

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos del receptor de poliovirus humano (RVP)

Campo de la invención

5 La invención se encuentra el campo de la inmunoterapia y se refiere a anticuerpos y a fragmentos de los mismos que se enlazan al receptor de poliovirus de proteína, a secuencias de polinucleótidos que codifican estos anticuerpos y a células de hibridoma que producen estos anticuerpos. La invención se refiere además a composiciones terapéuticas y diagnósticas que comprenden estos anticuerpos y a procedimientos para tratar y diagnosticar enfermedades, particularmente cáncer, usando estos anticuerpos monoclonales.

Antecedentes de la invención

15 La inmunoterapia de cáncer se utiliza para generar y aumentar una respuesta inmunitaria antitumoral, por ejemplo, mediante tratamiento con anticuerpos específicos a antígenos sobre células tumorales, con fusiones de antígeno que presentan células con células tumorales, o mediante activación específica de células T antitumorales. La capacidad de reclutar células inmunes (por ejemplo, células T) contra células tumorales en un paciente proporciona una modalidad terapéutica de combatir tipos de cáncer y metástasis que hasta ahora eran considerados incurables.

20 Una respuesta inmune, mediada por células T, incluye múltiples etapas secuenciales, reguladas por un balance entre señales co-estimuladoras y co-inhibidoras que controlan la magnitud de la respuesta inmune. Las señales inhibidoras, denominadas puntos de control inmunitarios, son cruciales para el mantenimiento de la auto-tolerancia y también para la limitación de daño tisular colateral mediado por mecanismos inmunitarios. Estas señales cambian a medida que una infección o provocación inmunitaria se retira, se empeora o persiste, y estos cambios afectan la respuesta de células T y re-moldean la respuesta inmune.

30 La expresión de proteínas de punto de control inmunitarios puede regularse por parte de los tumores. Por ejemplo, el aumento de ligando de muerte programada - 1 (PD-L1) sobre la superficie de células cancerosas les permite evadir el sistema inmunitario de anfitrión inhibiendo células T mayúscula mediante el enlace a PD-1 que, de otra manera, puede atacar estas células tumorales. Por lo tanto, los puntos de control inmunitarios representan barreras significativas para la activación de inmunidad celular funcional contra cáncer. Por consiguiente, los anticuerpos antagónicos específicos para ligandos inhibitorios sobre células inmunitarias son considerados agentes anticancerosos viables y están siendo evaluados en las clínicas (por ejemplo, Nivolumab y Pembrolizumab). Otro ejemplo de molécula de punto de control inmunitario es un inmunoreceptor de célula T con dominios de Ig e ITIM (TIGIT). TIGIT es una molécula co-inhibitoria, expresada en diversas células inmunitarias que incluyen células T y células asesinas naturales (células NK). TIGIT se enlaza con alta afinidad a un receptor de virus del polio (RVP).

40 El receptor de poliovirus (RVP), también denominado CD155, es una glicoproteína de transmembrana involucrada en la mediación de la adhesión celular a moléculas de matriz extracelular. Previamente se describió como un antígeno tumoral y como una diana potencial para la intervención terapéutica a medida que su expresión aumenta en cánceres neuroectodérmicos, incluido glioblastoma multiforme, meduloblastoma, y carcinoma colorrectal (Solecki et al., J. Biol. Chem. 2002, 277: 25697-700), así como también en cáncer pancreático (Nishiwada et al., Anticancer Res. 2015, 35(4): 2287-97). RVP también es conocido por aumentar la activación inducida por suero de la señalización de Ras-Raf-

MEK-ERK, aumentar ciclinas D2 y E, y se anticipa que p27Kip1 disminuido, eventualmente acortando el período de la fase G0/G1 del ciclo celular (Kakunaga 2004, J. Biological Chemistry, 279, 36419-36425), por esa razón bloqueando el RVP en células tumorales, reduce la viabilidad de células tumorales. RVP también tiene un papel crítico en la angiogénesis y se sugiere que regula la angiogénesis inducida por VEGF mediante el control de la interacción de VEGFR2 con integrina $\alpha(v)\beta(3)$, y la ruta de señalización de Rap1-Akt mediada por VEGFR2 (Kinugasa et al., 2012, Circ Res. 2012, 110(5),716-26). Adicionalmente, RVP forma un complejo con IGF1R y participa en la señalización de Met y bloquea la viabilidad celular reducida de la formación de complejo (Lee et al., Scientific Reports 2014, 20, 4, 7139).

La participación de RVP en metástasis fue demostrada inyectando células cancerosas a la cola de ratones inhibiendo metástasis a los pulmones. Se ha mostrado que el RVP aumentado en células cancerosas trans-interactúa con su contra-receptor en plaquetas y que esta trans-interacción aumenta la metástasis de las células cancerosas a los pulmones (Morimoto et al., Oncogene (2008) 27, 264–273).

La solicitud estadounidense de patente No. 20070041985 divulga moléculas que se enlazan específicamente al menos un dominio intra- o extracelular del RVP o cualquier derivado del mismo, en cuyo caso la molécula tiene la capacidad de modular una adhesión mediada por receptor, conducta de tráfico y/o invasión de una célula que expresa el RVP o cualquier derivado del mismo.

La solicitud estadounidense de patente No. 20090215175 proporciona moléculas (por ejemplo, pequeños compuestos químicos, oligonucleótidos, polipéptidos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo) que modula en las funciones de RVP necesarias para adhesión, tráfico, invasión y/o potencial metastásico de células. Las moléculas pueden usarse para el tratamiento de células que tienen un potencial metastásico, metástasis y cáncer.

La publicación de la solicitud vía PCT No. WO 2006/124667 divulga la modulación de la proteína zB7R1 (TIGIT) por anticuerpos monoclonales que bloquean el enlazamiento de TIGIT a su ligando RVP.

Existe una necesidad insatisfecha de proporcionar agentes adicionales y más efectivos, específicos, seguros y/o estables que, solos o en combinación con otros agentes, potencien células del sistema inmunitario para atacar células infectadas con tumor o virus inhibiendo el enlazamiento de RVP a TIGIT.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de los mismos que reconocen el receptor de poliovirus (RVP), impiden su enlazamiento a inmunoreceptor de células T con dominios de Ig e ITIM (TIGIT) e inhiben la actividad supresora sobre linfocitos tales como células asesinas naturales (NK por natural killer) y células T. Los anticuerpos anti-RVP divulgados en la presente memoria son capaces de enlazarse a RVP presente en células cancerosas. Estos anticuerpos y fragmentos de los mismos se caracterizan por tener conjuntos únicos de secuencias de regiones que determinan complementariedad (CDR), alta afinidad y alta especificidad a RVP y son útiles en la inmunoterapia de cáncer para combatir la evasión inmunitaria de tumor, como una terapia independiente y en combinación con otros agentes anticancerosos. Los anticuerpos también son útiles en el tratamiento de infecciones virales.

Ahora se divulga que los anticuerpos anti-RVP de alta afinidad divulgados en la presente memoria bloquean la interacción de TIGIT-RVP y restauran la actividad de células T y NK. Los anticuerpos mostraron alta especificidad para el RVP humano. Estas propiedades

hacen los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente invención candidatos valiosos para usar en terapia inmunitaria de cáncer, lo cual hace posible la administración de dosis más bajas con menos efectos colaterales.

De manera ventajosa, los mAbs anti-RVP según la invención pueden inducir la proliferación de células T mejor que los mAbs anti PD-1 y CTLA-4 en un modelo in-vitro de PD-L1 (A549). El efecto de inducción fue mostrado para células de sangre mononucleares periféricas (PMBCs) y células T CD4 y CD8 purificadas. Adicionalmente, los mAbs de RVP pudieron inducir la activación de células NK en la mayoría de las células diana ensayadas. Además, algunos de los anticuerpos anti-RVP descritos en la presente memoria tienen una actividad anticancerosa in vitro comparable con aquella de un agente conocido, Erbitux®, usado actualmente en terapia. Además, algunos de los anticuerpos anti-RVP descritos en la presente memoria mostraron un efecto sinérgico al combinarse con agentes anticancerosos adicionales tales como anticuerpos anti PD-1 y CTLA-1 y el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Adicionalmente, se encontró que algunos de los anticuerpos anti-RVP inducen la citotoxicidad mediada por células, dependientes de anticuerpos (ADCC). Se divulga además que algunos anticuerpos anti-RVP según la invención no tiene efecto de bloqueo en la señalización co-estimulante de DNAM1; por lo tanto, no tienen efecto dañino en otras señales de inducción inmunitaria.

De manera interesante, a pesar de la alta similitud de secuencia entre las secuencias de RVP humano y de roedor, los anticuerpos de la presente invención son altamente específicos del RVP humano.

Se divulga además que, inesperadamente, algunos anticuerpos monoclonales quiméricos que comprenden una cadena constante humana mostraron un efecto aumentado en la activación de célula inmunitaria en comparación con sus anticuerpos monoclonales equivalentes de murino.

Algunos de los mAbs anti-RVP descritos en la presente memoria fueron capaces de reducir la viabilidad de las células tumorales de una manera inmuno-independiente bloqueando RVP en células tumorales. Sin querer atarse a ningún mecanismo de acción, se sugiere que esta actividad resulta de la capacidad de RVP para abreviar el período de la fase G0/G1 del ciclo de la célula.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se enlaza al receptor de poliovirus (RVP), o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos la porción de enlazamiento de antígeno, donde el anticuerpo aislado o el fragmento del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

i. Tres CDRs de una región variable de cadena pesada (HC) que comprende SEQ ID NO: 77 y tres CDRs de una variable de cadena ligera (LC) que comprende SEQ ID NO: 79, o un análogo o un derivado de las mismas que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de dicho anticuerpo o de fragmento;

ii. Tres regiones que determinan complementariedad (CDRs) de una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 69 y tres CDRs de una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 71, o un análogo o un derivado de las mismas que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de dicho anticuerpo o fragmento; y

iii. Tres CDRs de una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 73 y tres CDRs de una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 75, o un análogo o derivado de las mismas que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de dicho anticuerpo o fragmento.

Los anticuerpos que comprenden secuencias de CDR contenidas en homólogos de cadenas pesada y ligera de las SEQ ID Nos: 2, 10, 18, 26, 34 o 42 también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Según algunas formas de realización, la SEQ ID NO: 2 es intercambiable con la SEQ ID NO: 69. Según algunas formas de realización, la SEQ ID NO: 10 es intercambiable con la SEQ ID NO: 71. Según algunas formas de realización, la SEQ ID NO: 18 es intercambiable con la SEQ ID NO: 73. Según algunas formas de realización, la SEQ ID NO: 26 es intercambiable con la SEQ ID NO: 75. Según algunas formas de realización, la SEQ ID NO: 34 es intercambiable con la SEQ ID NO: 77. Según algunas formas de realización, la SEQ ID NO: 42 es intercambiable con la SEQ ID NO: 79.

Existen varios métodos conocidos en la técnica para determinar las secuencias de CDR de una molécula de anticuerpo dado, pero no hay un método estándar inequívoco. La determinación de las secuencias de CDR de regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo puede hacerse según cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, los métodos conocidos como KABAT, Chothia y IMGT. Un conjunto seleccionado de CDRs puede incluir secuencias identificadas forma de un método; más precisamente, algunas secuencias de CDR puede determinarse usando KABAT y algunas usando IMGT, por ejemplo.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento comprende las secuencias de CDR de un anticuerpo monoclonal señalado como Anti-RVP 4E5 (o hRVP.07); más precisamente, las tres secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena pesada se describen en la SEQ ID NO: 69 y las tres secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena ligera se describen en la SEQ ID NO: 71.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia GFDFSRYW (SEQ ID NO: 4). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia PDGNYNALDYW (SEQ ID NO: 8).

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de anticuerpo comprenden CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia RYW. Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia RYWMT (SEQ ID NO: 80). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprenden CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia PDGNYNALDY (SEQ ID NO: 82).

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende: (i) CDR1 de CP que comprende la secuencia GFDFSRYW (SEQ ID NO: 4); (ii) CDR2 de CP que comprende la secuencia: EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6); y (iii) CDR3 de CP que comprende la secuencia: PDGNYNALDYW (SEQ ID NO: 8).

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende: (i) CDR1 de CP que comprende la secuencia RYW; (ii) CDR2 de CP que comprende la secuencia: EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6); y (iii) CDR3 de CP que comprende la secuencia: PDGNYNALDY (SEQ ID NO: 82).

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia

- KASQDVGTA VT (SEQ ID NO: 12). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia WASTRHT (SEQ ID NO: 14). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende: (i) CDR1 de CL comprende la secuencia KASQDVGTA VT (SEQ ID NO: 12); (ii) CDR2 de CL comprende la secuencia: WASTRHT (SEQ ID NO: 14); y (iii) CDR3 de CL comprende la secuencia: QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16).
- Según algunas formas específicas de realización el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento comprenden secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia: GFDFSRYW (SEQ ID NO: 4), CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia: EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6), CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia: PDGNYNALDYW (SEQ ID NO: 8), CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia: KASQDVGTA VT (SEQ ID NO: 12), CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia: WASTRHT (SEQ ID NO: 14), y CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia: QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16), o análogos de los mismos que comprenden no más de 5% de sustitución, supresión y/o inserción de aminoácidos en la secuencia de región hipervariable (HVR).
- Según algunas formas específicas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento comprende un conjunto de seis secuencias de CDR que consisten en:
- CDR1 de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 80,
 - CDR2 de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 81,
 - CDR3 de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 82,
 - CDR1 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 12,
 - CDR2 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 14, y
 - CDR3 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 16.
- Según algunas formas específicas de realización el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento comprende un conjunto de seis secuencias de CDR que consisten en: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, y SEQ ID NO: 16.
- Según otras formas específicas de realización el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento comprende un conjunto de seis secuencias de CDR que consisten en: SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, y SEQ ID NO: 16.
- Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 69), o un análogo o derivado de las mismas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de la región variable de cadena pesada.
- Según algunas formas de realización, el análogo de SEQ ID NO: 2 es una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 69.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 71), o un análogo del mismo que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de región variable de cadena ligera.

- 5 Según algunas formas de realización, el análogo de SEQ ID NO: 10 es una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 71.

- 10 Según una forma específica de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 69, y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 71, o un análogo del mismo que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de cadena ligera y/o cadena pesada.

- 15 La invención también abarca un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de enlazarse con alta afinidad a un epítipo dentro de la proteína de RVP humana a la cual se enlaza el anticuerpo monoclonal (mAb) 4E5.

- 20 Según otras formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado comprende las secuencias de CDR de un anticuerpo monoclonal indicado como 7D4 (or hRVP.01); más precisamente, las tres secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 73 y las tres secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 75.

- 25 Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia GYTFTEYTMH (SEQ ID NO: 20). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia VIPLEY (SEQ ID NO: 24). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende: (i) CDR1 de CP comprende la secuencia GYTFTEYTMH (SEQ ID NO: 20); (ii) CDR2 de CP comprende la secuencia: GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22); y (iii) CDR3 de CP comprende la secuencia: VIPLEY (SEQ ID NO: 24).

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia EYTMH (SEQ ID NO: 83).

- 35 Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia KASQNVYTNVA (SEQ ID NO: 28). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia SASYRYR (SEQ ID NO: 30). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende: (i) CDR1 de CL comprende la secuencia KASQNVYTNVA (SEQ ID NO: 28); (ii) CDR2 de CL comprende la secuencia: SASYRYR (SEQ ID NO: 30); y (iii) CDR3 de CL comprende la secuencia: QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32).

Según algunas formas específicas de realización el anticuerpo monoclonal aislado comprende CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia GYTFTEYTMH (SEQ

ID NO: 20), CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia: GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22), CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia: VIPLEY (SEQ ID NO: 24), CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia: KASQNVYTNVA (SEQ ID NO: 28), CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia: SASYRYR (SEQ ID NO: 30), y CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia: QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32), o análogos del mismo que comprende no más de 5% sustitución, supresión y/o inserción de aminoácidos en la secuencia de HVR.

Según algunas formas específicas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento comprende un conjunto de seis secuencias de CDR que consisten en: CDR1 de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 83, CDR2 de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 22, CDR3 de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 24, CDR1 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 28, CDR2 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 30, y CDR3 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 32.

Según algunas formas específicas de realización el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento comprende un conjunto de seis secuencias de CDR que consisten en: SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, y SEQ ID NO: 32.

Según otras formas específicas de realización el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento comprende un conjunto de seis secuencias de CDR que consisten en: SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, y SEQ ID NO: 32.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 73, o un análogo o derivado de las mismas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de la región variable de cadena pesada.

Según algunas formas de realización, el análogo de SEQ ID NO: 18 es una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 73.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 75, o un análogo del mismo que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de la región variable de cadena ligera.

Según algunas formas de realización, el análogo de SEQ ID NO: 26 es una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 75

Según una forma específica de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 73, y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 75, o un análogo del mismo que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de cadena ligera y/o pesada.

La invención también abarca un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de enlazarse con alta afinidad a un epítipo con la proteína de RVP humana a la cual se enlaza mAb 7D4.

Según otras formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado comprende las secuencias de CDR de un anticuerpo monoclonal indicado como 5B9 (or hRVP.09); más

precisamente, las tres secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 77 y las tres secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 79.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado comprende las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) contenidas en la región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 34 y las tres secuencias de CDR contenidas en la secuencia de la región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, y SEQ ID NO: 54. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia GYTFSNYWIE (SEQ ID NO: 36). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia SNYWIE (SEQ ID NO: 84).

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende: (i) CDR1 de CP comprende la secuencia SNYWIE (SEQ ID NO: 84); (ii) CDR2 de CP comprende la secuencia: EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38); y (iii) CDR3 de CP comprende la secuencia: TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40).

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia KASQDVGTA VV (SEQ ID NO: 44). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia WASSRHN (SEQ ID NO: 46). Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48).

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia KASQDVGTA V (SEQ ID NO: 85).

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende: (i) CDR1 de CL comprende la secuencia KASQDVGTA V (SEQ ID NO: 85); (ii) CDR2 de CL comprende la secuencia: WASSRHN (SEQ ID NO: 46); y (iii) CDR3 de CL comprende la secuencia: QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48).

Según formas adicionales de realización, CDR2 de CL comprende la secuencia descrita en SEQ ID Nos: 46, 56, 57, 58, 59, 60, o 61. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

Según algunas formas específicas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento comprende una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia: GYTFSNYWIE (SEQ ID NO: 36), CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia: EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38), CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia: TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40), CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia: KASQDVGTA VV (SEQ ID NO: 44), CDR2 de cadena ligera que

comprende la secuencia: WASSRHN (SEQ ID NO: 46), y CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia: QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48), o análogos del mismo que comprenden no más de 5% de sustitución, supresión y/o inserción de aminoácidos en la secuencia de HVR.

- 5 Según algunas formas específicas de realización el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento que consiste en: CDR1 de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 84, CDR2 de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 38, CDR3 de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 40, CDR1 de cadena ligera que tiene una
10 secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 85, CDR2 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 46, y CDR3 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 48.

- Según algunas formas específicas de realización el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento que consiste en: CDR1 de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en
15 SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 84, CDR2 de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 38, CDR3 de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 40, CDR1 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 85, CDR2 de cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58,
20 SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, y SEQ ID NO: 61; y CDR3 de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 48. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

- Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 77, o un
25 análogo o derivado de las mismas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de la región variable de cadena pesada.

Según algunas formas de realización, el análogo de SEQ ID NO: 34 es una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 77.

- Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 79, o un
30 análogo del mismo que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de la región variable de cadena ligera.

Según algunas formas de realización, el análogo de SEQ ID NO: 42 es una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 79.

- 35 Según una forma específica de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 77, y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en
40 SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 79, o un análogo del mismo que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de cadena ligera y/o pesada.

- Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 34, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ
45 ID NO: 53, o SEQ ID NO: 54; o un análogo del mismo que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de cadena ligera y/o pesada. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención

La invención también abarca anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de enlazarse con alta afinidad a un epítipo dentro de la proteína de RVP humana a la cual se enlaza mAb 5B9.

5 Según algunas formas de realización, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo reconoce RVP humano con una afinidad de al menos 10^{-8} M. Según otras formas de realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se enlaza con una afinidad de 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M o o incluso más alta al RVP humano. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

10 Los análogos y derivados de los anticuerpos mAb aislados, y el fragmento de anticuerpos descritos antes, también se encuentran dentro del alcance de la invención. En algunas formas de realización, los análogos particulares o mAbs aislados o fragmentos de los mismos que comprenden al menos una región variable descrita en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 34 y 42 también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. mAbs aislados o fragmentos de
15 los mismos que comprenden al menos una región variable descrita en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 69, 71, 73, 75, 77 y 79 también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento análogo de anticuerpo tienen al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de la región hipervariable del anticuerpo de referencia.
20

Según algunas formas de realización, el análogo o derivado del anticuerpo aislado o fragmento del mismo tiene al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con una región variable de la secuencia de anticuerpo de referencia. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

25 Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la invención comprende una región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 69, o un análogo que tiene al menos 95% de similitud de secuencia con dicha secuencia. Según otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la invención comprende una región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID
30 NO: 18 o SEQ ID NO: 73, o un análogo que tiene al menos 95% de similitud de secuencia a dicha secuencia. Según otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la invención comprende una región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 77, o un análogo que tiene al menos 95% de similitud de secuencia a dicha secuencia.

35 Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 71, o un análogo que tiene al menos 95 % de similitud de secuencia a dicha secuencia. Según otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 75, o un análogo que
40 tiene al menos 95 % de similitud de secuencia a dicha secuencia. Según otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 79, o un análogo que tiene al menos 95 % de similitud de secuencia a dicha secuencia.

45 Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde: (i) la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 2 y la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 10; (ii) la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 18 y la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 26; o (iii) la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 34 y la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 42. También se

incluyen análogos de los anticuerpos o fragmentos que tienen al menos 95 % de similitud de secuencia a dichas cadenas pesadas o ligeras.

Según otras formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde: (i) la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 69 y la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 71; (ii) la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 73 y la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 75; o (iii) la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 77 y la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 79. También se incluyen análogos de los anticuerpos o fragmentos que tienen al menos 95 % de similitud de secuencia a dichas cadenas pesadas o ligeras.

Según algunas formas de realización, el análogo tiene al menos 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia a una cadena ligera pesada de anticuerpo de las regiones variables descritas antes. Según algunas formas de realización, el análogo comprende no more una sustitución, supresión o adición de aminoácido a una o más secuencias de CDR de la región hipervariable, más precisamente cualquiera de las secuencias de CDR descritas en SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 12, 14, 16, 20, 22, 24, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 44, 46, 48, 80, 81, 82, 83, 84, y 85. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la presente invención. Según algunas formas de realización, la sustitución de aminoácido es una sustitución conservadora.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región hipervariable (HVR) que tiene regiones de cadena ligera y pesada definidas anteriormente, en el cual fueron sustituidos, suprimidos y/o adicionados 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una HVR que tiene regiones de cadena ligera y pesada definidas anteriormente, en el cual fue sustituido un aminoácido. Según formas específicas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una CDR tal como se ha definido anteriormente, en el cual fue sustituido un aminoácido. Según algunas formas específicas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena ligera CDR2 tal como se ha definido anteriormente, en el cual fue sustituido un aminoácido.

Según algunas formas específicas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena ligera CDR2 que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 55 (WASSRHX), donde X se selecciona del grupo que consiste en A, R, D, E, P, y T. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena ligera CDR2 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 56-61.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de anticuerpo comprende un conjunto de CDR seleccionado del grupo que consiste en:

i. Un conjunto de CDR de seis CDRs donde: CDR1 de CP se selecciona de GYTFSNYWIE (SEQ ID NO: 36) y SNYWIE (SEQ ID NO: 84); CDR2 de CP es EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38); CDR3 de CP es TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40); CDR1 de CL se selecciona de KASQDVGTA VV (SEQ ID NO: 44) y KASQDVGTA V (SEQ ID NO: 85); CDR2 de CL se selecciona del grupo que consiste en: WASSRHN (SEQ ID NO: 46), WASSRHA (SEQ ID NO: 56), WASSRHR (SEQ ID NO: 57), WASSRHD (SEQ ID NO: 58), WASSRHE (SEQ ID NO: 59), WASSRHP (SEQ ID NO: 60), y WASSRHT (SEQ ID NO: 61); y LC CDR3 es QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48).

ii. Un conjunto de CDR de seis CDRs donde: la secuencia de CDR1 de CP se selecciona de GFDFSRYW (SEQ ID NO: 4) y RYWMT (SEQ ID NO: 80); CDR2 de CP se selecciona de EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6) y EIHPDSSKINYTPSQKD (SEQ ID NO: 81); CDR3 de CP se selecciona de PDGNYNALDYW (SEQ ID NO: 8) y PDGNYNALDY (SEQ ID NO: 82); CDR1 de CL es KASQDVGTAVT (SEQ ID NO: 12); CDR2 de CL es WASTRHT (SEQ ID NO: 14); y CDR3 de CL es QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16).

iii. Un conjunto de CDR D6 CDRs donde: la secuencia de CDR1 de CP se selecciona de GYTFTEYTMH (SEQ ID NO: 20) y EYTMH (SEQ ID NO: 83); CDR2 de CP es GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22); CDR3 de CP es VIPLEY (SEQ ID NO: 24); CDR1 de CL es KASQNVYTNA (SEQ ID NO: 28); CDR2 de CL es SASYRYR (SEQ ID NO: 30); y CDR3 de CL es QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32).

La presente invención proporcionar, por lo tanto, un anticuerpo monoclonal que enlaza específicamente la proteína humana RVP, o un fragmento de enlace del mismo, donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento comprende un conjunto de seis secuencias de CDR donde el conjunto se selecciona del grupo que consiste en:

- i. SEQ ID NOs. 4, 6, 8, 12, 14 y 16;
- ii. SEQ ID NOs. 20, 22, 24, 28, 30 y 32;
- iii. SEQ ID NOs. 36, 38, 40, 44, 46 y 48;
- iv. SEQ ID NOs. 36, 38, 40, 44, 55 y 48;
- v. SEQ ID NOs. 80, 81, 82, 12, 14 y 16;
- vi. SEQ ID NOs. 83, 22, 24, 28, 30 y 32;
- vii. SEQ ID NOs. 84, 38, 40, 85, 46 y 48; y
- viii. SEQ ID NOs. 84, 38, 40, 85, 55 y 48.

La presente invención también proporciona anticuerpos monoclonales y fragmentos de enlace de los mismos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde dichas cadenas comprenden un conjunto de secuencia de cadena pesada de región variable y secuencia de cadena ligera de región variable, dicho conjunto se selecciona del grupo que consiste en:

- i. SEQ ID NOs: 2 y 10;
- ii. SEQ ID NOs: 69 y 71;
- iii. SEQ ID NOs: 18 y 26;
- iv. SEQ ID NOs: 73 y 75;
- v. SEQ ID NOs: 34 y 42; y
- vi. SEQ ID NOs: 77 y 79.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir RVP humano que se enlaza a TIGIT expresado en células T o células NK.

Según una forma específica de realización, el mAb se selecciona del grupo que consiste en: anticuerpo quimérico y un fragmento de anticuerpo que comprende al menos la porción de enlace antígeno de un anticuerpo. Según formas específicas de realización, el

anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Según otras formas de realización, el anticuerpo quimérico comprendía una región constante humana. Según otras formas de realización, el anticuerpo quimérico monoclonal comprende una región constante de IgG1 humana. Según una forma específica de realización, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fd', Fv, dAb, región de CDR aislada, anticuerpo de una sola cadena (scab), "diacuerpos", y "anticuerpos lineales". Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la presente invención.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una secuencia marco seleccionada del grupo que consiste en: IgG2a de ratón, IgG2b de ratón, IgG3 de ratón, IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana, y IgG4 humana. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la presente invención.

Según algunas formas de realización, se proporciona un conjugado que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo tal como se ha descrito antes.

Según algunas formas de realización, el conjugado comprende una proteína portadora.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporcionan secuencias de polinucleótido que codifican anticuerpos monoclonales que tienen alta afinidad y especificidad para RVP, así como también vectores y células anfitrionas que portan estas secuencias de polinucleótido.

Según algunas formas de realización, se proporcionan secuencias de polinucleótido que codifican secuencias de aminoácidos de una región variable de CP y una región variable de CL descritas anteriormente.

Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótido codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o cadena capaces de enlazarse a un epítipo dentro de la proteína de RVP humano a la cual se enlaza: (i) un anticuerpo monoclonal (identificado en la presente memoria como 4E5) que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 10; (ii) un anticuerpo monoclonal (identificado en la presente memoria como 7D4) que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 18 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 26; o (iii) un anticuerpo monoclonal (identificado en la presente memoria como 5B9) que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 34 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 42.

Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótido codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o cadena que comprende la secuencia descrita en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 69. Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótido codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o cadena que comprende la secuencia descrita en SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 71.

Según otras formas de realización, la secuencia de polinucleótido codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o cadena que comprende la secuencia descrita en SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 73. Según formas adicionales de realización, la secuencia de polinucleótido codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o cadena que comprende la secuencia descrita en SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 75.

Según otras formas de realización, la secuencia de polinucleótido codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o cadena que comprende la secuencia descrita en SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 77. Según formas adicionales de realización, la secuencia de polinucleótido codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o cadena que comprende la secuencia descrita en SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 79.

Según algunas otras formas de realización, la secuencia de polinucleótido según la invención codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o cadena que comprenden las seis secuencias de CDR: (i) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: GFDFSRYW (SEQ ID NO: 4) o RYWMT (SEQ ID NO: 80), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: PDGNYNALDY (SEQ ID NO: 82), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQDVGTAVT (SEQ ID NO: 12), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASTRHT (SEQ ID NO: 14), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16); (ii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: EYTMH (SEQ ID NO: 83), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: VIPLEY (SEQ ID NO: 24), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQNVYTNVA (SEQ ID NO: 28), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: SASYRYR (SEQ ID NO: 30), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32); o (iii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: SNYWIE (SEQ ID NO: 84), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQDVGTA V (SEQ ID NO: 85), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASSRHN (SEQ ID NO: 46), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48).

Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos definida anteriormente codifica una molécula seleccionada del grupo que consiste en: un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que comprende al menos una porción de enlace de antígeno y un conjugado de anticuerpo que comprende dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la presente invención.

Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótido que codifica una región variable de anticuerpo monoclonal de cadena pesada, comprende una secuencia descrita en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 68, o una variante de la misma que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia.

Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótido que codifica una región variable de anticuerpo monoclonal de cadena pesada, comprende una secuencia descrita en SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 72, o una variante de la misma que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia.

Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótido que codifica una región variable de anticuerpo monoclonal de cadena pesada, comprende una secuencia descrita en SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 76, o una variante de la misma que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia.

Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótido que codifica una región variable de anticuerpo monoclonal de cadena ligera, comprende una secuencia descrita en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 70, o una variante de la misma que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia.

Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótido que codifica una región variable de anticuerpo monoclonal de cadena ligera, comprende una secuencia descrita en SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 74, o una variante de la misma que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia.

Según algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótido que codifica una región variable de anticuerpo monoclonal de cadena ligera, comprende una secuencia descrita en SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 78, o una variante de la misma que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia.

- 5 La presente invención proporciona, según algunas formas de realización, un polipéptido que comprende al menos una secuencia codificada por al menos una secuencia de polipéptido divulgada anteriormente.

- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una cadena de anticuerpo cadena o fragmento de la misma según la presente invención. Según algunas formas de realización, el constructo de ácido nucleico es un plásmido.

Según algunas formas de realización el plásmido comprende una secuencia de polinucleótido descrita en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 33.

- 15 Según algunas formas de realización el plásmido comprende una secuencia de polinucleótido descrita en SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, o SEQ ID NO: 76.

Según otras formas de realización el plásmido comprende una secuencia de polinucleótido descrita en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 41.

Según otras formas de realización el plásmido comprende una secuencia de polinucleótido descrita en SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 74, o SEQ ID NO: 78.

- 20 En otro aspecto más, la presente invención proporciona una célula de hibridoma capaz de producir un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que comprende las secuencias específicas de CDR y/o regiones variables específicas de cadenas pesadas y ligeras definidas anteriormente.

- 25 Según algunas formas de realización, se proporciona una serie de hibridoma que comprende al menos una secuencia de polinucleótido divulgada anteriormente.

- Según algunas formas de realización, el hibridoma es capaz de producir un anticuerpo monoclonal que comprende las seis secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): (i) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: GFDFSRYW (SEQ ID NO: 4) o RYWMT (SEQ ID NO: 80), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: PDGNYNALDY (SEQ ID NO: 82), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQDVGTAVT (SEQ ID NO: 12), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASTRHT (SEQ ID NO: 14), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16); (ii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: EYTMH (SEQ ID NO: 83), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: VIPLEY (SEQ ID NO: 24), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQNVYTNVA (SEQ ID NO: 28), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: SASYRYR (SEQ ID NO: 30), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32); o (iii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: SNYWIE (SEQ ID NO: 84), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQDVGTAV (SEQ ID NO: 85), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASSRHN (SEQ ID NO: 46), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48).

Anticuerpos o fragmentos de los mismos según la presente invención pueden adherirse a una fracción citotóxica, una fracción radioactiva o una fracción identificable.

La presente invención proporciona, según otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende en calidad de un ingrediente activo, al menos un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugados del mismo, que reconoce RVP con alta afinidad y especificidad, y opcionalmente al menos un excipiente, un diluyente, una sal o un vehículo farmacéuticamente aceptables.

Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que es capaz de enlazarse a un epítipo dentro de la proteína de RVP humana a la cual se enlaza un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en: (i) un anticuerpo identificado en la presente memoria como 4E5 (también señalado como RVP.07), que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 10; (ii) un anticuerpo identificado en la presente memoria como 7D4 (también señalado como RVP.01) que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 18 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 26; y (iii) un anticuerpo identificado en la presente memoria como 5B9 (también señalado como RVP.09) que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 34 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 42.

Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende las seis CDRs: (i) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: GFDfsRYW (SEQ ID NO: 4) o RYWMT (SEQ ID NO: 80), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: PDGNYNALDY (SEQ ID NO: 82), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQDVGTAVT (SEQ ID NO: 12), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASTRHT (SEQ ID NO: 14), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16); (ii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia EYTMH (SEQ ID NO: 83), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: VIPLEY (SEQ ID NO: 24), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQNVYTNVA (SEQ ID NO: 28), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: SASRYR (SEQ ID NO: 30), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32); o (iii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia SNYWIE (SEQ ID NO: 84), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQDVGTAV (SEQ ID NO: 85), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASSRHN (SEQ ID NO: 46), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48).

Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 34, y SEQ ID NO: 77. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención

Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 42, y SEQ ID NO: 79. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

- 5 Según una forma específica de realización, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 69 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 71.
- 10 Según una forma específica de realización, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 73 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 26 o DES ID NO: 75.
- 15 Según una forma específica de realización, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 77 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 79.
- Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende una combinación de al menos dos anticuerpos, o fragmento de anticuerpos, la cual reconoce RVP humano.
- 20 Según otras formas de realización, la composición farmacéutica comprende un mAb o fragmento que enlaza específicamente RVP según la invención, y un mAb o fragmento que enlaza específicamente un antígeno diferente tal como receptor de célula, antígeno tumoral o proteína inmunomoduladora.
- 25 También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo según la invención, para usar en restaurar la citotoxicidad de NK inhibiendo el enlazamiento de RVP a TIGIT expresado en células NK.
- Según algunas formas de realización, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo es capaz de inhibir RVP humano que se enlaza a TIGIT expresado en células T.
- 30 Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica según la presente invención es para usar en inmunoterapia de cáncer o en aumentar la respuesta inmunitaria.
- El cáncer puede ser cualquier cáncer que exprese RVP. Según algunas formas de realización, el cáncer sobreexpresa RVP.
- 35 Según algunas formas de realización de la invención, el cáncer es un cáncer metastásico. Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica según la presente invención es para uso en inhibir la formación o la distribución de metástasis o reducir el número total de metástasis en un sujeto.
- 40 Según algunas formas de realización de la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un melanoma, un cáncer de mamá, un cáncer pancreático, un cáncer colorrectal, un cáncer de colon, un cáncer cervical, un cáncer de riñón, un cáncer de pulmón, un cáncer de tiroides, un cáncer de próstata, un cáncer de cerebro, un cáncer renal, cáncer de garganta, un carcinoma de laringe, un cáncer de vejiga, un cáncer hepático, un fibrosarcoma, un cáncer de células endometriales, un glioblastoma, sarcoma, leucemia mieloide y linfoma. Cada posibilidad representa una forma separada de
- 45 realización de la invención.

- Según algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer sólido. Según algunas formas específicas de realización, el cáncer sólido se selecciona del grupo que consiste en melanoma (piel), cáncer de pulmón, colon, mama, uterino y renal. Según formas específicas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón y liposarcoma.
- Según otras formas de realización, el cáncer es cáncer hematológico. Según algunas formas de realización, el cáncer hematológico es leucemia mieloide, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple o síndrome mielodisplásico. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención. Según algunas formas de realización, el cáncer es leucemia. Según formas específicas de realización, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML).
- Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica según la presente invención es para uso en el tratamiento de una infección viral.
- Según algunas formas de realización, la infección viral es causada por un virus que se enlaza a una célula diana por medio de un RVP sobre una superficie de la célula infectada.
- Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica según la presente invención es para usar en tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionados con angiogénesis. Según algunas formas de realización, la enfermedad o trastorno relacionados con angiogénesis se seleccionan del grupo que consiste en: cáncer, enfermedades proliferativas de la célula en el ojo (enfermedades oculares), trastornos retinales y enfermedades inflamatorias. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.
- Según otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para inhibir el enlazamiento de RVP humano a al menos un ligando mediante el uso de un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo definido anteriormente.
- Según un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto que la necesite, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo definido anteriormente.
- Según otro aspecto más, la presente invención proporciona un método de tratamiento de cáncer que comprende administrar a un sujeto que la necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado del mismo, que reconoce RVP humano con alta afinidad y especificidad y es capaz de inhibir su enlazamiento a su ligando.
- Según algunas formas de realización, el anticuerpo en la composición farmacéutica administrada se selecciona del grupo que consiste en: (i) un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 2 y las secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 10; (ii) un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 18 y las secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 26; o (iii) un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena pesada descrita en SEQ ID NO: 34 y las secuencias de CDR contenidas en la región variable de cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 42.
- Según algunas formas específicas de realización, el anticuerpo monoclonal en la composición farmacéutica administrada comprende: CDR1 de cadena pesada comprende

- la secuencia seleccionada del grupo que consiste en GFDFSRYW (SEQ ID NO: 4) y RYWMT (SEQ ID NO: 80); CDR2 de cadena pesada comprende la secuencia: EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6); CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia: PDGNYNALDY (SEQ ID NO: 82); CDR1 de cadena ligera comprende la secuencia: KASQDVGTAVT (SEQ ID NO: 12); CDR2 de cadena ligera comprende la secuencia: WASTRHT (SEQ ID NO: 14); y CDR3 de cadena ligera comprende la secuencia: QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16). Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.
- Según otras formas específicas de realización, el anticuerpo monoclonal en la composición farmacéutica administrada comprende: CDR1 de cadena pesada comprende la secuencia EYTMH (SEQ ID NO: 83); CDR2 de cadena pesada comprende la secuencia: GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22); CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia: VIPLEY (SEQ ID NO: 24); CDR1 de cadena ligera comprende la secuencia: KASQNVYTNVA (SEQ ID NO: 28); CDR2 de cadena ligera comprende la secuencia: SASYRYR (SEQ ID NO: 30); y CDR3 de cadena ligera comprende la secuencia: QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32).
- Según otras formas específicas de realización, el anticuerpo monoclonal en la composición farmacéutica administrada comprende: CDR1 de cadena pesada comprende la secuencia SNYWIE (SEQ ID NO: 84); CDR2 de cadena pesada comprende la secuencia: EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38); CDR3 de cadena pesada comprende la secuencia: TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40); CDR1 de cadena ligera comprende la secuencia: KASQDVGTAVT (SEQ ID NO: 85); CDR2 de cadena ligera comprende la secuencia: WASSRHN (SEQ ID NO: 46); y CDR3 de cadena ligera comprende la secuencia: QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48).
- Según algunas formas de realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva da lugar a una disminución en el tamaño del tumor o en el número de metástasis en el sujeto.
- Según algunas formas de realización, el método de tratamiento de cáncer comprende administrar o realizar al menos una terapia anticancerosa adicional. Según algunas formas de realización, la terapia anticancerosa adicional es cirugía, quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia.
- Según algunas formas de realización, el método de tratamiento de cáncer comprende administrar un anticuerpo monoclonal que reconoce RVP humano con alta afinidad y especificidad y un agente anticanceroso adicional. Según algunas formas de realización, el agente anticanceroso adicional se selecciona del grupo que consiste en: modulador inmunitario, célula del linfocito activada, inhibidor de cinasa y agente quimioterapéutico.
- Según otras formas de realización, el modulador inmunitario adicional es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo que se enlaza a un antígeno distinto de RVP humano.
- Según algunas formas de realización, el modulador inmunitario adicional es un anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario. Según algunas formas de realización, el modulador inmunitario adicional es un anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario seleccionada del grupo que consiste en proteína 1 de muerte celular programada 1 (PD-1), PD-L1 y PD-L2, molécula 1 de adición a célula carcinoembrionaria relacionada con antígeno (CEACAM1), gen 3 de activación del linfocito (LAG3), CD137, OX40 (también denominada CD134), receptores de tipo inmunoglobulina de célula asesina (KIR), TIGIT y cualquier combinación de los mismos. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

- Según algunas formas de realización, el agente anticanceroso se selecciona del grupo que consiste en: Erbitux, citarabina, fludarabina, fluorouracilo, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, gemcitabina, vincristina, vinblastina, vinorelbina, carmustina, lomustina, clorambucilo, ciclofosfamida, cisplatino, carboplatina, ifosfamida, mecloretamina, melfalán,
- 5 tiotepa, dacarbazina, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etopósido, tenipósido y cualquier combinación de los mismos. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.
- Según algunas formas de realización, el agente anticanceroso es un receptor de factor de crecimiento anti-cáncer epidérmico (EGFR). Según algunas formas de realización, el
- 10 inhibidor de EGFR se selecciona del grupo que consiste en: Cetuximab (Erbitux®), Panitumumab (Vectibix®), y necitumumab (Portrazza®). Según algunas formas de realización, el inhibidor de EGFR es Cetuximab (Erbitux®).
- Según algunas formas de realización de la invención, el sujeto es un sujeto humano.
- 15 Según algunas formas de realización de la invención, el uso comprende además el uso de un agente que disminuye la actividad o la expresión de un receptor co-inhibidor inmunitario.
- Según algunas formas de realización de la invención, la célula inmunitaria es una célula T.
- Según algunas formas de realización de la invención, el receptor co-inhibidor inmunitario se selecciona del grupo que consiste en PD-1, TIGIT, DNAM-1, CTLA-4, LAG3, TIM3,
- 20 BTLA, VISTA, B7H4, CD96, BY55, LAIR1, SIGLEC10, y 2B4. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.
- Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para modular la función y/o actividad de sistema inmunitario que comprende modular el enlazamiento de RVP a TIGIT usando un anticuerpo según la invención.
- 25 Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una infección viral de un virus que utiliza CD155 como un receptor de entrada, en un sujeto que lo necesite, y el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal anti RVP descrito en la presente memoria. Según
- 30 algunas formas de realización, el virus se selecciona del grupo que consiste en: virus de polio, virus de Coxsackie, adenovirus y virus de deficiencia humana (HIV).
- Según otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno relacionados con angiogénesis. Según algunas formas de
- 35 realización, la enfermedad o trastorno relacionados con angiogénesis se seleccionan del grupo que consiste en: cáncer, enfermedades proliferativas desde células en el ojo (enfermedades oculares), trastornos de la retina y enfermedad inflamatoria. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.
- Según algunas formas de realización, el método para tratar cáncer incluye prevenir o reducir la formación, el crecimiento o la difusión de metástasis en un sujeto mediante la inhibición de angiogénesis.
- 40 Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar o pronosticar cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto y el método comprende determinar el nivel de expresión de RVP en una muestra biológica de dicho sujeto usando al menos un anticuerpo como el que se ha descrito en la presente memoria.
- La presente invención comprende además, según otro aspecto, un método para determinar
- 45 o cuantificar la expresión de RVP, y el método comprende poner en contacto una muestra

biológica con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y medir el nivel de formación de complejo, en cuyo caso el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) seleccionadas del grupo que consiste en: (i) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: GFDFSRYW (SEQ ID NO: 4) o RYWMT (SEQ ID NO: 80), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: PDGNYNALDY (SEQ ID NO: 82), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQDVGTAVT (SEQ ID NO: 12), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASTRHT (SEQ ID NO: 14), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16); (ii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia EYTMH (SEQ ID NO: 83), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: VIPLEY (SEQ ID NO: 24), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQNVYTNVA (SEQ ID NO: 28), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: SASYRYR (SEQ ID NO: 30), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32); o (iii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia SNYWIE (SEQ ID NO: 84), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQDVGTA V (SEQ ID NO: 85), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASSRHN (SEQ ID NO: 46), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48).

Los métodos de determinar y cuantificar pueden realizarse in-vitro o ex-vivo según algunas formas de realización o pueden usarse en condiciones de diagnóstico asociadas con la expresión de RVP. Los anticuerpos según la presente invención también pueden usarse para configurar métodos de tamizaje. Por ejemplo, un ensayo inmuno-absorbente enlazado a enzima (ELISA), o un ensayo radio-inmunitario (RIA) puede formarse para niveles de medición de polipéptido secretado o asociado a células usando los anticuerpos y los métodos conocidos en la técnica.

Según algunas formas de realización, el método para detectar o cuantificar la presencia de RVP comprende las etapas de:

- i. Incubar una muestra con un anticuerpo específico de RVP o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos una porción de enlazamiento de antígeno;
- ii. Detectar el RVP enlazado usando una sonda detectable.

Según algunas formas de realización, el método comprende además las etapas de:

- iii. Comparar la cantidad de (ii) con una curva estándar obtenida de una muestra de referencia que contiene una cantidad conocida de RVP; y
- iv. Calcular la cantidad del RVP en la muestra a partir de la curva estándar.

Según algunas formas particulares de realización, la muestra es un fluido corporal.

Según algunas formas de realización, el método se realiza in-vitro o ex-vivo.

También se proporciona un kit para medir la expresión de RVP en muestras biológicas, el cual comprende al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) seleccionadas del grupo que consiste en: (i) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: GFDFSRYW (SEQ ID NO: 4) o RYWMT (SEQ ID NO: 80), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO: 6), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: PDGNYNALDY (SEQ ID NO: 82), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia:

KASQDVGTAVT (SEQ ID NO: 12), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASTRHT (SEQ ID NO: 14), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPYT (SEQ ID NO: 16); (ii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: EYTMH (SEQ ID NO: 83), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO: 22), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: VIPLEY (SEQ ID NO: 24), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQNVYTNVA (SEQ ID NO: 28), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: SASYRYR (SEQ ID NO: 30), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYNSYPLA (SEQ ID NO: 32); o (iii) CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia: SNYWIE (SEQ ID NO: 84), CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia: EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO: 38), CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia: TKIYGNSFDY (SEQ ID NO: 40), CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia: KASQDVGTAV (SEQ ID NO: 85), CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia: WASSRHN (SEQ ID NO: 46), y CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia: QQYSRYPLT (SEQ ID NO: 48).

Según un aspecto, la presente invención proporciona un kit para detectar cáncer; el kit diagnóstico comprende un anticuerpo de fragmento del mismo tal como se ha divulgado en la presente memoria.

Según algunas formas de realización, la invención proporciona un método de diagnóstico, que evalúa la severidad o determina la etapa de una enfermedad inmuno-relacionada o una enfermedad proliferativa que comprende determinar la expresión o actividad de RVP en una muestra de un sujeto usando un anticuerpo según la presente invención o un fragmento o conjugado del mismo, y comparando la expresión o la actividad de RVP con una cantidad de referencia de la expresión o la actividad de RVP. Dicha cantidad de referencia puede obtenerse de una muestra tomada de un sujeto normal, del mismo sujeto mientras se encuentra en una etapa diferente de la enfermedad o se determina a partir de datos clínicos de una gran población de sujetos.

Otras formas de realización y el alcance completo de la aplicabilidad de la presente invención se volverán evidentes a partir de la descripción detallada dada de aquí en adelante. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, mientras indican formas preferidas de realización de la invención, se dan solamente a manera de ilustración, puesto que los diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención se volverán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1C son gráficos que representan la correlación de los niveles de expresión de ARNm de RVP (alta o baja, como se indique) con probabilidad de supervivencia. La correlación fue medida para cáncer de pulmón (Figura 1A), cáncer de mama (Figura 1B) y liposarcoma (Figura 1C). Los conjuntos de datos de la expresión de ARNm fueron obtenidos a partir del sitio GEO y analizados usando el sitio bioprofiling.de, tal como sigue: para cáncer de pulmón, el conjunto de datos GEO ID: GSE31210, para cáncer de mama, el conjunto de datos GEO ID: GSE25055 y para liposarcoma el conjunto de datos GEO ID: GSE30929.

Figura 2 es una ilustración esquemática de expresión de receptor sobre células inmunitarias o tumorales. TIGIT se refiere a un receptor co-inhibidor sobre muchas células inmunitarias (por ejemplo, células T); DNAM-1 (también denominado CD226) se refiere a un receptor de activación sobre muchas células inmunitarias (por ejemplo, células T); receptor de Fc se refiere al receptor de activación fuerte principalmente sobre células NK, pero también sobre células de mieloides que incluyen neutrófilos y macrófagos; RVP se

refiere a un ligando inhibidor para TIGIT (que se enlaza más débil a DNAM-1), expresado por muchas células tumorales; Nectin-2 se refiere a un ligando de activación para DNAM-1 (reconocimiento marginal por parte de TIGIT), expresado por muchas células tumorales. El enlazamiento de anti-RVP según la presente invención muestra un efecto dual: 1) promover la muerte de células tumorales por medio de receptores de Fc; y 2) incrementar activación de células inmunitarias bloqueando la interacción con TIGIT.

Figuras 3A-3D son gráficos que representan análisis de FACS de los cuatro anticuerpos anti-RVP generados. Se muestra la eficacia de los anticuerpos en bloquear el enlazamiento directo de TIGIT-Fc a una línea celular tumoral. Figura 3A ilustra un anticuerpo anti-RVP que no bloquea (anticuerpo mAb anti-RVP 2G3, también denominado hRVP.17). Figuras 3B-3D muestran que tres de los anticuerpos generados, a saber: 5B9 (también denominado hRVP.09), 7D4 (también denominado hRVP.01) y 4E5 (también denominado hRVP.07), respectivamente, son mAb anti-RVP de bloqueo, tal como se muestra por medio del bloqueo del enlazamiento de TIGIT-Ig. Se adicionaron sopas de híbrido más (5 μ l de /pozo) a células de HepG2. Se usó TIGIT-Fc a 2 μ g/ pozo a una concentración final de 20 μ g/ml y se midieron niveles de TIGIT enlazado a célula mediante FACS después de adicionar anti-Fc Ab etiquetado de modo fluorescente. Los histogramas llenados representan tinción de fondo por el reactivo anti-Fc.

Figura 4 es un gráfico que muestra cómo el bloqueo de las interacciones de RVP-TIGIT con el anticuerpo mAb anti-RVP 7D4 (también denominado hRVP.01) mejora la matanza de células NK de la línea celular humana MDA-MB-231 (Adenocarcinoma de mama). La matanza específica se calcula con base en la secreción de [35S]--metionina de las células diana. El control (Ctrl) es IgG de ratón no relacionada. Valor de P = 0.0056.

Figura 5 es un gráfico que representa que bloqueando interacciones de RVP-TIGIT usando el mAb anti-RVP 4E5 (también denominado hRVP.07) mejora la matanza de células NK de línea celular cancerosa humana HepG2 (carcinoma hepatocelular). Falta de matanza de HepG2 sin mAb; 4E5 anti-RVP - matanza de HepG2 con 4E5mIgG1 anti-RVP de ratón (sin activación de receptor de Fc humano); 4e5hIgG1 anti-RVP - matanza de HepG2 con 4E5-hIgG1 anti-RVP (activación de receptor de Fc humano), Erbitux (P.C) – un mAb de control positivo Erbitux (anti-EGFR). Todos los mAbs fueron usados a 10 μ g/ml. Valores P: 4E5 anti-RVP - 0.04, 4e5hIgG1 anti-RVP - 0.000746 y Erbitux (control positivo) - 0.003219.

Figuras 6A-6O son gráficos que representan que las líneas celulares tumorales humanas expresan RVP y Nectin-2. Las células de melanoma (Figuras 6A-E), las células de cáncer de mama (Figuras 6F-H), células colorrectales (Figura 6I), células de riñón (Figura 6J), células de cáncer de pulmón (Figura 6K), células de cáncer de próstata (Figura 6L), células tumorales del cerebro (Figura 6M), y células de carcinoma hepatocelular (Figuras 6N-O) expresan todas RVP y Nectin-2. mAbs fueron usados a 0,2 μ g/pozo: un mAb anti-Nectin-2 comercial y el mAb anti-RVP 4E5 (también denominado hRVP.07).

Figuras 7A-7C son gráficos de análisis de FACS que representan que RVP es el ligando principal de TIGIT. Figura 7A ilustra que las células de HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano) expresan RVP y Nectin-2. Figura 7B ilustra que mAb anti-RVP purificado 4E5 (también denominado hRVP.07) (0,15 μ g) bloquea casi completamente (por encima de 97%) el enlazamiento de TIGIT-Ig (2 μ g/ml), a pesar del hecho de que estas células también expresan Nectin-2. Figura 7C ilustra que las células CHO expresan altos niveles de hNectin-2. Figura 7D muestran la falta de tinción de las mismas células CHO que en la Figura 7C por parte de todos los mAbs de RVP, lo que significa que no hay un reconocimiento directo de Nectin-2 por parte de mAbs anti-RVP y, por lo tanto, el bloqueo del enlazamiento de TIGIT visto en la Figura 7B no puede explicarse por el bloqueo de Nectin-2, sino más bien es el resultado de un bloqueo directo de RVP.

Figuras 8A-8C representan una eficiencia de enlazamiento similar de todos los mAbs anti-RVP a RVP humano. Todos los tres clones de bloqueo generan un enlazamiento similar (menos de 10 % de diferencia) a ambas células endógenas de HepG2 RVP (Figura 8A) y células sobre-expresadas de B16-hRVP hRVP (Figura 8B). El enlazamiento también fue examinado usando línea celular Vero del mono verde africano (Figura 8C) que expresa una proteína de RVP con 93% de similitud a RVP humano. En este caso, los diferentes Abs mostraron intensidades diferenciales de tinción. Se usaron 0,2 µg de cada mAb en todos los casos.

Figura 9 es un gráfico que representa que los anticuerpos anti-RVP de la invención no reconocen RVP canino. TIGIT-Fc humano (10 µg/ml) es de reacción cruzada fuerte y se enlaza a la línea celular MDCK canina. Ninguno de los mAbs de RVP pudieron enlazarse a estas células, lo cual sugiere que no reconocen el RVP canino.

Figuras 10A-10D representan que Nectin-2 se enlaza preferencialmente por DNAM-1 y no por TIGIT. Las células que sobre-expresan RVP o Nectin2 fueron teñidas usando las concentraciones indicadas de anticuerpo. Figura 10A ilustra el enlazamiento de TIGIT-Fc a células que expresan Nectin2; Figura 10B ilustra en enlazamiento de DNAM-FC a células que expresan Nectin-2. Figura 10C ilustra el enlazamiento de TIGIT a células que expresan RVP. Figura 10D ilustra el enlazamiento de DNAM-1 a células que expresan RVP.

Figura 11 muestra el efecto de anticuerpos anti-RVP en la proliferación de células T. PBMCs humanos fueron etiquetadas con CFSE incubadas con células diana en presencia de los anticuerpos indicados. Los resultados se presentan como una proliferación incrementada múltiples veces en relación con el control. Los resultados son de un total combinado de 7 experimentos de 10 donantes sanos. Valores P: para mAb 4E5 - 0.000241, para mAb 5B9 - 1.96E-05, para anti PD-1 - 0.016303, para anti CTLA4 - 0.000171, y para 4E5hlgG1 - 0.008176.

Figura 12 muestra el efecto combinado de anticuerpos anti-RVP y otros anticuerpos en la proliferación de células T. PBMCs humanos fueron etiquetados con CFSE e incubados con células diana en presencia de la combinación indicada de anticuerpos. Los resultados se presentan como proliferación incrementada múltiples veces en relación con el control. Los resultados son 7 experimentos independientes que usaron 12 donantes sanos. Valores P: anti PD1+anti CTLA - 47.54E-03, anti PD-1+4E5 - 7.02E-02, anti PD-1+5B9 - 1.11E-04, anti CTLA4+4E5 - 1.37E-03, anti CTLA4+5B9 - 5.47E-06.

Figura 13 representa el efecto específico de anticuerpos anti-RVP en la proliferación de células T de CD8. Los PBMCs humanos fueron etiquetados con CFSE e incubados con células diana (A549) en la presencia de los anticuerpos indicados. Las células positivas de CD8 fueron contadas mediante FACS después de 9-12 días en cultivo. Los resultados se presentan como proliferación incrementada varias veces en relación con el control. Los resultados son de 2 experimentos independientes usando donantes sanos de PBMC.

Figura 14 representa la relación de células CD8 a células CD4 siguiente a la inducción con diferentes anticuerpos. Los PBMCs humanos fueron etiquetados con CFSE e incubados con células diana (A549) en la presencia de los anticuerpos indicados. Las células fueron contadas después de 9-12 días en cultivo. Los resultados son de un total combinado de 2 experimentos de 2 donantes sanos.

Figura 15 muestra el efecto de anticuerpos anti-RVP en desgranulación de NK. Se incubaron células NK humanas con células de MDA-MB-231 (línea celular de cáncer de mama triple negativa) en la presencia de los anticuerpos indicados. Los resultados son representativos de 7 experimentos independientes hechos con 5 diferentes donantes sanos de células NK. Valores P: RVP4E5 - 0.005063, RVP5B9 - 0.00374, RVP7D4 -

0.019448, RVP4E5-hIgG1 - 2.03E-05, RVP5B9-hIgG1 - 1.45E-05, RVP7D4-hIgG1 5.8E-05.

Figuras 16A-16D muestra el efecto de los anticuerpos anti-RVP en la supervivencia de células tumorales en ausencia de células inmunitarias. La supervivencia de células de A549 (Figura 16A), células de U373 (Figura 16B), células de HCT116 (Figura 16C), y Mel-624 (Figura 16D) fue examinada usando ensayo de supervivencia de células de MTT en presencia de 50 microgramos/ml del mAb indicados durante 24 horas. Se calcula la importancia mediante un solo ensayo de Student TTEST, de una sola cola, * <0.05 , ** <0.03 , y *** <0.02 .

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales específicos del receptor de poliovirus humano (RVP). La invención también proporciona producción y uso de los mAbs como agentes terapéuticos. En particular, los mAbs de la presente invención pueden usarse, solos o en combinación con otros agentes, para restaurar y aumentar la actividad de destrucción antitumoral de las células inmunitarias, y como reactivos de diagnóstico.

El término "antígeno", tal como se usen la presente memoria, se refiere una molécula o una porción de una molécula capaz de provocar la formación de anticuerpo y enlazarse específicamente por un anticuerpo. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. El enlazamiento específico, referido anteriormente, significa indicar que el antígeno reaccionará, de una manera altamente selectiva, con su anticuerpo correspondiente inocula multitud de otros anticuerpos que pueden suscitarse por otros antígenos. Un antígeno, según algunas formas de realización de la presente invención, es una proteína de RVP.

El término "RVP", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al receptor de poliovirus, también conocido como CD155 (grupo de diferenciación 155). El RVP es una glicoproteína de transmembrana con una secuencia de señal N-terminal, tres dominios de tipo inmunoglobulina (Ig) extracelular, un dominio de transmembrana y una cola citoplásmica. Tiene un tamaño molecular de aproximadamente 80 kDa y una estructura compuesta por tres dominios de tipo Ig, específicamente un dominio exterior de tipo V, seguido por dos dominios de tipo C2. Un RVP ejemplar según la invención se describe en números de acceso de GenBank: NP_001129240.1, NP_001129241.1, NP_001129242.2 y NP_006496.4. Estos receptores de poliovirus comparten la secuencia del dominio extracelular y, por lo tanto, pueden ser diana para la fracción de enlazamiento por afinidad de la invención.

El término "determinante antigénico" o "epítipo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la región de una molécula de antígeno que reacciona específicamente con un anticuerpo particular. Pueden usarse secuencias de péptidos derivadas de un epítipo, solas o conjuntamente con una fracción portadora, aplicando métodos conocidos en la técnica, para inmunizar animales y para producir anticuerpos policlonales o monoclonales adicionales. Pueden usarse péptidos aislados derivado de un epítipo en métodos diagnósticos para detectar anticuerpos.

Debe notarse que la afinidad puede cuantificarse usando métodos conocidos tales como resonancia de plasmón superficial (SPR) (descrita por Scarano S, Mascini M, Turner AP, Minunni M. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors [Captura de imágenes mediante resonancia de plasmón superficial para biosensores a base de afinidad]. Biosens Bioelectron. 2010, 25: 957-66), y puede calcularse usando, por ejemplo, una constante de disociación, Kd, de modo que un Kd más bajo refleje una afinidad más alta.

Los anticuerpos o un fragmento de los mismos según la invención se enlazan a un epítopo en hRVP. Específicamente, los anticuerpos se enlazan a un epítopo dentro de aminoácidos 1-343 del RVP tal como se describe en NP_006496.4.

Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, comprenden dos cadenas pesadas enlazadas conjuntamente por enlaces de disulfuro y dos cadenas ligeras, y cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada respectiva mediante enlaces de disulfuro en una configuración con forma de "Y". La digestión proteolítica de un anticuerpo produce dominios de Fv (fragmento variable) y Fc (fragmento cristalino). Los dominios de enlazamiento de antígeno, Fab, incluyen regiones donde varía la secuencia de polipéptido. El término F(ab')₂ representa dos brazos de Fab' enlazados conjuntamente por enlaces de disulfuro. El eje central del anticuerpo se denomina el fragmento de Fc. Cada cadena pesada tiene un extremo un dominio variable (VH) seguido por un número de dominios constantes (CH). Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante (CL) en su otro extremo, y el dominio variable de la cadena ligera es alineado con el dominio variable de la cadena pesada y el dominio constante de la cadena ligera es alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Los dominios variables de cada par de cadenas, ligera y pesada, forman el sitio de enlazamiento del antígeno. Los dominios sobre las cadenas, ligera y pesada, tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco, cuyas secuencias se conservan relativamente, se unen por tres dominios hipervariables conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDRs 1-3). Estos dominios contribuyen a la especificidad y afinidad del sitio de enlazamiento de antígeno.

La identificación o determinación de CDR a partir de una secuencia variable dada de cadena pesada o ligera se hace normalmente usando uno de pocos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, tal determinación se hace según Kabat (Wu T.T y Kabat E.A., J Exp Med, 1970; 132:211–50) e IMGT (Lefranc M-P, et al., Dev Comp Immunol, 2003, 27:55-77).

Cuando se usa la expresión "CDR que tiene una secuencia", o una expresión similar, incluye opciones en las cuales la CDR comprende las secuencias especificadas y también opciones en las cuales la CDR consiste en la secuencia especificada.

La especificidad de antígeno de un anticuerpo se basa en la región hipervariable (HVR), a saber: las secuencias únicas de CDR tanto de cadena ligera como de cadena pesada que forman conjuntamente el sitio de enlazamiento de antígeno.

El isotipo de la cadena pesada (gamma, alfa, delta, epsilon o mu) determina la clase de inmunoglobulina (IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, respectivamente). La cadena ligera es cualquiera de dos isótopos (kappa, κ o lambda, λ). Ambos isótopos se encuentran en todas las clases de anticuerpo.

El término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalente es, y fragmentos de anticuerpos suficientemente largos para exhibir la actividad biológica deseada, a saber: el enlazamiento a RVP humano.

Anticuerpo o anticuerpos según la invención incluyen anticuerpos intactos tales como anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales (mAbs), así como también fragmentos proteolíticos de los mismos, tales como los fragmentos de Fab o F(ab')₂. Anticuerpos de cadena única también caen dentro del alcance de la presente invención.

Fragmentos de anticuerpo

"Fragmentos de anticuerpo" comprenden solamente una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye un sitio de enlazamiento de antígeno del anticuerpo intacto y, por lo tanto, se conservan la capacidad de enlazar el antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo abarcados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento de Fab que tiene dominios de VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento de Fab' el cual es un fragmento de Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio de CH1; (iii) el fragmento de Fd fragmento que tiene dominios de VH y CH1; (iv) el fragmento de Fd' que tiene dominios de VH y CH1 y uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio de CH1; (v) el fragmento de Fv que tiene los dominios de VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento de dAb (Ward et al., Nature 1989, 341, 544-546) que consiste en un dominio de VH; (vii) regiones de CDR aisladas; (viii) fragmentos de F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos de Fab' enlazados por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (ix) molécula de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, Fv de cadena sencilla; scFv) (Bird et al., Science 1988, 242, 423-426; y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1988, 85,5879-5883); (x) "diacuerpos" con dos sitios de enlazamiento de antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (véanse, por ejemplo, las publicaciones EP 404,097, WO 93/11161 y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444-6448); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) los cuales, conjuntamente con polipéptidos complementarios de cadena ligera, forman un de regiones de enlazamiento de antígeno (Zapata et al. Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062; y U.S. Pat. No. 5,641,870).

Para la producción de fragmentos de anticuerpo han sido desarrolladas diversas técnicas. Tradicionalmente, estos fragmentos fueron derivados mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto et al., Journal de Biochemical y Biophysical Methods 24:107-117 (1992) y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente mediante células anfitrionas recombinantes. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpos puede aislarse de las bibliotecas de fago de anticuerpo. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos de Fab'-SH directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos de F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos de F(ab')₂ pueden aislarse directamente del cultivo de célula anfitriona recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el profesional experto. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento de Fv de cadena sencilla (scFv).

Los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser polipéptidos de composite de cadena sencilla que tienen capacidades de enlazamiento de antígeno y que comprende secuencias de aminoácidos homólogas o análogas a las regiones variables de una cadena ligera y una cadena pesada de inmunoglobulina, es decir VH-VL enlazado o Fv de cadena sencilla (scFv). Pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente estadounidense No. 4,946,778) para producir anticuerpos de cadena sencilla a RVP.

El término "anticuerpo monoclonal" (mAb), tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenidos de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir que los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un antígeno sencillo. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante sencillo sobre el antígeno.

El adjetivo "monoclonal" no deben interpretarse como que requiera producción del anticuerpo o mediante algún método particular. Los mAbs pueden obtenerse mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usarse de conformidad con la presente invención pueden ser hechos por el método de hibridoma, descrito primero por Kohler et al., Nature 1975, 256, 495, o pueden ser hechos mediante métodos de ADN recombinantes (véase, por ejemplo, la patente estadounidense no. 4,816,567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpo de fago usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al., Nature 1991, 352, 624-628 o Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222:581-597.

El diseño y desarrollo de moléculas de enlace de antígeno monovalente recombinante, derivadas de anticuerpos monoclonales a través de identificación rápida y clonación de los genes funcionales pesados variables (VH) y ligeros variables (VL) y el diseño y clonación de una secuencia de ADN sintético optimizada para expresión en bacterias recombinantes se describen en Fields et al. 2013, 8(6):1125-48.

Los mAbs de la presente invención pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, y IgD. Una hibridoma que produce un mAb puede cultivarse in vitro o in vivo. Pueden obtenerse altos títulos de mAbs mediante producción in vivo cuando se inyectan células de las hibridomas individuales por vía intra-peritoneal a ratones Balb/c puros-preparados para producir líquido ascítico que contiene altas concentraciones de los mAbs deseados. Los mAbs pueden ser purificados a partir de tales líquidos ascíticos o a partir de sobrenadantes de cultivo usando métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

También se abarcan los anticuerpos anti-idiotipo específicamente inmunoreactivos con las regiones hipervariables de un anticuerpo de la invención.

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de enlazamiento de antígeno (ABD) el cual comprende tres CDRs de una cadena ligera y tres CDRs de una cadena pesada, en cuyo caso dicho ABD tiene al menos 90 % de identidad de secuencia o similitud con un ABD de un anticuerpo de ratón monoclonal que comprende: (i) una cadena variable pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 69 y una cadena variable ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 71 (identificado en la presente memoria como 4E5 o hRVP.07); (ii) una cadena variable pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 73 y una cadena variable ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 75 (identificado en la presente memoria como 7D4 o hRVP.01); o (iii) una cadena variable pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 77 y una cadena variable ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 79 (identificado en la presente memoria como 5B9 o hRVP.09). Tal anticuerpo puede tener un dominio de ABD que tiene al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96, al menos 97, al menos 98, al menos 99 % de identidad de secuencia o similitud o 100 % de identidad de secuencia con ABD correspondiente de 4E5, 7D4 o 5B9.

Identidad de secuencia es la cantidad de aminoácidos o nucleótidos que coinciden exactamente entre dos secuencias diferentes. La similitud de secuencia permite sustitución conservadora de aminoácidos que han de determinarse aminoácidos idénticos.

La invención también proporciona variantes conservadoras de aminoácido de las moléculas del anticuerpo según la invención. Las variantes según la invención también pueden ser hechas para que conserven la estructura molecular total de las proteínas codificadas. Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales que comprenden los productos de proteína divulgados, algunas sustituciones racionales serán reconocidas por el experto en la técnica. Las sustituciones de aminoácidos, es decir las "sustituciones

conservadoras", pueden ser hechas, por ejemplo, con base en la similitud en polaridad, carga, solubilidad, capacidad hidrófuga, capacidad hidrofílica y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. El término "análogo de anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo derivado de otro anticuerpo mediante una o más sustituciones conservadoras de aminoácido.

El término "variante de anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula que comprende el anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, proteínas de fusión en las cuales el anticuerpo o un fragmento de enlazamiento de antígeno del mismo se enlaza con otra entidad química se consideran una variante de anticuerpo.

Análogos y variantes de las secuencias de anticuerpo también se encuentran dentro del alcance de la presente solicitud. Estos incluyen, pero no se limitan a, sustitución, inserción y supresión conservadoras y no conservadoras de aminoácidos dentro de la secuencia. Tal modificación y el análogo o variante de anticuerpo resultantes se encuentran dentro del alcance de la presente invención en tanto confieran o incluso mejoren el enlazamiento del anticuerpo al RVP humano.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos, tal como las conocidas por aquellos expertos en la técnica, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen el reemplazo de un aminoácido con otro que tiene el mismo tipo de grupo funcional o cadena lateral, por ejemplo, alifático, aromático, cargado positivamente, cargados negativamente. Estas sustituciones pueden mejorar la biodisponibilidad oral, la penetración y la focalización a poblaciones celulares específicas, inmunogenicidad y similares. Un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de péptido, polipéptido o proteína que altera, añade un suprime un sólo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de modo conservador", donde la alteración da lugar a la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, según una tabla conocida en la técnica, los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras de unos por otros:

1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Debe hacerse énfasis en que las secuencias de cadena de variante se determinan mediante métodos de secuenciación usando cebadores específicos. Los diferentes métodos de secuenciación empleados sobre la misma secuencia pueden dar lugar a secuencias ligeramente diferentes debido a problemas técnicos y cebadores diferentes, particularmente en los terminales de secuencia. Por lo tanto, las diferentes variantes de las secuencias de cadena variable anti-RVP se especifican a lo largo de la solicitud.

Las expresiones "molécula que tiene la porción de enlazamiento de antígeno de un anticuerpo" y "fragmentos de enlazamiento de antígeno", tal como se usan en la presente memoria, pretenden incluir no solamente moléculas de inmunoglobulina intacta de

cualquier isotipo y generadas por cualquier línea celular animal o microorganismo, sino también la fracción reactiva de enlazamiento de antígeno del mismo, incluyendo, pero no limitado a, el fragmento de Fab, el fragmento de Fab', el fragmento de F(ab')₂, la porción variable de las cadenas pesadas y/o ligeras de los mismos, mini-anticuerpos de Fab (véanse, por ejemplo, la publicación WO 93/15210, la solicitud de patente estadounidense 08/256,790, la publicación WO 96/13583, la solicitud de patente estadounidense 08/817,788, la publicación WO 96/37621, la solicitud de patente estadounidense 08/999,554), y anticuerpos de cadena sencilla que incorporan tal fracción reactiva, así como también cualquier otro tipo de molécula en la cual tal fracción reactiva de anticuerpo ha sido insertada físicamente. Tales moléculas pueden proporcionarse mediante cualquier técnica conocida que incluye, pero no se limita a, la disociación enzimática, la síntesis de péptidos o las técnicas recombinantes.

Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular, o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de tales anticuerpos, en tanto exhiban la actividad biológica deseada (patente estadounidense no. 4,816,567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Además, el injerto de una región determinante de complementariedad (CDR) puede realizarse para alterar ciertas propiedades de la molécula de anticuerpo, incluyendo afinidad o especificidad. Un ejemplo no limitante de injerto de CDR se divulga en la patente estadounidense 5,225,539.

Anticuerpos quiméricos son moléculas de las cuales diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un mAb de murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos que tienen residuos de marco de región variable, sustancialmente de anticuerpo humano (denominado un anticuerpo aceptador) y CDRs sustancialmente de un anticuerpo de ratón (denominado un anticuerpo de donante) también se denominan anticuerpos humanizados. Anticuerpos quiméricos se usan igualmente para reducir inmunogenicidad en la aplicación y para incrementar los rendimientos en producción, por ejemplo, cuando los mAbs de murino tienen rendimientos más altos de híbridomas, pero inmunogenicidad más alta en humanos, de manera que se usan mAbs quiméricos de humano/murino. En la técnica se conocen anticuerpos quiméricos y métodos para su producción (por ejemplo, solicitudes de patente vía PCT: WO 86/01533, WO 97/02671, WO 90/07861, WO 92/22653 y patentes estadounidenses 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089, 5,530,101 y 5,225,539).

Según algunas formas específicas de realización, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal quimérico.

Según algunas formas de realización, el anticuerpo quimérico comprende regiones constantes derivadas de humano.

Según algunas formas de realización, las regiones constantes humanas del anticuerpo quimérico se seleccionan del grupo que consiste en: IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana, y IgG4 humana.

Según una forma específica de realización, el anticuerpo quimérico monoclonal o fragmento del mismo, comprende una subclase de región constante de subtipo de IgG1 humana.

Según una forma particular de realización, se proporciona un anticuerpo monoclonal quimérico que reconoce RVP el cual comprende un conjunto de seis CDRs seleccionadas del grupo que consiste en: (i) SEQ ID NOs: 4 o 80, 6 o 81, 8 o 82, 12, 14, and, 16; (ii) SEQ ID Nos: 20 o 83, 22, 24, 28, 30, y 32; y (iii) SEQ ID Nos: 36 o 84, 38, 40, 44 o 85, 46, y 48.

5 Farmacología

En las formulaciones farmacéuticas y medicamentos, el agente activo se utiliza preferiblemente junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico. El o los vehículos in que ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no indebidamente dañinos al destinatario del mismo. El agente activo se proporciona en una cantidad que es efectiva para lograr el efecto farmacológico deseado, tal como se ha descrito antes, y en una cantidad apropiada para alcanzar la posición deseada.

Normalmente, los anticuerpos y fragmentos y conjugados de los mismos de la presente invención que comprenden la porción de enlazamiento de antígeno de un anticuerpo o que comprende otro polipéptido que incluye un mimético de péptido se suspenderá en una solución salina estéril para usos terapéuticos. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse, de manera alterna, para controlar la liberación de ingrediente activo (molécula que comprende la porción de enlazamiento de antígeno de un anticuerpo) o para prolongar su presencia en el sistema de un paciente. Se conocen numerosos sistemas de entrega de medicamento adecuados incluyen, por ejemplo, sistema de liberación de medicamento que son implantables, hidrogeles, hidroximetilcelulosa, microcápsulas, liposomas, microemulsiones, microesferas y similares. Pueden prepararse preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para hacer complejos de la molécula o adsorberla según la presente invención. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli (etileno-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero de polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebáico. La velocidad de liberación de la molécula según la presente invención, es decir de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, desde tal matriz depende del peso molecular de la molécula, la cantidad de la molécula dentro de la matriz y el tamaño de partículas dispersadas.

La composición farmacéutica de esta invención puede administrarse por cualquier medio adecuado, tal como por vía oral, tópica, intranasal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraarticular, intralesional, intratumoral o parenteral. Ordinariamente se usa administración intravenosa (i.v.) para entregar anticuerpos.

Será aparente para aquellos de habilidad media en la técnica que la cantidad efectiva terapéuticamente de la molécula según la presente invención dependerá, entre otras cosas, del horario de administración, la dosis unitaria de la molécula administrada, de si la molécula se administra en combinación con otros agentes terapéuticos, del estado inmunitario y la salud del paciente, la actividad terapéutica de la molécula administrada, su persistencia en la circulación de la sangre y del criterio del médico tratante.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere una cantidad de un medicamento efectivo para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del medicamento puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas a órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el medicamento pueda impedir el crecimiento y/o matar las células

cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para terapia del cáncer, la eficiencia en vivo puede medirse, por ejemplo, evaluando la duración de supervivencia, el tiempo de progreso de la enfermedad (TTP), las velocidades de respuesta (RR), la duración de respuesta, y/o la calidad de vida.

5 El cáncer corregible para tratamiento mediante la presente invención incluye, pero no se limita a: carcinoma, linfoma, las toma, sarcoma y leucemia o malignidades linfoides. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer celular escamoso, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón), cancer del peritoneo, 10 cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal (incluido 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 de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y 15 diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como también linfoma de células B (incluido el linfoma que no es de Hodgkin de bajo grado/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL de grado intermedio difuso; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células no disociadas, pequeño, de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células de 20 manto; linfoma relacionado con sida y macroglobulinemia); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células peludas (tricoleucemia); leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo después de trasplante (PTLD), así como también proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meig. Preferiblemente, el cáncer 25 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma que no es de Hodgkins (NHL), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejidos suaves, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovarios, mesotelioma, y mieloma múltiple. Las condiciones cancerosas 30 corregibles para tratamiento de la invención incluyen cánceres metastásicos.

Según otras formas de realización, la composición farmacéutica según la invención es para uso en tratamiento de cáncer, caracterizado por sobreexpresión de RVP. Los tipos de cánceres relacionados con sobreexpresión de RVP pueden identificarse usando bases de 35 datos conocidas tales como The Cancer Genome Atlas (TCGA). Según algunas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma corticosuprarrenal (ACC), carcinoma de células renales cromóforas (KICH), carcinoma hepatocelular de hígado (LIHC), adenocarcinoma de colon y rectal (COAD, READ), adenocarcinoma ductal pancreático (PAAD), feocromocitoma & paraganglioma (PCPG), carcinoma de riñón papilar (KIRP), adenocarcinoma de pulmón (LUAD), carcinoma de células escamosas de cabeza 40 y cuello (HNSC), adenocarcinoma de próstata (PRAD), carcinoma endometrial de cuerpo uterino (UCEC), cáncer cervical (CESC), melanoma cutáneo (SKCM), mesotelioma (MESO), cáncer de vejiga urotelial (BLCA), carcinoma de riñón de células claras (KIRC), carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC), carcinosarcoma uterino (UCS), sarcoma (SARC), cistadenocarcinoma seroso de ovario (OV), carcinoma de tiroides papilar (THCA), glioblastoma multiforme (GBM), cáncer de mama (BRCA), glioma de grado más 45 bajo (LGG), y linfoma de células B grandes difusas (DLBC). Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

Las moléculas de la presente invención como ingredientes activos se disuelven, dispersan o mezclan en un excipiente farmacéuticamente aceptable y compatible con el ingrediente 50 activo como es bien sabido. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina o suero, suero de fosfato de pH regulado (PBS), destroza, glicerina, etanol o similares y

combinaciones de los mismos. Otros vehículos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores de pH.

- 5 La composición farmacéutica según la presente invención puede administrarse conjuntamente con una composición neoplásica.

10 El término "tratamiento", tal como se usa en la presente memoria, se refiere tanto a tratamiento terapéutico, como profiláctico o medidas preventivas. Aquellos que necesiten tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como también aquellos en los que el desorden ha de ser prevenido.

15 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que es normalmente caracterizado por crecimiento no regulado de células. Ejemplos de áncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen melanoma, cáncer de pulmón, tiroides, mama, colon, próstata, hepático, vejiga, renal, cervical, pancreático, leucemia, linfoma, mieloides, de ovarios, de útero, sarcoma, biliar o endometrial.

Según algunas formas de realización, el método de tratar cáncer comprende administrar la composición farmacéutica como parte de un régimen de tratamiento que comprende la administración de al menos un agente anti-canceroso adicional.

20 Según algunas formas de realización, el agente anti-canceroso se selecciona del grupo que consiste en un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un taxano, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor de topoisomerasa II, una asparaginasa, un agente de alquilación, un antibiótico antitumoral, y combinaciones de los mismos. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

25 Según algunas formas de realización, el antimetabolito se selecciona del grupo que consiste en citarabina, gludarabina, fluorouracilo, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, gemcitabina, e hidroxiaurea. Según algunas formas de realización, el inhibidor mitótico se selecciona del grupo que consiste en vincristina, vinblastina, y vinorelbina. Según algunas formas de realización, el inhibidor de topoisomerasa se selecciona del grupo que consiste en topotecán e irinotecán. Según algunas formas de realización, el agente de alquilación se selecciona del grupo que consiste en busulfán, carmustina, lomustina, clorambucilo, ciclofosfamida, cisplatino, carboplatino, ifosamida, mecloretamina, melfalán, tiotepa, dacarbazina, y procarbazona. Según algunas formas de realización, el antibiótico antitumoral se selecciona del grupo que consiste en bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, idarubicina, mitomicina, mitoxantrona, y plicamicina. Según algunas formas de realización, la topoisomerasa II se selecciona del grupo que consiste en etopósido y tenipósido. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la presente invención.

40 Según algunas formas particulares de realización, el agente anti-canceroso adicional se selecciona del grupo que consiste en bevacizumab, carboplatino, ciclofosfamida, doxorubicina clorhidrato, gemcitabina clorhidrato, topotecán clorhidrato, tiotepa, y combinaciones de los mismos. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la presente invención.

45 Anticuerpos monoclonales según la presente invención pueden usarse como parte de una terapia combinada con al menos un agente anti-canceroso. Según algunas formas de realización, el agente anti-canceroso adicional es un inmuno-modulador, una célula del linfocito activada, un inhibidor de cinasa o un agente quimioterapéutico.

Según algunas formas de realización, el agente anti-canceroso es un inmuno-modulador, ya sea agonista o antagonista, tal como un anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario.

El bloqueo por inmunoterapia de punto de control ha demostrado ser un nuevo entorno fascinante de tratamiento de cáncer. Las rutas de punto de control inmunitario consisten en una trama de moléculas co-estimulantes e inhibidoras que trabajan de común acuerdo para mantener la auto-tolerancia y proteger los tejidos del daño por el sistema inmunitario en condiciones fisiológicas. Los tumores aprovechan ciertas rutas de punto de control para evadir el sistema inmune. Por lo tanto, la inhibición de tales rutas ha emergido como una estrategia promisorio de tratamiento anticanceroso.

El anticuerpo anti-citotóxico T de linfocito 4 (CTLA-4) ipilimumab (aprobado en 2011) fue el primer agente inmuno-terapéutico que mostró un beneficio para el tratamiento de pacientes con cáncer. El anticuerpo interfiere con señales inhibidoras durante la presentación de antígeno a células T. El anticuerpo de muerte celular anti-programada 1 (PD-1) pembrolizumab (aprobado en 2014) bloquea la señalización inmuno-reguladora negativa del receptor de PD-1 expresada por células T. Un agente adicional anti-PD-1 fue presentado para aprobación regulatoria en 2014 para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). La investigación activa está explorando actualmente muchos otros puntos de control inmunitarios, entre ellos: CEACAM1, NKG2A, B7-H3, B7-H4, VISTA, CD112R, gen de activación de linfocito 3 (LAG3), CD137, OX40 (también denominado CD134), y receptores de tipo inmunoglobulina de célula asesina (KIR).

Según algunas formas específicas de realización, el inmuno-modulador se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo que inhibe CTLA-4, una proteína de muerte celular programada anti-humana 1 (PD-1), anticuerpo de PD-L1 y PD-L2, una célula de linfocito citotóxica activada, un agente de activación de linfocito, un anticuerpo contra CEACAM, un anticuerpo contra TIGIT, y un inhibidor de ruta RAF/MEK. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la presente invención. Según algunas formas específicas de realización, el inmuno-modulador adicional se selecciona de mAb a PD-1, mAb a PD-L1, mAb a PD-L2, mAb a CEACAM1, mAb a CTLA-4, mAb a TIGIT, Interleucina 2 (IL-2) o célula asesina activada de linfocina (LAK).

Según otras formas de realización, el agente anticanceroso adicional es un agente quimioterapéutico. El agente de quimioterapia, que podrían administrarse conjuntamente con el anticuerpo según la presente invención, o por separado, podría comprender cualquier agente de este tipo conocido en la técnica que exhibe actividad anticancerosa, incluyendo pero no limitados a: mitoxantrona, inhibidores de topoisomerasa, vincas de veneno de huso: vinblastina, vincristina, vinorelbina (taxol), paclitaxel, docetaxel; agentes de alquilación: mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida; metotrexato; 6-mercaptopurina; 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina; podofilotoxinas: etopósido, irinotecán, topotecán, dacarbazina; antibióticos: doxorubicina (adriamicina), bleomicina, mitomicina; nitrosoureas: carmustina (BCNU), lomustina, epirubicina, idarubicina, daunorubicina; iones inorgánicos: cisplatino, carboplatino; interferón, asparaginasa; hormonas: tamoxifeno, leuprolida, flutamida, y acetato de megestrol.

Según algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de agentes de alquilación, antimetabolitos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores relacionados, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, antibióticos, L-asparaginasa, inhibidor de topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación de platino, urea sustituida con antracenediona, derivados de metil hidrazina, supresor corticoadrenal, adrenocorticosteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógeno, andrógenos, antiandrógeno, y análogos de hormona que libera gonadotropina. Según otra forma de realización, el agente quimioterapéutico se selecciona

del grupo que consiste en 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina (LV), irenotecán, oxaliplatino, capecitabina, paclitaxel y doxetaxel. Pueden usarse uno o más agentes quimioterapéuticos.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica según la presente invención es para uso en el tratamiento de cáncer o para uso en mejorar la respuesta inmunitaria.

El término "mejorar respuesta inmunitaria" se refiere a incrementar el nivel de respuesta del sistema inmunitario e inducido prolongar su memoria. La composición farmacéutica según la presente invención puede usarse para estimular el sistema inmunitario después de vacunación. Por lo tanto, en una forma de realización, la composición farmacéutica puede usarse para mejorar la vacunación.

En determinadas formas de realización, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, tiroides, mama, colon, melanoma, de próstata, hepático, de vejiga, renal, cervical, pancreático, leucemia, linfoma, mieloides, de ovarios, de útero, sarcoma, biliar y de células de endometrio. Cada posibilidad representa una forma separada de realización de la invención.

Según algunas formas de realización, una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo o fragmento del mismo según la presente invención, y una composición farmacéutica, que comprende un inmuno-modulador adicional o un inhibidor de cinasa, se usan en el tratamiento de cáncer mediante administración separada.

Según otro aspecto más, la presente invención proporciona un método de tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesite, el cual comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo según la presente invención.

El término "cantidad efectiva", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad suficiente del anticuerpo monoclonal o del fragmento de anticuerpo que al administrarse a un sujeto tendrá el efecto terapéutico destinado. La cantidad efectiva requerida para lograr el resultado final terapéutico puede depender de un número de factores que incluyen, por ejemplo, el típico específico del tumor y la severidad de la condición del paciente y si la combinación se co-administra además con radiación. La cantidad efectiva (dosis) de los agentes activos, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para afectar una respuesta terapéutica benéfica en el sujeto con el tiempo, incluida, pero no limitada a la inhibición del crecimiento tumoral, reducción en la velocidad de crecimiento tumoral, prevención de crecimiento tumoral y metástasis y supervivencia mejorada.

La toxicidad y efectividad terapéutica de las composiciones descritas en la presente memoria pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la IC₅₀ (la concentración que proporciona 50% de inhibición) y la dosis máxima tolerada para un compuesto sujeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de una gama de dosificaciones para uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo, entre otras cosas, de la forma de dosificación empleada, el régimen de dosificación elegido, la composición de los agentes usada para el tratamiento y la ruta de administración utilizada, entre otros factores relevantes. La formulación exacta, la ruta de administración y la dosificación pueden elegirse por el médico individual en vista de la condición del paciente. Dependiendo de la severidad y del nivel de respuesta de la condición que va a tratarse, la dosificación también puede ser una administración sencilla de una composición de liberación lenta y el curso del tratamiento dura desde varios días hasta varias semanas o hasta que se efectúa la cura o

se logra la disminución del estado de enfermedad. La cantidad de una composición que va a administrarse dependerá, por supuesto, del sujeto que está siendo tratado, de la severidad de la aflicción, la manera de administración, el criterio del médico que prescribe y todos los otros factores relevantes.

- 5 El término "administrar" o "administración de" una sustancia, un compuesto o un agente a un sujeto puede realizarse usando uno de una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un compuesto o un agente pueden administrarse por vía enteral o parenteral. Vía enteral se refiere a la administración a través del tracto gastrointestinal que incluye administración oral, sublingual o rectal. La administración
- 10 parenteral incluye administración por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, ocular, sublingual, intranasal, por inhalación, intraespinal, intra cerebral y transdérmica (mediante absorción, por ejemplo, a través de un canal de la piel). Un compuesto o agente también puede introducirse apropiadamente por medio de dispositivos poliméricos recargables o biodegradables u otros dispositivos, por ejemplo,
- 15 parches y bombas, o formulaciones que proporcionan liberación prolongada, lenta o controlada el compuesto o el agente. La administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o por uno o más períodos prolongados. En algunas formas de realización, la administración incluye, tanto administración directa, incluyendo auto-administración, como también administración indirecta incluido el acto de
- 20 escribir un medicamento. Por ejemplo, tal como se usa en la presente memoria, un médico que instruye un paciente para auto-administrar un medicamento, o para hacerse administrar el medicamento por otra persona y/o quien proporciona a un paciente una prescripción para un medicamento está administrando el medicamento al paciente.

- Los anticuerpos se administran generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,1 a
- 25 aproximadamente 20 mg/kg de peso del paciente, comúnmente alrededor de 0,5 a aproximadamente 10 mg/kg, y con frecuencia aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg. A este respecto se prefiere usar anticuerpos que tienen una vida media de circulación de al menos 12 horas, preferiblemente de al menos 4 días, más preferiblemente de hasta 21 días. Se espera que los anticuerpos quiméricos tengan vidas medias
- 30 circulatorias de hasta 14-21 días. En algunos casos puede ser ventajoso administrar una dosis de carga grande seguida por dosis de mantenimiento periódicas (por ejemplo, semanalmente) durante el período de tratamiento. Los anticuerpos también pueden entregarse mediante sistemas de entrega de liberación lenta, bombas y otros sistemas de entrega conocidos para fusión continua.

- 35 Los términos "aproximadamente", "alrededor de" significan que debe suponerse un intervalo de Rohr aceptable, por ejemplo, de hasta 5% o 10%, para el valor particular.

Angiogénesis

- Según un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica según la presente invención para uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos
- 40 relacionados con angiogénesis.

- La angiogénesis es un evento celular importante en el cual las células endoteliales vasculares proliferan, se recortan y reorganizan para formar nuevos vasos a partir de redes vasculares preexistentes. Hay evidencia convincente de que el desarrollo de un suministro vascular es esencial para procesos proliferativos normales y patológicos y para
- 45 inflamación. El compartimiento vascular es necesario no sólo para el desarrollo y diferenciación de órganos durante la embriogénesis, sino también para curar heridas, reparar tejidos y funciones reproductivas en el adulto.

La angiogénesis también está implicada en la patogénesis de una variedad de trastornos incluyendo, pero sin limitarse a: tumores, retinopatías proliferativas, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide y psoriasis. La angiogénesis es esencial para el crecimiento de la mayoría de tumores primarios y sus metástasis subsiguientes. Los tumores pueden absorber suficientes nutrientes y oxígeno por difusión simple hasta un tamaño de 1-2 mm, y en tal punto su crecimiento adicional requiere la elaboración de un suministro vascular. Se piensa que este proceso involucra el reclutamiento de la vasculatura madura anfitriona adyacente para comenzar a brotar nuevos capilares de vasos sanguíneos los cuales crecen hacia y, a continuación, se infiltran en la masa tumoral. Además, la angiogénesis tumoral involucra el reclutamiento de células precursoras endoteliales circulantes de la médula ósea para promover la neovascularización.

Diagnóstico

La presente invención divulga además métodos para diagnosticar y pronosticar cáncer.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer o enfermedad infecciosa en un sujeto y el método comprende la etapa de determinar el nivel de expresión de RVP en una muestra biológica de dicho sujeto usando al menos un anticuerpo como se ha descrito en la presente memoria.

El término "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestra obtenidos de un organismo que puede usarse en un ensayo de diagnóstico o de monitoreo. El término abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tal como un espécimen de biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos y la progenie de las mismas. Adicionalmente, el término puede abarcar células tumorales circulantes u otras. El término abarca específicamente una muestra clínica incluye además células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados de células, suero, plasma, orina, fluido amniótico, fluidos biológicos que incluyen acuosos humorales y vítreos para muestras de los ojos, y muestras de tejidos. El término también abarca muestras que han sido manipuladas de cualquier manera después de su obtención, tal como tratamiento con reactivos, solubilizados y/o un enriquecimiento para ciertos componentes.

La determinación del nivel de expresión de RVP puede realizarse mediante un anticuerpo anti-RVP etiquetado como se ha descrito en la presente memoria. La determinación de la expresión puede realizarse, por ejemplo, mediante ELISA.

El método de la invención puede comprender además la etapa de comparar dicho nivel de expresión con un nivel de control.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente algunas formas de realización de la invención. De ninguna manera deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Procedimientos experimentales

Ahora se hace referencia los siguientes ejemplos que, conjuntamente con la descripción anterior, ilustran la invención de una manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica. Otras referencias generales que se refieren a procedimientos bien conocidos se proporcionan a lo largo de este documento para conveniencia del lector.

Ejemplo 1. Expresión de RVP alta se correlaciona con mal pronóstico

RVP y Nectin-2 son ligandos para el receptor inhibidor TIGIT (Figura 2). Los resultados se ilustran que los niveles altos de expresión de RVP se correlacionan con un mal pronóstico de cáncer de pulmón, cáncer de mama y liposarcoma (Figuras 1A-C, respectivamente). La expresión GEO de RVP fue correlacionada con la supervivencia usando bioprofiling. Los conjuntos de datos relevantes son ID: GSE31210, GSE25055, GSE30929. Además, usando los mismos análisis la expresión de Nectin-2 fue la mayoría de las veces un marcador positivo para supervivencia.

Ejemplo 2. Generación y purificación de mAbs anti-RVP

Para generar anticuerpos anti-RVP, se produjo una proteína recombinante y se purificó, hRVP-Fc, que combina la parte extracelular de RVP humano y la región de Fc humano de un portador de inmunoglobulina G como un inmunógeno.

Ratones BALB/c fueron inyectados con 50 µg del inmunógeno en adyuvante completo de Freund y 2 semanas más tarde en adyuvante incompleto de Freund. Después de 2 semanas, los sueros fueron analizados para el título de anticuerpo.

Los mejores intervinientes (el suero fue monitoreado mediante ensayo de ELISA para el título de los anticuerpos anti-hRVP-Fc) fueron potenciados con el inmunógeno en PBS. Tres días más tarde, se recogieron células de bazo y después de lisis de glóbulos rojos, se fusionaron con células SP2/0. Las células fueron sembradas en medio de 20% de RPMI 1640 que contenía hipoxantina, aminopterina, y timidina para selección de hibridoma y evaluadas para mAbs usando ELISA. Fueron generadas líneas celulares estables de hibridoma fusionando células de mieloma de SP2/0 con células de bazo de un ratón inmunizado.

Se seleccionaron adicionalmente resultados positivos (líneas celulares que secretan anticuerpos que reconocen hRVP-Fc) para desarrollar un producto que tendrá varias características diferenciadoras: a) alto rendimiento para reducir los costes de producción de anticuerpo; b) la falta de reactividad cruzada entre RVP de ratón y humano y varios otros ligandos de los receptores de célula inmunitaria; c) una fuerte capacidad de enlazamiento a las moléculas de RVP humano, maduras nativas, expresado en la superficie de células vivas (los anticuerpos fueron seleccionados de una combinación de anticuerpo monoclonal anti-hRVP integral con capacidad aprobada para reconocer hRVP en diferentes técnicas, por ejemplo, citometría de flujo, western blot (membrana de Western), ELISA). En efecto, el RVP humano y de ratón tienen alto nivel de homología y no es fácil generar un anticuerpo monoclonal de ratón que reconozca un homólogo humano. De manera más importante, el RVP es glicosilado en gran medida en su región extracelular. Por estas razones, no es fácil generar un anticuerpo que reconozca una proteína nativa usando antígenos comunes (tales como los derivados de E. coli).

Los presentes inventores han usado el inmunógeno de hRVP-Fc, una molécula producida en células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293T) de mamíferos y purificada en condiciones nativas mediante cromatografía de inmuno-afinidad para imitar cuidadosamente el RVP humano de proteína nativa. En conclusión, a partir de una combinación de mAbs anti-hRVP generados, fueron identificados representantes que reconocen una forma de RVP humano nativo en células vivas, lo cual es un prerrequisito para desarrollar un derivado que influencia haría la respuesta celular inmunitaria humana durante el tratamiento.

Fueron generados cuatro anticuerpos anti-RVP. De estos, tres anticuerpos fueron mAbs anti-RVP de bloqueo, a saber: anticuerpo 5B9 (también denominado hRVP.09), anticuerpo

7D4 (también denominado hRVP.01) y anticuerpo 4E5 (también denominado hRVP.07). Estos anticuerpos bloquean, todos, el enlazamiento de TIGIT-Ig (tal como se ilustra en Figuras 3B-D, respectivamente). Fue generado un cuarto anticuerpo que no bloquea el enlazamiento de TIGIT-Ig y fue denominado 2G3 (también denominado hRVP.17) (Figura 3A).

Se usó resonancia de plasmón de superficie (SPR) Biosensor Biacore™ T100 (GE Healthcare) para determinar Koff, Kon y KD entre los anticuerpos y hRVP (Tabla 1).

Tabla 1. Medición de afinidad de anticuerpos mediante Biacore™

mAB	Afinidad
4E5	7.22E ⁻¹⁰
5B9	1.62E ⁻⁰⁹
7D4	1.93E ⁻¹⁰

Anticuerpos monoclonales quiméricos que comprenden la región de IgG1 de cadena pesada humana, descrita en SEQ ID NO: 86 (que corresponde a GenBank: AAA02914.1), fueron producidos a partir de los tres anticuerpos anteriores, usando métodos conocidos en la técnica.

Ejemplo 3. Bloqueo de interacciones de RVP-TIGIT con mAb anti-RVP mejoró destrucción de células NK de líneas celulares humanas

Las células diana fueron etiquetadas con [35S]-metionina 12 horas antes del ensayo. Los anticuerpos indicados fueron adicionados a la concentración final de 5µg/ml e incubados con las dianas etiquetadas (5000 células/ pozo) durante 30 minutos sobre hielo. Los ensayos se realizaron en medio RPMI en 96 placas con forma de U a 37°C durante 5 horas. Las dianas etiquetadas fueron incubadas con células NK efectoras a una proporción de E:T de 10:1. Después de la incubación se centrifugaron las placas (1600 rpm, 5 min, 4°C) y se recogieron sobrenadantes (50 µl) y se transfirieron a placas Opti opacas (Packard). Se adicionaron 150 µl de líquido de centelleo (Perkin Elmer) y se analizó mediante un micro beta, β-contador (Perkin Elmer). Se determinó el etiquetado máximo adicionando 100 µl de NaOH de 0,1 N a una cantidad igual de dianas (5000/pozo). Se determinó liberación espontánea en pozos que contenían células dianas solamente. Se calculó la matanza específica final tal como sigue: ((lectura radioactiva - liberación espontánea) / (etiquetado máximo - liberación espontánea))*100 = matanza específica. Tal como se muestra en la figura 4, el cultivo de células NK con el mAb anti-RVP 7D4 (también denominado hRVP.01) mejoró (en dos veces) la matanza de células NK de la línea celular de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231.

Ejemplo 4. Bloqueo de interacciones de RVP-TIGIT con mAb anti-RVP mejoró matanza de células NK de líneas celulares cancerosas humanas

Las células dianas fueron etiquetadas con [35S]-metionina 12 horas antes del ensayo. Los anticuerpos indicados fueron adicionados a la concentración final de 5µg/ml e incubados con las dianas etiquetadas (5000 cells/ pozo) durante 30 minutos sobre hielo. Las células fueron incubadas con células NK efectoras a una relación de E:T de 10:1. Los ensayos se realizaron en medio RPMI en 96 placas con forma de U a 37°C durante 5 horas. Después de la incubación las placas fueron centrifugadas (1600 rpm, 5 min, 4°C) y se recogieron sobrenadantes (50 µl) y se transfirieron a placas Opti opacas (Packard). Se agregaron 150 µl de líquido de centelleo (Perkin Elmer) y se analizaron por medio de un micro beta, β-contador (Perkin Elmer). Se determinó el etiquetado máximo adicionando 100 µl de NaOH de 0,1N a una cantidad igual de dianas (5000/pozo). Se determinó una liberación

espontánea en pozos que contenían células diana solamente. Se calculó la matanza específica final tal como sigue: $((\text{lectura radioactiva} - \text{liberación espontánea}) / (\text{etiquetado máximo} - \text{liberación espontánea})) \times 100 = \text{matanza específica}$.

Tal como se muestra en la figura 5 el bloqueo de las interacciones de RVP-TIGIT con el mAb anti-RVP 4E5 (también denominado hRVP.07) mejora la matanza de células NK de la línea celular cancerosa humana HepG2 (carcinoma hepatocelular). Por lo tanto, es claro que el bloqueo de RVP conduce a una matanza mejorada de las células dianas. La matanza se mejora aún más cuando se usa la contraparte de IgG humana de 4E5 en una versión quimérica del mAb. La matanza es equivalente al control positivo (Erbitux®).

Ejemplo 5. Líneas celulares tumorales humanas expresan RVP y Nectin-2

Para examinar la expresión de RVP y Nectin-2 en células tumorales, se examinaron niveles de expresión de estas proteínas en diferentes líneas celulares tumorales mediante análisis FACS usando el anti RVP-4E5 Ab y el anti-Nectin-2 Ab (clon TX-31), ambos a 2 µg/ml. Tal como se muestra en las figuras 6A-O, diversas líneas celulares tumorales humanas expresan RVP y Nectin-2. Específicamente se muestra que las células de melanoma (Figuras 6A-E), células de cáncer de mama (Figuras 6F-H), células colorectales (Figura 6I), células de riñón (Figura 6J), células de cáncer de pulmón (Figura 6K), células de cáncer de próstata (Figura 6L), células tumorales de cerebro (Figura 6M), y células de carcinoma hepatocelular (Figuras 6N-O) expresan, todas, RVP y Nectin-2.

Ejemplo 6. RVP es el principal ligando de TIGIT

Las figuras 7A-7C demuestran que RVP es el principal ligando de TIGIT. Específicamente se mostró que las células de HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano) expresan tanto RVP, como Nectin-2 (Figura 7A). El cultivo de células de HepG2 cells con mAb anti-RVP purificado 4E5, también denominado hRVP.07 (0,15 µg/pozo), bloqueo casi completamente en el enlace de TIGIT-Ig (2 µg/ml) (Figura 7B), a pesar del hecho de que estas células también expresan Nectin-2. Tal como se muestra en Figura 7C y 7D, es claro que no hubo reconocimiento directo de Nectin-2 por los mAbs anti-RVPs.

Ejemplo 7. El enlace de clones de mAb a RVP humano y de primate

Tal como se muestra en Figuras 8A-C, todos los clones de anticuerpo anti-RVP ensayados se enlazan a RVP humano (hRVP), usando análisis de FACS. Brevemente, las células fueron sometidas a tripsinización para tinción a 2×10^5 células por pozo. Los anticuerpos indicados fueron adicionados durante 30 minutos sobre hielo. Todos los anticuerpos fueron usados a concentración final de 2 µg/ml. La detección de Ab anti-RVP enlazado se realizó usando IgG- 647 anti-ratón. Se usó IgG1 de ratón kappa como un control negativo.

Figura 8A ilustra que fue detectado hRVP endógeno mediante tinción de FACS sobre la superficie de células de carcinoma hepatocelular de HepG2. En Figura 8B fue usada la línea celular de murino B16. La secuencia de RVP de murino es diferente de la especie humana y no se reconoce por los anticuerpos RVP anti-humanos, tal como puede verse por la falta de señal (panel izquierdo). Cuando fue sobreexpresada la proteína de hRVP de longitud completa (NP_006496.4 aminoácidos 1-418) en estas células, todos los tres clones dieron lugar a una señal idéntica (panel derecho) soportando además la declaración de que esta tinción es el resultado de un enlace específico de estos Abs a la proteína de RVP humano.

A través de algunas especies se conserva la secuencia de aminoácidos de RVP. La conservación de aminoácidos de hRVP humano fue comparada con aquella del bono verde africano *in-silico* y se encontró que tenía una similitud de 93% a RVP humano. La tinción de FACS de células Vero de mono verde africano demostró que el RVP del mono se

reconoce eficientemente por todos los tres mAbs humanos (Figura 8C). Se encontró además que estos anticuerpos anti-RVP humanos no reconocen RVP de caninos y roedores tales como hámster o ratón. La figura 9 muestra análisis de FACS para la expresión de RVP canino que expresa células MDCK. Como puede verse, ninguno de los Abs anti-humanos dio lugar a una señal positiva, mientras que la expresión misma de RVP es sugerida por la fuerte señal de TIGIT-Ig.

Ejemplo 8. Nectin-2 se enlaza preferentemente por DNAM-1

Fueron usados TIGIT-Fc y DNAM-1-Fc a las concentraciones indicadas en Figuras 10 para teñir células que sobre expresan línea celular hNectin-2: RPMI-8866 (Figuras 10A y 10B), (o línea celular B16-hRVP (Figuras 10C y 10D). La detección de proteína de fusión enlazada fue hecha usando APC anti-human-IgG y analizada mediante FACS.

Para el enlazamiento de RVP, la señal mediante TIGIT-Fc fue de 2-4 veces más alta que la de DNAM-1-Fc, similarmente a un informe previo (Yu. X et al., 2009, Nat Immunol., 10(1):48-57). Al mismo tiempo, el enlazamiento de hNectin-2 a DNAM-1-Fc fue 2-10 veces más fuerte que su enlazamiento a TIGIT-Fc, lo cual es contradictorio a un informe (Yu. X et al 2009), pero corroborado por otro estudio (Zhu Y et al., 2016, J Exp Med., 8;213(2):167-76). Tomados juntos, los resultados ilustran que DNAM-1 es el receptor preferencial para el enlazamiento de Nectin-2. Por consiguiente, el bloqueo de RVP impedirá la señalización inhibitoria de TIGIT, mientras que permite la señalización co-estimulante mediante DNAM-1. DNAM-1 media la adhesión celular a otras células que portan sus ligandos.

Ejemplo 9. Anticuerpos anti RVP mejoran proliferación de células T

Para ensayar el efecto de los mAbs anti RVP en la proliferación de células T, se tinturaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE) y se incubaron con células dianas en la presencia de anticuerpos a una concentración de 4 µg/ml. Se midió la dilución de CFSE sobre células positivas de CD45 después de 5-9 días en cultivo. Tal como se mostró en Figura 11, la actividad de anti RVP 5B9 excede la actividad de los anticuerpos PD-1 y CTLA4 como un solo agente. Asimismo, el clon 4E5hIgG1 anti RVP quimérico, que tiene una región constante de IgG1 humana, fue superior a su contraparte de ratón. A continuación, fue examinado el efecto combinado de mAbs anti RVP y otros anticuerpos que se encontraron mejoran la proliferación de células T. PBMC humanas fueron tinturadas con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE) e incubadas con células dianas en la presencia de anticuerpos a una concentración de 4 µg/ml. Se midió la dilución de CFSE en células positivas de CD45 después de 5-9 días en cultivo. Los resultados muestran que la actividad de proliferación de anti-RVP 5B9, cuando se combina con PD-1 o con CTLA-4, excede la actividad de una combinación de PD-1 y CTLA4 (Figura 12). Asimismo, la actividad de una combinación de anti-RVP 4E5 y CTLA-4 = la combinación de PD-1 y CTLA4. A continuación, fue examinada la inducción específica de CD8. Tal como se muestra en la figura 13, la actividad de proliferación de células T de anticuerpos CD8 anti RVP excede la actividad de PD1. Igualmente, la actividad de inducción de anticuerpo 5B9 anti RVP excede la de CTLA1. La relación de proliferación de CD8/CD4 fue evaluada para los diferentes anticuerpos (Figura 14). 5B9 anti RVP tuvo la más alta relación de CD8/CD4. La secuencia de ADN de las cadenas pesadas y ligeras variables fue usada para construir anticuerpos quiméricos que comprende los dominios constantes de isotipo de IgG1 humana y el dominio ligero constante (LC) Kappa de IgG humana. La proliferación de células T inducida por anticuerpos quiméricos de contraparte humanos y de ratón fue medida mediante el ensayo de CFSE. Los números mostrados en Tabla 2 representan un nivel relativo de proliferación en comparación con el control.

Tabla 2. Un resumen del efecto de anticuerpos anti RVP en la proliferación de células T

nombre del clon	Tipo de Fc	Efecto en la proliferación de células T (CFSE)	Efecto en la proliferación de células T conteo de células
4E5	IgG1 de ratón	198%	320%
	IgG1 humana	275%	353%
5B9	IgG1 de ratón	300%	410%
	IgG1 humana	270%	364%
7D4	IgG1 de ratón	141%	260%
	IgG1 humana	280%	360%

A continuación, fue examinado el efecto de los anticuerpos de RVP en la desgranulación de NK. Durante la desgranulación, se liberaron gránulos citolíticos en células de NK y la proteína-1 de membrana asociada a lisosoma (LAMP-1, CD107a) que se encuentra presente en la superficie de gránulos citolíticos se transforma a la superficie celular y se vuelve accesible para enlazamiento de anticuerpo. Este marcador permite la identificación de células NK activadas. Se incubaron células NK con 5 células dianas diferentes, conjuntamente con los anticuerpos anti RVP (anticuerpos de ratón y de su contraparte humana quimérica). Fue evaluada la desgranulación usando anticuerpos anti-CD107a.

Tabla 3. Efecto de anticuerpos anti-RVP en la actividad de desgranulación de NK

Clon	Tipo de Fc	Células cancerosas dianas				
		MDA-MB-231	HepG2	MV-411	Mel-624*	A549
4E5	IgG1 de ratón	125%	150%	150%	120%	-
	IgG1 humana	305%	260%	160%	145%	260%
5B9	IgG1 de ratón	132%	160%	150%	120%	-
	IgG1 humana	300%	260%	220%	145%	240%
7D4	IgG1 de ratón	124%	160%	150%	115%	-
	IgG1 humana	220%	200%	130%	120%	165%

* Expresión de hRVP en Mel 624 es baja; por lo tanto, el efecto relativo es bajo.

Tal como se muestra en la tabla y Figura 15, todos los anticuerpos mostraron una actividad de desgranulación de NK, en cuyo caso los anticuerpos quiméricos tuvieron una actividad significativamente más alta en comparación a su anticuerpo de ratón correspondiente.

Ejemplo 10. Anticuerpos anti RVP reducen la supervivencia de células tumorales en ausencia de células inmunitarias.

La supervivencia de células de A549, U373, HCT116, y Mel-624 usando el ensayo de supervivencia de células MTT en presencia de 50 microgramos/ml de diferente mAb anti-RVP durante 24 horas. Tal como se muestra en Figuras 16A-16D y Tabla 4, el bloqueo de RVP por mAb 5B9 redujo significativamente la viabilidad de 20-40% en comparación con mIgG.

Tabla 4. Efecto de anticuerpos anti-RVP en la supervivencia de células tumorales.

Porcentaje de células muertas dentro de 24 horas a través de varias líneas celulares dianas en relación con células tratadas de mIgG.

mAb	MDA-MB-231	HCT-116	Mel-624	A549
4E5	12%	20%	-	25%
5B9	20%	22%	32%	25%
7D4	17%	27%	12%	25%

Ejemplo 11. Efecto in-vivo de anticuerpos anti-RVP en tumor humano en un modelo humanizado de ratón - humanización de corto plazo

La eficacia antitumoral de los anticuerpos se estudia in-vivo. Para estimar la eficacia de los anticuerpos descritos en la presente memoria sobre la inhibición de cáncer humano, se estudia el anticuerpo en un modelo que combina ambos tumores y linfocitos de origen humano. Se injerta ratones de NOD scid gamma (NSG) con hPBMCs para restaurar la competencia inmunitaria y se retan con células cancerosas humanas. En determinado momento/tamaño del tumor, los ratones son tratados con anticuerpo RVP anti-humano según la invención, se les administran dosis múltiples en diferentes momentos del reto post-tumoral. Los mismos experimentos se realizan con anticuerpos anti-RVP quiméricos. Las curvas de crecimiento de tumor y el peso corporal se miden 3x/semana y después de sacrificar los ratones se realiza un análisis fenotípico extenso de TILs y de poblaciones inmunes en diferentes órganos.

Se realiza un modelo similar con líneas tumorales en ratones PBMC huNSG según Gupta P., Oncoimmunology. 2015 Mar 6; 4(2): e981449.

Ejemplo 12. Efecto in-vivo de anticuerpos anti-RVP en tumor humano en un modelo humanizado de ratón -humanización a largo plazo

Para estimar la eficacia de anticuerpos anti-RVP en la inhibición de cáncer humano, se estudia el anticuerpo en un modelo que combina ambos tumores y linfocitos de origen humano. Se irradian cachorros recién nacidos de NOD scid gamma (NSG) y se insertan con CD34+ HSC para restaurar la competencia inmunitaria. 1-2 semanas después de la determinación de la reconstitución de células inmunitarias, los ratones son recetados con células cancerosas humanas y en momentos predeterminados/tamaño de tumor predeterminado se tratan con anticuerpo RVP antihumano según la invención, se les administran dosis múltiples en diferentes momentos. Se realizan los mismos experimentos con anticuerpos anti-RVP humanizados. Se mide curvas de crecimiento de tumor y peso corporal 3x/semana. Después de sacrificar los ratones se realiza un análisis fenotípico extenso de TILs y de poblaciones inmunes en diferentes órganos.

Un modelo similar usado para estudiar la actividad inhibidora de tumor de los anticuerpos de la presente invención fue establecido por The Jackson Laboratory (<http://immune-checkpoint.com/wp-content/uploads/sites/24/2015/01/Day-1-15.45-Rick-Huntress.pdf>).

Ejemplo 13. Inducción de secreción de IFN γ

Para ensayar el efecto de los mAbs anti RVP en la secreción de citocina, se incubaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de 2 donantes sanos con células dianas en la presencia de anticuerpos (mIgG, 5B9mIgG, anticuerpo anti CTL-4 denominado Ipilimumab), a concentraciones de 1 y 0,1 μ g/ml. Se midieron niveles de IFN γ después de 6 días en cultivo. Se observó una inducción significativa de IFN γ por el anticuerpo 5B9 anti-RVP ($P = 7.34548E^{-11}$ para 1 μ g/ml y $2.73179E^{-08}$ para 0,1 μ g/ml).

La secreción de IFN γ es un componente clave de la inmunidad antitumoral, la inducción de la secreción de IFN γ por parte de mAbs anti-RVP indica un efecto potencial additional anti-tumorigénico de estos compuestos en el tratamiento de cáncer.

- 5 La anterior descripción de las formas específicas de realización revelará la naturaleza general de la invención tan completamente, que otros pueden, aplicando conocimiento actual, modificar y/o adaptar fácilmente para varias aplicaciones tales formas específicas de realización sin una experimentación indebida y sin apartarse del concepto genérico y, por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones deben ser destinadas y se destinan a ser comprendidas dentro del significado y la gama de equivalentes de las formas de realización divulgadas. Ha de entenderse que la fraseología o terminología empleadas en la presente memoria tienen el propósito de descripción y no de limitación.
- 10