E7 y 1.15C8 (referidas en la presente como 6B2, 10A5, 7E7 y 15C8, respectivamente) se humanizaron tal como se describe más adelante. Los números de residuos son de acuerdo con Kabat et ál. (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª. Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Para la humanización del anticuerpo 6B2, las regiones hipervariables del anticuerpo 6B2 de rata (rat6B2) se diseñaron en sus marcos aceptores humanos más cercanos para generar 6B2 humanizado (h6B2.L1H1). Específicamente, desde el dominio rat6B2 VL, las

posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) se injertaron en la línea germinal humana IGKV1-33*01. A partir del dominio VH de rat6B2, las posiciones 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) se injertaron en la línea germinal humana IGHV2-5*08. Además, la posición 43 en el marco II de VL y las posiciones 69, 73, 78 en el marco III de VH se

5 retuvieron de la secuencia de rata en h6B2.L1H1. Se halló que aquellos residuos eran parte de los residuos marco que actuaban como la zona "Vernier", que puede ajustar la estructura CDR/HVR y adaptar el ajuste del antígeno. Ver, por ejemplo, Foote y Winter, *J. Mol. Biol.* 224: 487-499 (1992). Estas definiciones de CDR/HVR incluyen las posiciones

10 definidas por su hipervariabilidad de secuencia (Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970)), su ubicación estructural (Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987)) y su participación en los contactos de antígeno-anticuerpo (MacCallum et ál. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).

15

Las variantes 6B2 humanizadas adicionales se generaron al modificar cada residuo de rata de h6B2.L1H1 en la zona Vernier de vuelta al residuo de línea germinal humana y estas variantes son h6B2.L2H1 (VL: S43A), h6B2.L1H2 (VH: V69I), h6B2.L1H3 (VH: A73T), h6B2.L1H4 (VH: A78V), h6B2.L1H5 (VH: V69I, A73T, A78V), y h6B2.L2H5 (VL: S43A, VH: V69I, A73T, A78V; una versión completamente humanizada).

20

25

Para la humanización del anticuerpo 10A5, las regiones hipervariables del anticuerpo 10A5 de rata (rat10A5) se diseñaron en sus marcos aceptores humanos más cercanos para generar 10A5 humanizado (h10A5.L1H1). Específicamente, desde el dominio rat10A5 VL, las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) se injertaron en la línea germinal humana IGKV3-15*01. A partir del dominio VH de rat10A5, las posiciones 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) se injertaron en la línea germinal humana IGHV2-5*08. Además, la posición 43 en el marco II y la posición 58 en el marco III de VL y las posiciones 69 y 78 en el marco III de VH se retuvieron de la secuencia de rata en

30

h10A5.L1H1. Se halló que esos residuos eran parte de los residuos marco que actúan como la zona "Vernier" tal como se describe anteriormente.

- 5 Las variantes 10A5 humanizadas adicionales se generaron al modificar cada residuo de rata de h10A5.L1H1 en la zona Vernier de vuelta al residuo de línea germinal humana y estas variantes son h10A5.L2H1 (VL: S43A), h10A5.L3H1 (VL: V58I), h10A5.L4H1 (VL: S43A, V58I), h10A5.L1H2 (VH: V69I), h10A5.L1H3 (VH: A78V), h10A5.L1H4 (VH: V69I, A78V), y
- 10 h10A5.L4H4 (VL: S43A, V58I, VH: V69I, A78V; una versión completamente humanizada).

- Para la humanización del anticuerpo 7E7, las regiones hipervariables del anticuerpo 7E7 de rata (rat7E7) se diseñaron en sus marcos
- 15 aceptores humanos más cercanos para generar 7E7 humanizado (h7E7.L1H1). Específicamente, desde el dominio rat7E7 VL, las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) se injertaron en la línea germinal humana IGKV1-9*01. A partir del dominio VH de rat7E7, las posiciones 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) se injertaron en
- 20 la línea germinal humana IGHV1-3*01. Además, las posiciones 58, 71 y 87 en el marco III de VL, las posiciones 47, 48 en el marco II de VH y las posiciones 67, 69, 71, 91 y 93 en el marco III de VH se retuvieron de la secuencia de rata en h7E7.L1H1. Se halló que esos residuos eran parte de los residuos marco que actúan como la zona "Vernier" tal como
- 25 se describe anteriormente.

- Las variantes 7E7 humanizadas adicionales se generaron al modificar cada residuo de rata de h7E7.L1H1 en la zona Vernier de vuelta al residuo de línea germinal humana y estas variantes son h7E7.L2H1 (VL: I58V), h7E7.L3H1 (VL: Y71F), h7E7.L4H1 (VL: F87Y), h7E7.L5H1 (VL: I58V, Y71F, F87Y), h7E7.L1H2 (VH: I47W), h7E7.L1H3 (VH: I48M), h7E7.L1H4 (VH: A67V), h7E7.L1H5 (VH: L69I), h7E7.L1H6 (VH: A71R),
- 30

h7E7.L1H7 (VH: F91Y), h7E7.L1H8 (VH: T93A), h7E7.L1H9 (VH: I47W, I48M, A67V, L69I, A71R, F91Y, T93A), y h7E7.L5H9 (VL: I58V, Y71F, F87Y, VH: I47W, I48M, A67V, L69I, A71R, F91Y, T93A; una versión completamente humanizada).

5

Para la humanización del anticuerpo 15C8, las regiones hipervariables del anticuerpo 15C8 de rata (rat15C8) se diseñaron en sus marcos aceptores humanos más cercanos para generar 15C8 humanizado (h15C8.L1H1). Específicamente, desde el dominio rat15C8 VL, las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) se injertaron en la línea germinal humana IGKV1-9*01. A partir del dominio VH de rat15C8, las posiciones 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) se injertaron en la línea germinal humana IGHV1-3*01. Además, las posiciones 58, 71 y 87 en el marco III de VL, las posiciones 37, 47 y 48 en el marco II de VH y las posiciones 67, 69, 71 y 91 en el marco III de VH se retuvieron de la secuencia de rata en h15C8.L1H1. Se halló que esos residuos eran parte de los residuos marco que actúan como la zona "Vernier" tal como se describe anteriormente.

10

15

20

Las variantes 15C8 humanizadas adicionales se generaron al modificar cada residuo de rata de h15C8.L1H1 en la zona Vernier de vuelta al residuo de línea germinal humana y estas variantes son h15C8.L2H1 (VL: I58V), h15C8.L3H1 (VL: Y71F), h15C8.L4H1 (VL: F87Y), h15C8.L5H1 (VL: I58V, Y71F, F87Y), h15C8.L1H2 (VH: L37V), h15C8.L1H3 (VH: I47W), h15C8.L1H4 (VH: I48M), h15C8.L1H5 (VH: A67V), h15C8.L1H6 (VH: L69I), h15C8.L1H7 (VH: T71R), h15C8.L1H8 (VH: F91Y), h15C8.L1H9 (VH: L37V, I47W, I48M, A67V, L69I, T71R, F91Y) y h7E7.L5H9 (VL: I58V, Y71F, F87Y, VH: L37V, I47W, I48M, A67V, L69I, T71R, F91Y; una versión completamente humanizada).

25

30

Las primeras versiones humanizadas, h6B2, L1H1, h10A5.L1H1, h7E7, L1H1 y h15C8.L1H1, que contienen CDR de rata y residuos marco en posiciones

Vernier, y las versiones completamente humanizadas, h6B2.L2H5, h10A5.L4H4, h7E7.L5H9 y h15C8.L5H9, que contienen solo CDR de rata fueron sometidas a medición de afinidad de BIAcore al compararla con los anticuerpos de rata originales, rat6B2, rat10A5, rat7E7 y rat15C8.

- 5 Para las determinaciones de afinidad de unión de los anticuerpos TIGIT en comparación con TIGIT humano, TIGIT de mono cynomolgus y TIGIT de barrido de alanina humano por cinética de ciclo único, se utilizó medición de resonancia de plasmones superficiales (SRP) con un instrumento BIAcore™-T200, tal como se describe anteriormente. Los
- 10 resultados BIAcore™ en la Tabla 4, más adelante, indican que todas las variantes humanizadas exhiben una disminución en la afinidad de unión (es decir, un aumento en la K_D) de alrededor de 5 a 10 veces contra TIGIT cyno y humano. Las versiones completamente humanizadas de h6B2.L2H5 y h10A5.L4H4 muestran, sorprendentemente, afinidad de unión
- 15 similar como las primeras versiones humanizadas de h6B2.L1H1 y h10A5.L1H1, lo cual sugiere que los residuos marco rat6B2 y rat10A5 en las posiciones Vernier no contribuyen a la unión de TIGIT cyno y humano. Por lo tanto, ambos h6B2.L2H5 y h10A5.L4H4 representan la versión humanizada final para rat6B2 y rat10A5, respectivamente. En
- 20 contraste, las versiones completamente humanizadas de h7E7.L5H9 y h15C8.L5H9 perdieron la capacidad de unir TIGIT humano y cyno.

- Para aclarar adicionalmente qué residuos marco de rata en las posiciones Vernier para los primeros anticuerpos humanizados h7E7, L1H1, y h15C8.L1H1 son cruciales para la unión, todas las variantes de
- 25 pulido de marco estuvieron sometidas a medición de afinidad de BIAcore. Para el pulido de marco 7E7, las variantes de h7E7.L1H2, h7E7.L1H9, y h7E7.L5H9 que contienen sustitución de VH: I47W muestran una disminución de afinidad de unión de TIGIT cyno y humana de más de
- 30 100 veces, y variantes de h7E7.L3H1 y h7E7.L5H1, que contienen sustitución de VL: Y71F muestran una disminución de afinidad de unión de TIGIT cyno de alrededor de 2-3 veces. Por lo tanto, ambos residuos

marco de rata VH: I47 y VL: Y71 se mantuvieron en la versión humanizada 7E7 final, llamada h7E7.L5aH9a, para retener unión de TIGIT humano y cyno. Para el pulido de marco 15C8, las variantes de h15C8.L1H3, h15C8.L1H9, y h15C8.L5H9, que contienen sustitución de VH: I47W muestran una disminución de afinidad de unión de TIGIT cyno y humana de más de 100 veces, y variantes de h15C8.L3H1 y h15C8.L5H1 que contienen sustitución de VL: Y71F muestran una disminución de afinidad de unión de TIGIT cyno y humano de alrededor de 2-3 veces. Otras variantes, h15C8.L1H2, h15C8.L1H5 y h15C8.L1H7, que contienen sustitución VH: L37V, A67V y T71R, respectivamente, también muestran una disminución de afinidad de unión de TIGIT humano de alrededor de 2-3 veces. Por lo tanto, todos los cinco residuos marco de rata VH: I47, L37, A67, T71 y VL: Y71 se mantuvieron en la versión humanizada 15C8 final, llamada h15C8.L5aH9a, para retener unión de TIGIT humano y cyno.

Tabla 4. Resumen de mediciones de afinidad de BIACORE™ para variantes de anticuerpo 6B2, 10A5, 7E7 y 15C8 derivados de rata de SD contra TIGIT humano y cyno

	mAb xTIGIT	TIGIT humano			TIGIT cyno		
		Kon (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	KD (nM)	Kon (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	KD (nM)
5	rat6B2	9.97	0.35	0.04	6.88	2.02	0.29
10	h6B2.L1H1	46.7	25.3	0.54	12.3	11.8	0.96
	h6B2.L2H5	46.5	22.2	0.48	12.8	12.4	0.97
	rat10A5	9.05	0.84	0.09	6.78	2.81	0.41
15	h10A5.L1H1	45.7	23.8	0.52	14.7	12.7	0.86
	h10A5.L4H4	52.1	22.7	0.44	15.2	12.9	0.85
	rat7E7	5.68	0.18	0.03	3.99	0.27	0.07
20	h7E7.L1H1	20.6	4.76	0.23	4.18	1.52	0.36
	h7E7.L2H1	20.6	5.04	0.24	4.93	1.79	0.36
	h7E7.L3H1	9.2	2.18	0.24	12.8	12.2	0.95
	h7E7.L4H1	29.5	7.96	0.27	6.29	2.74	0.44
	h7E7.L5H1	32.1	10.4	0.32	5.75	3.24	0.56
25	h7E7.L1H2	-	-	>100	-	-	>100
30	h7E7.L1H3	28.2	10.7	0.38	9.08	3.81	0.42
	h7E7.L1H4	27.9	7.49	0.27	6.01	2.43	0.40
	h7E7.L1H5	32.4	12.9	0.40	8.98	3.59	0.40

5	h7E7.L1H6	18.5	6.48	0.35	6.41	2.84	0.44
	h7E7.L1H7	27.4	8.49	0.31	6.64	2.86	0.43
	h7E7.L1H8	27.8	10.1	0.36	8.45	3.31	0.39
	h7E7.L1H9	–	–	>100	–	–	>100
	h7E7.L5H9	–	–	>100	–	–	>100
	h7E7.L5aH9a	12.8	3.63	0.28	5.91	1.82	0.31
10	rat15C8	5.22	0.18	0.03	3.81	0.96	0.25
	h15C8.L1H1	9.22	3.57	0.39	4.93	4.64	0.94
	h15C8.L2H1	7.71	5.06	0.66	5.02	5.02	1.00
	h15C8.L3H1	6.31	5.33	0.84	3.36	5.88	1.75
	h15C8.L4H1	9.55	6.11	0.64	4.85	5.59	1.15
15	h15C8.L5H1	6.74	5.62	0.83	2.81	7.52	2.68
	h15C8.L1H2	10.4	10.7	1.03	3.82	8.06	2.1
	h15C8.L1H3	–	–	>100	–	–	>100
	h15C8.L1H4	8.41	4.98	0.59	5.32	5.58	1.05
20	h15C8.L1H5	7.98	5.67	0.71	4.84	5.58	1.15
	h15C8.L1H6	13.8	7.56	0.55	6.63	5.56	0.84
	h15C8.L1H7	6.1	5.97	0.98	2.19	2.06	0.94
	h15C8.L1H8	6.2	3.81	0.61	2.91	1.19	0.41
25	h15C8.L1H9	–	–	>100	–	–	>100
	h15C8.L5H9	–	–	>100	–	–	>100
	h15C8.L5aH9a	11.2	4.21	0.38	5.96	6.13	1.03

Ejemplo 3. Estudios de unión y bloqueo in vitro de anticuerpos anti-TIGIT

5 A. Caracterización de unión in vitro de anticuerpos anti-TIGIT

Los anticuerpos anti-TIGIT derivados de OMT y SD se caracterizaron in vitro por su capacidad de unirse a TIGIT y bloquear la unión del receptor de poliovirus (PVR) a TIGIT. La unión a TIGIT humano y cyno se evaluó mediante análisis BIACORE™, tal como se describe anteriormente, en el contexto de afinidad tanto monovalente como bivalente, y en comparación con un anticuerpo anti-TIGIT derivado de ratón (1A5) y un anticuerpo anti-TIGIT derivado de hámster quimérico (10A7; ver, por ejemplo, la publicación estadounidense 2009/0258013, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia). Los resultados del análisis BIACORE™, descrito en la Tabla 5, indica que numerosas variantes de clones anti-TIGIT derivadas de OMT, tal como 4.1D3.Q1E y 7.4A3.C96S.Q1E, y variantes de clones anti-TIGIT derivados de SD eran capaces de unirse a TIGIT humano y cyno, cada uno con una afinidad elevada y similar. Tales propiedades son deseables para los anticuerpos anti-TIGIT terapéutico ya que permiten una evaluación fácil de toxicidad utilizando mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) como una especie de toxicología no clínica. La reactividad cruzada del clon 4.1D3.Q1E con conejo puede proporcionar una especie de toxicología adicional.

Tabla 5. Análisis de BIACORE™ de clones anti-TIGIT derivados de SD y OMT optimizados

Fuente	Clon	Análisis de			
		cinética BIAcore			
		TIGIT humano	TIGIT cyno	TIGIT humano	TIGIT cyno
rata	4.1A4.Q1.C96	Afinidad monovalente (nM)		Afinidad bivalente (nM)	
		4.9	2.6	0.31	0.035
de OMT	4.1A4.Q1E.C96	3.6	2.4		
	4.1A4.Q1E.C96S	29.4	12.6		

5		4.1A4.Q1E.C96	>100	>100		
		Y				
10		4.1D3.Q1	0.61	3.4	≤ 0.019	0.36
		4.1D3.Q1E	0.57	3.2		
15		7.4A3.Q1.C96	3.60	1.6	0.098	≤ 0.05
		7.4A3.Q1E.C96	3.45	2.09		
20		7.4A3.Q1E.C96	2.97	2.02		
		S				
25		7.4A3.Q1E.C96	98.1	35.5		
		Y				
30	rata	1.6B2	0.035	0.29	≤ 0.027	0.091
	de SD	quimérico				
35		h1.6B2.L1H1	0.54	0.96		
		1.10A5	0.093	0.41	≤ 0.003	0.013
40		quimérico				
		h1.10A5.L1H1	0.52	0.86		
45		1.7E7	≤ 0.018	0.067	≤ 0.004	≤ 0.009
		quimérico				

5		h1.7E7.L1H1	0.33	0.51		
		1.15C8 quimérico	0.034	0.25	≤ 0.007	≤ 0.013
		h1.15C8.L1H1	0.58	1.39		
	Ratón	h1A5.L2H8	5.76	> 500	0.26	7.77
10	Hámster	c10A7 (a24 humano)			0.54	8.22
	er	c10A7 (a0.24 murino)				

15

Se realizaron estudios de unión in vitro adicionales de los

clones de anticuerpo anti-TIGIT derivados de OMT y SD. Los clones anti-TIGIT derivados de OMT y SD se evaluaron para unirse a TIGIT humano y cyno expresado en la superficie de células CHO mediante análisis de FACS. Las células CHO se transfectaron con TIGIT humano de longitud completa (CHO-hTIGIT) o TIGIT cynomologous (CHO-cyTIGIT). Las células CHO que expresan TIGIT se incubaron con cada anticuerpo anti-TIGIT en las concentraciones indicadas y luego se detectaron mediante un anticuerpo anti-hIgG etiquetado con FITC (ver la Figura 1A) utilizando los métodos estándar. Los resultados, mostrados en la Tabla 6 y las Figuras 1B-1E, corroboran los resultados del análisis BIACORE™, descritos anteriormente.

30

También se evaluó la unión a linfocitos T primarios humanos de los clones anti-TIGIT derivados de OMT y SD mediante análisis FACS. El

PBMC humano se activó con anti-CD3 unido a la placa (5 µg/ml) y anti-CD28 soluble (2 µg/ml) durante 2 días tal como se describe en Yu et ál. *Nature Immunology*. 10: 48-57, 2009, que se incorpora en su totalidad a la presente mediante referencia. Las células luego se lavaron e incubaron con cada anticuerpo anti-TIGIT en las concentraciones indicadas y luego se detectaron mediante un anticuerpo anti-hIgG etiquetado con FITC. Las células también se tiñeron con anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD25 (*BD bioscience*). La unión de los linfocitos T CD4+ (CD25+CD4+) humanos y CD8+ (CD25+CD8+) humanos fue evaluada por los clones anti-TIGIT mediante FACS. Todas las muestras se adquirieron en instrumentos LSR-II o LSR-Fortessa (BD Biosciences) y se analizaron utilizando software FlowJo (Treestar). Tal como se describe en la Tabla 6 y las Figuras 2A-2D, los clones exhibieron unión aproximadamente equivalente a su TIGIT objetivo.

Tabla 6. Resumen de unión de CHO-TIGIT y linfocitos T humanos de clones anti-TIGIT derivados de SD y OMT optimizados

Ensayo	10A7 (mu TIGIT) & 1A5 (hu TIGIT)	clones de OMT (hu TIGIT)	clones de SD (hu TIGIT)
unión a CHO- TIGIT (EC50)	10A7 0.54 nM 1A5 0.14 nM	4.1A4.C96S.Q1E 0.90 nM 4.1D3.Q1E 1.04 nM 7.4A3.C96S.Q1E 3.04 nM	1.6B2 0.52 nM 1.7E7 0.10 nM
unión a linfocitos T humanos (EC50)	10A7 0.63 nM 1A5 0.14 nM	4.1A4.C96S.Q1E 0.38 nM 4.1D3.Q1E 1.36 nM 7.4A3.C96S.Q1E 2.63 nM	1.6B2 0.09 nM 1.7E7 0.11 nM

B. Caracterización de bloqueo in vitro de anticuerpos anti-TIGIT

Los clones de anticuerpo anti-TIGIT derivados de OMT y SD también fueron evaluados por su capacidad de bloquear las interacciones TIGIT-PVR y TIGIT-CD226

Para evaluar la capacidad de los clones para bloquear la interacción

TIGIT-PVR, se utilizó un ensayo de bloqueo ELISA. Brevemente, la proteína de fusión PVR-Fc humana recombinante, la proteína de fusión PVR-Fc de mono cynomolgus, o la proteína de fusión PVR-Fc de ratón se recubrió en 4 µg/ml a 25 µl/pocillo en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.0) sobre placas de microtitulación Maxisorp de 384-pocillos (NUNC, Dinamarca) y se incubaron durante la noche a 4°C. La solución de recubrimiento luego se descartó y la placa se bloqueó utilizando albúmina de suero bovino (BSA) al 0.5 % en PBS a 80 µl/pocillo y se incubó con agitación suave durante 1 hora. Las curvas de titulación de anticuerpos de control de isotipo Fab y anti-TIGIT se diluyeron en amortiguador de ensayo (PBS, BSA al 0.5 %, Tween 20 al 0.05 %) utilizando 12 diluciones seriales de 2.5 veces (40000-1.7 ng/mL). Volúmenes iguales de TIGIT-AviFlag-biotina humana (1 µg/mL), TIGIT-AviFlag-biotina cynomolgus (150 ng/mL), o TIGIT-His de ratón (1 µg/mL) se agregaron a estas curvas de titulación y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. La placa bloqueada se lavó 3x con amortiguador de lavado (PBS, Tween 20 al 0.05 %, pH 7.4) utilizando un lavador de placa de microtitulación automatizada ELx405 (BioTek Instruments, Vermont) y la mezcla de anticuerpo/ligando-biotina o ligando-His se agregó a 25 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. La placa luego se lavó 6x con amortiguador de lavado y se detectó TIGIT-AviFlag-biotina humana unida, TIGIT-AviFlag-biotina cyno, o TIGIT-His de ratón al agregar 25 µl/pocillo de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (1:10000, Amersham, UK) o anti-His de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:2500, Qiagen, Alemania) diluido en amortiguador de ensayo. Luego de una incubación de 30 minutos o 1 hora, la placa se lavó 6x con amortiguador de lavado y se agregó 100 µl/pocillo de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilo bencidina (TMB) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD EUA) para permitir que se desarrollara el color. La reacción se inactivó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia se

leyó a 450 nm en un lector de placa de microtitulación MULTISKAN ASCENT® (Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia). Las curvas de ajuste se graficaron a partir de los valores de densidad ópticos resultantes de las placas de ELISA y los IC50 se calcularon utilizando software Genedata Screener (Genedata, Suiza). Tal como se muestra en las Figuras 3A-3D, estos ensayos demostraron la reactividad cruzada y la capacidad de bloque de 4.1D3.Q1E para TIGIT humano TIGIT y TIGIT cyno, que distingue 4.1D3.Q1E del anticuerpo anti-TIGIT derivado de hámster, 10A7, que reacciona de forma cruzada con TIGIT de ratón, pero no con TIGIT cyno. Los datos indican que 4.1D3.Q1E bloquea fuertemente la unión de TIGIT cyno con PVR cyno. Los datos también indican que 4.1D3.Q1E es un bloqueador más fuerte de TIGIT humano respecto a PVR humano que el clon de anticuerpo anti-TIGIT derivado de hámster 10A7.

Estos estudios se validaron adicionalmente en experimentos de bloqueo de PVR CHO-TIGIT donde las células CHO que expresan TIGIT se incubaron con proteína de fusión PVR-Fc etiquetada en la presencia de anticuerpo anti-TIGIT o un control de IgG1 humana (Figura 4A). Tal como se muestra en la Tabla 7 y las Figuras 4B-4E, la incubación con 10 µg/ml de anticuerpo anti-TIGIT derivado de OMT (Figuras 4B y 4C) o anticuerpo anti-TIGIT derivado de SD (Figuras 4D y 4E) tuvo como resultado el bloqueo de la unión a TIGIT-PVR para huTIGIT-huPVR y cyTIGIT-cyPVR, con valores IC50 en el intervalo nanomolar y subnanomolar.

Para evaluar la capacidad de los clones para bloquear la interacción TIGIT-CD226, se utilizó TR-FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo). Primero, el CD226 etiquetado con SNAP humano (ST) con fluoróforos donantes y aceptores no permeables se expresó y etiquetó utilizando células CHO. El ST-CD226 humano se coexpresó con TIGIT etiquetado con HA, en presencia o ausencia de los clones de anticuerpo anti-TIGIT derivados de OMT y SD.

La adición de cada uno de los clones evaluados a los cultivos celulares redujo de forma considerable la capacidad de asociación de TIGIT y CD226 (Tabla 7). Estos datos sugieren que el tratamiento anti-TIGIT con los anticuerpos anti-TIGIT identificados pueden limitar la interacción de TIGIT con CD226, lo que indica que estos anticuerpos pueden ser terapéuticos favorables basándose en su capacidad de activar la actividad de los linfocitos T al liberar la supresión mediada por TIGIT de actividad de CD226 y evitar el posterior agotamiento de linfocitos T CD8⁺.

Tabla 7. Resumen de bloqueo de TIGIT-PVR y bloqueo de TIGIT-CD226 de clones anti-TIGIT derivados de SD y OMT optimizados

5	Ensayo	10A7 (mu TIGIT) & 1A5 (hu TIGIT)	clones de OMT (hu TIGIT)	clones de SD (hu TIGIT)
10	bloqueo de TIGIT-PVR (IC50)	10A7 0.07 nM 1A5 0.18 nM	4.1A4.C96S.Q1E 0.14 nM 4.1D3.Q1E 0.29 nM 7.4A3.C96S.Q1E 0.38 nM	1.6B2 0.08 nM 1.7E7 0.04 nM
20	TIGIT- CD226 FRET (IC50)	10A7 17.6 nM 1A5 13.7 nM	4.1A4.C96S.Q1E 25.2 nM 4.1D3.Q1E 45.0 nM 7.4A3.C96S.Q1E 19.3 nM	
25				

30 Ejemplo 4. Caracterización farmacocinética de anticuerpos anti-TIGIT

Luego, las propiedades farmacocinéticas (PK) de clones de anticuerpo

anti-TIGIT derivados de OMT y SD se evaluaron en monos cynomolgus en comparación con el anticuerpo anti-TIGIT derivado de ratón que porta una mutación de aglicosilación N297G (1A5 N297G) y un anticuerpo de control anti-gD. En estos experimentos, la concentración de suero de los anticuerpos se midió a lo largo de un período de 28 días luego de administraciones intravenosas de 10 mg/kg en monos cynomolgus. Los estudios PK revelaron que la variante h1.6B2 derivada de SD exhibió la depuración más rápida, a aproximadamente 20 ml/día/kg (Figuras 5A y 5B). La variante 1A5 evaluada también exhibió depuración rápida, a aproximadamente 15 ml/día/kg (Figuras 5A y 5B). En contraste a estas variantes anti-TIGIT, las variantes OMT evaluadas (4.1D3.Q1E, 7.4A3.C96S.Q1E y 4.1A4.C96S.Q1E) mostraron una depuración de aproximadamente 8-10 ml/día/kg (Figuras 5A y 5B), que está en el extremo superior del intervalo cyno históricamente aceptado de aproximadamente 4-8 ml/día/kg. Los perfiles PK de las variantes de OMT eran similares al anticuerpo anti-gD de control a través de d10, donde la disposición del fármaco mediada por tiempo objetivo (TMDD, por sus siglas en inglés) y/o los efectos del anticuerpo anti-terapéutico intrincan las estimaciones.

El anticuerpo anti-TIGIT derivado de OMT 4.1D3, que exhibió propiedades PK favorables, también se comparó con 10A7 humanizado (h10A7.K4G3) en un estudio PK de 7 días. En este experimento, ocho monos cynomolgus hembra se colocaron en dos grupos de cuatro monos, donde el primer grupo recibió h10A7.K4G3 y el segundo grupo recibió 4.1D3. Ambos anticuerpos anti-TIGIT se administraron a un nivel de dosis de 10 mg/kg (volumen de dosis de 5 ml/kg; concentración de dosis de 2 mg/ml) mediante inyección en bolo intravenosa lenta. Las muestras de sangre (0.5 ml) se recolectaron a 0 hora (previo a la dosis), 0.25 hora, 2 horas, 8 horas, 1 día, 3 días y 7 días luego de la dosis de acuerdo con las siguientes ventanas de recolección:

5	Momentos temporales luego de Ventana de recolección	
	la dosis	
10	0 a 15 minutos	+/- 1 minuto
	16 a 30 minutos	+/- 2 minutos
	31 a 45 minutos	+/- 3 minutos
	46 a 60 minutos	+/- 4 minutos
	61 minutos a 2 horas	+/- 5 minutos
	>2 a 8 horas	+/-10 minutos
	>8 a 24 horas	+/- 20 minutos
15		

utilizando tubos separadores de suero en gel. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente y se dejó coagular durante al menos 20 minutos antes de la centrifugación. Las muestras se centrifugaron (aproximadamente 10 a 15 minutos a aproximadamente 1500 a 2000 x g [fuerza], 2°C a 8°C) dentro de 1 hora de la recolección. El suero se cultivó dentro de 30 minutos del comienzo de la centrifugación y se transfirió a tubos roscados superiores con códigos de barra 2D de 0.5-mL (Thermofisher Scientific catálogo n.º 3744 o equivalente). La muestra de suero se etiquetó con el número del animal, especie, grupo de dosis, día de recolección, tipo de muestra (es decir, suero PK), y números de estudio. Las muestras de suero luego se analizaron para las concentraciones de h10A7.K4G3 o 4.1D3. Tal como se muestra en las Figuras 5C y 5D, este estudio PK reveló que h10A7.K4G3 exhibió una depuración más rápida (AUC inferior) que 4.1D3, y que la depuración de h10A7.K4G3 (> 9 ml/día/kg) es más rápida que la recomendada para la

selección de anticuerpos monoclonales en monos cynomolgus. La depuración estimada se basó en los datos del día 0 al día 7 y se calculó mediante Winnonlin utilizando NCA.

5

Ejemplo 5. Análisis molecular de anticuerpos anti-TIGIT

También se evaluaron los clones de anticuerpo anti-TIGIT derivados de OMT (4.1D3, 7.4A3.C96S y 4.1A4.C96S) y derivados de SD (h1.6B2.L1H1, h1.10A5.L1H1, h1.7E7.L1H1 y h1.15C8.L1H1) en análisis de evaluación molecular (MA, por sus siglas en inglés) para las propiedades de línea celular estable. Brevemente, se evaluó el estrés de los anticuerpos anti-TIGIT (1 mg/ml) en condiciones químicas con AAPH (diclorhidrato de 2,2-azobis(2-amidinopropano)), una pequeña molécula conocida por generar radicales libres, así como bajo condiciones térmicas a pH variado (una prueba de estrés térmico de dos semanas a 40°C, ya sea a pH 5.5 o pH 7.4). Tal como se muestra en las Tablas 8 y 9, más adelante, se determinó que 4.1A4.C96S era inestable, al mostrar una pérdida del pico principal inaceptable y desamidación aumentada en los estudios MA. De manera similar, h1.7E7.L1H1 y h1.15C8.L1H1 mostraron una desamidación inicial elevada (>30 %). Por otra parte, se descubrió que los anticuerpos anti-TIGIT 4.1D3, 7.4A3.C96S, h1.6B2.L1H1 y h1.10A5.L1H1 poseían propiedades de estabilidad aceptable en los estudios MA.

25

Tabla 8. Resumen de estabilidad de MA para clones de anticuerpo anti-TIGIT derivado de OMT

5

10

	4.1A4.C96S	4.1D3	7.4A3.C96S
Estrés de AAPH	M en CDR-H1 es estable W en CDR-H2 es estable	W en CDR-H1 es estable W en CDR-H2 es estable W en CDR-L2 es estable	M en CDR-H1 es estable W en CDR-H2 es estable
Estrés térmico pH 5.5 (2 semanas) análisis de mapa de péptidos	NY en CDR-H1 es estable N(52)T en CDR-H2 son estables N(54)T en CDR-H2 son estables DY en CDR-H3 es estable NS en CDR-L3 es inestable - aumento de 15.7 % en desamidación	DS en CDR-H1 es estable NS en CDR-H1 es estable DY en CDR-H2 es estable DY en CDR-H3 es estable NN en CDR-L1 es estable	N(52)T en CDR-H2 es estable N(54)T en CDR-H2 es estable NP en CDR-H2 es estable DS en CDR-H3 es estable

15

20

25

tamaño carga LC/MS	Pérdida de monómeros (0.5 %) es aceptable Pérdida de pico principal (16.7 %) es <u>inaceptable</u> Las masas son las esperadas	Pérdida de monómeros (0.6 %) es aceptable Pérdida de pico principal (11.1 %) es aceptable Las masas son las esperadas	Pérdida de monómeros (1.1%) es aceptable Pérdida de pico principal (7.3%) es aceptable Las masas son las esperadas
Estrés térmico pH 7.4 (2 semanas) análisis de mapa de péptidos	NY en CDR-H1 sin cambio N(52)T y N(54)T en CDR-H2 sin cambio DY en CDR-H3 sin cambio NS en CDR-L3 aumento de 9.4 % en desamidación	DS CDR-H1 aumento de 2.8 % en isomerización NS CDR-H1 sin cambio DY en CDR-H2 sin cambio DY en CDR-H3 aumento de 2.7 % en isomerización NN en CDR-L1 sin cambio	N(52)T en CDR-H2 sin cambio N(54)T en CDR-H2 sin cambio NP en CDR-H2 sin cambio DS en CDR-H3 sin cambio
tamaño carga LC/MS	Pérdida de monómero (2.7 %) Pérdida de pico principal (21.9 %) Las masas son las esperadas	Pérdida de monómero (0.9 %) Pérdida de pico principal (27.7 %) Las masas son las esperadas	Pérdida de monómero (2.3 %) Pérdida de pico principal (15.7 %) Las masas son las esperadas

30

Tabla 9-1 Resumen de estabilidad de MA para clones de anticuerpo anti-TIGIT derivado de SD

	h7E7.L1H1	h15C8.L1H1
Estrés de AAPH	Sin puntos de interés de oxidación	Sin puntos de interés de oxidación
Estrés térmico	DP en CDR-H2 es estable	DP en CDR-H2 es estable
pH 5.5	NG en CDR-H2 es estable	NG en CDR-H2 es estable
(2 semanas)	NT en CDR-L2 es estable	DG en CDR-H3 es inestable (aumento de 14.7 % en isomerización (3.8 % a 18.5 %))
análisis de mapa de péptidos	NL en CDR-L2 es estable	N(92)N(93)G en CDR-L3 es estable - desamidación inicial elevada 39.2 %
	N(92)N(93)G en CDR-L3 es estable - desamidación inicial elevada 31.5 %	

tamaño carga LC/MS	Pérdida de monómeros (0.8%) es aceptable Pérdida de pico principal (6.2%) es aceptable Las masas son las esperadas	Pérdida de monómeros (0.9%) es aceptable Pérdida de pico principal (10.3%) es aceptable Las masas son las esperadas
Estrés térmico pH 7.4 (2 semanas) análisis de mapa de péptidos	DP en CDR-H2 sin cambio NG en CDR-H2 aumento de 1.9 % en desamidación NT en CDR-L2 sin cambio NL en CDR-L2 sin cambio N(92)N(93)G en CDR-L3	DP en CDR-H2 sin cambio NG en CDR-H2 aumento de 3.3 % en desamidación DG en CDR-H3 aumento de 7.0 % en isomerización N(92)N(93)G en CDR-L3 - aumento de 15.5 % en desamidación

5		aumento de 24.3 % en desamidación	
	tamaño	Pérdida de monómero (0.5 %)	Pérdida de monómero (1.5 %)
	carga	Pérdida de pico principal (16.7 %)	Pérdida de pico principal (25.2%)
	LC/MS	Las masas son las esperadas	Las masas son las esperadas
15			

Tabla 9-2 Resumen de estabilidad de MA para clones de anticuerpo anti-TIGIT derivado de SD

20		h6B2.L1H1	h10A5.L1H1
		M en CDR-H1 es estable	M en CDR-H1 es estable
25	Estrés de AAPH	W(52) y W(53) en CDR-H2 son estables	W(52) y W(53) en CDR-H2 son estables
		W en CDR-H3 es estable	W en CDR-H3 es estable
30			

5	Estrés térmico				
	pH 5.5				
	(2 semanas)				
10		NG en CDR-H2 es estable			
				NG en CDR-H2 es estable	
15	análisis de mapa de péptidos	NT en CDR-H2 es estable			
				NT en CDR-H2 es estable	
		NP en CDR-H2 es estable		NP en CDR-H2 es estable	
20				NS es CDR-L3 es estable	
		NS es CDR-L3 es estable			
25	tamaño				
	carga				
30	LC/MS				

	Pérdida de monómeros (0.2%) es aceptable	Pérdida de monómeros (0.1%) es aceptable
5	Pérdida de pico principal (2.4%) es aceptable	Pérdida de pico principal (6.3%) es aceptable
10	Las masas son las esperadas	Las masas son las esperadas

15

20

25

30

5	Estrés	NG en CDR-H2 aumento	
	térmico	de 5.6% en	
		desamidación	NG en CDR-H2 aumento de
	pH 7.4		4.8% en desamidación
	(2	NT en CDR-H2 sin	
10	semanas)	cambio	NT en CDR-H2 sin cambio
		NP en CDR-H2 sin	NP en CDR-H2 sin cambio
		cambio	
	análisis		NS es CDR-L3 sin cambio
15	de mapa	NS es CDR-L3 sin	
	de	cambio	
	péptidos		
		Pérdida de monómero	Pérdida de monómero (0.2
		(0.0 %)	%)
20	tamaño		
	carga	Pérdida de pico	Pérdida de pico
	LC/MS	principal (9.9%)	principal (14.5 %)
		Las masas son las	Las masas son las
25		esperadas	esperadas

Ejemplo 6. Mapeo de epítomos de TIGIT estructural y funcional

Para entender mejor cómo el anticuerpo anti-TIGIT 4.1D3 y sus variantes optimizadas (por ejemplo, 4.1D3.Q1E), en particular, son capaces de reactividad cruzada de ejemplo (por ejemplo, reactividad cruzada entre TIGIT humano, cyno y conejo), alta afinidad para TIGIT, y fuerte bloqueo de interacción/función de TIGIT-PVR Y TIGIT-CD226 mientras exhibe propiedades de evaluación farmacocinéticas y moleculares, la estructura de cristal de 4.1D3 en complejo con TIGIT se determinó y comparó con las estructuras de cristal del anticuerpo 1A5 anti-TIGIT derivado de ratón unido a TIGIT y un anticuerpo anti-TIGIT derivado de hámster 10A7 unido a TIGIT, tal como se describe en detalle más adelante. Los experimentos de mutagénesis de barrido de alanina de la interfaz de TIGIT también se realizaron para identificar residuos epitópicos funcionales.

A. Expresión, purificación y cristalización de TIGIT y Fab

Los residuos de TIGIT humano 23-128 se expresaron y purificaron tal como se describe (ver, por ejemplo, Stengel et ál. *PNAS*. 109(14): 5399-5404, 2012). Los fragmentos Fab que incluyen cadenas pesadas y ligeras se expresaron y purificaron tal como se describe (ver, por ejemplo, Carter et ál. *Nat. Biotech.* 1992). El TIGIT purificado se mezcló con un exceso de fragmento Fab purificado para generar el complejo de TIGIT/Fab. El complejo luego se purificó adicionalmente en una columna de exclusión de tamaño equilibrada en solución salina tamponada con HEPES (HEPES 10 mM, pH 7.5 y NaCl 100 mM) para generar una muestra que contiene solo complejos 1:1 de TIGIT y Fab. Cada uno de los complejos TIGIT/Fab luego se concentraron para su cristalización y se sometieron a técnicas estándar de análisis de cristalización de difusión de vapor de alto rendimiento. Para el

complejo TIGIT/10A7, la muestra se concentró a aproximadamente 25 mg/mL y se descubrió que se cristalizaba en HEPES 0.1 M pH 7.5, PEG 4000 al 20 %, e isopropanol al 10 %. Para el complejo TIGIT/1A5, la muestra se concentró a aproximadamente 25 mg/mL y se descubrió que se cristalizaba en HEPES 0.05 M pH 7.0, PEG3350 al 12 %, y triptona al 1 %. Para el complejo TIGIT/4.1D3, la muestra se concentró a aproximadamente 25 mg/mL y se descubrió que se cristalizaba en HEPES 0.1 M pH 7.5, PEG 6000 al 10 %, y MPD al 5 %. Los cristales se crioprotegieron con glicerol y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido de acuerdo con las técnicas estándar para la recolección de datos.

B. Recolección de datos y solución de estructura

Los datos de difracción de rayos X se recolectaron en condiciones enfriadas cryo a 100 Kelvin utilizando radiación de rayos X de varios sincotrones en la fuente de luz avanzada (Berkeley, CA) o fuente de fotones avanzados (Argonne, IL) de acuerdo con los métodos estándar. Las imágenes de difracción se procesaron y redujeron utilizando el software de procesamiento de datos XDS (Kabsch W. *Acta Cryst. D. Biol. Crystl.* 66: 125-132, 2010). Los modelos se generaron utilizando la técnica de reemplazo molecular con el programa PHASER. La estructura de TIGIT humano (Stengel et ál PNAS 2012) y el modelo del anticuerpo Fab (Nakamura et ál Cell Host Microbe 2013) se utilizaron como modelos de búsqueda. Las estructuras fueron sometidas a rondas iterativas de ajuste de modelo utilizando el programa COOT y refinamiento utilizando los programas Phenix.refine o BUSTER. Los modelos se refinaron a valores R y libres de R y estadísticas de Ramachandran (calculadas por Molprobability). El procesamiento de datos y estadística de refinamiento se puede encontrar en la Tabla 10.

Tabla 10. Recolección de datos y estadísticas de refinamiento

Recolección de datos y estadística de refinamiento			
	TIGIT/10A7	TIGIT/1A5	TIGIT/1D3
Recolección de datos	ALS 5.0.2	APS LS-CAT 211D-G	APS 221D-D
Grupo de espacio	P21	P1	I4
Dimensiones de la célula			
a, b, c (Å)	53.02, 76.99, 136.91	74.60, 88.78, 101.10	212.39, 212.39, 66.52
α, β, γ (°)	90, 90.6, 90	101.1, 101.5, 110.5	90, 90, 90
Resolución (Å)	136.90–1.84 (1.94–1.84) *	81.11–2.77 (2.92–2.77) *	106.19–1.91 (2.01–1.91) *
R_{sim} o $R_{\text{fusión}}$	0.063 (0.512)	0.062 (0.558)	0.089 (0.973)
$I / \sigma I$	12.7 (2.4)	12.1 (2.3)	12.8 (1.8)
Plenitud (%)	96.4 (95.7)	97.8 (97.1)	93.8 (69.3)
Redundancia	3.8 (3.8)	2.2 (2.1)	7.4 (6.6)
Refinamiento			
Resolución (Å)	136.9–1.85	81.11–2.77	27.96–1.91
Cant. de reflejos	90418	58936	107910
$R_{\text{trabajo}} / R_{\text{libre}}$	17.8/21.8%	19.9/27.1%	18.6/21.6%
desviaciones r.m.s			
Longit. de enlace (Å)	0.010	0.010	0.010
Ángulos de enlace (°)	1.16	1.26	1.13
Ramachandran			
Más favorables	97.0%	91.2%	97.4%
No permitidos	0.3%	1.4%	0.1%

*los valores en paréntesis son para la carcasa de mayor resolución

C. La estructura de 4.1D3 unida a TIGIT humano

El complejo 4.1D3 Fab con TIGIT se cristalizó en el grupo de espacio I4, con dos complejos en la unidad asimétrica, y se sometió a difracción a 1.91Å. La superposición de los dos complejos individuales en la unidad asimétrica muestra solo cambios menores en el posicionamiento de la cadena principal entre las copias individuales. La estructura de 4.1D3 unida a TIGIT humano (Figura 6A) muestra que 4.1D3 interfiere de forma estérica con unión de PVR (Figuras 6B y 6C). El área de superficie enterrada entre 4.1D3 y TIGIT es aproximadamente 1630Å². Las interacciones de cadena ligera 4.1D3 están agrupadas alrededor de residuos de TIGIT 77–82, con CDR L1 Tyr27d y CDR L3 Tyr92, Ser93, Thr94, y Phe96 que entra en contacto con los residuos de TIGIT Ile77, Pro79, Ser80 y Lys82. CDR L2 no realizar ningún contacto

con TIGIT. Las interacciones de cadena pesada de 4.1D3 están mediadas principalmente por CDR H2 y H3 y hacen más contacto extenso con TIGIT. 4.1D3 CDR H1 Asn32 entra en contacto con TIGIT Leu73. 4.1D3 CDR H2 Tyr52, Arg52b, Phe53, Lys54, Tyr56 y Asp58 entran en contacto con
5 residuos de TIGIT Thr55, Gln56, Asn58, Glu60, Asp63, Gln64, Leu65, Ile68, Asn70, Ser80, y His111. Los residuos de 4.1D3 CDR H3 Tyr99, Asp100, Leu100a Leu100b y Ala100c entran en contacto con los residuos de TIGIT Leu65, Ala67, Ile68, Leu73, His76, Ile77, Ser78, Pro79 y Lys82. 4.1D3 interactúa con TIGIT utilizando una combinación de
10 interacciones no polares y polares. El residuo de cadena ligera CDR L3 Thr94 forma contactos polares con Pro79 y Ser80 de TIGIT. Los residuos de CDR H2 de cadena pesada Arg52b y Tyr56 forman enlaces de hidrógeno con residuos de TIGIT Asn58 y Glu60. El residuo de CDR H3 de cadena pesada Leu100a forma un enlace de hidrógeno con TIGIT His76. El
15 residuo de CDR H2 de cadena pesada Lys54 y el residuo de CDR H3 Asp100 forman puentes de sal con los residuos de TIGIT Glu60 y Lys82, respectivamente. Ver también las Figuras 6D y 6E.

Basándose en la estructura de cristal del complejo 4.1D3/TIGIT, se
20 determinaron los residuos de TIGIT que son contactados por 4.1D3 (es decir, los residuos epitópicos de TIGIT unidos por 4.1D3) y los residuos de 4.1D3 que son contactados por TIGIT (es decir, los residuos paratópicos de 4.1D3 contactados por TIGIT). Las tablas 11 y 12, debajo, muestran los residuos de TIGIT y los residuos de cadena
25 ligera o pesada de 4.1D3 a los que contactan, según se evaluó utilizando una exigencia de distancia de contacto de 3.7Å, un punto donde las fuerzas de interacción de van der Waals (no polares) son las más altas.

30 **Tabla 11. Residuos epitópicos de TIGIT y sus residuos paratópicos correspondientes en la cadena ligera de 4.1D3**

<u>TIGIT</u>		<u>cadena ligera de 4.1D3</u>	
Ile	77	Tyr	27d
Pro	79	Tyr	92
		Ser	93
		Thr	94
Ser	80	Thr	94
Lys	82	Tyr	27d

Tabla 12. Residuos epitópicos de TIGIT y sus residuos paratópicos correspondientes en la cadena pesada de 4.1D3

5	<u>TIGIT</u>		<u>cadena pesada</u>	
			<u>de 4.1D3</u>	
	Thr	55	Phe	53
	Gln	56	Phe	53
10	Asn	58	Arg	52b
			Tyr	56
	Glu	60	Lys	54
15			Tyr	56
	Leu	65	Leu	100b
	Ile	68	Leu	100a
	Leu	73	Leu	100a
20	His	76	Tyr	99
			Asp	100
			Leu	100a
			Leu	100b
25	Ser	78	Leu	100b
	Pro	79	Leu	100b
	Ser	80	Asp	58
	Lys	82	Asp	100
30	His	111	Phe	53

El barrido de alanina de la interfaz de TIGIT humana también se realizó, con mutaciones de alanina de residuos de TIGIT hechos para

5 Gln53, Gln56, Glu60, Leu65, Ile68, Asn70, Leu73, His76, His111, Tyr113 y Thr117. Estos mutantes, junto con los de tipo salvaje, fueron evaluados para la unión al fragmento Fab 4.1D3. En este experimento, la mutación de los residuos de TIGIT Glu60, Leu65, e Ile68 redujeron la unión de 4.1D3 más de 10 veces (Figuras 7A, 7B y 7E). La mutación

10 de residuos de TIGIT Gln56, Asn70, Leu73, His111 y Tyr113 redujeron la unión de 4.1D3 entre 1 y 10 veces (Figuras 7A, 7B y 7E). La mutación de Gln53, His76 y Thr117 de TIGIT no afectó la unión de 4.1D3 (Figuras 7A, 7B y 7E). Este análisis estuvo de acuerdo con el análisis de la estructura de cristal, con los residuos de TIGIT que afectaron

15 mayormente la unión de 4.1D3 que se sabe que interactúa con 4.1D3 en la estructura.

D. La estructura de 1A5 unida a TIGIT humano

20 El complejo 1A5 Fab con TIGIT se cristalizó en el grupo de espacio P1, con cuatro complejos en la unidad asimétrica, y se sometió a difracción a 2.77 Å. Superposición de los cuatro complejos individuales en la unidad asimétrica muestra solo cambios menores en el posicionamiento de la cadena principal entre las copias

25 individuales. La estructura de 1A5 unido a TIGIT humano (Figura 8) muestra que 1A5 interfiere de forma estérica con la unión de PVR, pero el epítipo en TIGIT humano al que 1A5 se une no es idéntico a aquel de 4.1D3 (Figura 9). El área de superficie enterrada entre 1A5 y TIGIT es aproximadamente 1715Å². Las interacciones de cadena ligera 1A5 con

30 TIGIT están principalmente agrupadas entre los residuos 109 y 119, con un contacto periférico con Glu60. La CDR L1 de cadena ligera 1A5 tiene un solo residuo de contacto, Trp32, que entra en contacto con los

residuos de TIGIT Ile109, Thr117 y Thr119. El residuo CDR L2 1A5 Lys50 entra en contacto con TIGIT Glu60. Los residuos de la CDR L3 1A5 Gly91, Gln92, Ser93 y Tyr94 entran en contacto con los residuos de TIGIT Thr112, Tyr113, Pro114, Asp115, Gly116 y Thr117. Para la cadena

5 pesada 10A7, los residuos CDR H1 Thr30 y Asp31 hacen contacto con el residuo de TIGIT Leu73. Los residuos de la CDR H2 10A7 Tyr52, Val53, Ser54, Tyr58 y Tyr59 hacen contacto con los residuos de TIGIT Gln53, Thr55, Asp72, Leu73 y Tyr113. Los residuos de CDR H3 10A7 Phe97, Arg98, Pro100 y Trp100a hacen contacto con los residuos de TIGIT

10 Gln56, Asn58, Glu60, Asp63, Gln64, Leu65, Ile68, Leu73, His76 y His111. Los contactos entre 1A5 y TIGIT son principalmente no polares de naturaleza, donde las dos excepciones son un enlace de hidrógeno entre el residuo de la CDR H2 1A5 Ser54 y el residuo de TIGIT Asp72, y un puente de sal entre la CDR H3 1A5 Arg98 y el residuo de TIGIT

15 Glu60.

Basándose en la estructura de cristal del complejo 1A5/TIGIT, se determinaron los residuos de TIGIT que son contactados por 1A5 (es decir, los residuos epitópicos de TIGIT unidos por 1A5) y los residuos

20 de 1A5 que son contactados por TIGIT (es decir, los residuos paratópicos de 1A5 contactados por TIGIT). Las tablas 13 y 14, debajo, muestran los residuos de TIGIT y los residuos de cadena ligera o pesada de 1A5 a los que contactan, según se evaluó utilizando una exigencia de distancia de contacto de 3.7Å, un punto donde las fuerzas

25 de interacción de van der Waals (no polares) son las más altas.

Tabla 13. Residuos epitópicos de TIGIT y sus residuos paratópicos correspondientes en la cadena ligera de 1A5

5

10

15

<u>TIGIT</u>		<u>Cadena ligera de 1A5</u>	
Thr	112	Tyr	94
Tyr	113	Tyr	94
Pro	114	Tyr	94
Gly	116	Gln	92
Thr	117	Trp	32
		Gly	91
		Gln	92

20

25

30

Tabla 14. Residuos epitópicos de TIGIT y sus residuos paratópicos correspondientes en la cadena pesada de 1A5

	<u>TIGIT</u>		<u>Cadena pesada</u> <u>de 1A5</u>	
5	Gln	53	Tyr	58
	Thr	55	Tyr	52
			Tyr	58
	Gln	56	Phe	97
10			Arg	98
			Pro	100
	Asn	58	Arg	98
	Glu	60	Arg	98
15	Leu	65	Arg	98
	Asp	72	Tyr	52
			Val	53
			Ser	54
20	Leu	73	Thr	30
			Asp	31
	Tyr	113	Tyr	58
25			Tyr	59

El barrido de alanina de la interfaz de TIGIT también se realizó, con mutaciones de alanina de residuos de TIGIT hechos para Gln53, Gln56, Glu60, Leu65, Ile68, Asn70, Leu73, His76, His111, Tyr113 y Thr117. Estos mutantes, junto con los de tipo salvaje, fueron evaluados para la unión al fragmento Fab 1A5. En este experimento, la mutación de los

residuos de TIGIT Gln56, Glu60, Leu65, Ile68 y Tyr113 redujeron la unión de 1A5 más de 10 veces (Figuras 7A, 7B y 7D). La mutación de residuos de TIGIT Leu73, His76, Asn70, His111 y Thr117 redujeron la unión de 1A5 entre 1 y 10 veces (Figuras 7A, 7B y 7D). La única mutación de TIGIT Gln53 no afectó la unión de 1A5 (Figuras 7A, 7B y 7D). Este análisis estuvo de acuerdo con el análisis de la estructura de cristal, con muchos de los residuos de TIGIT que afectaron mayormente la unión de 1A5 que se sabe que interactúa con 1A5 en la estructura.

10

E. La estructura de 10A7 unida a TIGIT humano

15

El complejo 10A7 Fab/TIGIT se cristalizó en el grupo de espacio P21, con dos complejos 10A7/TIGIT en la unidad asimétrica, y se sometió a difracción a 1.85Å. La superposición de los dos complejos muestra solo diferencias menores en el posicionamiento de la cadena principal para ambos TIGIT y 10A7. La estructura de 10A7 unida a TIGIT humano (Figura 10A) muestra que 10A7 interfiere de forma estérica con la unión de PVR (Figura 10B), pero el epítipo en TIGIT humano al que 10A7 se une no es idéntico a aquel de 4.1D3 o 1A5 (Figura 9). El área de superficie enterrada entre 10A7 y TIGIT es aproximadamente 1420 Å². La agrupación de residuos de contacto de TIGIT entre Leu65 e Ile77, con dos contactos de CDR 10A7 periféricos con TIGIT Gln56 y Pro87. La CDR L1 de cadena ligera tiene una inserción de seis aminoácidos y utiliza los residuos Tyr27d, Gly27f, Val28, Lys29 y Leu32 para hacer contacto con los residuos de TIGIT Gln56, Leu65, Ile68, Asn70, Leu73, His76, Ser78, Ile77 y Pro79. CDR L2 solo hace dos contactos a través de Tyr50 e Ile53 con TIGIT His76, Ile77 y Pro79. CDR L3 Gly91, Ile92, Asn93 y Asn94 entran en contacto con los residuos de TIGIT Asp72, Leu73 y His76. Para las CDR de cadenas pesadas, ningún residuo de H1 contacta TIGIT. Para CDR H2, Phe50 y Arg52 contacto Asn70, Ala71, Asp72, Leu73 y Gly74. Para las CDR H3, los residuos Arg95, Leu97, Gly98, His99 y

25

30

Asn100 entran en contacto con los residuos TIGIT Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77 y Pro87. En general las interacciones entre la cadena ligera 10A7 y TIGIT fueron principalmente de naturaleza hidrofóbica, con un contacto de enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo Tyr50 de CDR L2 y el carbonilo de la estructura principal de Ile77. Para la cadena pesada 10A7, los contactos polares se encuentran entre Arg52 y los grupos carbonilo de la estructura principal de TIGIT Ala71 y Asp72, así como entre Arg95 y los grupos carbonilo de la estructura principal de Gly74 y Trp75.

Basándose en la estructura de cristal del complejo 10A7/TIGIT, se determinaron los residuos de TIGIT que son contactados por 10A7 (es decir, los residuos epitópicos de TIGIT unidos por 10A7) y los residuos de 10A7 que son contactados por TIGIT (es decir, los residuos paratópicos de 10A7 contactados por TIGIT). Las tablas 15 y 16, debajo, muestran los residuos de TIGIT y los residuos de cadena ligera o pesada de 10A7 a los que contactan, según se evaluó utilizando una exigencia de distancia de contacto de 3.7Å, un punto donde las fuerzas de interacción de van der Waals (no polares) son las más altas.

Tabla 15. Residuos epitópicos de TIGIT y sus residuos paratópicos correspondientes en la cadena ligera de 10A7

<u>TIGIT</u>		<u>cadena ligera</u> <u>de 10A7</u>	
Asp	72	Asn	94
Leu	73	Gly	91
		Ile	92
His	76	Tyr	27d
		Leu	32
		Tyr	50
Ile	77	Tyr	50
Pro	79	Glu	30
		Tyr	50
		Ile	53

Tabla 16. Residuos epitópicos de TIGIT y sus residuos paratópicos correspondientes en la cadena pesada de 10A7

<u>TIGIT</u>		<u>cadena pesada de 10A7</u>	
Ala	71	Arg	52
		Phe	58
Asp	72	Arg	52
Leu	73	Arg	52
		Arg	95

5			Asn	100
	Gly	74	Arg	52
	Trp	75	Arg	95
			Leu	97
			Gly	98
10			His	99
	His	76	Gly	98
			Asn	100
	Ile	77	Gly	98
15	Pro	87	Leu	97

El barrido de alanina de la interfaz de TIGIT también se realizó, con mutaciones de alanina de residuos de TIGIT hechos para Gln53, Gln56, Glu60, Leu65, Ile68, Asn70, Leu73, His76, His111, Tyr113 y Thr117. Estos mutantes, junto con los de tipo salvaje, fueron evaluados para la unión al fragmento Fab 10A7. En este experimento, solo las mutaciones Leu73Ala y His76Ala afectaron la unión de 10A7 más de 10 veces (Figuras 7A-7C). La mutación de los otros residuos enumerados no afectaron de forma considerable la unión de 10A7 (Figuras 7A-7C). Esto coincidía de forma precisa con la estructura de cristal de 10A7 unido a TIGIT, donde Leu73 y His76 se encontraron directamente en el epítipo unido por 10A7.

F. Los anticuerpos anti-TIGIT 4.1D3, 1A5 y 10A7 reconocen TIGIT en epítipos únicos

Los estudios estructurales descritos anteriormente demuestran que los

tres anticuerpos anti-TIGIT 4.1D3, 1A5, y 10A7, reconocen TIGIT en epítomos únicos, que puede explicar sus características y propiedades funcionales distintas. Tal como se muestra más adelante en la Tabla 17, por ejemplo, 4.1D3 se une a TIGIT en los residuos Ser78, Ser80 y Lys82, que no están unidos por ninguno de los anticuerpos 1A5 o 10A7. La Figura 11 es una representación estructural, que muestra que los residuos Ser78, Ser80 y Lys82 de TIGIT están contactados de forma íntima por 4.1D3, pero no por 1A5 o 10A7.

Tabla 17. Residuos epitópicos de TIGIT dentro de 3.7Å para los anticuerpos anti-TIGIT 4.1D3, 1A5 y 10A7

4.1D3	1A5	10A7
	53	
55	55	
56	56	
58	58	

5	60	60	
	65	65	
	68		
			71
		72	72
10	73	73	73
			74
			75
	76		76
	77		77
15	78		
	79		79
	80		
	82		
			87
20	111		
		112	
		113	
		114	
		116	
25		117	
30			

Ejemplo 7. Caracterización de la expresión de TIGIT, PD-1 y CD226 en

células inmunitarias

Luego, se caracterizó la expresión de TIGIT, PD-1 y CD226 en linfocitos T CD4+ y CD8+ a partir de especímenes de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple (MM) utilizando citometría de flujo multicolor. Las células se aislaron de médula ósea congelada obtenida de pacientes con MM (n=10). Se recolectaron muestras de dos de los pacientes con MM en el diagnóstico y luego una vez más al entrar en remisión. Se utilizó médula ósea congelada de donantes saludables como un control (n=8). En estos experimentos, las muestras de médula ósea se tiñeron con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados de forma fluorescente: BV605 (PD-1), Alexa Fluor 488 (FoxP3), PE-DNAM-1 (CD226), PE-Cy7 (CD45), BUV737 (CD8), PerCP-eF710 (CD4), APC (TIGIT), Brilliant Violet 421 (NKp46), Brilliant Violet 421 (CD56), Brilliant Violet 510 (CD3), Brilliant Violet 510 (CD38), PE-Cy7 (CD319), PE (CD19) y tinte LIVE/DEAD FixableNear-IR Dead Cell Stain (Life Technologies, ThermoFisher).

TIGIT, PD-1 y CD226 demostraron estar altamente expresados en linfocitos T CD4+ y CD8+ obtenidos de la médula ósea de pacientes con MM en comparación con linfocitos T CD4+ y CD8+ obtenidos de la sangre periférica de pacientes saludables (Figura 12). Los linfocitos T CD4+ y CD8+ obtenidos de la médula ósea de pacientes con MM también fueron determinados para expresar conjuntamente TIGIT y PD-1 (Figura 13). Dado este patrón de expresión, los anticuerpos anti-TIGIT de la invención son útiles para tratar pacientes que tienen una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o cáncer (por ejemplo, un mieloma, por ejemplo, MM), ya sea como una monoterapia o en combinación con un agente terapéutico adicional, tal como un antagonista de unión al eje PD-1 (por ejemplo, un antagonista de unión a PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, MPDL3280A (atezolizumab)).

Otras modalidades

- Si bien la invención que antecede se describió de forma detallada a modo ilustrativo y de ejemplo, a los efectos de claridad de comprensión, las descripciones y los ejemplos no deberían interpretarse como taxativos del alcance de la invención. Debe entenderse que pueden llevarse a la práctica otras modalidades diferentes, dada la descripción general proporcionada anteriormente.
- Estas descripciones de toda la patente y la bibliografía científica citada en la presente se incorporan expresamente en su totalidad mediante esta referencia.