

ANTICUERPOS BIESPECIFICOS ANTI-PVRIG/ANTI-TIGIT Y MÉTODOS DE USOREFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de las Solicitudes provisionales de patentes de los Estados Unidos núms. 62/679,703, presentada el 1 de junio de 2018 y 62/773,586, presentada el 30 de noviembre de 2018, todas las cuales se incorporan como referencia en su totalidad.

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se presentó electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. La copia ASCII, creada el 29 de
10 mayo de 2019, se llama 114386-5011-WO_SL.txt y tiene un tamaño de 2.631.244 bytes.

I. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los linfocitos T sin tratamiento previo deben recibir dos señales independientes de las células presentadoras de antígenos (APC) para que se activen productivamente. La primera, la Señal 1, es
15 específica de antígeno y ocurre cuando los receptores de antígeno de linfocitos T encuentran el complejo de antígeno-MHC apropiado en la APC. El destino de la respuesta inmunitaria se determina mediante una segunda señal independiente de antígeno (Señal 2) que se administra a través de una molécula coestimuladora de linfocitos T que se acopla a su ligando expresado en APC. Esta segunda
20 señal puede ser ya sea estimuladora (coestimulación positiva) o inhibidora (coestimulación negativa o coinhibición). En ausencia de una señal coestimuladora, o en presencia de una señal coinhibidora, la activación de los linfocitos T se ve reducida o interrumpida, lo que puede llevar a un estado de falta de respuesta específica del antígeno (conocida como anergia de los linfocitos T), o puede dar como resultado la muerte apoptótica de linfocitos T.

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

Tanto las señales coestimuladoras positivas como las negativas tienen papeles críticos en la regulación de las respuestas inmunitarias mediadas por células, y las moléculas que median estas señales han demostrado ser dianas efectivas para la inmunomodulación. Sobre la base de este conocimiento, se han desarrollado varios enfoques terapéuticos que involucran el direccionamiento a moléculas
35 coestimuladoras y se ha demostrado que son útiles para la prevención y el tratamiento del cáncer al activar, o impedir la desactivación, de las respuestas inmunitarias en pacientes con cáncer y para la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias, así como el rechazo del trasplante alogénico, cada uno mediante la desactivación de las respuestas inmunitarias no controladas, o mediante la inducción de "señal de desactivación" por coestimulación negativa (o
40 coinhibición) en sujetos con estas condiciones patológicas.

La manipulación de las señales emitidas por los ligandos B7 ha demostrado potencial en el tratamiento de la autoinmunidad, las enfermedades inflamatorias, y el rechazo al trasplante. Las estrategias terapéuticas incluyen el bloqueo de la coestimulación mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra el ligando o el receptor de un par coestimulador, o mediante el uso de proteínas de fusión solubles compuestas por el receptor coestimulador que puede fijar y bloquear su ligando apropiado. Otro enfoque es la inducción de coinhibición mediante el uso de una proteína de fusión soluble de un ligando inhibidor. Estos enfoques se basan, al menos parcialmente, en la eliminación eventual de los linfocitos T autorreactivos o alorreactivos (que son responsables de los procesos patógenos en enfermedades autoinmunitarias o trasplantes, respectivamente), probablemente debido a que, en ausencia de coestimulación (que induce genes de supervivencia celular), los linfocitos T se vuelven altamente susceptibles a la inducción de la apoptosis. Por lo tanto, los agentes novedosos que son capaces de modular las señales coestimuladoras, sin comprometer la capacidad del sistema inmunitario para defenderse contra los patógenos, son altamente ventajosos para el tratamiento y la prevención de tales afecciones patológicas.

Las vías coestimuladoras desempeñan un papel importante en el desarrollo de tumores. Curiosamente, se ha demostrado que los tumores evitan la destrucción inmunitaria al impedir la activación de los linfocitos T mediante la inhibición de factores coestimuladores en las familias B7-CD28 y TNF, así como también al atraer los linfocitos T reguladores, que inhiben las respuestas de los linfocitos T antitumorales (véase Wang (2006), "Immune Suppression by Tumor Specific CD4⁺ Regulatory T cells in Cancer", *Semin. Cancer. Biol.* 16:73-79; Greenwald y otros (2005), "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-48; Watts (2005), "TNF/TNFR Family Members in Co-stimulation of T Cell Responses", *Ann. Rev. Immunol.* 23: 23-68; Sadum, y otros, (2007) "Immune Signatures of Murine and Human Cancers Reveal Unique Mechanisms of Tumor Escape and New Targets for Cancer Immunotherapy", *Clin. Canc. Res.* 13(13): 4016-4025). Tales moléculas coestimuladoras expresadas en tumores se han convertido en biomarcadores de cáncer atractivos y pueden servir como antígenos asociados a tumores (TAA). Además, las vías coestimuladoras se han identificado como puntos de control inmunológicos que atenúan las respuestas inmunitarias dependientes de los linfocitos T, tanto en el nivel de iniciación como en la función efectora dentro de las metástasis tumorales.

Durante la última década, se han desarrollado agonistas y/o antagonistas de diversas proteínas coestimuladoras para tratar enfermedades autoinmunitarias, rechazo a injertos, alergia y cáncer. Por ejemplo, CTLA4-Ig (Abatacept, Orencia®) está aprobado para el tratamiento de RA, CTLA4-Ig mutada (Belatacept, Nulojix®) para la prevención del rechazo agudo al trasplante renal y por el anticuerpo anti-CTLA4 (Ipilimumab, Yervoy®), recientemente aprobado para el tratamiento del melanoma. Se han aprobado otros reguladores de coestimulación, como los anticuerpos anti-PD-1 de Merck (Keytruda®) y BMS (Opdivo®), que se han aprobado para tratamientos contra el cáncer y también se están haciendo pruebas para aplicarlos en el caso de infecciones virales.

Sin embargo, aunque la monoterapia con anticuerpos de anti-inhibidor de punto de control ha resultado prometedora, varios estudios (Ahmadzadeh y otros, *Blood* 114:1537 (2009), Matsuzaki y otros, *PNAS* 107(17):7875-7880 (2010), Fourcade y otros, *Cancer Res.* 72(4):887-896 (2012) y Gros y otros, *J. Clinical Invest.* 124 (5):2246 (2014) que examinaron linfocitos que infiltran tumores (TIL) han demostrado que los TIL comúnmente expresan receptores de puntos de control múltiples. Además, es

probable que los TIL que expresan puntos de control múltiples sean, de hecho, los más reactivos al tumor. En contraste, los linfocitos T no reactivos al tumor en la periferia tienen más probabilidades de expresar un solo punto de control. El bloqueo del punto de control con anticuerpos monoespecíficos de longitud completa es probablemente no discriminatorio con respecto a la desrepresión de los TIL reactivos al tumor frente a los linfocitos T que expresan un solo reactivo a los autoantígenos que se supone que contribuyen a las toxicidades autoinmunes.

Una diana de interés es PVRIG. PVRIG, también llamada proteína que contiene un dominio de inmunoglobulina relacionada con el receptor de poliovirus, Q6DKI7 o C7orf15, es una proteína de dominio transmembrana de 326 aminoácidos de longitud, con un péptido de señal (que abarca del aminoácido 1 al 40), un dominio extracelular (que abarca del aminoácido 41 al 171), un dominio transmembrana (que abarca del aminoácido 172 al 190) y un dominio citoplasmático (que abarca del aminoácido 191 hasta 326). PVRIG se une a la proteína 2 relacionada con el receptor de poliovirus (PVL2, también conocida como nectina-2, CD112 o mediador de entrada de herpesvirus B, (HVEB) una glicoproteína de membrana plasmática humana), el componente de unión de PVRIG.

Otra diana de interés es TIGIT. TIGIT es un receptor coinhibidor que se expresa altamente en linfocitos T CD4+ efectores y reguladores (Treg), linfocitos T CD8+ efectores y células NK. Se ha demostrado que TIGIT atenúa la respuesta inmunitaria mediante (1) señalización directa, (2) inducción de señalización de ligando, y (3) competencia con e interrupción de señalización mediante el receptor coestimulador CD226 (también denominado DNAM-1). La señalización de TIGIT ha sido la más estudiada en las células NK, donde se demostró que el acoplamiento con su ligando cognado, el receptor del poliovirus (PVR, también denominado CD155) suprime directamente la citotoxicidad de las células NK a través de su dominio ITIM citoplasmático. La inactivación del gen TIGIT o el bloqueo de anticuerpos de la interacción TIGIT/PVR demostró mejorar la inactivación de células NK *in vitro*, así como exacerbar enfermedades autoinmunitarias *in vivo*. Además de sus efectos directos sobre los linfocitos T y células NK, TIGIT puede inducir la señalización mediada por PVR en células dendríticas o tumorales, lo que lleva al aumento en la producción de citocinas antiinflamatorias tales como IL10. En los linfocitos T, TIGIT también puede inhibir las respuestas de los linfocitos al interrumpir la homodimerización del receptor coestimulador CD226, y al competir con este para unirse a PVR.

TIGIT está altamente expresado en linfocitos, que incluyen los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y los Treg, que infiltran diferentes tipos de tumores. PVR también se expresa ampliamente en tumores, lo que sugiere que el eje de señalización TIGIT-PVR puede ser un mecanismo de escape inmunitario dominante para el cáncer. En particular, la expresión de TIGIT está estrechamente relacionada con la expresión de otro receptor coinhibidor importante, PD1. TIGIT y PD1 se expresan conjuntamente en los TIL de numerosos tumores humanos y murinos. A diferencia de TIGIT y CTLA4, la inhibición de PD1 de las respuestas de los linfocitos T no implica la competencia por la unión del ligando con un receptor coestimulador.

En consecuencia, los anticuerpos biespecíficos PVRIG/TIGIT, capaces de dirigirse a ambas vías, son una diana atractiva para la terapia con un solo anticuerpo. Dichos anticuerpos permitirán dirigirse a receptores de puntos de control múltiples y proporcionarán importancia terapéutica en el tratamiento del cáncer. También se proporcionan anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT para su uso como se describe en la presente.

II. BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

En consecuencia, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que se une monovalentemente a un PVRIG humano y se une monovalentemente a TIGIT para su uso en la activación de linfocitos T para el tratamiento del cáncer.

- 5 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que se une monovalentemente a un PVRIG humano y se une monovalentemente a TIGIT para su uso en la activación de linfocitos T y/o células NK para el tratamiento del cáncer.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

- a) una primera porción de unión a antígeno que comprende:
- 10 i. un primer dominio variable de cadena pesada que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de un anticuerpo anti-PVRIG; y
- ii. un primer dominio variable de cadena ligera que comprende un vlCDR1, vlCDR2, y vlCDR3 de un anticuerpo anti-PVRIG;

en donde el anticuerpo anti-PVRIG se selecciona del grupo que consiste en CHA.7.518.4, CHA.7.518.1, CHA.7.518, CHA.7.524 CHA.7.530, CHA.7.538_1, CHA.7.538_2, CHA.7.502, CHA.7.503, CHA.7.506, CHA.7.508, CHA.7.510, CHA.7.512, CHA.7.514, CHA.7.516, CHA.7.518, CHA.7.520.1, CHA.7.520.2, CHA.7.522, CHA.7.524, CHA.7.526, CHA.7.527, CHA.7.528, CHA.7.530, CHA.7.534, CHA.7.535, CHA.7.537, CHA.7.538.1, CHA.7.538.2, CHA.7.543, CHA.7.544, CHA.7.545, CHA.7.546, CHA.7.547, CHA.7.548, CHA.7.549, CHA.7.550, CHA.7.538.1.2, CPA.7.021, CPA.7.001, CPA.7.003, CPA.7.004, CPA.7.006, CPA.7.008, CPA.7.009, CPA.7.010, CPA.7.011, CPA.7.012, CPA.7.013, CPA.7.014, CPA.7.015, CPA.7.017, CPA.7.018, CPA.7.019, CPA.7.022, CPA.7.023, CPA.7.024, CPA.7.033, CPA.7.034, CPA.7.036, CPA.7.040, CPA.7.046, CPA.7.047, CPA.7.049, CPA.7.050 y CHA.7.518; y

- a) una segunda porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno de anti-TIGIT.

25 En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

- a) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno anti-PVRIG; y
- b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende:
- i. un segundo dominio variable de cadena pesada que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de un anticuerpo anti-TIGIT; y
- 30 ii. un segundo dominio variable de cadena ligera que comprende un vlCDR1, vlCDR2, y vlCDR3 de un anticuerpo anti-TIGIT;

en donde el dominio de unión a antígeno anti-TIGIT se selecciona del grupo que consiste en CPA.9.086, CHA.9.547.18, CPA.9.018, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.057, CPA.9.059, CPA.9.083, CPA.9.089, CPA.9.093, CPA.9.101, CPA.9.103, CHA.9.536.1, CHA.9.536.3, CHA.9.536.4, CHA.9.536.5, CHA.9.536.6, CHA.9.536.7, CHA.9.536.8, CHA.9.560.1, CHA.9.560.3, CHA.9.560.4, CHA.9.560.5, CHA.9.560.6, CHA.9.560.7, CHA.9.560.8, CHA.9.546.1, CHA.9.547.1, CHA.9.547.2, CHA.9.547.3, CHA.9.547.4, CHA.9.547.6, CHA.9.547.7, CHA.9.547.8, CHA.9.547.9, CHA.9.547.13, CHA.9.541.1, CHA.9.541.3, CHA.9.541.4, CHA.9.541.5, CHA.9.541.6, CHA.9.541.7, y CHA.9.541.8.

40 En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

- a) una primera porción de unión a antígeno que comprende:

- i. un primer dominio variable de cadena pesada que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de un anticuerpo anti-PVRIG; y
- ii. un primer dominio variable de cadena ligera que comprende un vlCDR1, vlCDR2, y vlCDR3 de un anticuerpo anti-PVRIG

5 en donde el anticuerpo anti-PVRIG se selecciona del grupo que consiste en CHA.7.518.4, CHA.7.518.1, CHA.7.518 humanizado, CHA.7.524 humanizado, CHA.7.530 humanizado, CHA.7.538_1 humanizado, CHA.7.538_2 humanizado, CHA.7.502, CHA.7.503, CHA.7.506, CHA.7.508, CHA.7.510, CHA.7.512, CHA.7.514, CHA.7.516, CHA.7.518, CHA.7.520.1, CHA.7.520.2, CHA.7.522, CHA.7.524, CHA.7.526, CHA.7.527, CHA.7.528, CHA.7.530, CHA.7.534, CHA.7.535, CHA.7.537, CHA.7.538.1, CHA.7.538.2,
 10 CHA.7.543, CHA.7.544, CHA.7.545, CHA.7.546, CHA.7.547, CHA.7.548, CHA.7.549, CHA.7.550, CHA.7.538.1.2, CPA.7.021, CPA.7.001, CPA.7.003, CPA.7.004, CPA.7.006, CPA.7.008, CPA.7.009, CPA.7.010, CPA.7.011, CPA.7.012, CPA.7.013, CPA.7.014, CPA.7.015, CPA.7.017, CPA.7.018, CPA.7.019, CPA.7.022, CPA.7.023, CPA.7.024, CPA.7.033, CPA.7.034, CPA.7.036, CPA.7.040, CPA.7.046, CPA.7.047, CPA.7.049, y CPA.7.050 CHA.7.518; y

15 b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende:

- i. un segundo dominio variable de cadena pesada que comprende un vhCDR1, vhCDR2, y vhCDR3 de un anticuerpo anti-TIGIT; y
- ii. un segundo dominio variable de cadena ligera que comprende un vlCDR1, vlCDR2, y vlCDR3 de un anticuerpo anti-TIGIT;

20 en donde el anticuerpo anti-TIGIT se selecciona del grupo que consiste en CPA.9.086, CHA.9.547.18, CPA.9.018, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.057, CPA.9.059, CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.089, CPA.9.093, CPA.9.101, CPA.9.103, CHA.9.536.1, CHA.9.536.3, CHA.9.536.4, CHA.9.536.5, CHA.9.536.6, CHA.9.536.7, CHA.9.536.8, CHA.9.560.1, CHA.9.560.3, CHA.9.560.4, CHA.9.560.5, CHA.9.560.6, CHA.9.560.7, CHA.9.560.8, CHA.9.546.1, CHA.9.547.1, CHA.9.547.2, CHA.9.547.3,
 25 CHA.9.547.4, CHA.9.547.6, CHA.9.547.7, CHA.9.547.8, CHA.9.547.9, CHA.9.547.13, CHA.9.541.1, CHA.9.541.3, CHA.9.541.4, CHA.9.541.5, CHA.9.541.6, CHA.9.541.7 y CHA.9.541.8.

En algunas modalidades, la primera porción de unión a antígeno comprende:

- i. una primera cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3; y
- ii. una primera cadena ligera que comprende VL-CL, en donde CL es el dominio constante de un anticuerpo kappa o lambda.

En algunas modalidades, el primer CH3 de cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos S354C, E356D, M358L, y T366W.

En algunas modalidades, CL es kappa.

En algunas modalidades, la segunda porción de unión a antígeno comprende:

- 35 i. una segunda cadena pesada que comprende HC-CL-bisagra-CH2-CH3, en donde CL es kappa o lambda; y
- ii. una segunda cadena ligera que comprende VL-CH1.

En algunas modalidades, el segundo CH3 de cadena pesada comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, E356D, M358L, T366S, L368A, e Y407V.

40 En algunas modalidades, CL es lambda.

En algunas modalidades, CL es kappa.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

a) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno anti-PVRIG; y

b) una segunda porción de unión a antígeno anti-TIGIT que comprende:

5 i. una segunda región variable de cadena pesada que comprende CPA.9.086 VH (EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTTVTVSS; SEQ ID NO: 1634); y

10 ii. una segunda región variable de cadena ligera que comprende CPA.9.086 VL (QSALTQPRASGNPGQRTVITSCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGS QSGTSASLTISGLQSEDEAEYFCAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL; SEQ ID NO:1639).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

c) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno anti-PVRIG; y

15 d) una segunda porción de unión a antígeno anti-TIGIT que comprende:

i. una segunda región variable de cadena pesada que comprende CPA.9.547.18 VH (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTTLTVTVSS; SEQ ID NO 1664); y

20 ii. una segunda región variable de cadena ligera que comprende CPA.9.547.18 VL (DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMALWSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQGGQSYPTFGQGKLEIK; SEQ ID NO:1668).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

25 a) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-PVRIG que comprende:

i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CHA.7.518.1 (QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTTLTVTVSS; SEQ ID NO:1539); y

30 ii. una primera cadena ligera que comprende CHA.7.518.1 VL (DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQHFHWGTPYTFGQGKLEIK; SEQ ID NO:1544); y

b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno de anti-TIGIT.

35 En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

a) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-PVRIG que comprende:

40 i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CHA.7.518.4 VH (QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTTLTVTVSS; SEQ ID NO: 3179); y

ii. una primera cadena ligera que comprende CHA.7.518.4 VL (DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK; SEQ ID NO: 3180); y

b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno de anti-TIGIT.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

a) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-PVRIG que comprende:

i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CHA.7.518.1 (QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLTVSS; SEQ ID NO:1539); y

ii. una primera región variable de cadena ligera que comprende CHA.7.518.1 (DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK; SEQ ID NO:1544); y

b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-TIGIT que comprende

i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CPA.9.086 VH (EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSS; SEQ ID NO: 1634); y

ii. una primera región variable de cadena ligera que comprende CPA.9.086 VL (QSALTQPRASGNPGQRTVISCSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGS QSGTSASLTISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL; SEQ ID NO: 1639).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

a) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-PVRIG que comprende:

i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CHA.7.518.4 VH (QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLTVSS; SEQ ID NO: 3179); y

ii. una primera cadena ligera que comprende CHA.7.518.4 VH (QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLTVSS; SEQ ID NO:3180); y

b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-TIGIT que comprende:

i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CPA.9.086 VH (EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSS; SEQ ID NO: 1634); y

ii. una primera región variable de cadena ligera que comprende CPA.9.086 VL (QSALTQPRASGNPGQRTVITSCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGS QSGTSASLTISGLQSEDEAEYFCAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL; SEQ ID NO: 1639).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

5 a) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-PVRIG que comprende:

i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CHA.7.518.1 (QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS; SEQ ID NO:1539); y

10 ii. una primera región variable de cadena ligera que comprende CHA.7.518.1 VL (DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGS TDFTLTISLQPEDFATYYCQHFVGTPYTFGQGTKLEIK; SEQ ID NO: 1544); y

b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-TIGIT que

15 i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CHA.9.547.18 HC (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTLVTVSS; SEQ ID NO: 1664); y

20 ii. una primera región variable de cadena ligera que comprende CHA.9.547.18 VL (DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK; SEQ ID NO: 1668).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende:

a) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-PVRIG que

25 i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CHA.7.518.4 VH (QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS; SEQ ID NO: 3179); y

30 ii. una primera cadena ligera que comprende CHA.7.518.4 VL (DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGS TDFTLTISLQPEDFATYYCQHFVGTPYTFGQGTKLEIK; SEQ ID NO:3180); y

b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión de anti-TIGIT que comprende:

35 i. una primera región variable de cadena pesada que comprende CHA.9.547.18 HC (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1664); y

40 ii. una primera región variable de cadena ligera que comprende CHA.9.547.18 VL (DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK; SEQ ID NO: 1668).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT es un anticuerpo humanizado.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT como se describe en la presente.

5 Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica un primer dominio variable de cadena pesada o cadena pesada como se describe en la presente;

b) un segundo ácido nucleico que codifica un primer dominio variable de cadena ligera o cadena ligera como se describe en la presente;

10 c) un tercer ácido nucleico que codifica un segundo dominio variable de cadena pesada o cadena pesada como se describe en la presente; y

d) un cuarto ácido nucleico que codifica un segundo dominio variable de cadena ligera o cadena ligera como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición de vector de expresión que comprende:

15 a) un primer vector de expresión que comprende el primer ácido nucleico como se describe en la presente;

b) un segundo vector de expresión que comprende el segundo ácido nucleico como se describe en la presente;

20 c) un tercer vector de expresión que comprende el tercer ácido nucleico como se describe en la presente; y

d) un cuarto vector de expresión que comprende el cuarto ácido nucleico como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición de vector de expresión que comprende:

25 a) un primer vector de expresión que comprende el primer y segundo ácidos nucleicos como se describe en la presente; y

b) un segundo vector de expresión que comprende el tercer y cuarto ácidos nucleicos como se describe en la presente.

30 En algunas modalidades, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende la composición del vector de expresión como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para fabricar un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende:

35 a) cultivar la célula huésped como se describe en la presente en condiciones en donde se expresa el anticuerpo; y

b) recuperar el anticuerpo.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar los linfocitos T de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los linfocitos T del paciente.

40 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método de activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-

PVRIG/anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los CTL del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar células NK de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de células NK del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar los linfocitos T $\gamma\delta$ de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los linfocitos T $\gamma\delta$ del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar linfocitos Th1 de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los linfocitos Th1 del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para disminuir o eliminar el número de células y/o la actividad de al menos una de los linfocitos T reguladoras (Treg) en un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para aumentar la producción de interferón- γ y/o la secreción de citocinas proinflamatorias en un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG/anti-TIGIT como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de esófago, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma, y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma, y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende:

a) una primera porción de unión a antígeno que comprende una porción de unión a antígeno anti-PVRIG que comprende:

i. un primer dominio variable de cadena pesada que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de un anticuerpo anti-PVRIG; y

ii. un primer dominio variable de cadena ligera que comprende un vICDR1, vICDR2, y vICDR3 de un anticuerpo anti-PVRIG;

en donde la porción de unión a antígeno anti-PVRIG se selecciona del grupo que consiste en CPA.7.021, CPA.7.001, CPA.7.003, CPA.7.004, CPA.7.006, CPA.7.008, CPA.7.009, CPA.7.010, CPA.7.011, CPA.7.012, CPA.7.013, CPA.7.014, CPA.7.015, CPA.7.017, CPA.7.018, CPA.7.019, CPA.7.022, CPA.7.023, CPA.7.024, CPA.7.033, CPA.7.034, CPA.7.036, CPA.7.040, CPA.7.046, CPA.7.047, CPA.7.049, CPA.7.050, CHA.7.502, CHA.7.503, CHA.7.506, CHA.7.508, CHA.7.510, CHA.7.512, CHA.7.514, CHA.7.516, CHA.7.518, CHA.7.520.1, CHA.7.520.2, CHA.7.522, CHA.7.524, CHA.7.526, CHA.7.527, CHA.7.528, CHA.7.530, CHA.7.534, CHA.7.535, CHA.7.537, CHA.7.538.1, CHA.7.538.2, CHA.7.543, CHA.7.544, CHA.7.545, CHA.7.546, CHA.7.547, CHA.7.548, CHA.7.549, CHA.7.550, CHA.7.518.1; CHA.7.538.1.2 y CHA.7.518.4; y

b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno de anti-TIGIT, en donde el dominio de unión a antígeno de anti-TIGIT es de un anticuerpo como se proporciona en las Figuras 24 y 41, y en particular en las Figuras 24A-24EE.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende:

a) una primera porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno anti-PVRIG en donde el dominio de unión a antígeno anti-PVRIG es de un anticuerpo como se proporciona en la Figura 35; y

b) una segunda porción de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno de anti-TIGIT que comprende:

i. un segundo dominio variable de cadena pesada que comprende un vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3 de un anticuerpo anti-TIGIT; y

ii. un segundo dominio variable de cadena ligera que comprende un vICDR1, vICDR2, y vICDR3 de un anticuerpo anti-TIGIT;

en donde el dominio de unión a antígeno de anti-TIGIT se selecciona del grupo que consiste en CPA.9.018, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.057, CPA.9.059, CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.089, CPA.9.093, CPA.9.101, CPA.9.103, CHA.9.536.1, CHA.9.536.3, CHA.9.536.4, CHA.9.536.5, CHA.9.536.6, CHA.9.536.7, CHA.9.536.8, CHA.9.560.1, CHA.9.560.3, CHA.9.560.4, CHA.9.560.5, CHA.9.560.6, CHA.9.560.7, CHA.9.560.8, CHA.9.546.1, CHA.9.547.1, CHA.9.547.2, CHA.9.547.3, CHA.9.547.4, CHA.9.547.6, CHA.9.547.7, CHA.9.547.8, CHA.9.547.9, CHA.9.547.13, CHA.9.541.1, CHA.9.541.3, CHA.9.541.4, CHA.9.541.5, CHA.9.541.6, CHA.9.541.7, CHA.9.541.8 y CHA.9.547.18.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PVRIG que comprende:

i) un dominio variable de cadena pesada o cadena pesada que comprende el vhCDR1, vhCDR2, y vhCDR3 de la secuencia siguiente:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQG
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID
NO:3179),

y

ii) un dominio variable de cadena ligera o cadena ligera que comprende el vICDR1, vICDR2, vICDR3 de la secuencia siguiente:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TIGIT que comprende:

i) un dominio variable de cadena pesada o cadena pesada que comprende el vhCDR1, vhCDR2,
y vhCDR3 de la secuencia siguiente:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKG
RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:1664),
y

ii) un dominio variable de cadena ligera o cadena ligera que comprende el vlCDR1, vlCDR2, y vlCDR3
de la secuencia siguiente:

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMALWSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PVRIG comprende:

a) una cadena pesada que comprende CHA.7.518.4 VH
(QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ
GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTK
TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHENHNTQKSLSLSPGK; SEQ ID NO:3175); y

b) una cadena ligera que comprende CHA.7.518.4 VL
(DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTCSFNRGEC; SEQ ID NO:3362).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición que comprende un
anticuerpo anti-PVRIG como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición de ácido nucleico que
comprende:

i) un primer ácido nucleico que codifica una cadena pesada o un dominio variable de cadena pesada
como se describe en la presente; y

ii) un segundo ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena ligera o cadena ligera como
se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición que comprende un
anticuerpo anti-TIGIT como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición de ácido nucleico que
comprende:

i) un primer ácido nucleico que codifica una cadena pesada o un dominio variable de cadena pesada
como se describe en la presente; y

ii) un segundo ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena ligera o cadena ligera como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición de vector de expresión que comprende:

- 5 i) un primer vector de expresión que comprende el primer ácido nucleico como se describe en la presente; y
- ii) un segundo vector de expresión que comprende el segundo ácido nucleico como se describe en la presente.

Un vector de expresión que comprende:

- 10 i) el primer ácido nucleico como se describe en la presente; y
- ii) el segundo ácido nucleico como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición de vector de expresión que comprende:

- 15 i) un primer vector de expresión que comprende el primer ácido nucleico como se describe en la presente; y
- ii) un segundo vector de expresión que comprende el segundo ácido nucleico como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende:

- 20 i) el primer ácido nucleico como se describe en la presente; y
- ii) el segundo ácido nucleico como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión o la composición del vector como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT que comprende:

- 25 i) cultivar la célula huésped como se describe en la presente en condiciones en donde se expresa el anticuerpo; y
- ii) recuperar el anticuerpo.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar los linfocitos T de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los linfocitos T del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar linfocitos T citotóxicos (CTL) de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los CTL del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar células NK de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de las células NK del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar linfocitos T $\gamma\delta$ de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los linfocitos T $\gamma\delta$ del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar linfocitos Th1 de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los linfocitos Th1 del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para disminuir o eliminar el número de células y/o la actividad de al menos uno de los linfocitos T reguladores (Treg) en un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para aumentar la producción de interferón- γ y/o la secreción de citocinas proinflamatorias en un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de esófago, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma, y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma, y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar una terapia combinada que comprende un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de acuerdo con lo descrito en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar una terapia combinada que comprende un anticuerpo anti-PVRIG como se describe en la presente y un anticuerpo anti-PD-1.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en pembrolizumab y nivolumab.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar una terapia combinada que comprende un anticuerpo anti-TIGIT como se describe en la presente y un anticuerpo anti-PD-1.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en pembrolizumab y nivolumab.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar una terapia combinada que comprende un anticuerpo anti-TIGIT como se describe en la presente y un anticuerpo anti-PVRIG como se describe en la presente.

5 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar una terapia combinada triple que comprende un anticuerpo anti-TIGIT como se describe en la presente, un anticuerpo anti-PVRIG, y un anticuerpo anti-PD-1.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar una terapia combinada triple que comprende un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-PVRIG como se describe en la presente, y un anticuerpo anti-PD-1.

10 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar una terapia combinada triple que comprende un anticuerpo anti-TIGIT como se describe en la presente, un anticuerpo anti-PVRIG como se describe en la presente y un anticuerpo anti-PD-1.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en pembrolizumab y nivolumab.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar los linfocitos T de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los linfocitos T del paciente.

20 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar linfocitos T citotóxicos (CTL) de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los CTL del paciente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar linfocitos T $\gamma\delta$ de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los linfocitos T $\gamma\delta$ del paciente.

25 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para activar linfocitos Th1 de un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente, en donde se activa un subconjunto de los linfocitos Th1 del paciente.

30 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para disminuir o eliminar el número de células y/o la actividad de al menos uno de los linfocitos T reguladores (Treg) en un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para aumentar la producción de interferón- γ y/o la secreción de citocinas proinflamatorias en un paciente que comprende administrar al paciente el anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente.

35 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente el anticuerpo anti-PVRIG o anti-TIGIT como se describe en la presente.

40 En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón

(de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de esófago, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma, y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma, y síndromes mielodisplásicos (MDS).

c) BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa las secuencias del PVRIG humano (que muestra dos puntos de partida de metionina diferentes, así como también la secuencia de longitud completa). El péptido de señal está subrayado, el ECD tiene subrayado doble. PVRIG, también llamada proteína que contiene un dominio de inmunoglobulina relacionada con el receptor de poliovirus, Q6DKI7 o C7orf15, se relaciona con las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que se muestran en el identificador de acceso RefSeq NP_076975, que se muestra en la Figura 1.

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

La Figura 3A-3C muestra las secuencias de CDR para Fab que se determinaron para bloquear con éxito la interacción del PVRIG con su homólogo PVRL2.

Las Figuras 4A-4AA muestran las secuencias de aminoácidos de los dominios pesados y ligeros variables, las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, y las CDR pesadas variables y ligeras variables para las secuencias anti-PVRIG de CPA humanas enumeradas de la invención que se unen a PVRIG y bloquean la unión de PVRIG y PVLR2.

Las Figuras 5A-5H representan las secuencias de aminoácidos de los dominios pesados y ligeros variables, las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, y las CDR pesadas variables y ligeras variables para ocho secuencias anti-PVRIG de CPA humanas de la invención que se unen a PVRIG pero no bloquean la unión de PVRIG y PVLR2.

Las Figuras 6A-6G representan las CDR para todas las secuencias de anticuerpos anti-PVRIG de CPA que se generaron que se unen a PVRIG, incluidas aquellas que no bloquean la unión de PVRIG y PVLR2.

Las Figuras 7A-7AE representan las cadenas ligeras y pesadas variables, así como también las secuencias vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de cada uno de los anticuerpos CHA enumerados de la invención, CHA.7.502, CHA.7.503, CHA.7.506, CHA.7.508, CHA.7.510, CHA.7.512, CHA.7.514, CHA.7.516, CHA.7.518, CHA.7.520.1, CHA.7.520.2, CHA.7.522, CHA.7.524, CHA.7.526, CHA.7.527, CHA.7.528, CHA.7.530, CHA.7.534, CHA.7.535, CHA.7.537, CHA.7.538.1, CHA.7.538.2, CHA.7.543, CHA.7.544, CHA.7.545, CHA.7.546, CHA.7.547, CHA.7.548, CHA.7.549,

CHA.7.550, y CHA.7.518.4 (estos incluyen las secuencias variables pesada y ligera de secuencias de ratón (a partir de Híbridomas).

Las Figuras 8A-8D representan las secuencias vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de cada uno de los anticuerpos CPA enumerados de la invención, CPA.7.001 a CPA.7.050 son secuencias humanas (de presentación en fagos).

Las Figuras 9A-9C representan las secuencias de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

La Figura 10 representa varios fragmentos ECD de PVRIG humano.

Las Figuras 11A-11I representan una compilación de las secuencias humanizadas de cinco anticuerpos CHA.

Las Figuras 12A-12E representan una compilación de las secuencias humanizadas de cinco anticuerpos CHA.

La Figura 13 representa esquemas para combinar los anticuerpos VH y VL CHA humanizados de las Figuras 11A-11I y las Figuras 12A-12E. "VHquim" y "VLquim" son las secuencias pesada y ligera variables de ratón unidas a un dominio constante de IgG humana.

Las Figuras 14A-14BX muestran varias secuencias PVRIG y otras secuencias que encuentran uso en la invención.

Las Figuras 15A y 15B representan las cadenas pesadas y ligeras variables, así como las secuencias vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 de cada uno de los anticuerpos CHA enumerados de la invención, CHA.7.518.1.H4(S241P), y CHA.7.538.1.2.H4(S241P).

Las Figuras 16A-16E representan cuatro secuencias humanizadas para cada uno de CHA.7.518, CHA.7.524, CHA.7.530, CHA.7.538_1 y CHA.7.538_2. Todos los anticuerpos humanizados comprenden la sustitución H4(S241P). Tenga en cuenta que la cadena ligera para CHA.7.538_2 es la misma que para CHA.7.538_1. El "H1" de cada uno es un "intercambio de CDR" sin cambios en el marco humano. Las secuencias subsiguientes alteran los cambios de marco mostrados en una fuente en negrita más grande. Las secuencias de CDR se indican en negrita. Las definiciones de CDR son AbM de la página web www.bioinf.org.uk/abs/. Línea germinal humana y secuencias de unión de IMGT®, el sistema de información internacional ImMunoGeneTics® www.imgt.org (fundador y director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia). La numeración de los residuos se muestra como secuencial (sec) o de acuerdo con Chothia del sitio web www.bioinf.org.uk/abs/ (AbM). "b" indica la cadena lateral enterrada; "p" indica parcialmente enterrada; "i" indica la cadena lateral en la interfaz entre los dominios VH y VL. Las diferencias de secuencia entre líneas germinales humanas y murinas se señalan con un asterisco (*). Las posibles mutaciones adicionales en los marcos se indican debajo de la secuencia. Los cambios potenciales en las secuencias de CDR se indican debajo de cada secuencia de CDR como se indica en la figura (# de sustituciones de desamidación: Q/S/A; estas pueden impedir la desamidación de asparagina (N). @ sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H; estas pueden impedir la oxidación del triptófano; @ sustituciones de oxidación de metionina: L/F/A).

Las Figuras 17A a 17C representan una compilación de las secuencias humanizadas de tres anticuerpos CHA: CHA.7.518, CHA.7.538.1, y CHA.7.538.2.

La Figura 18 representa esquemas para combinar los anticuerpos VH y VL CHA humanizados. "VHquim" y "VLquim" son las secuencias pesada y ligera variables de ratón unidas a un dominio constante de IgG humana.

Figura 19. Alineación de secuencias de ortólogos de PVRIG. Secuencias alineadas del dominio extracelular de PVRIG humano, de *Macaca fascicularis*, de tití, y de *Macaca mulatta*. Las diferencias entre humano y *Macaca fascicularis* se resaltan en amarillo.

Las Figuras 20A-20D representan las secuencias de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico para la cadena pesada variable (A y B, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico para la cadena ligera variable (C y D, respectivamente) para AB-407 (BOJ-5G4-F4).

Las Figuras 21A y 21B representan las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de IgG1 (con algunas sustituciones de aminoácidos útiles), IgG2, IgG3, IgG4, IgG4 con una variante de bisagra humanas que encuentran uso particular en la presente invención, y los dominios constantes de las cadenas ligeras kappa y lambda.

La Figura 22 representa las secuencias de TIGIT ECD humano y de *Macaca fascicularis* y de las proteínas PVR ECD humanas.

Las Figuras 23A-23D representan las secuencias de anticuerpos anti-TIGIT. A menos que se indique lo contrario, las CDR utilizan la numeración IMGT (que incluye los anticuerpos del listado de secuencias).

Las Figuras 24A-24SSSS representan las secuencias de numerosos anticuerpos anti-TIGIT para su uso en los anticuerpos biespecíficos de la presente invención.

La Figura 25 representa un esquema de una modalidad de anticuerpo biespecífico ilustrativo mediante el uso de la tecnología CrossMab (MAbs. 2016 agosto-septiembre; 8 (6): 1010-1020) y tecnología de botones en el ojal (Nat Biotechnol. Julio de 1998;16(7):677-81).

La Figura 26 proporciona las secuencias de las cadenas pesada y ligera para cada brazo del anticuerpo biespecífico CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086. Los dominios variables se muestran en cursiva. Las CDR están coloreados en rojo. Las mutaciones en los dominios Fc se muestran en negrita y subrayadas.

La Figura 27 proporciona los sensogramas de SPR (líneas negras) de (A) unión de TIGIT humano al anticuerpo biespecífico TIGIT-PVRIG capturado sobre dos superficies independientes y de (B) unión de PVRIG humano al anticuerpo biespecífico de TIGIT-PVRIG capturado sobre dos superficies independientes. Las líneas rojas en (A) y (B) son el ajuste global de los sensogramas a un modelo de enlace cinético simple 1:1. El intervalo de concentración de TIGIT fue de 362 pM a 88 nM y el intervalo de concentración de PVRIG fue de 460 pM a 112 nM. Debido a que no hubo suficientes datos de desintegración de la señal de disociación después de 15 minutos con el antígeno TIGIT, la k_d se mantuvo arbitrariamente constante en $1e^{-5} \text{ seg}^{-1}$ para el ajuste global. Cuando se mantiene la k_d constante para la interacción TIGIT-anticuerpo biespecífico, se estimó que k_a era $3.9 e^6 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ con la relación k_d/k_a al calcular $K_D = 2.6 \text{ pM}$. Las constantes de unión para la interacción PVRIG-anticuerpo biespecífico fueron $k_a = 1.3 e^6 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$, $k_d = 2.4 e^{-4} \text{ seg}^{-1}$, y $K_D = 187 \text{ pM}$.

La Figura 28 representa el ensayo "sándwich" de SPR que demuestra la unión simultánea de TIGIT humano y PVRIG humano al anticuerpo biespecífico anti-TIGIT-PVRIG. El anticuerpo biespecífico se inyecta primero (A) sobre TIGIT humano inmovilizado covalentemente al chip biosensor. A continuación, se inyecta (B) PVRIG humano sobre el anticuerpo biespecífico fijado a TIGIT.

La Figura 29 representa la caracterización de linfocitos T CD8⁺ específicos a pp65. A) Se activaron PBMC con el péptido pp65₍₄₉₅₋₅₀₃₎, IL-2 e IL-7 durante 11 días. Se realizó citometría de flujo para evaluar

el porcentaje de linfocitos T reactivos a pp65 y la expresión de PVRIG, TIGIT, y PD-1. Se muestran la jerarquía de activación representativa de 1 donante y la tinción representativa del tetrámero de dos donantes. De izquierda a derecha, los linfocitos se activaron mediante dispersión directa (FSC)/dispersión lateral (SSC) (parte superior izquierda), y células positivas CD3⁺ CD8⁺ vivas. Dentro de la población positiva CD3⁺ CD8⁺, se determina el porcentaje de células que se unen al tetrámero HLA-A201 pp65 y se muestran los datos de 2 donantes. B. La expresión de PVRIG, TIGIT y PD-1 en linfocitos T reactivos a pp65 se evaluó mediante citometría de flujo. El número en la esquina superior derecha denota la MFI de la diana de interés en relación con el control de isotipo.

La Figura 30 representa el efecto del bloqueo del receptor inhibidor sobre los linfocitos T CD8 reactivos a pp65 de CMV en cocultivo con la línea celular de cáncer Mel-624 pp65. Se cultivaron conjuntamente linfocitos T reactivos a pp65 de CMV para 2 donantes, el donante 4 (A) y el donante 72 (B) con una línea celular tumoral Mel-624 modificada que expresa ectópicamente pp65 en presencia de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086 solo o en combinación, CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 BsAb o un control de isotipo IgG humano durante 18 horas. Los medios acondicionados se analizaron para determinar la secreción de citocinas. Los números encima de las barras indican el % de cambio relativo al control de isotipo. Los gráficos de barras muestran el promedio + desviación estándar para IFN- γ (N=2).

La Figura 31 proporciona titulación dependiente de la dosis del bloqueo del receptor inhibidor en linfocitos T CD8 reactivos a pp65 de CMV en cocultivo con la línea celular de cáncer Mel-624 pp65. Se cultivaron conjuntamente linfocitos T reactivos a pp65 de CMV para 2 donantes, el donante 4 (A) y el donante 72 (B) con una línea celular tumoral Mel-624 modificada que expresa ectópicamente pp65 en presencia de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086 solo o en combinación, CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 BsAb o un control de isotipo IgG humano durante 18 horas. Se usó una serie de dilución de 10 puntos, 4 veces a partir de 20 μ g/ml para cada anticuerpo. Los medios acondicionados se analizaron para determinar la secreción de citocinas. Se informan valores de EC₅₀ (nM) para el bloqueo combinado mediante el uso de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086 y para los tratamientos de anticuerpos biespecíficos. Datos representativos (N=2).

La Figura 32 proporciona una descripción general de las estrategias de heterodimerización de Fc para su uso en la generación de anticuerpos biespecíficos aplicables a los anticuerpos biespecíficos de la invención. (Véase, Godar, y otros, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(3):251-276 (2018).)

La Figura 33 proporciona una descripción general de los formatos de anticuerpos biespecíficos asimétricos aplicables a los anticuerpos biespecíficos de la invención. (Véase, Brinkmann y Kontermann, *The making of bispecific antibodies*, MAbs, 9(2): 182–212 (2017).)

La Figura 34 proporciona una descripción general de los formatos de anticuerpos biespecíficos simétricos aplicables a los anticuerpos biespecíficos de la invención. (Véase, Brinkmann y Kontermann, *The making of bispecific antibodies*, MAbs, 9(2): 182–212 (2017).)

La Figura 35 proporciona anticuerpos anti-PVRIG adicionales para su uso en los anticuerpos biespecíficos de la presente invención.

La Figura 36 proporciona los sensogramas de SPR (líneas negras) de la unión de PVRIG humano a anticuerpos biespecíficos y mono-específicos de PVRIG capturados. Las líneas rojas en ambos son el ajuste global de los sensogramas a un modelo de enlace cinético simple 1:1. El intervalo de

concentración de PVRIG fue de 460 pM-112 nM. (A) CHA.7.518.4-H4 ojal + CHA.9.547.18-H4 CrossMab botón, (B) CHA.7.518.4-H4 ojal + CPA.9.086- CrossMab H4 botón, (C) CHA.7.518.4-H4 ojal + CPA.9.086 scFv (VL-VH)-H4 botón, (D) CHA.7.518.4-H4 ojal + CPA.9.086 scFv (VH-VL)-H4 botón, (E) CPA.9.086 scFv (VH-VL) H4 var1 + CHA.7.518.1 Fab H4 var2, (F) CHA.7.518.1 scFv (VL-VH) H4 var1 + CPA.9.086 Fab H4 var2, (G) CHA.9.547.18 scFv (VH-VL) H4 var1 + CHA.7.518.4 Fab H4 var2, (H) CHA.7.518.4 scFv (VL-VH) H4 var1 + CHA.9.547.18 Fab H4 var2, (I) CHA.7.518.1 H4, (I) (J) Synagis H4. Las afinidades de unión se estimaron a partir del cálculo de la relación k_d/k_a (K_D) para cada anticuerpo y se presentan en la Figura 38.

La Figura 37 proporciona los sensogramas SPR (líneas negras) de la unión de TIGIT humano a anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos de TIGIT capturados. Las líneas rojas son el ajuste global de los sensogramas a un modelo de enlace cinético simple 1:1. El intervalo de concentración de TIGIT fue 362 pM-88 nM. (A) CHA.7.518.4-H4 ojal + CHA.9.547.18-H4 CrossMab botón, (B) CHA.7.518.4-H4 ojal + CPA.9.086-CrossMab H4 botón, (C) CHA.7.518.4-H4 ojal + CPA.9.086 scFv (VL-VH)-H4 botón, (D) CHA.7.518.4-H4 ojal + CPA.9.086 scFv (VH-VL)-H4 botón, (E) CPA.9.086 scFv (VH-VL) H4 var1 + CHA.7.518.1 Fab H4 var2, (F) CHA.7.518.1 scFv (VL-VH) H4 var1 + CPA.9.086 Fab H4 var2, (G) CHA.9.547.18 scFv (VH-VL) H4 var1 + CHA.7.518.4 Fab H4 var2, (H) CHA.7.518.4 scFv (VL-VH) H4 var1 + CHA.9.547.18 Fab H4 var2, (I) CPA.9.086 H4, (J) Synagis H4. Las afinidades de unión se estimaron a partir del cálculo de la relación k_d/k_a (K_D) para cada anticuerpo y se presentan en la Figura 39.

La Figura 38 proporciona las afinidades de unión a PVRIG de anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos determinados por SPR.

La Figura 39 proporciona las afinidades de unión a TIGIT de anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos determinados por SPR.

La Figura 40 proporciona anticuerpos anti-PVRIG adicionales para su uso en los anticuerpos biespecíficos de la presente invención. El texto de fuente roja indica sustituciones de aminoácidos y () indica una eliminación con respecto a la secuencia de aminoácidos de IgG4 humana de referencia. El texto subrayado indica las CDR. El texto resaltado en gris indica los dominios Fc.

La Figura 41 proporciona anticuerpos anti-TIGIT adicionales para su uso en los anticuerpos biespecíficos de la presente invención. El texto de fuente roja indica sustituciones de aminoácidos y () indica una eliminación con respecto a la secuencia de aminoácidos de IgG4 humana de referencia. El texto subrayado indica las CDR. El texto resaltado en gris indica los dominios Fc.

La Figura 42 proporciona un diagrama de un formato de anticuerpo biespecífico CrossMab ilustrativo que tiene un brazo de anticuerpo tradicional y uno en el que se intercambian los dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera. Las sustituciones de aminoácidos para el formato de "botón en el ojal" se indican de acuerdo con la numeración Eu de IgG1 humana.

La Figura 43 proporciona un diagrama de un formato de anticuerpo biespecífico "abrebotellas" ilustrativo que tiene un brazo de anticuerpo tradicional y un brazo de fusión scFv-Fc. Las sustituciones de aminoácidos para el formato de "botón en el ojal" se indican de acuerdo con la numeración Eu de IgG1 humana.

La Figura 44 proporciona un diagrama de un formato de anticuerpo biespecífico " abrebotellas" ilustrativo que tiene un brazo de anticuerpo tradicional y un brazo de fusión scFv-Fc. Las sustituciones

de aminoácidos para el formato de "heterodimerización isovolumétrica" se indican de acuerdo con la numeración Eu de IgG1 humana. Se indican sustituciones adicionales que contribuyen a reducir la unión de FcγR.

La Figura 45 proporciona datos sobre la expresión y purificación de anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG-TIGIT, el contenido de monómero y el % de anticuerpo biespecífico ensamblado correctamente según lo determinado por LC-MS después de la etapa de cromatografía de afinidad MabSelect Sure y cromatografía de exclusión por tamaño (si el % de monómero era inferior a 95 % a partir de la cromatografía de afinidad).

La Figura 46 proporciona datos sobre los ensayos de detección de CMV para la detección de anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG-TIGIT en tres donantes de linfocitos T diferentes y realizados a una concentración total de anticuerpos de 10 ug/ml por tratamiento

La figura 47 proporciona ejemplos de citometría de flujo de la expresión de PVRIG, TIGIT y el ligando PD-1 (PVR, PVRL2 y PD-L1, respectivamente) en las líneas de células CHO recombinantes usadas en los ensayos celulares.

La Figura 48 proporciona ejemplos de citometría de flujo de los niveles de expresión de PVRIG, TIGIT y PD-1 en linfocitos T de tres donantes diferentes.

La Figura 49 proporciona datos de unión de ELISA que demuestran la unión simultánea de PVRIG y TIGIT para diversos anticuerpos anti-PVRIG-TIGIT mediante el uso de una placa recubierta de PVRIG y la detección de anticuerpos unidos mediante el uso de TIGIT-His biotinilado y Streptavidina-HRP.

La Figura 50 proporciona datos de unión de ELISA que demuestran la unión simultánea de PVRIG y TIGIT para diversos anticuerpos anti-PVRIG-TIGIT mediante el uso de una placa recubierta de TIGIT y la detección de anticuerpos unidos mediante el uso de PVRIG-His biotinilado y Streptavidina-HRP.

La Figura 51 proporciona datos de EC-50 para los datos del ensayo ELISA proporcionados en las Figuras 49 y 50.

La Figura 52 proporciona datos de estabilidad de ejemplo de anticuerpos biespecíficos en múltiples formatos evaluados por Fluorimetría Diferencial de Barrido (DSF) y formación de agregados después de mantener un pH bajo y 3 ciclos de congelación y descongelación.

La Figura 53 proporciona una evaluación de la estabilidad de los diferentes formatos biespecíficos. Se realizaron pruebas para simular la inactivación viral tras mantener los anticuerpos a pH 3 durante varios momentos y para la prueba de estrés tras realizar 3 ciclos de congelación/descongelación en serie. Los cambios en la cantidad relativa de cadena pesada (que contiene scFv o Fab) (A), cadena ligera (B) en condiciones reductoras o molécula intacta (C) en condiciones no reductoras (CE-SDS) y en peso molecular bajo, peso molecular alto, y contenido de especies de monómeros (SEC-UPLC) (D). Los datos se informan como un cambio de $T = 0$.

La Figura 54A proporciona un ensayo de cocultivo in vitro con linfocitos T CD8+ específicos de CMV humano de tres donantes (Donante 4, Donante 210 y Donante 234) que se utilizaron para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-TIGIT (CPA.9.086 y CHA.9.547.18) y los anticuerpos anti-PVRIG (CHA.7.518.1, CHA.7.518.4) sobre la secreción de citocinas específicas de antígeno, ya sea solas, en combinación o como anticuerpos biespecíficos. La línea celular diana usada en el ensayo fue la línea celular que expresa melanoma 624 (Mel-624) HLA-A2 + PVRL2 + PVR + que ha sido modificada para expresar ectópicamente pp65. Las células se cultivaron en placas a razón de 75 000 células/pocillo en

placas tratadas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron 15 000 linfocitos T CD8+ humanos a cada pocillo. Los anticuerpos anti humanos de PVRIG, TIGIT o hIgG4 de control de isotipo indicados se añadieron a una concentración de 1 µg/ml. Los cocultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO2 durante 24 horas. La cantidad de IFNγ humano en el sobrenadante del cocultivo se midió mediante citometría de flujo mediante el uso de un ensayo de microesferas LEGENDplex IFN (BD Biosciences). Se indica el aumento porcentual de la secreción de IFNγ para cada anticuerpo sobre el isotipo hIgG4 (n = 2 experimentos, se muestran los resultados representativos de 1 experimento). (A) CHA.7.518.4-H4 ojal + CPA.9.086-CrossMab H4 botón, (B) CHA.7.518.4-H4 ojal + CPA.9.086 scFv (VH-VL)-H4 botón, (C) CPA.9.086 scFv (VH-VL) H4 var1 + CHA.7.518.1 Fab H4 var2, (D) CHA.7.518.1 scFv (VL-VH) H4 var1 + CPA.9.086 Fab H4 var2, (E) CHA.7.518.1 H4, (F) CPA.9.086 H4, (G) CHA.7.518.1 H4, (H) CPA.9.086 H4, (I) Synagis H4.

La Figura 54B proporciona un resumen de las dos réplicas del ensayo de CMV realizadas con diferentes expansiones de las células del donante.

d) DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A. Descripción general

La presente invención proporciona varios anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT útiles, para su uso en particular en el tratamiento del cáncer. El cáncer puede considerarse como una incapacidad del paciente de reconocer y eliminar células cancerosas. En muchos casos, estas células transformadas (por ejemplo, cancerosas) contrarrestan la inmunovigilancia. Existen mecanismos de control natural que limitan la activación de los linfocitos T en el cuerpo para impedir la actividad no restringida de los linfocitos T, la cual puede ser aprovechada por las células cancerosas para evadir o suprimir la respuesta inmunitaria. El objetivo de la inmunoterapia es restaurar la capacidad de las células efectoras inmunitarias, especialmente los linfocitos T, para reconocer y eliminar el cáncer. El campo de la inmunooncología, a veces denominado "inmunoterapia", está evolucionando rápidamente, y se aprobaron recientemente varios anticuerpos inhibidores del punto de control de linfocitos T tales como Yervoy, Keytruda y Opdivo. Estos anticuerpos generalmente se denominan "inhibidores de punto de control" porque bloquean los reguladores típicamente negativos de la inmunidad de los linfocitos T. En general, se entiende que puede usarse una variedad de señales inmunomoduladoras, tanto coestimuladoras como coinhibidoras, para disponer una respuesta inmunitaria óptima específica del antígeno. En general, estos anticuerpos se unen a las proteínas inhibidoras del punto de control, como CTLA-4 o PD-1, que en circunstancias normales impiden o suprimen la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTL). Al inhibir la proteína del punto de control, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos que se unen a estas proteínas, puede lograrse una mayor respuesta de los linfocitos T contra tumores. Es decir, estas proteínas del punto de control de cáncer suprimen la respuesta inmunitaria; cuando las proteínas se bloquean, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos contra la proteína del punto de control, el sistema inmunitario se activa, lo que lleva a la estimulación inmunitaria, lo que da como resultado el tratamiento de afecciones tales como cáncer y enfermedades infecciosas.

La presente invención se dirige al uso de anticuerpos biespecíficos para proteínas de punto de control adicionales, PVRIG y TIGIT. PVRIG se expresa en la superficie celular de los linfocitos T y las células

NK y comparte varias similitudes con otros puntos de control inmunitarios conocidos. La identificación y los métodos usados para mostrar que PVRIG es un receptor de punto de control se tratan en el documento WO2016/134333, que se incorpora expresamente en la presente como referencia. En la presente descripción se proporcionan los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT al PVRIG humano que bloquea la interacción y/o la unión de PVRL2. Cuando PVRIG se une mediante su ligando (PVRL2), se genera una señal inhibidora que actúa para atenuar la respuesta inmunitaria de células NK y linfocitos T contra una célula diana (es decir, análoga a PD-1/PDL1). El bloqueo de la unión de PVRL2 a PVRIG apaga esta señal inhibidora de PVRIG y, como resultado, modula la respuesta inmunitaria de los linfocitos T y las células NK. El uso de un anticuerpo contra PVRIG que bloquea la unión a PVRL2 es un enfoque terapéutico que mejora la inactivación de las células cancerosas por los linfocitos T y las células NK. Se han generado anticuerpos de bloqueo que se unen a PVRIG y bloquean la unión de su ligando, PVRL2.

De manera similar, se ha demostrado que TIGIT tiene además atributos de un receptor de punto de control, y la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT que bloquean la interacción y/o la unión de TIGIT a PVR. Cuando TIGIT está fijado por su ligando (PVR), se genera una señal inhibidora que actúa para atenuar la respuesta inmunitaria de los linfocitos T y células NK contra una célula diana (es decir, análoga a PD-1/PDL1). El bloqueo de la unión de PVR a TIGIT desactiva esta señal inhibidora de TIGIT y, como resultado, modula la respuesta inmunitaria de los linfocitos T y las células NK. El uso de un anticuerpo contra TIGIT que bloquea la unión a PVR es un enfoque terapéutico que mejora la destrucción de células cancerosas por los linfocitos T y las células NK. Se han generado anticuerpos de bloqueo que se unen a TIGIT y bloquean la unión de su ligando, PVR.

Además, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT para su uso en el tratamiento del cáncer.

B. Definiciones

Para que la solicitud se entienda de forma más completa, a continuación se exponen varias definiciones. Estas definiciones pretenden abarcar los equivalentes gramaticales.

Las definiciones de dominio de IgG usadas en la presente descripción están de acuerdo con las secuencias de referencia de IMGT (www.IMGT.org)

En la presente, "ablación" significa una disminución o eliminación de la actividad. En algunas modalidades, es útil eliminar la actividad de los dominios constantes de los anticuerpos. Por lo tanto, por ejemplo, "ablación de la unión a FcγR" significa que la variante de aminoácido de la región Fc tiene menos de 50 % de unión inicial en comparación con una región Fc que no contiene la variante específica, en donde se prefiere una pérdida de actividad de menos de 70-80-90-95-98 %, y en general, en donde la actividad se encuentra por debajo del nivel de unión detectable en un ensayo Biacore. Como se muestra en la Figura 21, una variante de ablación en la región constante IgG1 es la variante N297A, que elimina el sitio de glicosilación nativa y reduce significativamente la unión a FcγRIIIa y, por lo tanto, reduce la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

Por "dominio de unión a antígeno" o "ABD" en la presente se entiende un conjunto de seis **Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR)** que, cuando está presente como parte de una secuencia de polipéptidos, se une específicamente a un antígeno diana como se analiza en la presente.

Por lo tanto, un "dominio de unión a antígeno TIGIT" se une al antígeno TIGIT (cuya secuencia se muestra en la Figura 22) como se describe en la presente. De manera similar, un "dominio de unión al anticuerpo PVRIG" se une al antígeno PVRIG (cuya secuencia se muestra en la Figura 1) como se describe en la presente. Como se conoce en la técnica, estas CDR están generalmente presentes como

un primer conjunto de CDR pesadas variables (vhCDR o V_HCDR) y un segundo conjunto de CDR ligeras variables (vlCDR o V_LCDR), cada una comprende tres CDR: vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3 para la cadena pesada y vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 para la ligera. Las CDR están presentes en los dominios variable pesado y variable ligero, respectivamente, y juntos forman una región Fv. Por lo tanto, en algunos casos, las seis CDR del dominio de unión a antígeno son aportadas por una cadena pesada variable y ligera variable. En un formato de "Fab", el conjunto de 6 CDR es aportado por dos secuencias de polipéptidos diferentes, el dominio pesado variable (vh o V_H; que contiene las vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y el dominio ligero variable (vl o V_L; que contiene las vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3), con el terminal C del dominio vh unido al terminal N del dominio CH1 de la cadena pesada y el terminal C del dominio vl unido al terminal N del dominio ligero constante (y que forma por lo tanto, la cadena ligera).

La frase "porción de unión a antígeno" puede comprender un ABD o ser sinónimo de ABD.

En la presente, "modificación" significa una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos o una alteración de una porción ligada químicamente a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser un carbohidrato alterado o una estructura PEG unida a una proteína. En la presente, "modificación de aminoácidos" significa una sustitución, inserción, y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos. Para mayor claridad, a menos que se indique lo contrario, la modificación de aminoácidos es siempre a un aminoácido codificado por ADN, por ejemplo, los 20 aminoácidos que tienen codones en ADN y ARN.

En la presente, "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" significa el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos parentales por un aminoácido distinto. En particular, en algunas modalidades, la sustitución es en un aminoácido no natural en la posición particular, ya sea no natural dentro del organismo o en cualquier organismo. Por ejemplo, la sustitución N297A se refiere a una variante de polipéptido, en este caso una variante de Fc, en la que la asparagina en la posición 297 se reemplaza con alanina. Para mayor claridad, una proteína que fue modificada por ingeniería genética para cambiar la secuencia codificante de ácidos nucleicos, pero no el aminoácido de inicio (por ejemplo, intercambio de CGG (que codifica arginina) con CGA (que aún codifica arginina) para aumentar los niveles de expresión del organismo huésped), no es una "sustitución de aminoácidos"; es decir, a pesar de la creación de un nuevo gen que codifica la misma proteína, si la proteína tiene el mismo aminoácido en la posición particular en donde se inició, no es una sustitución de aminoácidos.

Por "inserción de aminoácidos" o "inserción", como se usa en la presente, se entiende la adición de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental. Por ejemplo, -233E o 233E designan una inserción de ácido glutámico después de la posición 233 y antes de la posición 234. Además, -233ADE o A233ADE designan una inserción de AlaAspGlu después de la posición 233 y antes de la posición 234.

Como se usan en la presente, "eliminación de aminoácidos" o "eliminación" significan la eliminación de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptidos parentales.

Por ejemplo, E233- o E233#, E233() o E233del designa una eliminación de ácido glutámico en la posición 233. Además, EDA233- o EDA233# designa una eliminación de la secuencia GluAspAla que comienza en la posición 233.

Como se usan en la presente, "proteína variante", "variante de proteína" o "variante" significan una proteína que es diferente de la proteína parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Variante de proteína puede referirse a la proteína en sí misma, a una composición que comprende la proteína, o a la secuencia de aminoácidos que la codifica. Preferentemente, la variante de proteína tiene al menos una modificación de aminoácidos en comparación con la proteína parental, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de setenta modificaciones de aminoácidos y, preferentemente, de alrededor de una a alrededor de cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con la proteína parental. Como se describe a continuación, en algunas modalidades, el polipéptido parental, por ejemplo, un polipéptido parental Fc, es una secuencia de tipo salvaje humana, tal como la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, aunque las secuencias humanas con variantes también pueden servir como "polipéptidos parentales". La secuencia variante de proteína en la presente preferentemente poseerá al menos alrededor de 80 % de identidad con una secuencia de proteína parental, y con máxima preferencia al menos alrededor de 90 % de identidad, con mayor preferencia al menos alrededor de 95-98-99 % de identidad. La proteína variante puede referirse a la proteína variante en sí misma, a las composiciones que comprenden la variante de proteína, o a la secuencia de ADN que la codifica. En consecuencia, como se usan en la presente, "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" significan un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, "variante de IgG" o "IgG variante", como se usan en la presente, significan un anticuerpo que difiere de una IgG parental (nuevamente, en muchos casos, de una secuencia de IgG humana) en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, y "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante", como se usan en la presente, significan una secuencia de inmunoglobulina que difiere de una secuencia de inmunoglobulina parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. "Variante de Fc" o "Fc variante" como se usan en la presente significan una proteína que comprende una modificación de aminoácidos en un dominio Fc. Las variantes de Fc de la presente invención se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácidos que las componen. Por lo tanto, por ejemplo, S241P o S228P es una variante de bisagra con la prolina de sustitución en la posición 228 en comparación con el polipéptido bisagra IgG4 parental, en donde la numeración S228P es de acuerdo con el índice EU y el S241P es la numeración de Kabat. El índice EU o índice EU según Kabat o esquema de numeración EU se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman y otros 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85, incorporado en su totalidad en la presente como referencia). La modificación puede ser una adición, eliminación o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos naturales y, en algunos casos, aminoácidos sintéticos. Los ejemplos incluyen la patente de Estados Unidos núm. 6,586,207; documentos WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin y otros, (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11:1135-1137; J. W. Chin y otros, (2002), PICAS United States of America 99:11020-11024; y, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10, todos incorporados como referencia en su totalidad.

Como se usa en la presente, "proteína" significa al menos dos aminoácidos unidos de manera covalente, que incluyen proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. El grupo peptídico puede comprender aminoácidos y enlaces peptídicos naturales, o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, "análogos", tales como peptoides (véase Simon y otros, PNAS USA 89(20):9367 (1992),
 5 incorporado como referencia en su totalidad). Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos (por ejemplo, no un aminoácido codificado por ADN); como comprenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, homo-fenilalanina, citrulina, ornitina y noreleucina se consideran aminoácidos sintéticos para los propósitos de la invención, y pueden usarse aminoácidos con configuración D- y L- (R o S). Las variantes de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de
 10 aminoácidos sintéticos incorporados mediante el uso de, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz y colegas, que incluyen, entre otros, los métodos descritos en Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson y otros, 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101 (2):7566-71, Zhang y otros, 2003, 303(5656):371-3, y Chin y otros, 2003, Science 301(5635):964-7, todos incorporados como referencia en su totalidad. Además, los polipéptidos pueden incluir derivatización sintética de una o más
 15 cadenas o terminales laterales, glicosilación, PEGilación, permutación circular, ciclización, enlazadores a otras moléculas, fusión a proteínas o dominios proteicos, y adición de etiquetas peptídicas o marcadores.

Como se usa en la presente, "residuo" significa una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, asparagina 297 (también denominada Asn297 o N297) es un
 20 residuo en la posición 297 en el anticuerpo IgG1 humano.

Como se usan en la presente, "Fab" o "región Fab" significan el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL, y CL. Fab puede referirse a esta región aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.

Como se usan en la presente, "Fv", "fragmento Fv" o "región Fv" significan un polipéptido que
 25 comprende los dominios VL y VH de un único anticuerpo. Como comprenderán los expertos en la técnica, estos generalmente están formados por dos cadenas.

Por "Fv monocatenario" o "scFv" en la presente se entiende un dominio pesado variable unido covalentemente a un dominio ligero variable, generalmente mediante el uso de un enlazador de scFv como se describe en la presente, para formar un scFv o dominio scFv. Un dominio scFv puede estar
 30 en orientación desde el terminal N al terminal C (vh-enlazador-vl o vl-enlazador-vh). En general, el enlazador es un enlazador de scFv como se conoce generalmente en la técnica, y el enlazador peptídico incluye predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala o Thr.

Por "enlazador" se entiende generalmente un enlazador peptídico que se usa en el contexto de un scFv o un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente. El enlazador peptídico debería tener una
 35 longitud adecuada para unir dos moléculas de modo que asuman la conformación correcta con respecto a la otra, para que conserven la actividad deseada. En una modalidad, el enlazador tiene de alrededor de 1 a 50 aminoácidos de longitud, preferentemente, de alrededor de 1 a 30 aminoácidos de longitud. En una modalidad, pueden usarse enlazadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud, en donde alrededor de 5 a alrededor de 10 aminoácidos pueden usarse en algunas modalidades. Los enlazadores útiles
 40 incluyen polímeros de glicina-serina, que incluyen, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n, y (GGGS)_n, en donde n es un número entero de al menos uno (y, generalmente, de 3 a 4), polímeros de

glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, y otros enlazadores flexibles. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen, entre otros, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden ser útiles como enlazadores. En algunas modalidades, los enlazadores se seleccionan de los enumerados en las

5 Tablas 1 y 2 a continuación (véase, también, la Figura 7 de la Patente de Estados Unidos núm. 9,650,446.)

Tabla 1: Enlazadores scFv cargados positivamente

Nombre	Secuencia	Longitud	Carga	SEQ ID NO:
Gly-Ser 15	GGGGSGGGGSGGGGS	15	0	3632
Enlazador Whitlow	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	18	+1	3633
6paxk_1 (+ A)	IRPRAIGGSKPRVA	14	+4	3634
+ B	GKGSGGKGGSGKGGS	15	+3	3635
+ C	GGKSGGKGGSGGKGS	15	+3	3636
+ D	GGKSGGGKSGGGKS	15	+3	3637
+ E	GKGKSGKGKSGKGKS	15	+6	3638
+ F	GGKSGGKGGSGKGGS	15	+3	3639
+ G	GKPGSGKPGSGKPGS	15	+3	3640
+ H	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	20	+4	3641
+1	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	20	+8	3642

Tabla 2: Enlazadores scFv cargados negativamente

Nombre	Secuencia	Longitud	Carga	SEQ ID NO:
Gly-Ser 15	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	20	0	3643
3hsc2 (-A)	STAGEITHLGGEDFD	14	-4	3644
-B	GEGSGEGGSGEGGS	15	-3	3645
-C	GEGSGGEGSGGEGS	15	-3	3646
-D	GGGESGGGESGGGES	15	-3	3647
-E	GEGESGEGESGEGFS	15	-6	3648
-F	GGGESGGEGSGEGGS	15	-3	3649
-G	GEGESGEGESGEGESGEGES	20	-8	3650

Como se usan en la presente, "modificación de subclase IgG" o "modificación de isotipo" significan una modificación de aminoácidos que convierte un aminoácido de un isotipo de IgG en el aminoácido correspondiente en un isotipo de IgG alineado, distinto. Por ejemplo, debido a que IgG1 comprende una tirosina, e IgG2, una fenilalanina en la posición EU 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación de subclase IgG. De manera similar, como IgG1 tiene una prolina en la posición 241 e IgG4 tiene una serina en esa posición, una molécula de IgG4 con un S241P se considera una

modificación de la subclase de IgG. Tenga en cuenta que las modificaciones de subclases se consideran sustituciones de aminoácidos en la presente.

Como se usa en la presente, "modificación no natural" significa una modificación de aminoácidos que no es isotípica. Por ejemplo, debido a que ninguna IgG comprende una asparagina AN en la posición 297, la sustitución N297A en IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 (o híbridos de estas) se considera una modificación no natural.

Como se usan en la presente, "aminoácido" e "identidad de aminoácido" significan uno de los 20 aminoácidos naturales que están codificados por ADN y ARN.

Como se usa en la presente, "función efectora" significa un evento bioquímico que surge como resultado de la interacción de una región Fc del anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen, entre otras, ADCC, ADCP, y CDC.

Como se usa en la presente, "ligando de IgG Fc" significa una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo de ligando de Fc/Fc. Los ligandos de Fc incluyen, entre otros, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manosa, receptor de manosa, proteína estafilocócica A, proteína estreptocócica G, y FcγR viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos de receptores Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc homólogos a los FcγR (Davis y otros, 2002, Immunological Reviews 190:123-136, incorporado como referencia en su totalidad). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Los ligandos de Fc de IgG particulares son receptores de Fc gamma y FcRn. Como se usa en la presente, "ligando de Fc" significa una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo de ligando de Fc/Fc.

Como se usa en la presente, "polipéptido parental" significa un polipéptido de inicio que se modifica posteriormente para generar una variante. El polipéptido parental puede ser un polipéptido natural o una variante o una versión modificada por ingeniería genética de un polipéptido natural. Polipéptido parental puede referirse al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido parental, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En consecuencia, como se usa en la presente, "inmunoglobulina parental" significa un polipéptido de inmunoglobulina no modificado que se modifica para generar una variante, y "anticuerpo parental", como se usa en la presente, significa un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante. Se debe tener en cuenta que "anticuerpo parental" incluye anticuerpos comerciales conocidos, producidos de forma recombinante como se describe a continuación.

Como se usan en la presente, "Fc", "región Fc" o "dominio Fc" significan el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo, a excepción del primer dominio de inmunoglobulina de la región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD, e IgG, los tres últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y el terminal N de bisagra flexible de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, el dominio de Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cγ2 y Cγ3 (Cγ2 y Cγ3) y la región bisagra más baja entre Cγ1 (Cγ1) y Cγ2 (Cγ2). A pesar de que los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana habitualmente se define para incluir los residuos C226 o P230 en su terminal carboxilo,

en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU según Kabat. En algunas modalidades, como se describe en detalle más adelante, se realizan modificaciones de aminoácidos en la región Fc, por ejemplo, para alterar la unión a uno o más receptores FcγR o al receptor FcRn.

En la presente, “región constante pesada” significa la porción CH1-bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo.

5 Como se usa en la presente, “posición” significa una ubicación en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden estar numeradas de forma secuencial, o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo, el índice EU para numeración de anticuerpos.

Como se usa en la presente, “antígeno diana” significa la molécula que se une de manera específica mediante la región variable de un anticuerpo determinado. En el presente caso, un antígeno diana de
10 interés en la presente es TIGIT, habitualmente TIGIT humano y opcionalmente TIGIT de *Macaca fascicularis*, como se define a continuación. Otro antígeno diana de interés es PVRIG, habitualmente PVRIG humano y, opcionalmente, PVRIG de *Macaca fascicularis*, como se define a continuación.

Como se usa en la presente, “célula diana” significa una célula que expresa un antígeno diana.

Como se usa en la presente, “región variable” significa la región de una inmunoglobulina que
15 comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes Vk (V.kappa), Vλ (V.lamda), y/o VH que forman los locus genéticos de inmunoglobulina de cadena kappa, lambda, y pesada, respectivamente.

Por “tipo salvaje o WT” en la presente se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluidas las variaciones alélicas. Una proteína WT tiene
20 una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no fue modificada de manera intencional.

En general, los anticuerpos de la presente invención son aislados o recombinantes. Cuando se usa para describir los distintos polipéptidos descritos en la presente, “aislado” significa un polipéptido que fue identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular en donde se expresó. En
25 general, un polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. Un “anticuerpo aislado” significa un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas distintas. “Recombinante” significa que los anticuerpos se generan mediante el uso de técnicas de ácidos nucleicos recombinantes en células huésped exógenas.

“Unión específica” o “se une específicamente a” o es “específica para” un antígeno o epítipo particular
30 significa una unión que difiere de manera mensurable de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, mediante la determinación de la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse mediante competencia con una molécula control que es similar a la diana.

35 La unión específica para un antígeno particular o un epítipo puede exhibirse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KD para un antígeno o epítipo de al menos alrededor de 10^{-9} M, al menos alrededor de 10^{-10} M, al menos alrededor de 10^{-11} M, al menos alrededor de 10^{-12} M, al menos alrededor de 10^{-13} M, al menos alrededor de 10^{-14} M, al menos alrededor de 10^{-15} M, donde KD se refiere a una velocidad de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. Típicamente, un anticuerpo
40 que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 o más veces mayor para una molécula control en relación con el antígeno o epítipo.

Además, la unión específica para un antígeno o epítipo particular puede exhibirse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KA o Ka para un antígeno o epítipo de al menos 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 veces mayor o más para el epítipo en relación con un control, en donde KA o Ka se refieren a una velocidad de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. La afinidad de unión se mide generalmente mediante resonancia de plasmón de superficie (por ejemplo, ensayo de Biacore) y citometría de flujo con células que expresan antígeno.

C. Secuencias

El listado de secuencias proporciona una serie de secuencias que se basan en el Formato de la Figura 23; se hace referencia a la Figura 4 del documento USSN 62/513,916 (incorporada en la presente expresamente como referencia) como una guía para el etiquetado de las secuencias. El dominio pesado variable está etiquetado con el identificador (por ejemplo, "CPA.9.086"), y la secuencia siguiente sigue el formato de la Figura 23 de la presente descripción (idéntico al formato de la Figura 4, al cual se hizo referencia anteriormente), en que el siguiente identificador de secuencia es vhCDR1, el siguiente a vhCDR2 con vhCDR3, la cadena pesada de longitud completa, el dominio ligero variable, vLCDR1, vLCDR2, vLCDR3 y la cadena ligera de longitud completa. Por lo tanto, un anticuerpo individual tiene 10 identificadores de secuencia asociados. En el listado de secuencias se incluyen las secuencias de IgG1 de ratón BM26 (BM26-M1) (documento WO2016/028656A1, clon 31C6) e IgG1 de ratón BM29 (BM29-M1) (documento US2016/0176963A1, clon 22G2). A menos que se indique, las secuencias de HC de longitud completa de los anticuerpos TIGIT y/o PVRIG están en formato H4(S241P).

D. Proteínas PVRIG

La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT que se unen específicamente a proteínas PVRIG e impiden la activación mediante su proteína ligando, PVRL2, una glicoproteína de membrana plasmática humana. PVRIG, también llamada proteína que contiene un dominio de inmunoglobulina relacionada con el receptor de poliovirus, Q6DKI7 o C7orf15, se relaciona con las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que se muestran en el identificador de acceso RefSeq NP_076975, que se muestra en la Figura 1. La secuencia de la proteína 2 relacionada con el receptor de poliovirus humano (PVLR2, también conocida como nectina-2, CD112 o mediador de entrada de herpesvirus B, (HVEB)), el componente de unión de PVRIG (como se muestra en el Ejemplo 5 de la publicación estadounidense 2016/0244521), se muestra en la Figura 2. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención son específicos para el dominio extracelular de PVRIG de manera que se bloquea la unión de PVRIG y PVLR2.

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

En consecuencia, como se usa en la presente, los términos "PVRIG" o "proteína PVRIG" o "polipéptido PVRIG" pueden incluir opcionalmente cualquiera de tales proteínas, o variantes, conjugados, o fragmentos de estas, que incluyen, entre otros, PVRIG conocida o de tipo salvaje, como se describe en la presente, así como cualesquiera variantes de empalme, variantes de aminoácidos o isoformas naturales, y en particular el fragmento ECD de PVRIG.

Como se indica en la presente y se describe con más detalle a continuación, se usan anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT que se unen a PVRIG e impiden la activación mediante PVRL2 (por ejemplo, más comúnmente, tras bloquear la interacción de PVRIG y PVRL2), para mejorar la activación de linfocitos T y/o células NK y su uso en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y la infección por patógenos.

E. Proteínas TIGIT

La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-TIGIT, y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT que se unen específicamente a proteínas TIGIT e impiden la activación mediante su proteína ligando, PVR, receptor de poliovirus (aka CD155) una glicoproteína de membrana plasmática humana. TIGIT, o el inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM, es una proteína receptora coinhibidora que también se conoce como WUCAM, Vstm3 o Vsig9. TIGIT tiene un dominio variable de inmunoglobulina, un dominio transmembrana, y un motivo inhibidor a base de tirosina del inmunorreceptor (ITIM) y contiene elementos de secuencia característicos de la familia de proteínas PVR. Las secuencias del dominio extracelular (ECD) de TIGIT y de PVR se muestran en la Figura 22. Los anticuerpos de la invención son específicos para el ECD de TIGIT de modo que se bloquea la unión de TIGIT y PVR

En consecuencia, como se usa en la presente, los términos "TIGIT" o "proteína TIGIT" o "polipéptido TIGIT" pueden incluir opcionalmente cualquiera de tales proteínas, o variantes, conjugados o fragmentos de estas, que incluyen, entre otros, TIGIT conocido o de tipo salvaje, como se describe en la presente, así como cualquier variante de empalme natural, variantes de aminoácidos o isoformas, y en particular el fragmento ECD de TIGIT.

Como se indica en la presente y se describe con más detalle a continuación, se usan anticuerpos anti-TIGIT (que incluye los fragmentos de unión al antígeno) que se unen a TIGIT e impiden la activación mediante PVR (por ejemplo, más comúnmente, tras bloquear la interacción de TIGIT y PVR), para mejorar la activación de linfocitos T y/o células NK y su uso en el tratamiento de enfermedades como el cáncer y la infección por patógenos.

V. Anticuerpos

Como se analiza a continuación, el término "anticuerpo" se usa de manera general. Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en donde cada par tiene una cadena "ligera" (que típicamente tiene un peso molecular de alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (que típicamente tiene un peso molecular de alrededor de 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. La presente invención se dirige a anticuerpos monoclonales que generalmente se basan en la clase de IgG, que tiene varias subclases, que incluyen, entre otras, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En general, IgG1, IgG2 e IgG4 se usan con más frecuencia que IgG3. Se debe tener en cuenta que IgG1 tiene diferentes alotipos con polimorfismos en 356 (D o E) y 358 (L o M). Las secuencias representadas en la presente usan el alotipo 356D/358M, sin embargo, el otro alotipo se incluye en la presente. Es decir, cualquier secuencia que incluya un dominio Fc de IgG1 incluido en la presente puede tener 356E/358L en reemplazo del alotipo 356D/358M. El término anticuerpo incluye además anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, aquellos anticuerpos que se unen al menos a dos dianas diferentes. En algunas modalidades, los anticuerpos

de la invención son anticuerpos biespecíficos que se unen a PVRIG y TIGIT (denominados en la presente anticuerpos biespecíficos anti-TIGIT/anti-PVRIG).

La porción del terminal amino de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento antigénico, generalmente denominada en la técnica y en la presente “dominio Fv” o “región Fv”. En la región variable, se agrupan tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de la complementariedad (en adelante denominada “CDR”), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos tiene mayor relevancia. El término “variable” se refiere al hecho de que ciertos segmentos de la región variable difieren ampliamente entre anticuerpos en lo que respecta a secuencia. La variabilidad dentro de la región variable no está distribuida uniformemente. Por el contrario, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones de marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas “regiones hipervariables” que tienen, cada una, 9-15 aminoácidos de longitud o más.

Cada VH y VL se compone de tres regiones hipervariables (“regiones determinantes de la complementariedad”, “CDR”) y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

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

Como será evidente para los expertos en la técnica, la numeración y ubicación exactas de las CDR pueden ser diferentes entre los diferentes sistemas de numeración. Sin embargo, debe entenderse que la descripción de una secuencia variable pesada y/o variable ligera incluye la descripción de las CDR asociadas (inherentes). En consecuencia, la descripción de cada región pesada variable es una descripción de las vhCDR (por ejemplo, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y la descripción de cada región ligera variable es una descripción de las vlCDR (por ejemplo, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3). Una comparación útil de la numeración de CDR es la siguiente, véase Lafranc y otros, Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003):

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

10

A lo largo de la presente descripción, el sistema de numeración Kabat se usa generalmente para referirse a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, los residuos 1-107 de la región variable de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la región variable de la cadena pesada) y la bisagra y el sistema de numeración EU para las regiones Fc (por ejemplo, Kabat y otros, supra (1991)).

15 La presente invención proporciona un gran número de conjuntos de CDR diferentes. En este caso, un “conjunto de CDR completo” comprende las tres CDR ligeras variables y las tres CDR pesadas variables, por ejemplo, vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3. Estas pueden ser parte de un dominio ligero variable o pesado variable más grande, respectivamente. Además, como se indica en mayor detalle en la presente, los dominios pesado variable y ligero variable pueden estar en cadenas de polipéptidos separadas, cuando se usa una cadena ligera y pesada, o en una cadena polipeptídica simple en el caso de secuencias de scFv.

20 Las CDR contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno o, más específicamente, de unión al epítipo de los anticuerpos. El término “epítipo” se refiere a un determinante que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Los epítipos son agrupamientos de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y habitualmente tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un único antígeno puede tener más de un epítipo.

25 El epítipo puede comprender residuos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también denominados componente inmunodominante del epítipo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como residuos de aminoácidos que son bloqueados de manera eficaz por el péptido de unión específica al antígeno; en otras palabras, el residuo de aminoácidos está dentro de la huella del péptido de unión específica al antígeno.

30 Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de distintos segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es aquel producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Los epítipos conformacionales o no conformacionales pueden distinguirse en que la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de solventes desnaturizantes.

35 Típicamente, un epítipo incluye al menos 3 y, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden verificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, “clasificación”. Como se describe a continuación, la

40

invención no solo incluye los dominios de unión al antígeno y los anticuerpos enumerados en la presente, sino además aquellos que compiten por la unión con los epítomos fijados por los dominios de unión al antígeno enumerados.

La porción del terminal carboxi de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Kabat y otros recolectaron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. En base al grado de conservación de las secuencias, clasificaron secuencias primarias individuales en la CDR y el marco y realizaron una lista de estas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª edición, publicación NIH, núm. 91-3242, E.A. Kabat y otros, incorporado como referencia en su totalidad).

En la subclase IgG de inmunoglobulinas, existen varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. En la presente, “dominio de inmunoglobulina (Ig)” significa una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. En la presente invención, son de interés los dominios de cadena pesada, que incluyen los dominios pesados constantes (CH) y los dominios bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, cada uno de los isotipos de IgG tiene tres regiones CH. En consecuencia, los dominios “CH” en el contexto de IgG son los siguientes: “CH1” se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice EU según Kabat. “CH2” se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice EU según Kabat, y “CH3” se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU según Kabat.

Otro tipo de dominio Ig de la cadena pesada es la región bisagra. En la presente, “bisagra” o “región bisagra” o “región bisagra del anticuerpo” o “región bisagra de la inmunoglobulina” significa el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominio constante de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio IgG CH1 finaliza en la posición 220 de EU, y el dominio IgG CH2 comienza en la posición 237 del residuo EU. Por lo tanto, para IgG, la bisagra del anticuerpo se define en la presente como que incluye las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU según Kabat.

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

Otra región de interés para sustituciones adicionales, que se describe a continuación, es la región Fc.

A. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT en la presente pueden derivarse de una mezcla de distintas especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto “anticuerpos quiméricos” como “anticuerpos humanizados” se refieren a los anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los “anticuerpos quiméricos” tradicionalmente comprenden regiones variables de un ratón (o una rata, en algunos casos) y las regiones constantes de un ser humano. Generalmente, “anticuerpos humanizados” se refiere a anticuerpos no humanos en los que las regiones de marco de dominio variable se intercambiaron por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto las CDR, es codificado por un polinucleótido parental humano o es

idéntico a tal anticuerpo excepto dentro de sus CDR. Las CDR, todas o algunas de las cuales son codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco de láminas beta de una región variable del anticuerpo humano a fin de crear un anticuerpo, cuya especificidad es determinada por las CDR injertadas. La creación de tales anticuerpos se describe, por ejemplo, en WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen y otros, 1988, Science 239:1534-1536, incorporados en su totalidad como referencia. La "retromutación" de residuos del marco aceptor seleccionados a los residuos de donante correspondientes se requiere, con frecuencia, para recuperar la afinidad perdida en el constructo injertado inicial (documentos US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, que se incorporan como referencia en su totalidad). El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción, y habitualmente toda, de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y por lo tanto, típicamente comprenderá una región Fc humana. También pueden generarse anticuerpos humanizados mediante el uso de ratones con un sistema inmunitario diseñado por ingeniería genética. Roque y otros, 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, que se incorpora como referencia en su totalidad. Una variedad de técnicas y métodos para humanizar y dar nueva forma a anticuerpos no humanos se conocen en la técnica (véase Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (Estados Unidos), y las referencias citadas en esa, que se incorporan como referencia en su totalidad). Los métodos de humanización incluyen, entre otros, los métodos descritos en Jones y otros, 1986, Nature 321:522-525; Riechmann y otros, 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen y otros, 1988, Science, 239:1534-1536; Queen y otros, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-33; He y otros, 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter y otros, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta y otros, 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman y otros, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor y otros, 1998, Protein Eng 11:321-8, la totalidad de los cuales se incorpora como referencia. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de anticuerpo no humano pueden incluir métodos de reconstrucción, como se describen, por ejemplo, en Roguska y otros, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973, incorporado en su totalidad como referencia.

Por lo tanto, las vhCDR y vlCDR de cualquiera de los anticuerpos enumerados en la presente pueden humanizarse (o "rehumanizarse", en el caso de aquellas que ya estaban humanizadas).

En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención comprenden una región variable de cadena pesada de un gen particular de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal y/o una región variable de cadena ligera de un gen particular de inmunoglobulina de cadena ligera de línea germinal. Por ejemplo, tales anticuerpos pueden comprender o consistir en un anticuerpo humano que comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que son "el producto de" o "derivan de" una secuencia particular de línea germinal. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal al comparar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionar la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que está más cerca en secuencia (es decir, que tiene mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una

secuencia particular de inmunoglobulina de línea germinal humana puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas naturales o una introducción intencional de mutaciones dirigidas al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humanizado típicamente es al menos 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican que el anticuerpo deriva de secuencias humanas cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humanizado puede ser al menos 95, 96, 97, 98 o 99 %, o incluso al menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal excluyendo las CDR. Es decir, las CDR pueden ser murinas, pero las regiones marco de la región variable (ya sea pesada o ligera) pueden ser al menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas en secuencia de aminoácidos a los aminoácidos de marco codificados por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana.

Típicamente, un anticuerpo humanizado derivado de una secuencia particular de línea germinal humana expresará no más de 10-20 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humanizado puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal (nuevamente, antes de la introducción de cualesquiera variantes en la presente; es decir, el número de variantes es generalmente bajo).

En una modalidad, el anticuerpo parental maduró por afinidad, como se conoce en la técnica. Pueden usarse métodos basados en la estructura para la humanización y la maduración de la afinidad, por ejemplo, como se describe en el documento USSN 11/004,590. Pueden usarse métodos basados en la selección para humanizar y/o madurar la afinidad de regiones variables del anticuerpo, que incluyen, entre otros, los métodos descritos en Wu y otros, 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca y otros, 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok y otros, 1996, J. Biol. Chem. 271(37):22611-22618; Rader y otros, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss y otros, 2003, Protein Engineering 16(10):753-759, los cuales se incorporan como referencia en su totalidad. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto únicamente de partes de las CDR, que incluyen, entre otros, los métodos descritos en el documento USSN 09/810,510; Tan y otros, 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis y otros, 2002, J. Immunol. 169:3076-3084, que se incorporan como referencia en su totalidad.

B. Modificación opcional de anticuerpos por ingeniería genética

Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden modificarse, o modificarse por ingeniería genética, para alterar las secuencias de aminoácidos mediante sustituciones de aminoácidos. Como se analiza en la presente, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos para alterar la afinidad de las CDR por la proteína (por ejemplo, TIGIT o PVRIG, que incluye tanto el aumento como la disminución de la unión), así como para alterar propiedades funcionales adicionales de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden modificarse por ingeniería genética para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del

anticuerpo, tales como la semivida en suero, la unión al complemento, la unión al receptor de Fc, y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de acuerdo con al menos algunas modalidades de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, una o más porciones químicas pueden unirse al anticuerpo) o pueden modificarse para alterar su glicosilación, para alterar, una vez más, una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Tales modalidades se describen más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat. En una modalidad, la región bisagra de C_{H1} se modifica de manera que se altere, por ejemplo, aumente o disminuya, la cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra. Este enfoque se describe con mayor detalle en la patente estadounidense núm. 5,677,425 de Bodmer y otros. La cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada, o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En aún otra forma de modalidad, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT pueden modificarse para anular el intercambio de brazo Fab *in vivo*, en particular cuando se usan dominios constantes de IgG4. Específicamente, este proceso implica el intercambio de mitades de moléculas de IgG4 (una cadena pesada más una cadena ligera) entre otros anticuerpos IgG4 que dan como resultado eficazmente anticuerpos biespecíficos que son funcionalmente monovalentes. Las mutaciones en la región bisagra y los dominios constantes de la cadena pesada pueden anular este intercambio (véase Aalberse, RC, Schuurman J., 2002, *Immunology* 105:9-19). Como se describe en la presente, una mutación que se usa particularmente en la presente invención es la S241P en el contexto de un dominio constante de IgG4. IgG4 encuentra uso en la presente invención ya que no tiene una función efectora significativa, y por lo tanto, se usa para bloquear la unión del receptor a su ligando sin agotamiento celular (por ejemplo, PVRIG a PVRL2 o TIGIT a PVR).

En algunas modalidades, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos en la región Fc, en general para alterar la unión a los receptores FcγR. Como se usan en la presente, "receptor Fc gamma ", "FcγR" o "FcγgammaR" significa cualquier miembro de la familia de proteínas que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificado por un gen FcγR. En seres humanos, esta familia incluye, entre otros, FcγRI (CD64), que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis y otros, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65, incorporado en su totalidad como referencia), así como cualquier isoforma o alotipo de FcγR o FcγR humano no descubierto. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, que incluye, entre otros, seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Los FcγR de ratón incluyen, entre otros, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII-1 (CD16), y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier isoforma o alotipo de FcγR o FcγR de ratón no descubierto.

Existen varias sustituciones útiles de Fc que pueden realizarse para alterar la unión a uno o más de los receptores FcγR. Tanto las sustituciones que producen mayor unión como las que producen menor unión pueden ser útiles. Por ejemplo, se sabe que el aumento de la unión a FcRIIIa generalmente produce el aumento de ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo; la reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo fijado en una célula diana y, posteriormente, provocan la lisis de la célula

diana). De manera similar, la disminución de la unión a FcγRIIb (un receptor inhibidor) también puede ser beneficiosa en algunas circunstancias. Las sustituciones de aminoácidos útiles en la presente invención incluyen las enumeradas en la patentes estadounidense núm. de acta 11/124,620 (en particular, la Figura 41) y la patente estadounidense núm. 6,737,056, las cuales se incorporan expresamente en la presente como referencia en su totalidad y específicamente para las variantes descritas en esa.

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

Además, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención se modifican para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente estadounidense núm. 6,277,375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región C_{H1} o C_L para contener un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes estadounidenses núms. 5,869,046 y 6,121,022 de Presta y otros. Se describen mutaciones adicionales para aumentar la semivida en suero en las patentes estadounidenses núms. 8,883,973, 6,737,056 y 7,371,826 y estas mutaciones incluyen 428L, 434A, 434S y 428L/434S.

En aún otra modalidad, puede modificarse la glicosilación de un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo aglicosilado (por ejemplo, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno o reducir la función efectora, tal como ADCC. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, al alterar uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos, por ejemplo, N297. Por ejemplo, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de marco de la región variable, para por consiguiente, eliminar la glicosilación en ese sitio, en donde un reemplazo de alanina es útil en algunas modalidades.

Adicionalmente o alternativamente, puede producirse un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que tenga un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga una menor

cantidad de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga más estructuras GlcNac bisectrices. Se demostró que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula huésped que tenga una maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito en la técnica células con la maquinaria de glicosilación alterada y pueden usarse como células huésped en las que se expresan anticuerpos recombinantes de acuerdo con al menos algunas modalidades de la invención para por consiguiente, producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense núm. 20040110704 y el documento WO 2003/035835.

10 Otra modificación de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT en la presente que se contempla en la invención es la PEGilación o la adición de otras porciones solubles en agua, típicamente polímeros, por ejemplo, para mejorar la semivida. Un anticuerpo puede PEGilarse, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo como se conoce en la técnica.

15 Además de las sustituciones realizadas para alterar la afinidad de unión a FcγRs y/o FcRn y/o aumentar la semivida en suero in vivo, pueden realizarse modificaciones adicionales de anticuerpos, como se describe con más detalle a continuación.

En algunos casos, se realiza maduración de la afinidad. Las modificaciones de aminoácidos en las CDR a veces se denominan "maduración de la afinidad". Un anticuerpo con "maduración de la afinidad" es uno que tiene una o más alteraciones en una o más CDR que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo con el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esas alteraciones. En algunos casos, puede ser deseable disminuir la afinidad de un anticuerpo con respecto a su antígeno.

En algunas modalidades, se realizan una o más modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención (por ejemplo, para las CDR de PVRIG o las CDR de TIGIT). En general, solo 1 o 2 o 3 aminoácidos están sustituidos en cualquier CDR individual, y generalmente no se realizan más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios dentro de un conjunto de 6 CDR (*por ejemplo*, vHCDR1-3 y vLCDR1-3). Sin embargo, debe observarse que cualquier combinación de ninguna sustitución, 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier CDR puede combinarse independiente y opcionalmente con cualquier otra sustitución.

La maduración de la afinidad puede hacerse para aumentar la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno en al menos alrededor de 10 % a 50-100-150 % o más, o de 1 a 5 veces en comparación con el anticuerpo "parental". En algunas modalidades, los anticuerpos con maduración de la afinidad tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno. Los anticuerpos con maduración de la afinidad se producen mediante procedimientos conocidos. La correlación de afinidad y eficacia se analiza a continuación.

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

Por lo tanto, se incluyen dentro de la definición de las CDR y los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención las CDR y anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT variantes; es decir, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden incluir modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR de los anticuerpos enumerados de la invención. Además, como se describe a continuación, las modificaciones de aminoácidos pueden realizarse además independiente y opcionalmente en cualquier región fuera de las CDR, que incluye las regiones de marco y constantes.

VI. Anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT, así como también anticuerpos anti-PVRIG y/o anti-TIGIT. (Por conveniencia, "anticuerpos anti-PVRIG/anti-TIGIT" y "anticuerpos biespecíficos PVRIG/TIGIT" y "anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT" se usan indistintamente). Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención se unen específicamente a TIGIT humano, y preferentemente al ECD de TIGIT humano, así como también a PVRIG, y nuevamente, preferentemente al ECD de PVRIG humano. La invención proporciona además dominios de unión al antígeno, que incluyen anticuerpos de longitud completa, que contienen varios conjuntos enumerados, específicos de 12 CDR, 6 CDR que se unen a TIGIT y 6 CDR que se unen a PVRIG.

La presente invención también proporciona anticuerpos anti-PVRIG que pueden estar en el contexto de un anticuerpo monoespecífico o un anticuerpo biespecífico. Dichos anticuerpos incluyen:

Secuencia de anticuerpos para PVRIG (definición de IMGT CDR en negrita y subrayada)

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 3179)

CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 3180)

La presente invención también proporciona anticuerpos anti-TIGIT que pueden estar en el contexto de un anticuerpo monoespecífico o un anticuerpo biespecífico. Dichos anticuerpos incluyen:

Secuencia de anticuerpos para TIGIT (definición de IMGT CDR en negrita y subrayada)

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1664)

CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 1668)

La unión específica para PVRIG y/o TIGIT o un epítipo de PVRIG y/o TIGIT puede exhibirse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una K_D de al menos alrededor de 10^{-4} M, al menos alrededor de 10^{-5} M, al menos alrededor de 10^{-6} M, al menos alrededor de 10^{-7} M, al menos alrededor de 10^{-8} M, al menos alrededor de 10^{-9} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-10} M, al menos alrededor de 10^{-11} M, al menos alrededor de 10^{-12} M, al menos alrededor de 10^{-13} M, al menos alrededor de 10^{-14} M, al menos alrededor de 10^{-15} M, o mayor, donde K_D se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción antígeno-anticuerpo particular para cada antígeno independientemente. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una K_D que es 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 o más veces mayor para una molécula control en relación con el antígeno o epítipo TIGIT.

Sin embargo, para una unión óptima a PVRIG y/o TIGIT expresada en la superficie de los linfocitos T y las células NK, los anticuerpos que tienen preferentemente una K_D inferior a 50 nM y, con máxima preferencia, inferior a 1 nM, con menos de 0.1 nM y menos de 1 pM encuentran uso en los métodos de la invención

Además, la unión específica para un antígeno o un epítipo particular puede exhibirse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una k_a (que se refiere a la constante de velocidad de asociación) para un antígeno o epítipo PVRIG y/o TIGIT al menos 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 o más veces mayor para el epítipo en relación con un control, donde k_a se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular.

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención se unen a un TIGIT y/o PVRIG humano con una K_D de 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, o 1 nM o menos (es decir, mayor afinidad de unión), o 1 pM o menos, en donde K_D se determina mediante métodos conocidos, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial (SPR, por ejemplo, ensayos Biacore), ELISA, KINEXA y más típicamente SPR a 25 °C o 37 °C.

A. Anticuerpos biespecíficos y/o heterodiméricos

La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos de punto de control de PVRIG y TIGIT que se basan en el uso de dos secuencias Fc variantes de cadena pesada diferentes, que se autoensamblan para formar dominios Fc que son heterodiméricos y anticuerpos que son anticuerpos heterodiméricos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que permiten la unión tanto a PVRIG como a TIGIT. Los constructos de anticuerpos descritos en la presente se basan en el autoensamblaje y el emparejamiento de dos dominios Fc de dos cadenas pesadas (*por ejemplo*, dos dominios Fc, dos regiones variables que comprenden los dos dominios Fc, y/o dos cadenas pesadas), para ensamblarse en un dímero. En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de cada monómero se alteran para facilitar el ensamblaje de los monómeros en dímeros. En algunas modalidades, estas variantes y/o alteraciones de aminoácidos están en la región constante. En algunas modalidades, las variantes de aminoácidos son diferentes en cada región constante para promover y/o facilitar el ensamblaje heterodimérico en comparación con el ensamblaje homodimérico. En la técnica se conocen numerosos métodos y formatos para anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Godar, y otros, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(3):251-276 (2018) y

Brinkmann y Kontermann, The making of bispecific antibodies, *MAbs*, 9(2): 182–212 (2017), ambos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad).

Como se proporciona en la presente, los anticuerpos heterodiméricos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención incluyen dos dominios de unión a antígeno (ABD), cada uno de los cuales se une a una proteína de punto de control diferente, en particular PVRIG y TIGIT. Estos anticuerpos heterodiméricos pueden ser biespecíficos y bivalentes (cada antígeno está fijado por un solo ABD, por ejemplo) o biespecíficos y trivalentes (un antígeno está fijado por un solo ABD y el otro está fijado por dos ABD). Para todos los dominios pesados y ligeros variables enumerados en la presente descripción, pueden realizarse variantes adicionales. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender ABD de cualquiera de los dominios y/o cadenas variables pesados y ligeros enumerados en la presente descripción, como por ejemplo en las figuras 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 17, 23, 24, 40, y 41. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender CDR de cualquiera de los dominios y/o cadenas pesados y ligeros variables enumerados en la presente descripción, como por ejemplo en las Figuras 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 17, 23, 24, 40, y 41. Como se describe en la presente, en algunas modalidades el conjunto de 6 CDR puede tener modificaciones de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos (con sustituciones de aminoácidos que encuentran un uso particular), así como cambios en las regiones marco de los dominios variables pesados y ligeros, siempre que los marcos (excluyendo las CDR) retengan al menos aproximadamente 80, 85 o 90 % de identidad con una secuencia de línea germinal humana. Por lo tanto, por ejemplo, las CDR idénticas como se describen en la presente descripción pueden combinarse con diferentes secuencias marco de secuencias de la línea germinal humana, siempre que las regiones marco retengan al menos 80, 85 o 90 % de identidad con una secuencia de línea germinal humana. Alternativamente, las CDR pueden tener modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, de 1, 2, 3, 4 o 5 modificaciones de aminoácidos en el conjunto de CDR (es decir, las CDR pueden modificarse siempre que el número total de cambios en el conjunto de 6 CDR sea menos de 6 modificaciones de aminoácidos, con cualquier combinación de CDR cambiada; *por ejemplo*, puede haber un cambio en vLCDR1, dos en vhCDR2, ninguno en vhCDR3, etc.), así como también haber cambios en la región marco, siempre que las regiones marco retengan al menos 80, 85 o 90 % de identidad con una secuencia de línea germinal humana.

La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos se obtienen generalmente mediante la expresión de genes para cada cadena ligera y pesada en las células huésped. Esto generalmente da como resultado la formación del heterodímero deseado (A-B), así como también los dos homodímeros (A-A y B-B (sin incluir los aspectos heterodiméricos de cadena ligera)).

Para abordar los problemas que rodean la formación de anticuerpos homodiméricos y heterodiméricos (y los aspectos relacionados con la separación de los dos durante la purificación), se han desarrollado métodos para sesgar el autoensamblaje en las formas heterodiméricas en oposición a las formas homodiméricas. Pueden usarse varios mecanismos y métodos para generar anticuerpos heterodiméricos y, en particular, para generar heterodímeros mediante el uso de las secuencias de anticuerpos PVRIG y TIGIT de la presente invención, incluidas las Figuras 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 17, 23, 24, 40, y 41. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende

las secuencias proporcionadas en las Figuras 26, 40, y 41 (sec. con núms. de ident.:3213-3612). En algunas modalidades, los mecanismos y métodos se combinan para asegurar un alto porcentaje de heterodimerización.

Las variantes que pueden promover variantes de heterodimerización (a veces denominadas "variantes de heterodimerización") pueden incluir variantes estéricas (*por ejemplo*, los "botones y ojales" como se proporciona como ejemplo en las Figuras 25, 42, y 43, o variantes "sesgadas" que se describen a continuación y las variantes de "pares de carga" descritas a continuación) así como también las "variantes pi", que permiten la purificación de homodímeros a partir de heterodímeros. Tales métodos se han descrito en una variedad de publicaciones de patentes, que incluye el documento WO1996/027011 así como también el documento WO2014/145806, incorporados en la presente como referencia en su totalidad para la discusión de "variantes de heterodimerización", mecanismos útiles para heterodimerización que incluyen "botones y ojales" ("KIH"; a veces en la presente descripción como variantes "sesgadas", "dirección electrostática" o "pares de carga" como se describe en los documentos WO2006/106905 o WO2014/145806, variantes pi como se describe en los documentos WO 2007/114325 o WO2014/145806, así como también en los documentos WO2017/218707, y WO2018045110; todos los cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

1. Variantes de heterodimerización

La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT en diversos formatos, que utilizan variantes heterodiméricas para permitir la formación y/o purificación heterodimérica sin homodímeros.

Existen varios pares adecuados de conjuntos de variantes de sesgo de heterodimerización. Estas variantes son en "pares" de "conjuntos". En algunas modalidades, un conjunto del par se incorpora en el primer monómero y el otro conjunto del par se incorpora en el segundo monómero. En algunas modalidades, estos conjuntos no necesariamente funcionan como variantes de "botones en ojales", con una correspondencia uno a uno entre un residuo en un monómero y un residuo en el otro; sino que más bien estos pares de conjuntos forman una interfaz entre los dos monómeros que promueve la formación de heterodímeros y desfavorece la formación de homodímeros, lo que permite que el porcentaje de heterodímeros que se forman espontáneamente en condiciones biológicas supere el 90 %, en lugar del 50 % esperado (25 % de homodímero A/A:50 % de heterodímero A/B:25 % de homodímero B/B). En algunas modalidades, el porcentaje de heterodímeros formados es mayor que 90 %, mayor que 91 %, mayor que 92 %, mayor que 93 %, mayor que 94 %, mayor que 95 %, mayor que 96 %, mayor que 97 %, mayor que 98 %, o mayor que 99 %.

En algunas modalidades, la formación de heterodímeros puede facilitarse mediante la adición de variantes estéricas. En algunas modalidades, mediante la modificación de los aminoácidos en cada cadena pesada, es más probable que cadenas pesadas diferentes se asocien para formar la estructura heterodimérica que para formar homodímeros con las mismas secuencias de aminoácidos Fc (*por ejemplo*, para evitar el emparejamiento incorrecto de HC/HC). Las variantes estéricas adecuadas se conocen en la técnica y se discuten con más detalle a continuación.

En algunas modalidades, también puede usarse opcionalmente un mecanismo denominado "botones y ojales" o "botones en ojales", en referencia a la modificación por ingeniería genética que crea influencias estéricas para favorecer la formación de heterodímeros y desfavorecer la formación de

homodímeros; en ocasiones, esto se denomina "botones y ojales", como se describe en Ridgway y otros, *Protein Engineering* 9(7):617 (1996); Atwell y otros, *J. Mol. Biol.* 1997 270:26; la patente estadounidense núm. 8,216,805, y el documento WO1996/027011, todos incorporados en la presente como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, los "botones" se refieren a una variante a del dominio CH3, T366Y, y los "ojales" se refieren a una variante b del dominio CH3, Y407T. En algunas modalidades, los "botones" se refieren a una variante a del dominio CH3, S354C/T366W, y los "ojales" se refieren a una variante b del dominio CH3, Y349C/T366S/L368A/Y407V. Además, como se describe en Merchant y otros, *Nature Biotech.* 16:677 (1998), estas mutaciones de "botones y ojales" pueden combinarse con puentes disulfuro para sesgar la formación hacia la heterodimerización. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende un conjunto de sustituciones del par y la porción de unión de TIGIT comprende el otro conjunto de sustituciones del par. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende las sustituciones de "botones" y la porción de unión de TIGIT comprende las sustituciones de "ojales" del par. En algunas modalidades, la porción de unión de TIGIT comprende las sustituciones de "botones" y la porción de unión a PVRIG comprende las sustituciones de "ojales" del par. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende las sustituciones S354C/T366W y la porción de unión de TIGIT comprende las sustituciones Y349C/T366S/L368A/Y407V. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende la sustitución S354C/E356D/M358L/T366W y la porción de unión de TIGIT comprende las sustituciones Y349C/E356D/M358L/T366S/L368A/Y407V.

En algunas modalidades, puede usarse además opcionalmente un mecanismo denominado "ART-Ig" (Tecnología de re-modificación por ingeniería genética asimétrica-Inmunoglobulina), que se refiere a la modificación por ingeniería genética de aminoácidos que introduce mutaciones para crear efectos de dirección electrostática; por ejemplo, estos abordan el emparejamiento de LC/HC (LC comunes mediante la mezcla de regiones determinantes de complementariedad/marco) y los problemas de emparejamiento incorrecto de HC/HC resueltos mediante la introducción de mutaciones para crear efectos de dirección electrostática. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende un conjunto de sustituciones del par y la porción de unión de TIGIT comprende el otro conjunto de sustituciones del par. Tales métodos se describen en Gunasekaran y otros, *J. Biol. Chem.* 285(25): 19637 (2010); y WO2006/106905, incorporados en la presente como referencia en su totalidad. Este método a veces se conoce además como "pares de carga". En algunas modalidades, la electrostática se usa para sesgar la formación hacia la heterodimerización. Estas sustituciones pueden además tener un efecto sobre pi, y por lo tanto, sobre la purificación, y en algunas modalidades, podrían además considerarse variantes de pi. En algunas modalidades, tales sustituciones se consideran y/o se denominan "variantes estéricas". En algunas modalidades, estas incluyen pares de carga bisagra de IgG1/CH3 (EEE-RRR) que comprenden el conjunto de sustituciones D221E/P228E/L368E, emparejadas con D221R/P228R/K409R. En algunas modalidades, estas incluyen pares de carga bisagra de IgG2/CH3 (EEE-RRRR) que comprenden el conjunto de sustituciones C223E/P228E/L368E emparejadas con C223R/E225R/P228R/K409R. En algunas modalidades, estas incluyen pares de carga CH3 (DD-KK) K392D/K409D emparejados con E356K/D399K. En algunas modalidades, estas incluyen pares EW-RVT, con K360E/K409W emparejados con Q347R/D399V/F405T. En algunas modalidades, estas incluyen pares EW-RVTS-S, con K360E/K409W/Y349C emparejados con

Q347R/D399V/F405T/S354C. En algunas modalidades, estas incluyen 366K (+ 351K) emparejados con 351D o E o D en 349, 368, 349, o 349 + 355. En algunas modalidades, estas incluyen pares DuoBody (LR), con F405L emparejado con K409R. En algunas modalidades, estas incluyen pares SEEDbody, con quimera IgG/A emparejada con una quimera IgG/A. En algunas modalidades, estas incluyen pares BEAT, con residuos de la interfaz TCR α emparejados con residuos de la interfaz TCR β . En algunas modalidades, estas incluyen pares BEAT, con residuos de la interfaz TCR α en el dominio CH3 a emparejados con residuos de la interfaz TCR β en el dominio CH3 b. En algunas modalidades, estas incluyen pares 7.8.60 (DMA-RRVV), con K360D/D399M/Y407A emparejados con E345R/Q347R/T366V/K409V. En algunas modalidades, estas incluyen pares 20.8.34 (SYMV-GDQA), con Y349S/K370Y/T366M/K409V emparejados con E356G/E357D/S364Q/Y407A. Véase, por ejemplo, Brinkmann y Kontermann, The making of bispecific antibodies, *MAbs*, 9 (2): 182–212 (2017). En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende un conjunto de sustituciones del par y la porción de unión de TIGIT comprende el otro conjunto de sustituciones del par. Véanse, por ejemplo, los documentos WO2012131555, y WO2011131746, incorporados en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, puede emplearse un mecanismo denominado CrossMAb para abordar los problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC. En algunas modalidades, se emplea CrossMAb^{VH-VL} para intercambiar los dominios VH y VL. En algunas modalidades, se emplea CrossMAb^{CH1-CL} para intercambiar los dominios CH1 y CL. En algunas modalidades, se emplea CrossMAb^{Fab} para intercambiar los dominios VH-CH1 y VL-CL. En algunas modalidades, los anticuerpos heterodiméricos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención emplean el CrossMAb^{CH1-CL} y se intercambian los dominios CH1 y CL. En algunas modalidades, los anticuerpos heterodiméricos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención emplean CrossMAb^{VH-VL} y se intercambian los dominios VH y VL. En algunas modalidades, los anticuerpos heterodiméricos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención emplean CrossMAb^{Fab} y se intercambian los dominios VH-CH1 y VL-CL. Véase, por ejemplo, el documento WO2009080251, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, puede emplearse un mecanismo denominado BiMAb para abordar los problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC y HC/HC y promover la formación del anticuerpo biespecífico deseado. Véase, por ejemplo, el documento WO2010129304, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, los problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC y HC/HC pueden resolverse tras introducir mutaciones para crear efectos de dirección electrostática, *por ejemplo*, en una IgG2 humana. En algunas modalidades, estos incluyen pares de BiMAb, con sustituciones a de dominio CH3 K249E/K288E emparejados con sustituciones b de dominio CH3 E236K/D278K. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende un conjunto de sustituciones del par de BiMAb y la porción de unión de TIGIT comprende el otro conjunto de sustituciones del par de BiMAb.

En algunas modalidades, puede emplearse un mecanismo denominado Fc Δ Adp para abordar problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC y HC/HC y promover la formación del anticuerpo biespecífico deseado. Véase, por ejemplo, el documento WO2010151792, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, los problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC y HC/HC pueden resolverse mediante la introducción de

mutaciones para crear una afinidad diferencial con la proteína A. En algunas modalidades, estos incluyen pares de FcΔAdp, con sustitución a del dominio CH3 H435R emparejada sin sustituciones en el dominio CH3. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende un conjunto de sustituciones del par FcΔAdp y la porción de unión de TIGIT comprende el otro conjunto de sustituciones del par FcΔAdp.

En algunas modalidades, puede emplearse un mecanismo denominado XmAb para abordar los problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC (Fab-scFv-Fc) y HC/HC y promover la formación del anticuerpo biespecífico deseado. Véase, por ejemplo, el documento WO2011028952, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, los problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC (Fab-scFv-Fc) y HC/HC pueden resolverse mediante la introducción de sustituciones de HA-TF. En algunas modalidades, el par HA-TF incluye sustituciones a del dominio CH3 S364H/F405A con sustituciones b del dominio CH3 Y349T/T394F. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende un conjunto de sustituciones del par XmAb y la porción de unión de TIGIT comprende el otro conjunto de sustituciones del par XmAb.

En algunas modalidades, puede emplearse un mecanismo denominado DuoBody para abordar los problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC (intercambio controlado de brazo Fab) y HC/HC y promover la formación del anticuerpo biespecífico deseado. Véase, por ejemplo, el documento WO2011131746, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, los problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC y HC/HC pueden resolverse mediante la introducción de sustituciones de dominio CH3. En algunas modalidades, el par DuoBody (L-R) incluye una sustitución a de dominio CH3 F405L emparejado con una sustitución b de dominio CH3 K409R. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende una de las sustituciones del par DuoBody y la porción de unión de TIGIT comprende la otra sustitución del par DuoBody.

En algunas modalidades, puede emplearse un mecanismo denominado Azymetric para abordar problemas de emparejamiento incorrecto de LC/HC (ortoFab-Ig) y HC/HC y promover la formación del anticuerpo biespecífico deseado. Véase, por ejemplo, el documento WO2012058768, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, los problemas de emparejamiento incorrecto pueden resolverse tras introducir sustituciones de ZW1. En algunas modalidades, el par ZW1 incluye sustituciones a del dominio CH3 T350V/L351Y/S400E/F405A/Y407V emparejadas con sustituciones b del dominio CH3 T350V/T366L/N390R/K392M/T394W. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende una de las sustituciones del par ZW1 y la porción de unión a TIGIT comprende la otra sustitución del par ZW1.

En algunas modalidades, puede emplearse un mecanismo denominado Biclomics para abordar LC/HC (LC comunes generados mediante el uso de bibliotecas de presentación de fagos y MeMo de ratón transgénico) y problemas de emparejamiento incorrecto de HC/HC y promover la formación del anticuerpo biespecífico deseado. Véase, por ejemplo, el documento WO2013157953, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, los problemas de emparejamiento incorrecto pueden resolverse introduciendo varias sustituciones. En algunas modalidades, el par de sustitución incluye la sustitución a del dominio CH3 T366K (+ L351K) emparejada con las sustituciones b del dominio CH3 L351D/E o D en cualquiera de Y349, L368, o Y349,

y + R355. En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG comprende una de las sustituciones del par Biclonics y la porción de unión a TIGIT comprende la otra sustitución del par Biclonics.

En algunas modalidades, las variantes estéricas resumidas en la presente pueden incorporarse opcional e independientemente con cualquier variante de pi u otras variantes tales como variantes de Fc, variantes de FcRn, etc., en uno o ambos monómeros, y pueden incluirse o excluirse opcional e independientemente de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención.

2. Formatos de anticuerpos biespecíficos ilustrativos

Como entenderán los expertos en la técnica y se analizarán con más detalle a continuación, los anticuerpos heterodiméricos biespecíficos anti-TIGIT/anti-PVRIG de la presente invención pueden presentarse en una variedad de configuraciones, como se proporciona en las Figuras 33 (formatos asimétricos) y 34. (formatos simétricos) (véase, además, Brinkmann y Kontermann, The making of bispecific antibodies, *MAbs*, 9(2): 182–212 (2017); incorporado como referencia en la presente descripción). En algunas modalidades, los formatos heterodiméricos de los anticuerpos biespecíficos anti-TIGIT/anti-PVRIG de la invención pueden tener diferentes valencias así como también ser biespecíficos. En algunas modalidades, los anticuerpos heterodiméricos biespecíficos anti-TIGIT/anti-PVRIG de la invención pueden ser bivalentes y biespecíficos, en donde una diana de punto de control (*por ejemplo*, PVRIG o TIGIT) está fijada por una porción de unión o dominio de unión a antígeno (ABD) y la otra diana del punto de control (*por ejemplo*, TIGIT o PVRIG) está fijada por una segunda porción de unión o dominio de unión a antígeno (ABD). En algunas modalidades, los anticuerpos heterodiméricos biespecíficos anti-TIGIT/anti-PVRIG de la invención también pueden ser trivalentes y biespecíficos, en donde la primera diana del punto de control (*por ejemplo*, PVRIG o TIGIT) está fijada por dos porciones de unión o dominios de unión a antígeno (ABD) y la segunda diana de punto de control (*por ejemplo*, PVRIG o TIGIT) por una segunda porción de unión o dominio de unión a antígeno (ABD).

En algunas modalidades, el formato es cualquiera de los proporcionados, por ejemplo, en las Figuras 33 y 34, así como también en los documentos WO2015/149077A1 y WO2017/218707, incorporados en la presente descripción como referencia en su totalidad. Estos formatos pueden combinarse además con cualquiera de las variantes anteriores.

B. Porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT

La unión específica para PVRIG o un epítipo de PVRIG puede exhibirla, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una KD de al menos alrededor de 10^{-4} M, al menos alrededor de 10^{-5} M, al menos alrededor de 10^{-6} M, al menos alrededor de 10^{-7} M, al menos alrededor de 10^{-8} M, al menos alrededor de 10^{-9} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-10} M, al menos alrededor de 10^{-11} M, al menos alrededor de 10^{-12} M, o más, donde KD se refiere a una velocidad de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 o más veces mayor para una molécula control en relación con el antígeno o epítipo PVRIG.

Generalmente, para la unión óptima a PVRIG expresada en la superficie de los linfocitos T y células NK, los anticuerpos tienen preferentemente una KD inferior a 50 nM y, con mayor preferencia, inferior a 1 nM, en donde menos de 0.1 nM y menos de 1 pM y 0.1 pM encuentran uso en los métodos de la invención.

Además, la unión específica para un antígeno particular o un epítipo puede exhibirla, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una K_A o K_a para un antígeno o epítipo PVRIG de al menos 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 o más veces mayor para el epítipo en relación con un control, donde K_A o K_a se refieren a una velocidad de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular.

- 5 En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PVRIG y/o anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención se unen a un PVRIG humano con una K_D de 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, o 1 nM o menos (es decir, mayor afinidad de unión), o 1 pM o menos, en donde K_D se determina mediante métodos conocidos, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial (SPR, por ejemplo, ensayos Biacore), ELISA, KINEXA, y, más típicamente, SPR a 25 °C o 37 °C.
- 10 En algunas modalidades, la afinidad de unión por los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT puede correlacionarse con la actividad. Los anticuerpos que exhiben la señal máxima más alta en los linfocitos T pueden correlacionarse con afinidades en el rango picomolar. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT pueden ser útiles para la inmunoterapia basada en linfocitos T, que se basa en parte en su afinidad. Se hace referencia a las
- 15 secuencias de anticuerpos del documento WO2016/134333, incorporadas en la presente como referencia y en particular para los dominios de unión a antígeno anti-PVRIG descritos en las Figuras 38 (que muestran secuencias que se unen a PVRIG y bloquean la interacción de PVRIG y PVRL2; incluida en la presente como Figura 4), la Figura 39 (que muestra secuencias que se unen a PVRIG y no bloquean la interacción de PVRIG y PVRL2, incluida en la presente como Figura 5), la Figura 40 (que
- 20 muestra las CDR y los datos de estos anticuerpos, incluida en la presente como Figura 6) y la Figura 41 (que muestra las CDR de hibridomas que se unen y bloquean, incluida en la presente como Figura 7), así como también la Figura 35 que proporciona porciones de unión a PVRIG adicionales para su uso en los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Es decir, las Figuras y Leyendas, así como las secuencias particulares y las SEQ ID NO: de todos los anticuerpos CPA.7 y CHA.7 (que incluye las
- 25 CDR, VH y VL y secuencias de longitud completa) del documento WO2016/134333 se incorporan expresamente en la presente.

Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención tienen afinidades de unión (según la medición mediante el uso de las técnicas descritas en la presente) en el intervalo picomolar, por ejemplo, de 0.1 a 9 pM, en donde se prefiere de alrededor de 0.2 a alrededor de 2, y en

30 donde de alrededor de 0.2 a alrededor de 0.5 es de uso particular.

Los anticuerpos PVRIG que pueden usarse para proporcionar la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención se etiquetan como sigue. Estos anticuerpos contra PVRIG descritos en la presente están etiquetados de la siguiente manera. Los anticuerpos contra PVRIG tienen números de referencia, por ejemplo, "CPA.7.013". Esto representa la

35 combinación de las cadenas pesadas variables y ligeras variables, como se muestra en la Figura 4A-4AA y Figuras 5A-5H, por ejemplo. "CPA.7.013.VH" se refiere a la porción pesada variable de CPA.7.013, mientras que "CPA.7.013.VL" es la cadena ligera variable. "CPA.7.013.vhCDR1", "CPA.7.013.vhCDR2", "CPA.7.013.vhCDR3", "CPA.7.013.vlCDR1", "CPA.7.013.vlCDR2", y "CPA.7.013.vlCDR3", se refieren a las CDR que se indican. "CPA.7.013.HC" se refiere a toda la cadena

40 pesada (por ejemplo, dominio variable y constante) de esta molécula, y "CPA.7.013.LC" se refiere a toda la cadena ligera (por ejemplo, dominio variable y constante) de la misma molécula. "CPA.7.013.H1"

se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende los dominios pesados y ligeros variables, que incluyen el dominio constante de IgG1 Humana (por lo tanto, las secuencias H1; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se muestran en las Figuras 9 y 21). En consecuencia, "CPA.7.013.H2" sería los dominios variables CPA.7.013 ligados a una IgG2 Humana. "CPA.7.013.H3" sería los dominios variables CPA.7.013 ligados a una IgG3 Humana, y "CPA.7.013.H4" sería los dominios variables CPA.7.013 ligados a una IgG4 Humana. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquiera de las secuencias de anticuerpos PVRIG y/o secuencias del dominio de unión a antígeno PVRIG como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

Los anticuerpos PVRIG que pueden usarse para proporcionar la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención se etiquetan como sigue. Los anticuerpos tienen números de referencia, por ejemplo, "CHA.7.518.1". Esto representa la combinación de las cadenas pesadas variables y ligeras variables, como se muestra en la Figura 7, por ejemplo, con el entendimiento de que estos anticuerpos incluyen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. "CPA.7.518.1.VH" se refiere a la porción pesada variable de CPA. 7.518.1, mientras que "CPA.7.518.1.VL" es la cadena ligera variable. "CPA. 7.518.1.vhCDR1", "CPA.7.518.1.vhCDR2", "CPA. 7.518.1.vhCDR3", "CPA. 7.518.1.vlCDR1", "CPA. 7.518.1.vlCDR2", y "CPA. 7.518.1.vlCDR3", se refieren a las CDR que se indican. "CPA. 7.518.1.HC" se refiere a toda la cadena pesada (por ejemplo, dominio variable y constante) de esta molécula, y "CPA. 7.518.1.LC" se refiere a toda la cadena ligera (por ejemplo, dominio variable y constante) de la misma molécula. En general, la cadena ligera kappa humana se usa para el dominio constante de cada anticuerpo de fago (o hibridoma humanizado) en la presente, aunque en algunas modalidades se usa el dominio constante ligero lambda. "CPA. 7.518.1.H1" se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende los dominios pesados y ligeros variables, que incluyen el dominio constante de IgG1 Humana (por lo tanto, las secuencias H1; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se muestran en la Figura 21). En consecuencia, "CPA. 7.518.1.H2" sería los dominios variables CPA. 7.518.1. ligados a una IgG2 Humana. "CPA. 7.518.1.H3 " sería los dominios variables CPA. 7.518.1. ligados a una IgG3 Humana y "CPA. 7.518.1.H4 " los dominios variables CPA. 7.518.1. ligados a una IgG4 Humana. Tenga en cuenta que, en algunos casos, las IgG humanas pueden tener mutaciones adicionales, las cuales se describen a continuación, y esto puede anotarse. Por ejemplo, en muchas modalidades, puede haber una mutación S241P en la IgG4 humana, y esto puede anotarse como "CPA. 7.518.1.H4(S241P)" por ejemplo. Se muestra en la Figura 21 la secuencia de IgG4 humana con esta variante de bisagra S241P. Otras variantes potenciales son IgG1(N297A), (u otras variantes que eliminan la glicosilación en este sitio y, por lo tanto, muchas de las funciones efectoras asociadas a la unión a FcγRIIIa) e IgG1(D265A), que reduce la unión a los receptores FcγR. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquiera de las secuencias de anticuerpos PVRIG como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquiera de las secuencias del dominio de unión a antígeno PVRIG como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

La invención proporciona además dominios pesados y ligeros variables, así como también cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, cualquiera de las cuales puede emplearse como parte de la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

En algunas modalidades, la invención proporciona scFv que se unen a PVRIG que comprenden un dominio pesado variable y un dominio ligero variable ligados por un enlazador de scFv como se describió anteriormente. Los dominios VL y VH pueden estar en cualquiera de las dos orientaciones, por ejemplo, desde el terminal N al C "VH-enlazador-VL" o "VL-enlazador-VH". Estos son nombrados en virtud de sus partes componentes; por ejemplo, "scFv-CHA.7.518.1VH-enlazador-VL" o "scFv-CPA.7.518.1.VL-enlazador-VH". Por lo tanto, "scFv-CPA. 7.518.1" puede estar en cualquiera de las dos orientaciones. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender un scFv que se une a PVRIG como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

La invención proporciona dominios de unión al antígeno, que incluyen anticuerpos de longitud completa, que contienen una serie de conjuntos enumerados específicos de 6 CDR. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquiera de los conjuntos de 6 CDR de las secuencias de anticuerpos PVRIG proporcionadas en la presente en la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

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

En muchas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención son humanos (derivados de fagos) y bloquean la unión de PVRIG y PVLR2. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender un anticuerpo contra PVRIG y/o una secuencia de dominio de unión a antígeno capaz de unirse a la interacción receptor-ligando y bloquearla como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender las CDR de una secuencia de anticuerpo PVRIG capaz de unirse a la interacción receptor-ligando y bloquearla como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos CPA, así como también las secuencias de CDR, que se unen a la interacción receptor-ligando y la bloquean, son los que figuran a continuación, en donde también se describen sus componentes, cuyas secuencias se muestran en la Figura 4:

CPA.7.001, CPA.7.001.VH, CPA.7.001.VL, CPA.7.001.HC, CPA.7.001.LC and CPA.7.001.H1, CPA.7.001.H2, CPA.7.001.H3, CPA.7.001.H4; CPA.7.001.vhCDR1, CPA.7.001.vhCDR2, CPA.7.001.vhCDR3, CPA.7.001.vlCDR1, CPA.7.001.vlCDR2, y CPA.7.001.vlCDR3;
CPA.7.003, CPA.7.003.VH, CPA.7.003.VL, CPA.7.003.HC, CPA.7.003.LC, CPA.7.003.H1, CPA.7.003.H2, CPA.7.003.H3, CPA.7.003.H4; CPA.7.003.vhCDR1, CPA.7.003.vhCDR2, CPA.7.003.vhCDR3, CPA.7.003.vlCDR1, CPA.7.003.vlCDR2, y CPA.7.003.vlCDR3;
CPA.7.004, CPA.7.004.VH, CPA.7.004.VL, CPA.7.004.HC, CPA.7.004.LC, CPA.7.004.H1, CPA.7.004.H2, CPA.7.004.H3 CPA.7.004.H4; CPA.7.004.vhCDR1, CPA.7.004.vhCDR2, CPA.7.004.vhCDR3, CPA.7.004.vlCDR1, CPA.7.004.vlCDR2, y CPA.7.004.vlCDR3;

CPA.7.006, CPA.7.006.VH, CPA.7.006.VL, CPA.7.006.HC, CPA.7.006.LC, CPA.7.006.H1,
 CPA.7.006.H2, CPA.7.006.H3 CPA.7.006.H4; CPA.7.006.vhCDR1, CPA.7.006.vhCDR2,
 CPA.7.006.vhCDR3, CPA.7.006.vlCDR1, CPA.7.006.vlCDR2, y CPA.7.006.vlCDR3;

5 CPA.7.008, CPA.7.008.VH, CPA.7.008.VL, CPA.7.008.HC, CPA.7.008.LC, CPA.7.008.H1,
 CPA.7.008.H2, CPA.7.008.H3 CPA.7.008.H4; CPA.7.008.vhCDR1, CPA.7.008.vhCDR2,
 CPA.7.008.vhCDR3, CPA.7.008.vlCDR1, CPA.7.008.vlCDR2, y CPA.7.008.vlCDR3;

10 CPA.7.009, CPA.7.009.VH, CPA.7.009.VL, CPA.7.009.HC, CPA.7.009.LC, CPA.7.009.H1,
 CPA.7.009.H2, CPA.7.009.H3 CPA.7.009.H4; CPA.7.009.vhCDR1, CPA.7.009.vhCDR2,
 CPA.7.009.vhCDR3, CPA.7.009.vlCDR1, CPA.7.009.vlCDR2, y CPA.7.009.vlCDR3;

15 CPA.7.010, CPA.7.010.VH, CPA.7.010.VL, CPA.7.010.HC, CPA.7.010.LC, CPA.7.010.H1,
 CPA.7.010.H2, CPA.7.010.H3 CPA.7.010.H4; CPA.7.010.vhCDR1, CPA.7.010.vhCDR2,
 CPA.7.010.vhCDR3, CPA.7.010.vlCDR1, CPA.7.010.vlCDR2, y CPA.7.010.vlCDR3;

20 CPA.7.011, CPA.7.011.VH, CPA.7.011.VL, CPA.7.011.HC, CPA.7.011.LC, CPA.7.011.H1,
 CPA.7.011.H2, CPA.7.011.H3 CPA.7.011.H4; CPA.7.011.vhCDR1, CPA.7.011.vhCDR2,
 CPA.7.011.vhCDR3, CPA.7.011.vlCDR1, CPA.7.011.vlCDR2, y CPA.7.011.vlCDR3;

25 CPA.7.012, CPA.7.012.VH, CPA.7.012.VL, CPA.7.012.HC, CPA.7.012.LC, CPA.7.012.H1,
 CPA.7.012.H2, CPA.7.012.H3 CPA.7.012.H4; CPA.7.012.vhCDR1, CPA.7.012.vhCDR2,
 CPA.7.012.vhCDR3, CPA.7.012.vlCDR1, CPA.7.012.vlCDR2, y CPA.7.012.vlCDR3;

30 CPA.7.013, CPA.7.013.VH, CPA.7.013.VL, CPA.7.013.HC, CPA.7.013.LC, CPA.7.013.H1,
 CPA.7.013.H2, CPA.7.013.H3 CPA.7.013.H4; CPA.7.013.vhCDR1, CPA.7.013.vhCDR2,
 CPA.7.013.vhCDR3, CPA.7.013.vlCDR1, CPA.7.013.vlCDR2, y CPA.7.013.vlCDR3;

35 CPA.7.014, CPA.7.014.VH, CPA.7.014.VL, CPA.7.014.HC, CPA.7.014.LC, CPA.7.014.H1,
 CPA.7.014.H2, CPA.7.014.H3 CPA.7.014.H4; CPA.7.014.vhCDR1, CPA.7.014.vhCDR2,
 CPA.7.014.vhCDR3, CPA.7.014.vlCDR1, CPA.7.014.vlCDR2, y CPA.7.014.vlCDR3;

CPA.7.015, CPA.7.015.VH, CPA.7.015.VL, CPA.7.015.HC, CPA.7.015.LC, CPA.7.015.H1,
 CPA.7.015.H2, CPA.7.015.H3 CPA.7.015.H4; CPA.7.015.vhCDR1, CPA.7.015.vhCDR2,
 CPA.7.015.vhCDR3, CPA.7.015.vlCDR1, CPA.7.015.vlCDR2, y CPA.7.015.vlCDR3;

CPA.7.017, CPA.7.017.VH, CPA.7.017.VL, CPA.7.017.HC, CPA.7.017.LC, CPA.7.017H1,
 CPA.7.017.H2, CPA.7.017.H3 CPA.7.017.H4; CPA.7.017.vhCDR1, CPA.7.000171.vhCDR2,
 CPA.7.017.vhCDR3, CPA.7.017.vlCDR1, CPA.7.017.vlCDR2, y CPA.7.017.vlCDR3;

CPA.7.018, CPA.7.018.VH, CPA.7.018.VL, CPA.7.018.HC, CPA.7.018.LC, CPA.7.018.H1,
 CPA.7.018.H2, CPA.7.018.H3 CPA.7.018.H4; CPA.7.017.vhCDR1, CPA.7.017.vhCDR2,
 CPA.7.017.vhCDR3, CPA.7.017.vlCDR1, CPA.7.017.vlCDR2, y CPA.7.017.vlCDR3;

CPA.7.019, CPA.7.019.VH, CPA.7.019.VL, CPA.7.019.HC, CPA.7.019.LC, CPA.7.019.H1,
 CPA.7.019.H2, CPA.7.019.H3 CPA.7.019.H4; CPA.7.019.vhCDR1, CPA.7.019.vhCDR2,
 CPA.7.019.vhCDR3, CPA.7.019.vlCDR1, CPA.7.019.vlCDR2, y CPA.7.019.vlCDR3;

CPA.7.021, CPA.7.021.VH, CPA.7.021.VL, CPA.7.021.HC, CPA.7.021.LC, CPA.7.021.H1,
 CPA.7.021.H2, CPA.7.021.H3 CPA.7.021.H4; CPA.7.021.vhCDR1, CPA.7.021.vhCDR2,
 CPA.7.021.vhCDR3, CPA.7.021.vlCDR1, CPA.7.021.vlCDR2, y CPA.7.021.vlCDR3;

CPA.7.022, CPA.7.022.VH, CPA.7.022.VL, CPA.7.022.HC, CPA.7.022.LC, CPA.7.022.H1, CPA.7.022.H2, CPA.7.022.H3 CPA.7.022.H4; CPA.7.022.vhCDR1, CPA.7.022.vhCDR2, CPA.7.002201.vhCDR3, CPA.7.022.vlCDR1, CPA.7.022.vlCDR2, y CPA.7.022.vlCDR3;

CPA.7.023, CPA.7.023.VH, CPA.7.023.VL, CPA.7.023.HC, CPA.7.023.LC, CPA.7.023.H1, CPA.7.023.H2, CPA.7.023.H3 CPA.7.023.H4; CPA.7.023.vhCDR1, CPA.7.023.vhCDR2, CPA.7.023.vhCDR3, CPA.7.023.vlCDR1, CPA.7.023.vlCDR2, y CPA.7.023.vlCDR3;

CPA.7.024, CPA.7.024.VH, CPA.7.024.VL, CPA.7.024.HC, CPA.7.024.LC, CPA.7.024.H1, CPA.7.024.H2, CPA.7.024.H3 CPA.7.024.H4; CPA.7.024.vhCDR1, CPA.7.024.vhCDR2, CPA.7.024.vhCDR3, CPA.7.024.vlCDR1, CPA.7.024.vlCDR2, y CPA.7.024.vlCDR3;

CPA.7.033, CPA.7.033.VH, CPA.7.033.VL, CPA.7.033.HC, CPA.7.033.LC, CPA.7.033.H1, CPA.7.033.H2, CPA.7.033.H3 CPA.7.033.H4; CPA.7.033.vhCDR1, CPA.7.033.vhCDR2, CPA.7.033.vhCDR3, CPA.7.033.vlCDR1, CPA.7.033.vlCDR2, y CPA.7.033.vlCDR3;

CPA.7.034, CPA.7.034.VH, CPA.7.034.VL, CPA.7.034.HC, CPA.7.034.LC, CPA.7.034.H1, CPA.7.034.H2, CPA.7.034.H3 CPA.7.034.H4; CPA.7.034.vhCDR1, CPA.7.034.vhCDR2, CPA.7.034.vhCDR3, CPA.7.034.vlCDR1, CPA.7.034.vlCDR2, y CPA.7.034.vlCDR3;

CPA.7.036, CPA.7.036.VH, CPA.7.036.VL, CPA.7.036.HC, CPA.7.036.LC, CPA.7.036.H1, CPA.7.036.H2, CPA.7.036.H3 CPA.7.036.H4; CPA.7.036.vhCDR1, CPA.7.036.vhCDR2, CPA.7.036.vhCDR3, CPA.7.036.vlCDR1, CPA.7.036.vlCDR2, y CPA.7.036.vlCDR3;

CPA.7.040, CPA.7.040.VH, CPA.7.040.VL, CPA.7.040.HC, CPA.7.040.LC, CPA.7.040.H1, CPA.7.040.H2, CPA.7.040.H3 y CPA.7.040.H4; CPA.7.040.vhCDR1, CPA.7.040.vhCDR2, CPA.7.040.vhCDR3, CPA.7.040.vlCDR1, CPA.7.040.vlCDR2, y CPA.7.040.vlCDR3;

CPA.7.046, CPA.7.046.VH, CPA.7.046.VL, CPA.7.046.HC, CPA.7.046.LC, CPA.7.046.H1, CPA.7.046.H2, CPA.7.046.H3 CPA.7.046.H4; CPA.7.046.vhCDR1, CPA.7.046.vhCDR2, CPA.7.046.vhCDR3, CPA.7.046.vlCDR1, CPA.7.046.vlCDR2, y CPA.7.046.vlCDR3;

CPA.7.047, CPA.7.047.VH, CPA.7.047.VL, CPA.7.047.HC, CPA.7.047.LC, CPA.7.047.H1, CPA.7.047.H2, CPA.7.047.H3 CPA.7.047.H4; CPA.7.047.vhCDR1, CPA.7.047.vhCDR2, CPA.7.047.vhCDR3, CPA.7.047.vlCDR1, CPA.7.004701.vlCDR2, y CPA.7.047.vlCDR3;

CPA.7.049, CPA.7.049.VH, CPA.7.049.VL, CPA.7.049.HC, CPA.7.049.LC, CPA.7.049.H1, CPA.7.049.H2, CPA.7.049.H3 CPA.7.049.H4; CPA.7.049.vhCDR1, CPA.7.049.vhCDR2, CPA.7.049.vhCDR3, CPA.7.049.vlCDR1, CPA.7.049.vlCDR2, y CPA.7.049.vlCDR3; y

CPA.7.050, CPA.7.050.VH, CPA.7.050.VL, CPA.7.050.HC, CPA.7.050.LC, CPA.7.050.H1, CPA.7.050.H2, CPA.7.050.H3 CPA.7.050.H4, CPA.7.050.vhCDR1, CPA.7.050.vhCDR2, CPA.7.050.vhCDR3, CPA.7.050.vlCDR1, CPA.7.050.vlCDR2, y CPA.7.050.vlCDR3.

Además, hay una serie de anticuerpos CPA generados en la presente que se unieron a PVRIG pero que no bloquearon la interacción de PVRIG y PVLR2. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender un anticuerpo PVRIG y/o una secuencia de dominio de unión a antígeno capaz de unirse a la interacción receptor-ligando pero no bloquearla como la porción de unión a PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender las CDR de una secuencia de anticuerpo PVRIG capaz de unirse a la interacción receptor-ligando pero no bloquearla como la porción de unión a PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos CPA, así como también las

secuencias de CDR, que se unen a la interacción receptor-ligando, pero sin bloquearla, son los que figuran a continuación, en donde además se describen sus componentes, cuyas secuencias se muestran en la Figura 4:

- CPA.7.028, CPA.7.028.VH, CPA.7.028.VL, CPA.7.028.HC, CPA.7.028.LC, CPA.7.028.H1,
 5 CPA.7.028.H2, CPA.7.028.H3 y CPA.7.028.H4; CPA.7.028.vhCDR1, CPA.7.028.vhCDR2,
 CPA.7.028.vhCDR3, CPA.7.028.vlCDR1, CPA.7.028.vlCDR2, y CPA.7.028.vlCDR3.
- CPA.7.030, CPA.7.030.VH, CPA.7.030.VL, CPA.7.030.HC, CPA.7.030.LC, CPA.7.030.H1,
 CPA.7.030.H2, CPA.7.030.H3 y CPA.7.030.H4; CPA.7.030.vhCDR1, CPA.7.030.vhCDR2,
 CPA.7.030.vhCDR3, CPA.7.030.vlCDR1, CPA.7.030.vlCDR2, y CPA.7.030.vlCDR3.
- 10 CPA.7.041, CPA.7.041.VH, CPA.7.041.VL, CPA.7.041.HC, CPA.7.041.LC, CPA.7.041.H1,
 CPA.7.041.H2, CPA.7.041.H3 y CPA.7.041.H4; CPA.7.041.vhCDR1, CPA.7.041.vhCDR2,
 CPA.7.041.vhCDR3, CPA.7.041.vlCDR1, CPA.7.041.vlCDR2, y CPA.7.041.vlCDR3.
- CPA.7.016, CPA.7.016.VH, CPA.7.016.VL, CPA.7.016.HC, CPA.7.016.LC, CPA.7.016.H1,
 CPA.7.016.H2, CPA.7.016.H3 y CPA.7.016.H4; CPA.7.016.vhCDR1, CPA.7.016.vhCDR2,
 15 CPA.7.016.vhCDR3, CPA.7.016.vlCDR1, CPA.7.016.vlCDR2, y CPA.7.016.vlCDR3.
- CPA.7.020, CPA.7.020.VH, CPA.7.020.VL, CPA.7.020.HC, CPA.7.020.LC, CPA.7.020.H1,
 CPA.7.020.H2, CPA.7.020.H3 y CPA.7.020.H4; CPA.7.020.vhCDR1, CPA.7.020.vhCDR2,
 CPA.7.020.vhCDR3, CPA.7.020.vlCDR1, CPA.7.020.vlCDR2, y CPA.7.020.vlCDR3.
- CPA.7.038, CPA.7.038.VH, CPA.7.038.VL, CPA.7.038.HC, CPA.7.038.LC, CPA.7.038.H1,
 20 CPA.7.038.H2, CPA.7.038.H3 y CPA.7.038.H4; CPA.7.038.vhCDR1, CPA.7.038.vhCDR2,
 CPA.7.038.vhCDR3, CPA.7.038.vlCDR1, CPA.7.038.vlCDR2, y CPA.7.038.vlCDR3.
- CPA.7.044, CPA.7.044.VH, CPA.7.044.VL, CPA.7.044.HC, CPA.7.044.LC, CPA.7.044.H1,
 CPA.7.044.H2, CPA.7.044.H3 y CPA.7.044.H4; CPA.7.044.vhCDR1, CPA.7.044.vhCDR2,
 CPA.7.044.vhCDR3, CPA.7.044.vlCDR1, CPA.7.044.vlCDR2, y CPA.7.044.vlCDR3.
- 25 CPA.7.045, CPA.7.045.VH, CPA.7.045.VL, CPA.7.045.HC, CPA.7.045.LC, CPA.7.045.H1,
 CPA.7.045.H2, CPA.7.045.H3 y CPA.7.045.H4; CPA.7.045.vhCDR1, CPA.7.045.vhCDR2,
 CPA.7.045.vhCDR3, CPA.7.045.vlCDR1, CPA.7.045.vlCDR2, y CPA.7.045.vlCDR3.

Como se analiza en la presente, la invención proporciona además variantes de los componentes anteriores, que incluye variantes en las CDR, como se describió anteriormente. Además, las cadenas
 30 pesadas variables pueden ser 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de "VH" en la presente, y/o contener de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 cambios de aminoácidos, o más, cuando se usan variantes de Fc. Se proporcionan cadenas ligeras variables que pueden ser 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de "VL" en la presente, y/o contener de 1, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 cambios de aminoácidos, o más, cuando se usan variantes de Fc. De manera similar, se proporcionan
 35 cadenas pesadas y ligeras que son 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de "HC" y "LC" en la presente, y/o contienen de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 cambios de aminoácidos, o más, cuando se usan variantes de Fc. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquiera de estos anticuerpos PVRIG y/o secuencias de dominio de unión a antígeno como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

40 Además, la presente invención proporciona una serie de anticuerpos CHA, que son anticuerpos murinos generados a partir de hibridomas. Como se conoce bien en la técnica, las seis CDR son útiles cuando

se colocan en regiones pesadas variables y ligeras variables de marco humanas o cuando se humanizan los dominios pesados y ligeros variables.

Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquiera de los siguientes conjuntos CHA de CDR de secuencias de anticuerpos PVRIG como parte de la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención. En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT, que comprenden los siguientes conjuntos CHA de CDR como parte de la porción de unión a PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT, cuyas secuencias se muestran en la Figura 7:

10	CHA.7.502.vhCDR1,	CHA.7.502.vhCDR2,	CHA.7.502.vhCDR3,	CHA.7.502.vlCDR1,
	CHA.7.502.vlCDR2, y CHA.7.502.vlCDR3.			
	CHA.7.503.vhCDR1,	CHA.7.503.vhCDR2,	CHA.7.503.vhCDR3,	CHA.7.503.vlCDR1,
	CHA.7.503.vlCDR2, y CHA.7.503.vlCDR3.			
	CHA.7.506.vhCDR1,	CHA.7.506.vhCDR2,	CHA.7.506.vhCDR3,	CHA.7.506.vlCDR1,
15	CHA.7.506.vlCDR2, y CHA.7.506.vlCDR3.			
	CHA.7.508.vhCDR1,	CHA.7.508.vhCDR2,	CHA.7.508.vhCDR3,	CHA.7.508.vlCDR1,
	CHA.7.508.vlCDR2, y CHA.7.508.vlCDR3.			
	CHA.7.510.vhCDR1,	CHA.7.510.vhCDR2,	CHA.7.510.vhCDR3,	CHA.7.510.vlCDR1,
	CHA.7.510.vlCDR2, y CHA.7.510.vlCDR3.			
20	CHA.7.512.vhCDR1,	CHA.7.512.vhCDR2,	CHA.7.512.vhCDR3,	CHA.7.512.vlCDR1,
	CHA.7.512.vlCDR2, y CHA.7.512.vlCDR3.			
	CHA.7.514.vhCDR1,	CHA.7.514.vhCDR2,	CHA.7.514.vhCDR3,	CHA.7.514.vlCDR1,
	CHA.7.514.vlCDR2, y CHA.7.514.vlCDR3.			
	CHA.7.516.vhCDR1,	CHA.7.516.vhCDR2,	CHA.7.516.vhCDR3,	CHA.7.516.vlCDR1,
25	CHA.7.516.vlCDR2, y CHA.7.516.vlCDR3.			
	CHA.7.518.vhCDR1,	CHA.7.518.vhCDR2,	CHA.7.518.vhCDR3,	CHA.7.518.vlCDR1,
	CHA.7.518.vlCDR2, y CHA.7.518.vlCDR3.			
	CHA.7.520_1.vhCDR1,	CHA.7.520_1.vhCDR2,	CHA.7.520_1.vhCDR3,	CHA.7.520_1.vlCDR1,
	CHA.7.520_1.vlCDR2, y CHA.7.520_1.vlCDR3.			
30	CHA.7.520_2.vhCDR1,	CHA.7.520_2.vhCDR2,	CHA.7.520_2.vhCDR3,	CHA.7.520_2.vlCDR1,
	CHA.7.520_2.vlCDR2, y CHA.7.520_2.vlCDR3.			
	CHA.7.522.vhCDR1,	CHA.7.522.vhCDR2,	CHA.7.522.vhCDR3,	CHA.7.522.vlCDR1,
	CHA.7.522.vlCDR2, y CHA.7.522.vlCDR3.			
	CHA.7.524.vhCDR1,	CHA.7.524.vhCDR2,	CHA.7.524.vhCDR3,	CHA.7.524.vlCDR1,
35	CHA.7.524.vlCDR2, y CHA.7.524.vlCDR3.			
	CHA.7.526.vhCDR1,	CHA.7.526.vhCDR2,	CHA.7.526.vhCDR3,	CHA.7.526.vlCDR1,
	CHA.7.526.vlCDR2, y CHA.7.526.vlCDR3.			
	CHA.7.527.vhCDR1,	CHA.7.527.vhCDR2,	CHA.7.527.vhCDR3,	CHA.7.527.vlCDR1,
	CHA.7.527.vlCDR2, y CHA.7.527.vlCDR3.			
40	CHA.7.528.vhCDR1,	CHA.7.528.vhCDR2,	CHA.7.528.vhCDR3,	CHA.7.528.vlCDR1,
	CHA.7.528.vlCDR2, y CHA.7.528.vlCDR3.			

	CHA.7.530.vhCDR1,	CHA.7.530.vhCDR2,	CHA.7.530.vhCDR3,	CHA.7.530.vlCDR1,
	CHA.7.530.vlCDR2, y CHA.7.530.vlCDR3.			
	CHA.7.534.vhCDR1,	CHA.7.534.vhCDR2,	CHA.7.534.vhCDR3,	CHA.7.534.vlCDR1,
	CHA.7.534.vlCDR2, y CHA.7.534.vlCDR3.			
5	CHA.7.535.vhCDR1,	CHA.7.535.vhCDR2,	CHA.7.535.vhCDR3,	CHA.7.535.vlCDR1,
	CHA.7.535.vlCDR2, y CHA.7.535.vlCDR3.			
	CHA.7.537.vhCDR1,	CHA.7.537.vhCDR2,	CHA.7.537.vhCDR3,	CHA.7.537.vlCDR1,
	CHA.7.537.vlCDR2, y CHA.7.537.vlCDR3.			
	CHA.7.538_1.vhCDR1,	CHA.7.538_1.vhCDR2,	CHA.7.538_1.vhCDR3,	CHA.7.538_1.vlCDR1,
10	CHA.7.538_1.vlCDR2, y CHA.7.538_1.vlCDR3.			
	CHA.7.538_2.vhCDR1,	CHA.7.538_2.vhCDR2,	CHA.7.538_2.vhCDR3,	CHA.7.538_2.vlCDR1,
	CHA.7.538_2.vlCDR2, y CHA.7.538_2.vlCDR3.			
	CHA.7.543.vhCDR1,	CHA.7.543.vhCDR2,	CHA.7.543.vhCDR3,	CHA.7.543.vlCDR1,
	CHA.7.543.vlCDR2, y CHA.7.543.vlCDR3.			
15	CHA.7.544.vhCDR1,	CHA.7.544.vhCDR2,	CHA.7.544.vhCDR3,	CHA.7.544.vlCDR1,
	CHA.7.544.vlCDR2, y CHA.7.544.vlCDR3.			
	CHA.7.545.vhCDR1,	CHA.7.545.vhCDR2,	CHA.7.545.vhCDR3,	CHA.7.545.vlCDR1,
	CHA.7.545.vlCDR2, y CHA.7.545.vlCDR3.			
	CHA.7.546.vhCDR1,	CHA.7.546.vhCDR2,	CHA.7.546.vhCDR3,	CHA.7.546.vlCDR1,
20	CHA.7.546.vlCDR2, y CHA.7.546.vlCDR3.			
	CHA.7.547.vhCDR1,	CHA.7.547.vhCDR2,	CHA.7.547.vhCDR3,	CHA.7.547.vlCDR1,
	CHA.7.547.vlCDR2, y CHA.7.547.vlCDR3.			
	CHA.7.548.vhCDR1,	CHA.7.548.vhCDR2,	CHA.7.548.vhCDR3,	CHA.7.548.vlCDR1,
	CHA.7.548.vlCDR2, y CHA.7.548.vlCDR3.			
25	CHA.7.549.vhCDR1,	CHA.7.549.vhCDR2,	CHA.7.549.vhCDR3,	CHA.7.549.vlCDR1,
	CHA.7.549.vlCDR2, y CHA.7.549.vlCDR3.			
	CHA.7.550.vhCDR1,	CHA.7.550.vhCDR2,	CHA.7.550.vhCDR3,	CHA.7.550.vlCDR1,
	CHA.7.550.vlCDR2, y CHA.7.550.vlCDR3.			
	CHA.7.518.4.vhCDR1,	CHA.7.518.4.vhCDR2,	CHA.7.518.4.vhCDR3,	CHA.7.518.4.vlCDR1,
30	CHA.7.518.4.vlCDR2, y CHA.7.518.4.vlCDR3.			

Como se mencionó anteriormente, estos conjuntos de CDR también pueden ser variantes de aminoácidos como se describió anteriormente.

Además, las regiones marco de las cadenas pesadas variables y ligeras variables pueden humanizarse como se conoce en la técnica (en donde se generan variantes ocasionales en las CDR según sea necesario) y, por lo tanto, pueden generarse variantes humanizadas de las cadenas VH y VL de las Figuras 7A-7DD. Además, los dominios pesados y ligeros variables humanizados pueden entonces fusionarse con regiones constantes humanas, tales como las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En particular, como se conoce en la técnica, las cadenas VH y VL murinas pueden humanizarse como se conoce en la técnica, por ejemplo, mediante el uso del programa IgBLAST del sitio web del NCBI, como se describe en Ye y otros Nucleic Acids Res. 41:W34-W40 (2013), incorporado en la presente

como referencia en su totalidad para los métodos de humanización. IgBLAST toma una secuencia de VH y/o VL murina y la compara con una colección de secuencias de línea germinal humana conocidas. Como se muestra en la presente, para las secuencias humanizadas generadas en la presente, las bases de datos usadas fueron los genes VH humanos de IMGT (F+ORF, 273 secuencias de línea

5 germinal) y los genes kappa VL humanos de IMGT (F+ORF, 74 secuencias de línea germinal). Se eligieron cinco secuencias de CHA ilustrativas: CHA.7.518, CHA.7.530, CHA.7.538_1, CHA.7.538_2 y CHA.7.524 (véanse las Figuras 7A-7DD para las secuencias de VH y VL). Para esta modalidad de la humanización, la línea germinal humana IGHV1-46 (alelo1) se eligió para las 5 como la secuencia aceptora y la región de unión de la cadena pesada humana IGHJ4 (alelo1) (gen J). Para tres de cuatro

10 (CHA.7.518, CHA.7.530, CHA.7.538_1 y CHA.7.538_2), se eligió la línea germinal humana IGKV1-39(alelo 1) como la secuencia aceptora y se eligió la cadena ligera humana IGKJ2(alelo1) (gen J). El gen J se eligió de secuencias de regiones de unión humana compiladas en el sistema de información ImMunoGeneTics internacional IMGT® como www.imgt.org. Las CDR se definieron de acuerdo con la definición de AbM (véase www.bioinfo.org.uk/abs/). Las Figura 11A-11I representan secuencias

15 humanizadas, así como también algunos cambios potenciales para optimizar la unión a PVRIG. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquiera de estas secuencias de dominio de unión a antígeno o anticuerpo PVRIG humanizado como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender secuencias de anticuerpos PVRIG

20 CHA.7.518 como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender secuencias de anticuerpos PVRIG CHA.7.530 como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender secuencias de anticuerpos PVRIG CHA.7.538_1 como la porción de unión a PVRIG de los

25 anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender secuencias de anticuerpos PVRIG CHA.7.538_2 como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender secuencias de anticuerpos PVRIG CHA.7.518.4 como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT

30 PVRIG/anti-TIGIT

Los anticuerpos humanizados específicos de anticuerpos CHA incluyen los mostrados en las Figuras 11A-11I, Figuras 12A-12E y Figura 13. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender secuencias de anticuerpos PVRIG CHA como se muestra en las Figuras 11A-11I, las Figuras 12A-12E y la Figura 13 como la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos

35 biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Como apreciarán los expertos en la técnica, cada secuencia pesada variable humanizada (pesada humanizada; HH) y ligera variable humanizada (ligera humanizada, HL) puede combinarse con las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. Es decir, CHA.7.518.HH1 es la primera cadena pesada variable humanizada, y CHA.7.518.HH1.1 es la cadena pesada de longitud completa, que comprende la secuencia humanizada "HH1" con una región

40 constante de IgG1 (CHA.7.518.HH1.2 es CHA.7.518.HH1 con IgG2, etc.). En algunas modalidades, el

anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende las secuencias PVRIG proporcionadas en las Figuras 4, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 26, y/o 40 como porción de unión a PVRIG.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PVRIG de la presente invención incluyen anticuerpos anti-PVRIG en donde las secuencias de V_H y V_L de diferentes anticuerpos anti-PVRIG pueden "mezclarse y combinarse" para crear otros anticuerpos anti-PVRIG. La unión a PVRIG de tales anticuerpos "mezclados y combinados" puede evaluarse mediante los ensayos de unión descritos anteriormente, por ejemplo, los ELISA. En algunas modalidades, cuando se mezclan y combinan cadenas V_H y V_L , una secuencia de V_H de un emparejamiento V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia de V_H estructuralmente similar. Del mismo modo, en algunas modalidades, una secuencia de V_L de un emparejamiento V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia de V_L estructuralmente similar. Por ejemplo, las secuencias de V_H y V_L de anticuerpos homólogos son particularmente susceptibles de mezclarse y combinarse. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender secuencias V_H y V_L de PVRIG a partir de diferentes anticuerpos anti-PVRIG que se han "mezclado y combinado" como la porción de unión a PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT.

En consecuencia, los anticuerpos de la invención comprenden secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas del grupo que consiste en (a) secuencias como se enumeran en la presente; (b) secuencias que difieren de las secuencias de aminoácidos de CDR especificadas en (a) por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos; (c) secuencias de aminoácidos que tienen 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad de secuencia con las secuencias especificadas en (a) o (b); (d) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los aminoácidos como se enumeran en la presente. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender secuencias de CDR variantes de PVRIG como parte de la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

Se incluyen adicionalmente en la definición de anticuerpos de PVRIG los anticuerpos que comparten identidad con los anticuerpos de PVRIG enumerados en la presente. Es decir, en ciertas modalidades, un anticuerpo anti-PVRIG de acuerdo con la invención comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos anti-PVRIG aisladas de moléculas inmunitarias de anticuerpos anti-PVRIG preferidos, respectivamente, en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-PVRIG parentales. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (por ejemplo, % de homología = $\text{núm. de posiciones idénticas} / \text{número total de posiciones} \times 100$), en vistas del número de espacios, y la longitud de cada espacio, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del por ciento de identidad entre dos secuencias pueden lograrse mediante el uso de un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender regiones variables de la cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos anti-PVRIG aisladas como se describen en la presente.

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

Adicionalmente o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención pueden usarse además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicos para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse con el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y otros (1990) *J Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpos de acuerdo con al menos algunas modalidades de la invención. Para obtener alineaciones espaciadas para su comparación, puede usarse Gapped BLAST como se describe en Altschul y otros, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

En general, el porcentaje de identidad para la comparación entre anticuerpos contra PVRIG es de al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, y se prefiere al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad. El porcentaje de identidad puede estar a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, toda la cadena pesada o ligera o a lo largo de una porción de las cadenas.

Por ejemplo, se incluyen dentro de la definición de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención aquellos que comparten identidad a lo largo de toda la región variable (por ejemplo, donde la identidad es 95 % o 98 % idéntica a lo largo de las regiones variables), o a lo largo de toda la región constante, o a lo largo del dominio Fc. En particular, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que tienen porciones de unión a PVRIG o dominios de unión al antígeno con al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, con al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de por ciento de identidad preferido, con el anticuerpo CHA.7.518.4.

Además, también se incluyen secuencias que pueden tener CDR idénticas pero cambian en el dominio variable (o toda la cadena pesada o ligera). Por ejemplo, los anticuerpos PVRIG incluyen aquellos con CDR idénticas a las mostradas en las Figuras 8A-8D pero cuya identidad a lo largo de la región variable puede ser menor, por ejemplo, 95 o 98 % idénticas. En particular, la invención proporciona el uso de anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que tienen porciones de unión a PVRIG o dominios de unión al antígeno con CDR idénticas a CHA.7.518.4, pero con regiones marco que son 95 % o 98 % idénticas a CHA.7.518.4.

Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender CDR idénticas a las mostradas en las Figuras 8A-8D como parte de la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

Además, también se incluyen secuencias que pueden tener CDR idénticas pero cambian en el dominio variable (o toda la cadena pesada o ligera). Por ejemplo, los anticuerpos de PVRIG incluyen aquellos con CDR idénticas a las mostradas en las Figuras 35A-35D pero cuya identidad a lo largo de la región variable puede ser menor, por ejemplo, 95 o 98 % idénticas.

- 5 Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender CDR idénticas a las mostradas en las Figuras 35A-35D como parte de la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG es de un anticuerpo anti-PVRIG como se proporciona en el documento WO 2017/041004 (incorporado en la presente como referencia en su totalidad). En algunas modalidades, la porción de unión a PVRIG es de un anticuerpo anti-PVRIG como se proporciona en el documento WO 2018/017864 (incorporado en la presente como referencia en su totalidad).

1. Anticuerpos de PVRIG que compiten por unirse con los anticuerpos enumerados

La presente invención proporciona no solo los anticuerpos enumerados sino también anticuerpos adicionales que compiten con los anticuerpos enumerados (los números de CPA y CHA enumerados en la presente que se unen específicamente a PVRIG) para unirse específicamente a la molécula PVRIG. Los anticuerpos de PVRIG de la invención se "clasifican" en distintas categorías de epítomos. Hay cuatro categorías separadas descritas en la presente; 1) la categoría de epítomo en la que caen CPA.7.002, CPA.7.003, CPA.7.005, CPA.7.007, CPA.7.010, CPA.7.012, CPA.7.015, CPA.7.016, CPA.7.017, CPA.7.019, CPA.7.020, CPA.7.021, CPA.7.024, CPA.7.028, CPA.7.032, CPA.7.033, CPA.7.036, CPA.7.037, CPA.7.038, CPA.7.043, CPA.7.046 y CPA.7.041; 2) la categoría de epítomo en la que caen CPA.7.004, CPA.7.009, CPA.7.011, CPA.7.014, CPA.7.018, CPA.7.022, CPA.7.023, CPA.7.034, CPA.7.040, CPA.7.045 y CPA.7.047; 3) CPA.7.039, que define la distinción entre la categoría 1 y la categoría 2, en que la categoría 1 bloquea la unión de CPA.7.039 y la categoría 2 empareda el ligando con CPA.7.039, y la categoría 4) con CPA.7.050. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender anticuerpos PVRIG y/o secuencias de dominios de unión a antígeno que son capaces de competir con los anticuerpos enumerados (los números de CPA y CHA enumerados en la presente descripción que se unen específicamente a PVRIG) como parte de la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

Por lo tanto, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT, donde la porción de unión a PVRIG de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT es capaz de competir por la unión con anticuerpos que están en la categoría 1, con anticuerpos que están en la categoría 2, con anticuerpos que están en la categoría 3 y/o con anticuerpos que están en la categoría 4.

35 Se generan anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT adicionales que compiten con los anticuerpos enumerados, como se conoce en la técnica y se describe en líneas generales a continuación. Los estudios de unión competitiva pueden realizarse como se conoce en la técnica, generalmente mediante el uso de ensayos de unión SPR/Biacore®, así como los ensayos ELISA y a base de células.

40 C. Porción de unión a TIGIT de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT

Los anticuerpos biespecíficos anti-TIGIT y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT descritos en la presente descripción pueden comprender un anticuerpo TIGIT y/o una secuencia de dominio de unión a antígeno como parte de la porción de unión a TIGIT, donde los anticuerpos de TIGIT se etiquetan como sigue. Tales anticuerpos contra TIGIT tienen números de referencia, por ejemplo, "CPA.9.086". Esto representa la combinación de las cadenas pesadas variables y ligeras variables, como se muestra en la Figura 23, por ejemplo, con el entendimiento de que estos anticuerpos incluyen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. "CPA.9.086.VH" se refiere a la porción pesada variable de CPA.9.086, mientras que "CPA.9.086.VL" es la cadena ligera variable. "CPA.9.086.vhCDR1", "CPA.9.086.vhCDR2", "CPA.9.086.vhCDR3", "CPA.9.086.vlCDR1", "CPA.9.086.vlCDR2", y "CPA.9.086.vlCDR3", se refieren a las CDR indicadas. "CPA.9.086.HC" se refiere a toda la cadena pesada (por ejemplo, dominio variable y constante) de esta molécula, y "CPA.9.086.LC" se refiere a toda la cadena ligera (por ejemplo, dominio variable y constante) de la misma molécula. En general, la cadena ligera kappa humana se usa para el dominio constante de cada anticuerpo de fago (o hibridoma humanizado) en la presente, aunque en algunas modalidades se usa el dominio constante ligero lambda. "CPA.9.086.H1" se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende los dominios pesados y ligeros variables, que incluyen el dominio constante de IgG1 Humana (por lo tanto, las secuencias H1; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se muestran en las Figuras 9 y 21). En consecuencia, "CPA.9.086.H2" sería los dominios variables CPA.9.086 ligados a una IgG2 Humana. "CPA.9.086.H3" sería los dominios variables CPA.9.086 ligados a una IgG3 Humana, y "CPA.9.086.H4" sería los dominios variables CPA.9.086 ligados a una IgG4 Humana. Tenga en cuenta que, en algunos casos, las IgG humanas pueden tener mutaciones adicionales, las cuales se describen a continuación, y esto puede anotarse. Por ejemplo, en muchas modalidades, puede haber una mutación S241P en la IgG4 humana, y esto puede anotarse, por ejemplo, como "CPA.9.086.H4(S241P)". Se muestra en la Figura 21 la secuencia de IgG4 humana con esta variante de bisagra S241P. Otras variantes potenciales son IgG1(N297A), (u otras variantes que eliminan la glicosilación en este sitio y, por lo tanto, muchas de las funciones efectoras asociadas a la unión a FcγRIIIa) e IgG1(D265A), que reduce la unión a los receptores FcγR. Los anticuerpos anti-TIGIT y/o los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquiera de las secuencias de dominio de anticuerpos TIGIT como la porción de unión a TIGIT de los anticuerpos anti-TIGIT y/o los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos anti-TIGIT y/o los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquiera de los dominios de unión al antígeno TIGIT como la porción de unión a TIGIT de los anticuerpos anti-TIGIT y/o los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT.

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

En algunas modalidades, la invención proporciona scFv que se unen a TIGIT que comprenden un dominio pesado variable y un dominio ligero variable ligados por un enlazador de scFv como se describió anteriormente. Los dominios VL y VH pueden estar en cualquiera de las dos orientaciones, por ejemplo, desde el "VH-enlazador-VL" o "VL-enlazador-VH" del terminal N al C. Estos son nombrados en virtud de sus partes componentes; por ejemplo, "scFv-CPA. 9.086.VH-enlazador-VL" o "scFv-CPA.9.086.VL-enlazador-VH". Por lo tanto, "scFv-CPA.9.086" puede estar en cualquiera de las dos orientaciones. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden

comprender cualquier scFv que se una a TIGIT como parte de la porción de unión a TIGIT de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden comprender cualquier scFv que se una a TIGIT como parte del dominio de unión a antígeno de TIGIT de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende las secuencias PVRIG proporcionadas en la Figura 26 como la porción de unión a PVRIG. En muchas modalidades, los anticuerpos de la invención son humanos (derivados de fagos) y bloquean la unión de TIGIT y PVR. Como se muestra en las Figuras 3 y 4, los anticuerpos de CPA que se unen a la interacción receptor-ligando y la bloquean, son los que figuran a continuación, donde también se describen sus componentes (como se analiza en la sección "Secuencia", las secuencias de todos los constructos excepto los de scFv están en el listado de secuencias, así como también se proporcionan en la Figura 24):

CPA.9.018, CPA.9.018.VH, CPA.9.018.VL, CPA.9.018.HC, CPA.9.018.LC, CPA.9.018.H1, CPA.9.018.H2, CPA.9.018.H3, CPA.9.018.H4; CPA.9.018.H4(S241P); CPA.9.018.vhCDR1, CPA.9.018.vhCDR2, CPA.9.018.vhCDR3, CPA.9.018.vICDR1, CPA.9.018.vICDR2, CPA.9.018.vICDR3 y scFv-CPA.9.018;

CPA.9.027, CPA.9.027.VH, CPA.9.027.VL, CPA.9.027.HC, CPA.9.027.LC, CPA.9.027.H1, CPA.9.027.H2, CPA.9.027.H3, CPA.9.027.H4; CPA.9.018.H4(S241P); CPA.9.027.vhCDR1, CPA.9.027.vhCDR2, CPA.9.027.vhCDR3, CPA.9.027.vICDR1, CPA.9.027.vICDR2, CPA.9.027.vICDR3 y scFv-CPA.9.027;

CPA.9.049, CPA.9.049.VH, CPA.9.049.VL, CPA.9.049.HC, CPA.9.049.LC, CPA.9.049.H1, CPA.9.049.H2, CPA.9.049.H3; CPA.9.049.H4; CPA.9.049.H4(S241P); CPA.9.049.vhCDR1, CPA.9.049.vhCDR2, CPA.9.049.vhCDR3, CPA.9.049.vICDR1, CPA.9.049.vICDR2, CPA.9.049.vICDR3 y scFv-CPA.9.049;

CPA.9.057, CPA.9.057.VH, CPA.9.057.VL, CPA.9.057.HC, CPA.9.057.LC, CPA.9.057.H1, CPA.9.057.H2, CPA.9.057.H3; CPA.9.057.H4; CPA.9.057.H4(S241P); CPA.9.057.vhCDR1, CPA.9.057.vhCDR2, CPA.9.057.vhCDR3, CPA.9.057.vICDR1, CPA.9.057.vICDR2, CPA.9.057.vICDR3 y scFv-CPA.9.057;

CPA.9.059, CPA.9.059.VH, CPA.9.059.VL, CPA.9.059.HC, CPA.9.059.LC, CPA.9.059.H1, CPA.9.059.H2, CPA.9.059.H3; CPA.9.059.H4; CPA.9.059.H4(S241P); CPA.9.059.vhCDR1, CPA.9.059.vhCDR2, CPA.9.059.vhCDR3, CPA.9.059.vICDR1, CPA.9.059.vICDR2, CPA.9.059.vICDR3 y scFv-CPA.9.059;

CPA.9.083, CPA.9.083.VH, CPA.9.083.VL, CPA.9.083.HC, CPA.9.083.LC, CPA.9.083.H1, CPA.9.083.H2, CPA.9.083.H3; CPA.9.083.H4; CPA.9.083.H4(S241P); CPA.9.083.vhCDR1, CPA.9.083.vhCDR2, CPA.9.083.vhCDR3, CPA.9.083.vICDR1, CPA.9.083.vICDR2, CPA.9.083.vICDR3 y scFv-CPA.9.083;

CPA.9.086, CPA.9.086.VH, CPA.9.086.VL, CPA.9.086.HC, CPA.9.086.LC, CPA.9.086.H1, CPA.9.086.H2, CPA.9.086.H3; CPA.9.086.H4; CPA.9.086.H4(S241P); CPA.9.086.vhCDR1, CPA.9.086.vhCDR2, CPA.9.086.vhCDR3, CPA.9.086.vICDR1, CPA.9.086.vICDR2, CPA.9.086.vICDR3 y scFv-CPA.9.086;

CPA.9.089, CPA.9.089.VH, CPA.9.089.VL, CPA.9.089.HC, CPA.9.089.LC, CPA.9.089.H1, CPA.9.089.H2, CPA.9.089.H3; CPA.9.089.H4; CPA.9.089.H4(S241P); CPA.9.089.vhCDR1,

- CPA.9.089.vhCDR2, CPA.9.089.vhCDR3, CPA.9.089.vICDR1, CPA.9.089.vICDR2, CPA.9.089.vICDR3 y scFv-CPA.9.089;
- CPA.9.093, CPA.9.093.VH, CPA.9.093.VL, CPA.9.093.HC, CPA.9.093.LC, CPA.9.093.H1, CPA.9.093.H2, CPA.9.093.H3; CPA.9.093.H4; CPA.9.093.H4(S241P); CPA.9.093.vhCDR1, CPA.9.093.vhCDR2, CPA.9.093.vhCDR3, CPA.9.093.vICDR1, CPA.9.093.vICDR2, CPA.9.093.vICDR3 y scFv-CPA.9.093;
- CPA.9.101, CPA.9.101.VH, CPA.9.101.VL, CPA.9.101.HC, CPA.9.101.LC, CPA.9.101.H1, CPA.9.101.H2, CPA.9.101.H3; CPA.9.101.H4; CPA.9.101.H4(S241P); CPA.9.101.vhCDR1, CPA.9.101.vhCDR2, CPA.9.101.vhCDR3, CPA.9.101.vICDR1, CPA.9.101.vICDR2, CPA.9.101.vICDR3 y scFv-CPA.9.101; y
- CPA.9.103, CPA.9.103.VH, CPA.9.103.VL, CPA.9.103.HC, CPA.9.103.LC, CPA.9.103.H1, CPA.9.103.H2, CPA.9.103.H3; CPA.9.103.H4; CPA.9.103.H4(S241P); CPA.9.103.vhCDR1, CPA.9.103.vhCDR2, CPA.9.103.vhCDR3, CPA.9.103.vICDR1, CPA.9.103.vICDR2, CPA.9.103.vICDR3 y scFv-CPA.9.103.
- Además, la presente invención proporciona una serie de anticuerpos CHA, que son anticuerpos murinos generados a partir de hibridomas. Como es bien conocido en la técnica, las seis CDR son útiles cuando se colocan en regiones pesadas y ligeras variables del marco humano o cuando los dominios pesados y ligeros variables están humanizados. En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos, habitualmente de longitud completa o dominios scFv, que comprenden los siguientes conjuntos de CDR, cuyas secuencias se muestran en la Figura 23 y/o la lista de secuencias:
- CHA.9.536.1, CHA.9.536.1.VH, CHA.9.536.1.VL, CHA.9.536.1.HC, CHA.9.536.1.LC, CHA.9.536.1.H1, CHA.9.536.1.H2, CHA.9.536.1.H3; CHA.9.536.1.H4, CHA.9.536.1.H4(S241P), CHA.9.536.1.vhCDR1, CHA.9.536.1.vhCDR2, CHA.9.536.1.vhCDR3, CHA.9.536.1.vICDR1, CHA.9.536.1.vICDR2 y CHA.9.536.1.vhCDR3;
- CHA.9.536.3, CHA.9.536.3.VH, CHA.9.536.3.VL, CHA.9.536.3.HC, CHA.9.536.3.LC, CHA.9.536.3.H1, CHA.9.536.3.H2, CHA.9.536.3.H3; CHA.9.536.3.H4, CHA.9.536.3.H4(S241P); CHA.9.536.3.vhCDR1, CHA.9.536.3.vhCDR2, CHA.9.536.3.vhCDR3, CHA.9.536.3.vICDR1, CHA.9.536.3.vICDR2 y CHA.9.536.3.vhCDR3;
- CHA.9.536.4, CHA.9.536.4.VH, CHA.9.536.4.VL, CHA.9.536.4.HC, CHA.9.536.4.LC, CHA.9.536.4.H1, CHA.9.536.4.H2, CHA.9.536.4.H3; CHA.9.536.4.H4, CHA.9.536.4.H4(S241P), CHA.9.536.4.vhCDR1, CHA.9.536.4.vhCDR2, CHA.9.536.4.vhCDR3, CHA.9.536.4.vICDR1, CHA.9.536.4.vICDR2 y CHA.9.536.4.vhCDR3;
- CHA.9.536.5, CHA.9.536.5.VH, CHA.9.536.5.VL, CHA.9.536.5.HC, CHA.9.536.5.LC, CHA.9.536.5.H1, CHA.9.536.5.H2, CHA.9.536.5.H3; CHA.9.536.5.H4, CHA.9.536.5.H4(S241P), CHA.9.536.5.vhCDR1, CHA.9.536.5.vhCDR2, CHA.9.536.5.vhCDR3, CHA.9.536.5.vICDR1, CHA.9.536.5.vICDR2 y CHA.9.536.5.vhCDR3;
- CHA.9.536.6, CHA.9.536.6.VH, CHA.9.536.6.VL, CHA.9.536.6.HC, CHA.9.536.6.LC, CHA.9.536.6.H1, CHA.9.536.6.H2, CHA.9.536.6.H3; CHA.9.536.6.H4, CHA.9.536.6.vhCDR1, CHA.9.536.6.vhCDR2, CHA.9.536.6.vhCDR3, CHA.9.536.6.vICDR1, CHA.9.536.6.vICDR2 y CHA.9.536.6.vhCDR3;
- CHA.9.536.7, CHA.9.536.7.VH, CHA.9.536.7.VL, CHA.9.536.7.HC, CHA.9.536.7.LC, CHA.9.536.7.H1, CHA.9.536.7.H2, CHA.9.536.7.H3; CHA.9.536.7.H4, CHA.9.536.5.H4(S241P); CHA.9.536.7.vhCDR1,

CHA.9.536.7.vhCDR2, CHA.9.536.7.vhCDR3, CHA.9.536.7.vICDR1, CHA.9.536.7.vICDR2 y
CHA.9.536.7.vhCDR3;

CHA.9.536.8, CHA.9.536.8.VH, CHA.9.536.8.VL, CHA.9.536.8.HC, CHA.9.536.8.LC, CHA.9.536.8.H1,
CHA.9.536.8.H2, CHA.9.536.8.H3; CHA.9.536.8.H4, CHA.9.536.8.H4(S241P), CHA.9.536.8.vhCDR1,
5 CHA.9.536.8.vhCDR2, CHA.9.536.8.vhCDR3, CHA.9.536.8.vICDR1, CHA.9.536.8.vICDR2 y
CHA.9.536.8.vhCDR3;

CHA.9.560.1, CHA. 9.560.1VH, CHA. 9.560.1.VL, CHA. 9.560.1.HC, CHA. 9.560.1.LC, CHA.
9.560.1.H1, CHA. 9.560.1.H2, CHA. 9.560.1.H3; CHA. 9.560.1.H4, CHA. 9.560.1.H4(S241P), CHA.
9.560.1.vhCDR1, CHA. 9.560.1.vhCDR2, CHA. 9.560.1.vhCDR3, CHA. 9.560.1.vICDR1, CHA.
10 9.560.1.vICDR2 y CHA. 9.560.1.vhCDR3;

CHA.9.560.3, CHA.9.560.3VH, CHA.9.560.3.VL, CHA.9.560.3.HC, CHA.9.560.3.LC, CHA.9.560.3.H1,
CHA.9.560.3.H2, CHA.9.560.3.H3; CHA.9.560.3.H4, CHA.9.560.3.H4(S241P); CHA. 9.560. 3.vhCDR1,
CHA. 9.560. 3.vhCDR2, CHA.9.560.3.vhCDR3, CHA.9.560.3.vICDR1, CHA.9.560.3.vICDR2 y
CHA.9.560.3.vhCDR3;

15 CHA.9.560.4, CHA.9.560.4VH, CHA.9.560.4.VL, CHA.9.560.4.HC, CHA.9.560.4.LC, CHA.9.560.4.H1,
CHA.9.560.4.H2, CHA.9.560.4.H3; CHA.9.560.4.H4, CHA.9.560.4.H4(S241P), CHA.9.560. 4.vhCDR1,
CHA.9.560. 4.vhCDR2, CHA.9.560.4.vhCDR3, CHA.9.560.4.vICDR1, CHA.9.560.4.vICDR2 y
CHA.9.560.4.vhCDR3;

CHA.9.560.5, CHA.9.560.5VH, CHA.9.560. 5.VL, CHA.9.560. 5.HC, CHA.9.560.5.LC, CHA.9.560.5.H1,
20 CHA.9.560.5.H2, CHA.9.560.5.H3; CHA.9.560. 5.H4, CHA.9.560.5.vhCDR1, CHA.9.560.5.vhCDR2,
CHA.9.560.5.vhCDR3, CHA.9.560.5.vICDR1, CHA.9.560.5.vICDR2 y CHA.9.560.5.vhCDR3;

CHA.9.560.6, CHA.9.560.6VH, CHA.9.560.6.VL, CHA.9.560. 6.HC, CHA.9.560.6.LC, CHA.9.560.6.H1,
CHA.9.560.6.H2, CHA.9.560.6.H3; CHA.9.560.6.H4, CHA.9.560.6.H4(S241P), CHA.9.560.6.vhCDR1,
CHA.9.560.6.vhCDR2, CHA.9.560.6.vhCDR3, CHA.9.560.6.vICDR1, CHA.9.560.6.vICDR2 y
25 CHA.9.560.6.vhCDR3;

CHA.9.560.7, CHA.9.560.7VH, CHA.9.560.7.VL, CHA.9.560.7.HC, CHA.9.560.7.LC, CHA.9.560.7.H1,
CHA.9.560.7.H2, CHA.9.560.7.H3; CHA.9.560.7.H4, CHA.9.560.7.H4(S241P); CHA.9.560.7.vhCDR1,
CHA.9.560.7.vhCDR2, CHA.9.560.7.vhCDR3, CHA.9.560.7.vICDR1, CHA.9.560.7.vICDR2 y
CHA.9.560.7.vhCDR3;

30 CHA.9.560.8, CHA.9.560.8VH, CHA.9.560.8.VL, CHA.9.560.8.HC, CHA.9.560.8.LC, CHA.9.560.8.H1,
CHA.9.560.8.H2, CHA.9.560.8.H3; CHA.9.560.8.H4, CHA.9.560.8.H4(S241P); CHA.9.560.8.vhCDR1,
CHA.9.560.8.vhCDR2, CHA.9.560.8.vhCDR3, CHA.9.560.8.vICDR1, CHA.9.560.8.vICDR2 y
CHA.9.560.8.vhCDR3;

CHA.9.546.1, CHA.9.546.1VH, CHA.9.546.1.VL, CHA.9.546.1.HC, CHA.9.546.1.LC, CHA.9.546.1.H1,
35 CHA.9.546.1.H2, CHA.9.546.1.H3; CHA.9.546.1.H4, CHA.9.546.1.H4(S241P), CHA.9.546.1.vhCDR1,
CHA.9.546.1.vhCDR2, CHA.9.546.1.vhCDR3, CHA.9.546.1.vICDR1, CHA.9.546.1.vICDR2 y
CHA.9.546.1.vhCDR3;

CHA.9.547.1, CHA.9.547.1VH, CHA.9.547.1.VL, CHA.9.547.1.HC, CHA.9.547.1.LC, CHA.9.547.1.H1,
CHA.9.547.1.H2, CHA.9.547.1.H3; CHA.9.547.1.H4, CHA.9.547.1.H4(S241P), CHA.9.547.1.vhCDR1,
40 CHA.9.547.1.vhCDR2, CHA.9.547.1.vhCDR3, CHA.9.547.1.vICDR1, CHA.9.547.1.vICDR2 y
CHA.9.547.1.vhCDR3;

- CHA.9.547.2, CHA.9.547. 2VH, CHA.9.547. 2.VL, CHA.9.547. 2.HC, CHA.9.547. 2.LC, CHA.9.547. 2.H1, CHA.9.547. 2.H2, CHA.9.547. 2.H3; CHA.9.547.2.H4, CHA.9.547.2.H4(S241P), CHA.9.547. 2.vhCDR1, CHA.9.547. 2.vhCDR2, CHA.9.547. 2.vhCDR3, CHA.9.547. 2.vICDR1, CHA.9.547. 2.vICDR2 y CHA.9.547. 2.vhCDR3;
- 5 CHA.9.547.3, CHA.9.547. 3VH, CHA.9.547. 3.VL, CHA.9.547. 3.HC, CHA.9.547. 3.LC, CHA.9.547. 3.H1, CHA.9.547. 3.H2, CHA.9.547. 3.H3; CHA.9.547.3.H4, CHA.9.547.3.H4(S241P), CHA.9.547. 3.vhCDR1, CHA. 9.547. 3.vhCDR2, CHA.9.547. 3.vhCDR3, CHA.9.547. 3.vICDR1, CHA.9.547. 3.vICDR2 y CHA.9.547. 3.vhCDR3;
- 10 CHA.9.547.4, CHA.9.547. 4VH, CHA.9.547. 4.VL, CHA.9.547. 4.HC, CHA. 9.547. 4.LC, CHA.9.547. 4.H1, CHA.9.547. 4.H2, CHA.9.547. 4.H3; CHA.9.547.4.H4, CHA.9.547.4.H4(S241P), CHA.9.547. 4.vhCDR1, CHA.9.547. 4.vhCDR2, CHA.9.547. 4.vhCDR3, CHA.9.547. 4.vICDR1, CHA.9.547. 4.vICDR2 y CHA.9.547. 4.vhCDR3;
- 15 CHA.9.547.6, CHA.9.547. 6 VH, CHA.9.547. 6.VL, CHA.9.547. 6.HC, CHA.9.547. 6.LC, CHA.9.547. 6.H1, CHA.9.547. 6.H2, CHA.9.547. 6.H3; CHA.9.547.6.H4, CHA.9.547.6.H4(S241P), CHA.9.547. 6.vhCDR1, CHA.9.547. 6.vhCDR2, CHA.9.547. 6.vhCDR3, CHA.9.547. 6.vICDR1, CHA.9.547. 6.vICDR2 y CHA.9.547. 6.vhCDR3;
- 20 CHA.9.547.7, CHA.9.547. 7VH, CHA.9.547. 7.VL, CHA.9.547. 7.HC, CHA.9.547. 7.LC, CHA.9.547. 7.H1, CHA.9.547. 7.H2, CHA.9.547. 7.H3; CHA.9.547.7.H4, CHA.9.547.7.H4(S241P), CHA.9.547. 7.vhCDR1, CHA.9.547. 7.vhCDR2, CHA.9.547. 7.vhCDR3, CHA.9.547. 7.vICDR1, CHA.9.547. 7.vICDR2 y CHA.9.547. 7.vhCDR3;
- 25 CHA.9.547.8, CHA.9.547. 8VH, CHA.9.547. 8.VL, CHA.9.547. 8.HC, CHA.9.547.8.LC, CHA.9.547. 8.H1, CHA.9.547. 8.H2, CHA.9.547. 8.H3; CHA.9.547.8.H4, CHA.9.547.8.H4(S241P), CHA.9.547. 8.vhCDR1, CHA.9.547. 8.vhCDR2, CHA.9.547. 8.vhCDR3, CHA.9.547. 8.vICDR1, CHA.9.547. 8.vICDR2 y CHA.9.547. 8.vhCDR3;
- 30 CHA.9.547.9, CHA.9.547.9, CHA.9.547.9VH, CHA.9.547.9.VL, CHA.9. 547.9.HC, CHA.9.547.9.LC, CHA.9.547.9.H1, CHA.9.547.9.H2, CHA.9.547.9.H3; CHA.9.547.9.H4, CHA.9.547.9.H4, CHA.9.547.9.H4(S241P), CHA.9.547.9.H4(S241P), CHA.9.547.9.vhCDR1, CHA.9.547.9.vhCDR2, CHA.9.547.9.vhCDR3, CHA.9.547.9.vICDR1, CHA.9.547.9.vICDR2 y CHA.9.547.9.vhCDR3;
- 35 CHA.9.547.13, CHA.9.547.13, CHA.9.547. 13VH, CHA.9. 547.13.VL, CHA.9. 547.13.HC, CHA. 9.547.13.LC, CHA. 9.547.13.H1, CHA.9.547.13.H2, CHA.9. 547.13.H3; CHA.9.547.13.H4, CHA.9.547.13.H4, CHA.9.547.13.H4(S241P), CHA.9.547.13.H4(S241P), CHA.9.547.13.vhCDR1, CHA.9.547.13.vhCDR2, CHA.9.547. 13.vhCDR3, CHA.9.547.13.vICDR1, CHA.9.547.13.vICDR2 y CHA.9.547. 13.vhCDR3;
- 40 CHA.9.541.1, CHA.9.541.1.VH, CHA.9.541.1.VL, CHA.9.541.1.HC, CHA.9.541.1.LC, CHA.9.541.1.H1, CHA.9.541.1.H2, CHA.9.541.1.H3; CHA.9.541.1.H4, CHA.9.541.1.H4(S241P), CHA.9.541.1.vhCDR1, CHA.9.541.1.vhCDR2, CHA.9.541.1.vhCDR3, CHA.9.541.1.vICDR1, CHA.9.541.1.vICDR2 y CHA. 9.541.1.vhCDR3;
- CHA.9.541.3, CHA.9.541. 3.VH, CHA.9.541. 3.VL, CHA.9.541. 3.HC, CHA.9.541. 3.LC, CHA.9.541. 3.H1, CHA.9.541. 3.H2, CHA.9.541. 3.H3; CHA.9.541.3.H4, CHA.9.541.3.H4(S241P), CHA.9.541. 3.vhCDR1, CHA.9.541. 3.vhCDR2, CHA.9.541. 3.vhCDR3, CHA.9.541. 3.vICDR1, CHA.9.541. 3.vICDR2 y CHA. 9.541. 3.vhCDR3;

CHA.9.541.4, CHA.9.541.4.VH, CHA.9.541. 4.VL, CHA.9.541. 4.HC, CHA.9.541. 4.LC, CHA.9.541. 4.H1, CHA.9.541. 4.H2, CHA.9.541. 4.H3; CHA.9.541.4.H4, CHA.9.541.4.H4(S241P), CHA.9.541. 4.vhCDR1, CHA.9.541. 4.vhCDR2, CHA.9.541. 4.vhCDR3, CHA.9.541. 4.vICDR1, CHA.9.541. 4.vICDR2 y CHA. 9.541. 4.vhCDR3;

5 CHA.9.541.5, CHA.9.541. 5.VH, CHA.9.541. 5.VL, CHA.9.541. 5.HC, CHA.9.541. 5.LC, CHA.9.541. 5.H1, CHA.9.541. 5.H2, CHA.9.541. 5.H3; CHA.9.541.5.H4, CHA.9.541.5.H4(S241P), CHA.9.541. 5.vhCDR1, CHA.9.541. 5.vhCDR2, CHA.9.541. 5.vhCDR3, CHA.9.541. 5.vICDR1, CHA.9.541. 5.vICDR2 y CHA. 9.541. 5.vhCDR3;

10 CHA.9.541.6, CHA.9.541. 6.VH, CHA.9.541. 6.VL, CHA.9.541. 6.HC, CHA.9.541. 6.LC, CHA.9.541. 6.H1, CHA.9.541. 6.H2, CHA.9.541.6.H3; CHA.9.541.6.H4, CHA.9.541.6.H4(S241P), CHA.9.541. 6.vhCDR1, CHA.9.541. 6.vhCDR2, CHA.9.541. 6.vhCDR3, CHA.9.541. 6.vICDR1, CHA.9.541. 6.vICDR2 y CHA. 9.541. 6.vhCDR3;

15 CHA.9.541.7, CHA.9.541. 7.VH, CHA.9.541. 7.VL, CHA.9.541. 7.HC, CHA.9.541. 7.LC, CHA.9.541. 7.H1, CHA.9.541. 7.H2, CHA.9.541. 7.H3; CHA.9.541.7.H4, CHA.9.541.7.H4(S241P), CHA.9.541. 7.vhCDR1, CHA.9.541. 7.vhCDR2, CHA.9.541. 7.vhCDR3, CHA.9.541. 7.vICDR1, CHA.9.541. 7.vICDR2 and CHA. 9.541. 7.vhCDR3; y

20 CHA.9.541.8, CHA.9.541. 8.VH, CHA.9.541. 8.VL, CHA.9.541. 8.HC, CHA.9.541. 8.LC, CHA.9.541. 8.H1, CHA.9.541. 8.H2, CHA.9.541. 8.H3; CHA.9.541.8.H4, CHA.9.541.8.H4(S241P); CHA.9.541. 8.vhCDR1, CHA.9.541. 8.vhCDR2, CHA.9.541. 8.vhCDR3, CHA.9.541. 8.vICDR1, CHA.9.541. 8.vICDR2 y CHA. 9.541. 8.vhCDR3.

CHA.9.547.18vhCDR1, CHA.9.547.18.vhCDR2, CHA.9.547.18.vhCDR3, CHA.9.547.18.vICDR1, CHA.9.547.18.vICDR2, y CHA.9.547.18.vICDR3.

En el caso de los scFv que comprenden las CDR de los anticuerpos anteriores, estos se etiquetan como scFv que incluyen un scFv que comprende un dominio pesado variable con los vhCDR, un enlazador y un dominio ligero variable con los vICDR, nuevamente como se indicó anteriormente en cualquiera de las dos orientaciones. Por lo tanto, la invención incluye scFv-CHA.9.536.3.1, scFv-CHA.9.536.3, scFv-CHA.9.536.4, scFv-CHA.9.536.5, scFv-CHA.9.536.7, scFv-CHA.9.536.8, scFv-CHA.9.560.1, scFv-CHA.9.560.3, scFv-CHA.9.560.4, scFv-CHA.9.560.5, scFv-CHA.9.560.6, scFv-CHA.9.560.7, scFv-CHA.9.560.8, scFv-CHA.9.546.1, scFv-CHA.9.547.1, scFv-CHA.9.547.2, scFv-CHA.9.547.3, scFv-CHA.9.547.4, scFv-CHA.9.547.6, scFv-CHA.9.547.7, scFv-CHA.9.547.8, scFv-CHA.9.547.9, scFv-CHA.9.547.13, scFv-CHA.9.541.1, scFv-CHA.9.541.3, scFv-CHA.9.541.4, scFv-CHA.9.541.5, scFv-CHA.9.541.6, scFv-CHA.9.541.7 y scFv-CHA.9.541.8.

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

35 Como se analiza en la presente, la invención proporciona además variantes de los componentes anteriores (CPA y CHA), que incluye variantes en las CDR, como se describió anteriormente. Por lo tanto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden un conjunto de 6 CDR como se describe en la presente que puede contener una, dos o tres diferencias de aminoácidos en el conjunto de CDR, siempre que el anticuerpo aún se una a TIGIT. Se conocen en la técnica ensayos adecuados para evaluar un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que contiene mutaciones en comparación con las secuencias CDR descritas en la presente, tales como los ensayos Biacore.

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

De manera similar, se proporcionan cadenas pesadas y ligeras que son 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de "HC" y "LC" de longitud completa en la presente (y en particular CPA.9.086), y/o contienen de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 cambios de aminoácidos, o más, cuando se usan variantes de Fc. En estas modalidades, la invención incluye estas variantes siempre que el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT aún se una a TIGIT. Se conocen en la técnica ensayos adecuados para evaluar un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que contiene mutaciones en comparación con las secuencias CDR descritas en la presente, tales como los ensayos Biacore.

Además, las regiones marco de las cadenas pesadas variables y ligeras variables de ya sea los anticuerpos CPA o los CHA de la presente pueden humanizarse (o, en el caso de los anticuerpos CHA, "rehumanizarse", en la medida en que puedan realizarse métodos de humanización alternativos) como se conoce en la técnica (con variantes ocasionales generadas en las CDR según sea necesario) y, por lo tanto, pueden generarse variantes humanizadas de las cadenas VH y VL de la Figura 23 (y en particular CPA.9.086). Además, los dominios pesados y ligeros variables humanizados pueden entonces fusionarse con regiones constantes humanas, tales como las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (que incluye la IgG4 (S241P)).

En particular, como se conoce en la técnica, las cadenas VH y VL murinas pueden humanizarse como se conoce en la técnica, por ejemplo, mediante el uso del programa IgBLAST del sitio web del NCBI, como se describe en Ye y otros Nucleic Acids Res. 41:W34-W40 (2013), incorporado en la presente como referencia en su totalidad para los métodos de humanización. IgBLAST toma una secuencia de VH y/o VL murina y la compara con una colección de secuencias de línea germinal humana conocidas. Como se muestra en la presente, para las secuencias humanizadas generadas en la presente, las bases de datos usadas fueron los genes VH humanos de IMGT (F+ORF, 273 secuencias de línea germinal) y los genes kappa VL humanos de IMGT (F+ORF, 74 secuencias de línea germinal). Se eligieron cinco secuencias de CHA ilustrativas: CHA.9.536, CHA.9.560, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.541 (véase la Figura 23). Para esta modalidad de la humanización, la línea germinal humana IGHV1-46 (alelo1) se eligió para las 5 como la secuencia aceptora y la región de unión de la cadena pesada humana IGHJ4 (alelo1) (gen J). Para tres de cuatro (CHA.7.518, CHA.7.530, CHA.7.538_1 y CHA.7.538_2), se eligió la línea germinal humana IGKV1-39(alelo 1) como la secuencia aceptora y se eligió la cadena ligera humana IGKJ2(alelo1) (gen J). El gen J se eligió de secuencias de regiones de unión humana compiladas en el sistema de información ImMunoGeneTics internacional IMGT® como www.imgt.org. Las CDR se definieron de acuerdo con la definición de AbM (véase

www.bioinfo.org.uk/abs/). En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la presente invención incluyen porciones de unión a TIGIT o dominios de unión al antígeno en donde las secuencias V_H y V_L de diferentes porciones de unión a TIGIT o dominios de unión al antígeno pueden "mezclarse y combinarse" para crear otras porciones de unión a TIGIT o dominios de unión al antígeno. La unión a TIGIT de tales anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT "mezclados y combinados" puede evaluarse mediante los ensayos de unión descritos anteriormente, por ejemplo, ensayos ELISA o Biacore. En algunas modalidades, cuando se mezclan y combinan cadenas V_H y V_L, una secuencia de V_H de un emparejamiento V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia de V_H estructuralmente similar. Del mismo modo, en algunas modalidades, una secuencia de V_L de un emparejamiento V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia de V_L estructuralmente similar. Por ejemplo, las secuencias de V_H y V_L de anticuerpos homólogos son particularmente susceptibles de mezclarse y combinarse.

En consecuencia, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención comprenden secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas del grupo que consiste en (a) secuencias como se enumeran en la presente; (b) secuencias que difieren de las secuencias de aminoácidos de CDR especificadas en (a) por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos; (c) secuencias de aminoácidos que tienen 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad de secuencia con las secuencias especificadas en (a) o (b); (d) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los aminoácidos como se enumeran en la presente. En particular, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT puede comprender el dominio de unión a antígeno del anticuerpo CPA.9.086 que puede tener secuencias seleccionadas de (a), (b), (c) o (d).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende las siguientes secuencias (Figura 26; las sustituciones de aminoácidos para el enfoque de heterodimerización del botón en el ojal están en negrita y subrayadas):

CHA.7.518.1.H4 (S241P) V_H IgG1 CH1 IgG4 CH2-CH3 S354C, E356D, M358L, T366W

*QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMEISSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCODELTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:3175);*

CHA.7.518.1.H4 (S241P) V_L Ckappa

*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQKPKGAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFHWGTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:3176);*

y

CPA.9.086 HC Clambda Crossmab IgG4 Y349C, E356D, M358L, T366S, L368A, Y407V
 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
 5 CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQDELTKNQVS
 LSCAAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
 SLSLSPGK (SEQ ID NO:3177);

10 **CPA.9.086 LC CH1**
 QSALTQPRASGNPGQRTVITSCGSSSNMGRFPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID
 NO: 3178).

15 En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende las siguientes
 secuencias:

CHA.7.518.1 VH
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:1539);

20 CHA.7.518.1 VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544);

y

25 CPA.9.086 VH
 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:1634);

30 CPA.9.086 VL
 QSALTQPRASGNPGQRTVITSCGSSSNMGRFPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende las siguientes
 secuencias:

35 CHA.7.518.4 VH
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:3179);

40 CHA.7.518.4 VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

y

CPA.9.086 VH

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 5 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:1634);

CPA.9.086 VL

QSALTQPRASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRPVNWWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQTSGTSASLT
 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639).

10 En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende las siguientes
 secuencias:

CHA.7.518.1 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:1539);

15

CHA.7.518.1 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544);

y

20

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:1664);

25 CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende las siguientes
 secuencias:

30 CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:3179);

CHA.7.518.4 VL

35 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

y

CHA.9.547.18 VH

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:1664);

CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una de las siguientes secuencias anti-PVRIG. () en las secuencias siguientes indica una delección con respecto a la secuencia de aminoácidos de IgG4 humana de referencia. El texto en **negrita** indica sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de IgG4 de referencia.

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una de las siguientes secuencias:

10 **CHA.7.518.1 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
FTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTA
RNAMDYWGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQF
15 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEQ**MTKNQVK**LTCVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3217);

CHA.7.518.1 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASV
GDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLQPEDFATYYCQH
FWGTPYTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
25 LPPSQEQ**MTKNQVK**LTCVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 3227);

CHA.7.518.1 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
30 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
FTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTA
RNAMDYWGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLT**CDV**SGFYPSDIAVEWESDGPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSC
35 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3237);

CHA.7.518.1 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASV
40 GDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLQPEDFATYYCQH
FWGTPYTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT

LPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWEEGDVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG; (SEQ ID NO:3247);

CHA.7.518.1 hIgG4 Variante 1

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ**EQ**MTKNQ**VK**LTCLVKGFYP
10 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG; (S
EQ ID NO:3257);

CHA.7.518.1 hIgG4 Variante 2

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSDTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE**EE**FNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPS
SDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG;
20 (SEQ ID NO:3267);

CHA.7.518.1 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**SQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLP**PSQDEL**TKNQVSL**S**
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSR**LT**VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
30 SLSPG; (SEQ ID NO:3277);

CHA.7.518.1 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

35 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**SQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**W**
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
40 SLSPG; (SEQ ID NO:3287);

CHA.7.518.1 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
5 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQDELTKNQVSL**SCAV**KGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**VS**RSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG;
(SEQ ID NO:3297);

CHA.7.518.1 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**WCL**VKGFY
15 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG;
(SEQ ID NO:3307);

CHA.7.518.4 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
20 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
FTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTA
RNAMDYWGQGLTVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQ**EQM**TKNQ**VKLT**CCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
25 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3317);

CHA.7.518.4 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASV
30 GDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLQPEDFATYYCQH
FWGTPYTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQ**EQM**TKNQ**VKLT**CCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3327);

35

CHA.7.518.4 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
FTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTA
40 RNAMDYWGQGLTVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT

LPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWEEDGVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3337);

CHA.7.518.4 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsggggDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQEDFATYYCQH
FWGTPYTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQF
NWXVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
10 LPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWEEDGVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3347);

CHA.7.518.4 hIgG4 Variante 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
15 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**Q**FNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ**Q**MTKNQV**KL**TCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**Q**EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
20 (SEQ ID NO:3357);

CHA.7.518.4 hIgG4 Variante 2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
25 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDPKPSDTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPS
SDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**E**EDGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3367);

30

CHA.7.518.4 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
35 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**SQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REE**Q**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV**CT**LPPSQ**DEL**TKNQV**SL**
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRW**Q**EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:3651);

40

CHA.7.518.4 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
5 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**W**
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:3652);

CHA.7.518.4 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV**CTLPPSQDEL**TKNQVSL**SCA**VKGFY
15 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3397);

0

CHA.7.518.4 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**W**CLVKGFY
25 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3407).

En algunas modalidades, la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
comprende una de las siguientes secuencias anti-PVRIG:

30

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

QSALTQPRASGNPGQRTVITSCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsgggsgEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
35 LPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQ**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3417);

40 **CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1**

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsgggsgQSALTQPRASGNP

GQRTVISCSSSNMGRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
 AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQEQMTKNQ**V**KLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 5 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3427);

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

QSALTQPRASGNPGQRTVISCSSSNMGRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
 ISGLQSEDEAEYFCAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsgggsgEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
 10 GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
 LPLHYYGMDVWGQGTITVTSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3437);

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsgggsgQSALTQPRASGNP
 20 GQRTVISCSSSNMGRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
 AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3447);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 1

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGP
 PCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
 30 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEQMTKNQ**V**KLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3457);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGP
 PCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCD**V**SGFY
 40 PSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3467);

PPSQEQMTKNQV**K**LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3517);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsggggDIQMTQSPSSLSASVG
DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQG
QSYPTFTFGQGTKLEIKESKYGPCPPCPAP**PVA**(**)**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
10 PPSQEQMTKNQV**K**LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3527);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLT
15 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsggggEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
IAMDYWGQGLTVTVSSSKYGPCPPCPAP**PVA**(**)**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**E**E**G**DVFSCS
20 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3537);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsggggDIQMTQSPSSLSASVG
25 DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQG
QSYPTFTFGQGTKLEIKESKYGPCPPCPAP**PVA**(**)**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**E**E**G**DVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3547);

30

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPC
35 PPCPAP**PVA**(**)**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEQMTKNQV**K**LTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3557);

40 **CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 2**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD

YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPS**SD**TKVDRVESKYGP
 PPCPAP**PVA**(**)**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE**EE**FNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ**EE**MTKNQVSLT**CD**V**SG**FYPS
 DIAVEWES**DG**QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEG**DVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

5 (SEQ ID NO:3567);

CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 10 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 CESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLP**PSQDEL**TKNQVSL**SC**
AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**V**SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS

15 LSPG (SEQ ID NO:3653);

CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 20 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 CESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**WC**
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS

25 LSPG (SEQ ID NO:3654);

CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 30 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLP**PSQDEL**TKNQVSL**SCA**VKGFYPS
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**V**SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO:3597);

35 o

CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 40 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**WC**LVKGFYPS

SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3607).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

5

CHA.7.518.1 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgVQQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
FTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTA
10 RNAMDYWGQGLTVTVSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQED**PEVQF
NWXVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3217);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
15 anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

QSALTQPRASGNPGQRTVITSCSGSSSNMGRFPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsgggsgEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
20 GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
LPLHYYGMDVWGQGT TVTVSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQED**P
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**CDV**SGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3437);

25

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGT TVTVSSggggsgggsgggsgggsgQSALTQPRASGNP
GQRTVITSCSGSSSNMGRFPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
30 AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQED**P
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**CDV**SGFYPSDIAVEWES**SDG**QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3447);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDPKPS**DT**KVDPKRVESKYGP
PCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQED**PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FN
40 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**CDV**SGFY
PSDIAVEWES**SDG**QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3467);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
 5 FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
 YAMDYWGQGTLLTVTSSESKEYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQED**PEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSQEEMTKNQVSLTCD**VS**GFYPSDIAVEWES**DG**QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3537);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTLLTVTSsgggsgggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASV
 DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQG
 15 QSYPTFTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQED**PEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSQEEMTKNQVSLTCD**VS**GFYPSDIAVEWES**DG**QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3547);

y

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTLLTVTSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
 YFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPS**DT**KVDKRVESKYGPPC
 25 PPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQED**PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**QE**EMTKNQVSLTCD**VS**GFYPS
 DIAVEWES**DG**QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3567).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.1 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
 35 SSLQPEDFATYYCQHFHGTPTFTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
 FTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDATVYYCAREDKTA
 RNAMDYWGQGTLLTVTSSESKEYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQED**PEVQF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPS**QE**QMTKNQV**KL**TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**QEG**NVFSC
 40 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3217);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

QSALTQPRASGNPGQRVTIISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsggggsEVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAAS
GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
LPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSESKYGPPCPPCPAP**PVA ()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**CDV**SGFYPSDIAVEWES**SD**GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR**WE**EGD
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3437);

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGT'TVTVSSGgggsgggsgggsgSALTQPRASGNP
GQRTVITSCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA ()** GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**CDVS**GFYPSDIAVEWESDGPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSR**WEED**
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3447);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGT'TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT'KTYTCNVDHKPS**SD**TKVDKRVESKYGP
PCPPCPAP**PVA ()**GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**VK**QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEE**EF**NS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**CDVS**GFY
PSDIAVEWES**SD**GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3467);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRIITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPYTFGQGTKLEIKggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
YAMDYWGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAP**PVA ()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPRE**E**EFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLT**CDV**SGFYPSDIAVEWES**SD**GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3537);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASVG
DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQG
QSYPTFTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA** () GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVK**KQ**EDPEVQFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEEFNFSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWEEGDVDFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3547);

y

5

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGPCC
10 PPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEFNFSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPS
DIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWEEGDVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO:3567).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
15 comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.1 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDTYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASV
20 GDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQH
FWGTPYTFGQGTKLEIKESKYGPCCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEQMTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3227);

25 y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

QSALTQPRASGNPGRVTISCSGSSSNMGRPVNWWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
30 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsgggsgEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
LPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSSESKYGPCCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEFNFSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWEEGD
35 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3437);

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsgggsgQSALTQPRASGNP
40 GQRTVITCSGSSSNMGRPVNWWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPCCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEFNFSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP

QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWEEGD
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3447);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 2

5 EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGP
PCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFY
10 PSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3467);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
15 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsggggEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
YAMDYWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCS
20 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3537);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsggggDIQMTQSPSSLSASVG
25 DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQG
QSYPTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3547);

30 y

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
35 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGPPC
PPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPS
DIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3567).

40

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.1 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYT
 5 FTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREDKTA
 RNAMDYWGQGT LVTVSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
 LPPSQEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**E**EGDVFSC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3237);

10 y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
 anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

QSALTQPRASGNPGQRTVITSCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
 15 ISGLQSEDEAEYFCVAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsgggsgEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
 GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
 LPLHYYGMDVWGQGT TTVTSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQ**E**QMTKNQV**K**LTCVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 20 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3417);

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGT TTVTVSSggggsgggsgggsgggsgQSALTQPRASGNP
 25 GQRTVITSCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
 AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQ**E**QMTKNQV**K**LTCVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3427);

30

CPA.9.086 hIgG4 Variante 1

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSDTKVDKRVESKYGP
 35 PCPPCPAPPVA () GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ**E**QMTKNQV**K**LTCVLKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3457);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT

FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
YAMDYWGQGLTVTVSSSKYGPCCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
5 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3517);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsggggDIQMTQSPSSLSASVG
10 DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQG
QSYPTFTFGQGTKLEIKESKYGPCCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3527);
15 y

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
20 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCC
PPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3557);

25 En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.1 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
30 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsggggDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQH
FWGTPYFTFGQGTKLEIKESKYGPCCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCD**VS**GFYPSDIAVEWES**DS**QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSC
35 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3247);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

40 QSALTQPRASGNPGQRVITISCGSSSNMGRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQTSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsggggEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP

LPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYITLPPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3417);

5

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSSggggsgggsgggsgsQSALTQPRASGNP
 GQRVTISCSGSSSNMGRPVNWWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDAEYFC
 10 AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYITLPPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3427);

15 **CPA.9.086 hIgG4 Variante 1**

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGP
 PCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
 20 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3457);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFTGQGTKLEIKggggsgggsgggsgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
 FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
 YAMDYWGQGLTVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITL
 30 PPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3517);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 35 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsgsDIQMTQSPSSLSASVG
 DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQG
 QSYPTFTGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITL
 PPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
 40 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3527);

y

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSGKQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
5 PPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ**EQMTKNQV****KL**TCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3557) .

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
10 comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.1 hIgG4 Variante 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDYAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
15 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ**EQMTKNQV****KL**TCLVKGFYPS
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3257) ;

20 y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

QSALTQPRASGNPGRVTISCSGSSSNMGRFPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
25 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsggggsEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
GFTTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
LPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQ**EQMTKNQV**SLTCD**VS**GFYPSDIAVEWES**SD**GQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
30 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3437) ;

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSggggsgggsggggsQSALTQPRASGNP
35 GQRVTISCSGSSSNMGRFPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQ**EQMTKNQV**SLTCD**VS**GFYPSDIAVEWES**SD**GQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3447) ;

CPA.9.086 hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRIITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIT
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPYTFGQGTLKLEIKgggsgggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
YAMDYWGQGTITLVTSSESKEYGPPCPPCAP**PVA ()** GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLT**CDV**SGFYPSDIAVEWES**DD**GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGDV**FSCS
VMHEALHNHYTOKSLSLSPG (SEQ ID NO:3537);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGTLTVTVSSggggsgggsggggsDIQMTQSPSSLSASVG
DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQG
QSYPTFTFGQGTKLEIKESKYGPCCPPCAP**PVA ()** GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLT**CDV**SGFYPSDIAVEWES**DDG**QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGDV**FSCS
VMHEALHNHYTOKSLSLSPG (SEQ ID NO:3547);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSDTKVDKRVESKYGPC
PPCPAP**PVA ()** GPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTY
RVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCT**DS**GFYPS
DIAVEWES**DS**GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3567).

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYNINWVRQAPGGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTSDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKYTCNVDHKPS**D**TKVDKRVESKYGP
CPPCPAP**PVA ()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**K**OEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNST

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSGKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGTLLTVTVSSGggggsgggsgggsggggsDIQMTQSPSSLSASVG
 DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPKGAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQG
 5 QSYPYTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSQE**Q**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3527);

y

10

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSGKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
 YFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
 15 PPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**QEQ**MTKNQV**KLT**CLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3557).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
 20 comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.1 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 25 TSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLTVTVSSASVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 ECESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**SQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV**CT**LPPS**QDEL**TKNQV**SL**
 30 **CA**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**VS**RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:3655);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
 anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 35 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTTVTVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
 CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**SQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQV**S**
 40 **LW**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSPG (SEQ ID NO:3487);

CPA.9.086 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
 5 GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**W**CLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3507);

10 **CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 15 CESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**W**C
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
 LSPG (SEQ ID NO:3656);

y

20

CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
 25 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**W**CLVKGFY
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3607).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
 30 comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.1 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 35 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 ECESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQVSL**W**
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
 40 SLSPG (SEQ ID NO:3657);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
 anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
5 CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQDELTKNQVS
LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
10 SLSLSPG (SEQ ID NO:3477);

CPA.9.086 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
LVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDDHKPSNTKVDKRVESKY
15 GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3497);

CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN
FYPRFAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
25 CESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQDELTKNQVSLSC
AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
LSPG (SEQ ID NO:3658);

y

CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDDHKPSNTKVDKRVESKYGP
35 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQDELTKNQVSLSCAVKGFYPS
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3597).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
40 comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.1 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTILVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
5 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQDELTKNQVSLSCAVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 3297);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

10 **CPA.9.086 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón**
EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
15 TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVS
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPG (SEQ ID NO:3487);

20 **CPA.9.086 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón**
EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
25 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3507);

CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W
30 **Botón**
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTILVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
CESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
35 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
LSPG (SEQ ID NO:3659);

y

40 **CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón**
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTILVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV

KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGFY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

5 (SEQ ID NO:3607) .

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.1 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGFY
15 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3307) ;

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

20 CPA.9.086 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
25 TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSQDELTKNQVS
LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPG (SEQ ID NO:3477) ;

30 CPA.9.086 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
35 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSQDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3497) ;

40 CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 CESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQDELTKNQVSLSC
 AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
 LSPG (SEQ ID NO: 3660);

y

CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSGKQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQDELTKNQVSLSCAVKGFY
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3597).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.4 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYT
 FTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGSGSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAREDKTA
 RNAMDYWGQGLTVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSQEQMTKNQV**KLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3317);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

QSALTQPRASGNPQGRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsgggsgEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
 GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
 LPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCD**VS**GFYPSDIAVEWES**SD**QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3437);

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsgggsgQSALTQPRASGNP
 QGRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC

CPA.9.086 hIgG4 Variante 2

10

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIT
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPYTFGQGTKLEIKgggsgggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
YAMDYWGQGTITLVTSSESKEYGPPCPPCAP**PVA ()** GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWES**DG**QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGDV**FSCS
VMHEALHNHYTOKSLSLSPG (SEQ ID NO:3537);

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGTLLVTVSSggggsgggsgggsgsDIQMTQSPSSLSASVG
DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQG
QSYPTYFGQGTKLEIKESKYGPCCPPCAP**PVA ()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEEFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL
30 PPSQEEMTKNQVSLTCD**VS**GFYPSDIAVEWES**SD**GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCS
VMHEALHNHYTOKSLSLSPG (SEQ ID NO:3547);

y

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 2

35 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDPKPSDTKVDKRVESKYGPCC
PPCPAP**PVA** () GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEE**EF**NSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCD**DV**SGFYPS
40 DIAVEWES**SD**GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3567).

40

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.4 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsggggDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQH
FWGTPYTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQF
NWXVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
10 LPPSQEQ**MTKNQV**KLTCVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3327);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

15 QSALTQPRASGNPGQRTVISCSSSNMGRPVNWXQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsggggEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
LPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
20 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCD**VS**GFYPSDIAVEWES**SD**QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3437);

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

25 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsggggQSALTQPRASGNP
GQRTVISCSSSNMGRPVNWXQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
30 QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCD**VS**GFYPSDIAVEWES**SD**QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3447);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 2

35 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPS**DT**KVDRKVESKYGP
PCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCD**VS**GFY
PSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
40 (SEQ ID NO:3467);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPKGAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLT
 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFTGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
 FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
 YAMDYWGQGTLLTVTSSESKEYGPPCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
 5 WYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSQEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**E**EG**D**VFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3537);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTLLTVTS**S**ggggsgggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASVG
 DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPKGAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS**S**SSLQPEDFATYYCQQG
 QSYPTFTGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 15 PPSQEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**E**EG**D**VFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3547);

y

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 2

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTLLTVTSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
 YFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS**D**TKVDRKVESKYGPPC
 PPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**Q**EEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPS
 25 DIAVEWES**D**GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**E**EG**D**VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3567).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

30 **CHA.7.518.4 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPKGAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLT
 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYFTGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
 FTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGSGYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTA
 RNAMDYWGQGTLLTVTSSESKEYGPPCPPCPAP**PVA**() GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQF
 35 NWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
 LPPS**Q**EEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**E**EG**D**VFSC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3337);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

40

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

QSALTQPRASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRPVNWWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVAVDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsgggsgEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDP
LPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
5 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEQMTKNQ**VKLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3417);

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

10 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsgggsgQSALTQPRASGNP
GQRVTISCSGSSSNMGRPVNWWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
15 QVYTLPPSQEQMTKNQ**VKLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3427);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 1

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
20 KNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGP
PCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEQMTKNQ**VKLT**CLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
25 (SEQ ID NO:3457);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
30 FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKWLLSY
YAMDYWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEQMTKNQ**VKLT**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3517);

35

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASVG
DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQG
40 QSYPTFTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL

PPSQEQMTKNQV**KL**TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3527);

y

5 **CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 1**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
PPCPAP**PVA**(**)** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
10 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEQMTKNQV**KL**TCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3557).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

15

CHA.7.518.4 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDYAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsggggDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQH
20 FWGTPYTFGQGTKEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA**(**)** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREE**E**FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCD**V**SGFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**E**EGDVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3347);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
25 anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

QSALTQPRASGNPQGRVTISCSGSSSNMGRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsggggEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
30 GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
LPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA**(**)** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEQMTKNQV**KL**TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3417);

35

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsggggQSALTQPRASGNP
GQGRVTISCSGSSSNMGRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
40 AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA**(**)** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP

QVYTLPPSQEQMTKNQV~~KL~~TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3427);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 1

5 EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGP
PCPPCPAP~~PVA~~(~~)~~GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV~~KQ~~EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEQMTKNQV~~KL~~TCLVKGFY
10 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3457);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
15 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
YAMDYWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP~~PVA~~(~~)~~GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV~~KQ~~EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEQMTKNQV~~KL~~TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
20 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3517);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASVG
25 DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQG
QSYPTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP~~PVA~~(~~)~~GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV~~KQ~~EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEQMTKNQV~~KL~~TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3527);
30 y

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
35 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
PPCPAP~~PVA~~(~~)~~GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV~~KQ~~EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEQMTKNQV~~KL~~TCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3557).

40 En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.4 hIgG4 Variante 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELESSLRSED TAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
5 CPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQED**PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**QEQMTKNQV****KL**TCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3357);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
10 anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

QSALTQPRASGNPGRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsgggsgggsgEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
15 GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
LPLHYYGMDVWGQGT TTVTSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQED**P
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPS**QEEM**TKNQVSLT**CDV**SGFYPSDIAVEWES**SD**QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3437);

CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGT TTVTVSSggggsgggsgggsgggsgQSALTQPRASGNP
GQRTVITCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
25 AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQED**P
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPS**QEEM**TKNQVSLT**CDV**SGFYPSDIAVEWES**SD**QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3447);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 2

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS**DT**KVDKRVESKYGP
PCPPCPAP**PVA()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQED**PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NS
35 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**QEEM**TKNQVSLT**CDV**SGFY
PSDIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3467);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFTGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGLTVTVSSggggsgggsgggsggggDIQMTQSPSSLSASVG
DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQG
10 QSYPTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA ()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLT**CDVSG**FYPSDIAVEWES**DGQ**PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3547);

15

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGP
20 PPCPAP**PVA ()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**CDV**SGFYPS
DIAVEWES**DG**QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3567).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
25 comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.4 hIgG4 Variante 2

30 QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTDYNINWVRQAPGGGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELESSLRSED TAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV D HKPS**DT**KVDKRVESKYGPP
CPPCPAP**PVA ()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**EF**NST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS**QE**EMTKNQVSLT**CDV**SGFYF
SDIAVEWES**SD**GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW**EEGD**VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3367) ;

35 y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

40 QSALTQPRASGNPGQRVITISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLggggsgggsggggsEVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAAS
GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYIADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP
LPLHYYGMDVWGOGTTVTVSSESKYGPPCPPCPAP**PVA ()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP

EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3417);

5 CPA.9.086 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsgggsgSALTQPRASGNP
GQRVTISCSGSSSNMGRPVNWWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSEDEAEYFC
AVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDP
10 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3427);

CPA.9.086 hIgG4 Variante 1

15 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSDTKVDKRVESKYGP
PCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEQMTKNQVKLTCLVKGFY
20 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3457);

CHA.9.547.18 scFv (VL-enlazador-VH) hIgG4 Variante 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTI
25 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIKggggsgggsgggsgggsgEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT
FSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGSGSKQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSY
YAMDYWGQGTITVTVSSSESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
30 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3517);

CHA.9.547.18 scFv (VH-enlazador-VL) hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGSGSKQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTITVTVSSggggsgggsgggsgggsgDIQMTQSPSSLSASVG
35 DRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQG
QSYPTFGQGTKLEIKESKYGPPCPPCPAP**PVA()**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**KQ**EDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3527);

40 y

CHA.9.547.18 hIgG4 Variante 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCC
PPCPAP**PVA ()** GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV**KQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
5 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ**EQMTKNQV****KLT**CLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3557) .

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.4 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMEISSLRSEDYAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN
15 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ**CTLPPSQDEL**TKNQV**SL**
CAVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**VS**RSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSPG (SEQ ID NO:3661) ;

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
25 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQV
L**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
30 SLSLSPG (SEQ ID NO:3487) ;

CPA.9.086 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
35 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**CQDEL**TKNQV**SLW**CLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:3507) ;

CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 CESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 5 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLW
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
 LSPG (SEQ ID NO:3662);

y

10 **CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 15 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGFYPS
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3607).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

20

CHA.7.518.4 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 25 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 ECESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLW
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:3663);

30 y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

35 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
 CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQDELTKNQVS
 40 LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVDSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
 SLSLSPG (SEQ ID NO:3477);

CPA.9.086 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
 5 GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQ**DEL**TKNQVSL**SC**AVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**VS**RSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3497);

10 **CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTTLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 15 CESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV**CT**LPPS**QDEL**TKNQVSL**SC**
AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**VS**RSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
 LSPG (SEQ ID NO:3664);

y

20

CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTTLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
 25 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQ**DEL**TKNQVSL**SC**AVKGFY
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**VS**RSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3597).

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT
 30 comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

CHA.7.518.4 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDYAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTTLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
 35 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
 PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV**CT**LPPS**QDEL**TKNQVSL**SC**AVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL**VS**RSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3397);

40 y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia
 anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
 CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 5 TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVS
 LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
 SLSLSPG (SEQ ID NO:3487);

10 CPA.9.086 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
 GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 15 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3507);

CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 CESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLW
 25 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
 LSPG (SEQ ID NO:3665);

y

CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
 PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGFY
 35 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3607) .

En algunas modalidades, la porción anti-PVRIG del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende la secuencia siguiente anti-PVRIG

40 CHA.7.518.4 VH hIgG4 Fc Y354C E356D M348L T366W Botón

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL

VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYG
 PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

5 (SEQ ID NO:3407);

y la porción anti-TIGIT del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende una secuencia anti-TIGIT seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias:

CPA.9.086 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

10 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
 CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 15 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQDELTKNQVS
 LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVDSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
 SLSLSPG (SEQ ID NO:3477);

CPA.9.086 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

20 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKY
 GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQDELTKNQVSLSCAVKGF
 25 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVDSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3497);

CHA.9.547.18 VH Clambda- VL-CH1 Crossmab hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 CESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQDELTKNQVSLSC
 35 AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRITVDSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
 LSPG (SEQ ID NO:3666);

y

CHA.9.547.18 VH hIgG4 Fc Y349C E356D L358L T366S L368A Y407V Ojal

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLSSYYAMDYWGQGLTVTVSSASASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGP

PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQ**DEL**TKNQVSL**SCAV**KGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL**VS**RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO:3597).

5 Adicionalmente, se incluyen en la definición de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT los anticuerpos que comprenden dominios de unión a TIGIT que comparten identidad con los dominios de unión de los anticuerpos contra TIGIT enumerados en la presente. Es decir, en ciertas modalidades, un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de acuerdo con la invención comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son idénticas
 10 a la totalidad o parte de los dominios de unión de las secuencias de aminoácidos anti-TIGIT de anticuerpos anti-TIGIT preferidos, respectivamente, en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-TIGIT parentales. El por ciento de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología=núm. de posiciones idénticas/número total de posiciones X 100),
 15 en vistas del número de espacios, y la longitud de cada espacio, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del por ciento de identidad entre dos secuencias pueden lograrse mediante el uso de un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

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

Adicionalmente o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención pueden usarse además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos
 30 públicos para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse con el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y otros (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpos de acuerdo con al menos algunas modalidades de la invención. Para obtener alineaciones espaciadas
 35 para su comparación, puede usarse Gapped BLAST como se describe en Altschul y otros, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

En general, el porcentaje de identidad para la comparación entre los dominios de unión a TIGIT o los
 40 dominios de unión al antígeno es de al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, y se prefiere al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad. El porcentaje de identidad puede

estar a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, toda la cadena pesada o ligera o a lo largo de una porción de las cadenas. Por ejemplo, se incluyen dentro de la definición de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención aquellos cuya porción de unión a TIGIT o dominios de unión al antígeno comparten identidad a lo largo de toda la región variable (por ejemplo, donde la identidad es 95 % o 98 % idéntica a lo largo de las regiones variables), o a lo largo de toda la región constante, o a lo largo del dominio Fc. En particular, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que tienen porciones de unión a TIGIT o dominios de unión al antígeno con al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, con al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % por ciento de identidad preferida, con el anticuerpo CPA.9.086. En particular, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que tienen porciones de unión a TIGIT o dominios de unión al antígeno con al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, con al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % por ciento de identidad preferida, con el anticuerpo CHA.9.547.18.

Además, también se incluyen secuencias que pueden tener CDR idénticas pero cambian en las porciones de marco del dominio variable (o toda la cadena pesada o ligera). Por ejemplo, los anticuerpos de TIGIT incluyen aquellos con CDR idénticas a las mostradas en la Figura 23 pero cuya identidad a lo largo de la región variable puede ser menor, por ejemplo, 95 o 98 % idénticas. En particular, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que tienen porciones de unión a TIGIT o dominios de unión al antígeno con CDR idénticas a CPA.9.086, pero con regiones marco que son 95 % o 98 % idénticas a CPA.9.086. En particular, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que tienen porciones de unión a TIGIT o dominios de unión al antígeno con CDR idénticas a CHA.9.547.18, pero con regiones marco que son 95 % o 98 % idénticas a CHA.9.547.18.

Además, también se incluyen secuencias que pueden tener CDR idénticas pero cambian en las porciones de marco del dominio variable (o toda la cadena pesada o ligera). Por ejemplo, los anticuerpos de TIGIT incluyen aquellos con CDR idénticas a las mostradas en las Figuras 24A-24SSSS pero cuya identidad a lo largo de la región variable puede ser menor, por ejemplo, 95 o 98 % idénticas. En algunas modalidades, la porción de unión a TIGIT es a partir de un anticuerpo anti-TIGIT como se proporciona en el documento US2016/0176963A1, (incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad). En algunas modalidades, la porción de unión a TIGIT es a partir de un anticuerpo anti-TIGIT como se proporciona en el documento US20170281764 (incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad). En algunas modalidades, la porción de unión a TIGIT es a partir de un anticuerpo anti-TIGIT como se proporciona en el documento WO2015009856 (incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad). En algunas modalidades, la porción de unión a TIGIT es a partir de un anticuerpo anti-TIGIT como se proporciona en el documento US 9713641 (incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad). En algunas modalidades, la porción de unión a TIGIT es a partir de un anticuerpo anti-TIGIT como se proporciona en el documento WO2016028656 (incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad).

1. Anticuerpos de TIGIT que compiten por la unión

La presente invención proporciona no solo los anticuerpos enumerados sino además anticuerpos adicionales que compiten con los anticuerpos enumerados (los números de CPA enumerados en la presente que se unen específicamente a TIGIT) para unirse específicamente a la molécula TIGIT. Los anticuerpos contra TIGIT de la invención se "clasifican" en distintas categorías de epítomos. Entre los anticuerpos de TIGIT en el estudio de clasificación de epítomos, hay cuatro comunidades, cada una con patrones de bloqueo por pares relacionados, que se separan en 12 categorías discretas totales descritas en la presente. Hay doce categorías discretas descritas en la presente; 1) BM9-H4, CHA.9.525, CPA.9.081-H4, CHA.9.538, CHA.9.553, CPA.9.069-H4, CHA.9.543, CHA.9.556, CPA.9.077-H4 y CHA.9.561; 2) CHA.9.560 y CHA.9.528; 3) CHA.9.552, CHA.9.521, CHA.9.541, CHA.9.529, CHA.9.519, CHA.9.527 y CHA.9.549; 4) CPA.9.057-H4 y CHA.9.554; 5) CHA.9.546, CPA.9.012-H4, CHA.9.547, CPA.9.013-H4, CPA.9.018-H4, MBSA43-M1, Sino PVR-Fc(ligando), CHA.9.555, PVR-Fc M2A(ligando), BM29-H4, CPA.9.027-H4, CPA.9.049-H4 y CPA.9.053-H4; 6) CPA.9.064-H4; 7) BM26-H4; 8) CPA.9.059-H4; 9) CHA.9.535 y CPA.9.009-H4; 10) CHA.9.536, CHA.9.522 y CPA.9.015-H4; 11) CPA.9.011-H4 y BM8-H4 y 12) CPA.9.071-H4. Como se describe en el documento WO2018/033798, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. Por lo tanto, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que compiten por la unión con anticuerpos que se encuentran en las categorías discretas de epítomos 1 a 12. En una modalidad particular, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que compiten por la unión con CPA.9.086 y son al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a CPA.9.086.

Se generan anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT adicionales que compiten con los anticuerpos enumerados, como se conoce en la técnica y se describe en líneas generales a continuación. Los estudios de unión competitiva pueden realizarse como se conoce en la técnica, generalmente mediante el uso de ensayos de unión SPR/Biacore®, así como los ensayos ELISA y a base de células.

VII. Ácidos nucleicos que codifican anticuerpos

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

Las composiciones de ácido nucleico que codifican los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT dependerán del formato del anticuerpo. Los anticuerpos tetraméricos, tradicionales que contienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras están codificados por dos ácidos nucleicos diferentes, uno que codifica la cadena pesada y otro que codifica la cadena ligera. Estos pueden colocarse en un solo vector de expresión o dos vectores de expresión, como se conoce en la técnica, transformados en células huésped, donde se expresan para formar los anticuerpos de la invención. En algunas modalidades, por ejemplo, cuando se usan constructos scFv, se usa generalmente un único ácido nucleico que codifica la cadena pesada variable-enlazador-cadena ligera variable, que puede insertarse en un vector de expresión para la transformación en las células huésped. Los ácidos nucleicos pueden

colocarse en vectores de expresión que contienen las secuencias de control de transcripción y traducción apropiadas, que incluye, entre otras, secuencias de señal y secreción, secuencias reguladoras, promotores, orígenes de replicación, genes de selección, etc.

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT recombinantes de acuerdo con al menos algunas modalidades de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO), PER.C6, HEK293 y otras, como se conoce en la técnica.

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

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se ligan operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃ y otras analizadas en la presente, de manera que las secuencias V_H y V_L puedan expresarse como una proteína monocatenaria contigua, en donde las regiones V_L y V_H están unidas mediante el enlazador flexible.

VIII. Formulaciones

Las composiciones terapéuticas usadas en la puesta en práctica de los métodos anteriores (y en particular los anticuerpos biespecíficos que comprenden al menos las CDR de CHA.7.518.1, CHA.7.518.4, CPA.9.086, y/o CHA.9.547.18) pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un portador adecuado para el método de administración deseado. Los portadores adecuados incluyen cualquier material que, al combinarse con la composición terapéutica, retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y generalmente no es reactivo con el sistema inmunitario del paciente. Los ejemplos incluyen, entre otros, cualquiera de un número de portadores farmacéuticos estándar tales como soluciones salinas estériles tamponadas con fosfato, agua bacteriostática y similares (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición, A. Osal., Ed., 1980). Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y pueden incluir tampones.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT formulado en una composición farmacéutica comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.1.H4(S241P) VH IgG1 CH1 IgG4 CH2-CH3 S354C, E356D, M358L, T366W
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVERSKYGGP
 CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCODELTKNQVSLWCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:3175);

CHA.7.518.1.H4 (S241P) VL Ckappa

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
5 NO:3176);

y

CPA.9.086 HC Clambda Crossmab IgG4 Y349C, E356D, M358L, T366S, L368A, Y407V
10 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSQDELTKNQVS
15 LSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLVSRSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO: 3177);

CPA.9.086 LC CH1

QSALTQPRASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
20 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID
NO:3178).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT formulado en una
25 composición farmacéutica comprende las siguientes secuencias:

Secuencia de anticuerpos para PVRIG (definición de IMGT CDR en negrita y subrayada)

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 3179);

30

CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVS~~ENIYDV~~LAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

35 y

Secuencia de anticuerpos para TIGIT (definición de IMGT CDR en negrita y subrayada)

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
40 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWL~~LSYYAMDY~~WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 1664);

CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMATWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PVRIG formulado en una composición farmacéutica comprende las siguientes secuencias:

5 *Secuencia de anticuerpos para PVRIG (definición de IMGT CDR en negrita y subrayada)*

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 3179);

10 y

CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180).

15 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TIGIT formulado en una composición farmacéutica comprende las siguientes secuencias:

Secuencia de anticuerpos para TIGIT (definición de IMGT CDR en negrita y subrayada)

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
20 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 1664);

y

CHA.9.547.18 VL

25 DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMATWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

En una modalidad preferida, la composición farmacéutica que comprende los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención puede estar en una forma soluble en agua, tal como estar presente en forma de sales farmacéuticamente aceptables, que se pretende que incluyan sales de adición ácidas y básicas. "Sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son biológicamente o de otra manera indeseables, formadas con ácidos inorgánicos y similares. Las "sales de adición básica farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas y similares.

La administración de la composición farmacéutica que comprende anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la presente invención, preferentemente en forma de una solución acuosa estéril, puede realizarse de varias maneras, las cuales incluyen, entre otras, subcutáneas e intravenosas.

Las cantidades de dosis y las frecuencias de administración, en una modalidad preferida, se seleccionan para que sean eficaces terapéuticamente o profilácticamente. Como se conoce en la técnica, los ajustes para la degradación de proteínas, la administración sistémica en comparación con la localizada, y la tasa de síntesis de nuevas proteasas, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la interacción farmacológica y la gravedad

de la afección pueden ser necesarios, y podrán determinarse mediante experimentación de rutina por expertos en la técnica.

Para tratar a un paciente, puede administrarse una dosis terapéuticamente eficaz de la variante Fc de la presente invención. Por "dosis terapéuticamente eficaz" en la presente se entiende una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y un experto en la técnica podrá determinarla mediante el uso de técnicas conocidas.

IX. Métodos para el uso de anticuerpos

Los anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención pueden usarse en varias aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. En algunos casos, la decisión del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT a administrar a un paciente se realiza mediante el uso de una evaluación de los niveles de expresión (ya sea los niveles de expresión génica o los niveles de expresión de proteínas, donde se prefiere este último) de biopsias de muestras de tumores para determinar si la muestra sobreexpresa TIGIT y/o PVRIG, para determinar el anticuerpo terapéutico a administrar.

A. Usos diagnósticos

En consecuencia, los anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención se usan además en el diagnóstico *in vitro* o *in vivo*, lo que incluye la formación de imágenes, de tumores que sobreexpresan PVRIG y/o TIGIT, respectivamente. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, como se analiza en la presente, tanto TIGIT como PVRIG, como proteínas diana inmunooncológicas, no se sobreexpresan necesariamente en las células cancerosas, sino más bien en los infiltrados inmunitarios en el cáncer (por ejemplo, en el microambiente tumoral, denominado además TME). Por lo tanto, este es el mecanismo de acción, *por ejemplo*, la activación de células inmunitarias tales como los linfocitos T y las células NK, da como resultado el diagnóstico de cáncer. En consecuencia, estos anticuerpos pueden usarse para diagnosticar cáncer. El diagnóstico con anticuerpos PVRIG se describe además en el documento WO 2016/134333, [0434 a 0459], incorporado en la presente como referencia.

Generalmente, el diagnóstico puede realizarse de varias maneras. En una modalidad, un tejido de un paciente, tal como una muestra de biopsia, se pone en contacto con un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT, marcado generalmente, de manera que el anticuerpo se une al TIGIT endógeno. El nivel de señal se compara con el del tejido normal no canceroso, ya sea del mismo paciente o de una muestra de referencia, para determinar la presencia o ausencia de cáncer. La muestra de biopsia puede ser de un tumor sólido, una muestra de sangre (para linfomas y leucemias tales como la LLA, el linfoma de linfocitos T, etc.).

En general, en esta modalidad, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT se marca, por ejemplo, con un fluoróforo u otro marcador óptico, que se detecta mediante el uso de un fluorómetro u otro sistema de detección óptica como se conoce bien en la técnica. En una modalidad alternativa, un anticuerpo marcado secundario se pone en contacto con la muestra, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo IgG anti-humano generado en un mamífero diferente (ratón, rata, conejo, cabra, etc.) para formar un ensayo tipo sándwich como se conoce en la técnica. Alternativamente, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT puede marcarse directamente (*por ejemplo*, con biotina) y la detección puede realizarse mediante un Ab secundario dirigido al agente de marcado de la técnica.

Una vez que se observa la sobreexpresión de TIGIT, el tratamiento puede proceder con la administración de un anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de acuerdo con la invención como se describe en la presente.

En otras modalidades, se realiza el diagnóstico *in vivo*. Generalmente, en esta modalidad, el anticuerpo anti-TIGIT (que incluye fragmentos de anticuerpo) se inyecta en el paciente y se realiza la formación de imágenes. En esta modalidad, por ejemplo, el anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT está generalmente marcado con un marcador óptico o un marcador de MRI, tal como un quelato de gadolinio, marcaje radioactivo de mAb (que incluye fragmentos).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT descritos en la presente se usan tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, o solo para el diagnóstico. Cuando se usan anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, algunas modalidades se basan en dos anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT diferentes para dos epítomos diferentes (por ejemplo, para dos epítomos diferentes dentro de TIGIT o PVRIG, o en base a su naturaleza biespecífica de unión a PVRIG y TIGIT), de manera que el anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT para el diagnóstico no compite por la unión con el anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT terapéutico, aunque en algunos casos el mismo anticuerpo puede usarse para ambos. Por ejemplo, esto puede realizarse mediante el uso de anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que están en diferentes categorías, *por ejemplo*, que se unen a diferentes epítomos en TIGIT o diferentes epítomos en PVRIG, como se describe en la presente. Por lo tanto, se incluyen en la invención composiciones que comprenden anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de diagnóstico y un anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT, y en algunas modalidades, los anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de diagnóstico se marcan como se describe en la presente. Además, la composición de los anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT también puede coadministrarse con otros fármacos como se describe en la presente.

Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT particularmente útiles para uso en el diagnóstico incluyen, pero no se limitan a estos anticuerpos enumerados, o anticuerpos que utilizan las CDR con secuencias variantes, o aquellos que compiten por la unión con cualquiera de los anticuerpos en las Figuras 5, 7 y/o 23.

En muchas modalidades, se marca un anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de diagnóstico. Por "marcado" en la presente se entiende que los anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT descritos en la presente tienen uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para permitir la detección en una pantalla o procedimiento de diagnóstico. En general, los marcadores se clasifican en varias clases: a) marcadores inmunitarios, que pueden ser un epítipo incorporado como un socio de fusión reconocido por un anticuerpo, b) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados, c) marcadores de moléculas pequeñas, que pueden incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como la biotina que permiten otros métodos de marcaje, y d) marcadores tales como

partículas (que incluye burbujas para el marcaje por ultrasonido), o marcadores paramagnéticos que permiten formar imágenes del cuerpo. Los marcadores pueden incorporarse en los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT en cualquier posición y pueden incorporarse in vitro o in vivo durante la expresión de proteínas, como se conoce en la técnica.

- 5 El diagnóstico puede realizarse in vivo, mediante la administración de un anticuerpo de diagnóstico que permita formar imágenes de todo el cuerpo como se describe a continuación, o in vitro, en muestras extraídas de un paciente. Una "muestra" en este contexto incluye cualquier número de cosas, que incluye, entre otras, fluidos corporales (que incluye, entre otros, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, transpiración y semen), así como muestras de tejidos como resultado
- 10 de biopsias de tejidos relevantes.

Además, como se describe a continuación y en los Ejemplos y Figuras, la información con respecto a los niveles de expresión de proteínas de ya sea PVRIG y/o TIGIT, puede usarse para determinar qué anticuerpos deberían administrarse a un paciente.

B. Tratamiento contra el cáncer

- 15 Los anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención encuentran un uso particular en el tratamiento del cáncer como una monoterapia. Debido a la naturaleza de un mecanismo de acción inmunooncológico, PVRIG y/o TIGIT no necesariamente tienen que estar sobreexpresados o correlacionados con un tipo particular de cáncer; es decir, el objetivo es hacer que los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT eliminen la supresión de la
- 20 activación de los linfocitos T y células NK, de modo que el sistema inmunitario persiga los cánceres.

- En algunas modalidades, un anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las secuencias de anticuerpos anti-PVRIG de las Figuras 4, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 26, y/o 40, encuentran uso en el tratamiento del cáncer (incluida la activación de linfocitos T y/o células NK como se describe a continuación), en particular las que comprenden una
- 25 sustitución S241P. Mientras que cualquier anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenda las secuencias de anticuerpos anti-PVRIG de las Figuras 4, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 26, y/o 40, encuentran uso en el tratamiento del cáncer (incluida la activación de linfocitos T y/o células NK como se describe a continuación), los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden CHA.7.518.1, CHA.7.518.4, y/o CHA.7.538.2
- 30 encuentran un uso particular en algunas modalidades.

- Mientras que cualquier anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenda las secuencias de anticuerpos anti-TIGIT de las Figuras 23, 24, y/o 41 encuentran uso en el tratamiento del cáncer (incluida la activación de linfocitos T y/o células NK como se describe a continuación), los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que CPA.9.086.H4(S241P), CPA.9.083.H4(S241P),
- 35 CHA.9.547.7.H4(S241P), y CHA.9.547.13.H4(S241P), CHA.9.547.18 encuentran un uso particular en algunas modalidades.

- En algunas modalidades, la presente invención también proporciona anticuerpos anti-PVRIG que comprenden las secuencias de anticuerpos anti-PVRIG de las Figuras 4, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 26, y/o 40, que encuentran uso en el tratamiento del cáncer (incluida la activación de linfocitos T y/o
- 40 células NK como se describe a continuación). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PVRIG comprenden:

Secuencia de anticuerpos para PVRIG (definición de IMGT CDR en negrita y subrayada)

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS**GYTFTDYN**INWVRQAPGQGLEWMGY**IYPYIGGS**GYAQKFQGRVTMTRDTS

5 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYC**AREDKTARNAMDY**WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 3179);

y

CHA.7.518.4 VL

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVS**ENIYDV**LAWYQQKPGKAPKLLIY**EAT**NLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYC**QHFWGTPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180).

Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención encuentran un uso particular en el tratamiento del cáncer. En general, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención son inmunomoduladores, en el sentido de que, en lugar de atacar directamente las células cancerosas, los anticuerpos de la invención estimulan el sistema inmunitario, generalmente al inhibir la acción del receptor del punto de control (*por ejemplo*, PVRIG o TIGIT). Por lo tanto, a diferencia de los tratamientos dirigidos a tumores, que tienen como objetivo inhibir las vías moleculares que son cruciales para el crecimiento y desarrollo tumorales, y/o disminuir las células tumorales, la inmunoterapia contra el cáncer se dirige a estimular el propio sistema inmunitario del paciente para eliminar las células cancerosas, lo que proporciona una destrucción tumoral a largo plazo. Pueden usarse diversos enfoques en la inmunoterapia contra el cáncer; entre ellos están las vacunas terapéuticas contra el cáncer para inducir respuestas de linfocitos T específicas de tumores, y anticuerpos inmunoestimuladores (es decir, antagonistas de receptores inhibidores = puntos de control inmunitarios) para eliminar las vías inmunosupresoras.

Las respuestas clínicas con tratamiento dirigido o tratamientos convencionales contra el cáncer tienden a ser transitorias a medida que las células cancerosas desarrollan resistencia, y se produce una recidiva del tumor. Sin embargo, el uso clínico de la inmunoterapia contra el cáncer en los últimos años ha demostrado que este tipo de tratamiento puede tener respuestas clínicas duraderas, y tienen un impacto considerable en la supervivencia a largo plazo. Sin embargo, aunque las respuestas son a largo plazo, solo un pequeño número de pacientes responde (a diferencia del tratamiento convencional o dirigido, donde responde un gran número de pacientes, pero las respuestas son transitorias).

Cuando se detecta clínicamente un tumor, este ya ha evadido el sistema inmunitario de defensa al adquirir propiedades inmunorresistentes e inmunosupresoras y al crear un microambiente tumoral inmunosupresor a través de diversos mecanismos y una variedad de células inmunitarias.

En consecuencia, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención son útiles en el tratamiento del cáncer. Debido a la naturaleza de un mecanismo de acción inmunooncológico, el receptor del punto de control (TIGIT o PVRIG) no necesariamente tiene que estar sobreexpresado o correlacionado con un tipo particular de cáncer; es decir, el objetivo es hacer que los anticuerpos eliminen la supresión de la activación de los linfocitos T y las células NK, de modo que el sistema inmunitario persiga los cánceres.

Como se usa en la presente descripción, "cáncer" se refiere ampliamente a cualquier enfermedad neoplásica (ya sea invasiva o metastásica) caracterizada por una división celular anormal y no controlada que causa un crecimiento maligno o un tumor (por ejemplo, un crecimiento celular no regulado). Como se usan en la presente, los términos "cáncer" o "canceroso" deben entenderse como

- 5 que abarcan cualquier enfermedad neoplásica (ya sea invasiva, no invasiva o metastásica) que se caracteriza por una división celular anormal y no controlada que causa un crecimiento maligno o un tumor, de lo cual se describen ejemplos no limitantes en la presente. Esto incluye cualquier afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Se ilustran ejemplos de tipos de cáncer en los ejemplos de trabajo y también se describen en la descripción.
- 10 Los ejemplos no limitantes de tipos de cáncer que pueden tratarse mediante el uso de los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de tales tipos de cáncer incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de
- 15 peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (que incluye cáncer gastrointestinal), cáncer de esófago, melanoma, mesotelioma, cáncer de células de Merkel, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides,
- 20 carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de laringe, cáncer de la cavidad oral, cáncer urotelial, tumores mutantes KRAS, síndromes mielodisplásicos (MDS), así como también neoplasias de linfocitos B, linfoma de linfocitos B (que incluye el linfoma no Hodgkin (NHL) de grado bajo/folicular); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de grado alto; NHL linfoblástico de grado alto; NHL de células
- 25 pequeñas no segmentadas de grado alto; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos; mieloma; mieloma múltiple y trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), neoplasias linfoides, proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales) y síndrome de Meigs, cáncer
- 30 de recto, cáncer de células renales, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de ovario temprano o avanzado (que incluye metastásico).

Como se muestra en los ejemplos de WO2016/134333, el PVRIG se sobreexpresa y/o se correlaciona con la infiltración de linfocitos tumorales (como se demuestra mediante la correlación con la expresión

35 de CD3, CD4, CD8 y PD-1) en varios tumores diferentes de diversos orígenes, y por lo tanto, es útil en el tratamiento de cualquier tipo de cáncer, que incluye, entre otros, cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de piel no melanoma

40 (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (CCR), linfoma (linfoma no Hodgkin (NHL) y linfoma de Hodgkin (HD)), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoblástica

aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, y cáncer de esófago.

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden CHA.7.518.1 como la porción de unión a PVRIG pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), cáncer de esófago. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden CHA.7.538.1.2 como la porción de unión a PVRIG pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), cáncer de esófago. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden CHA.7.518.4 como la porción de unión a PVRIG pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer

de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), cáncer de esófago. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas),

5 cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden CPA.9.086 pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas,

10 cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células

15 germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), cáncer de esófago. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer

20 con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden CPA.9.083 pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas,

25 cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células

30 germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), cáncer de esófago. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer

35 con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden CHA.9.547.7 pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de

40 páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de

pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), cáncer de esófago. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden CHA.9.547.13 pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden CPA.9.547.18 pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), cáncer de esófago. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), en donde el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.1.H4 (S241P) VH IgG1 CH1 IgG4 CH2-CH3 S354C, E356D, M358L, T366W
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 15 *TSTVYMEISSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK*
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 20 (SEQ ID NO:3175);

CHA.7.518.1.H4 (S241P) VL Ckappa
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQKPKGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 25 *DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID
 NO:3176);

y

CPA.9.086 HC Clambda Crossmab IgG4 Y349C, E356D, M358L, T366S, L368A, Y407V
EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYYAAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 35 *KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQDELTKNQVS*
LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO:3177);

CPA.9.086 LC CH1

40 *QSALTQPRASGNPGQRTVISCSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT*
ISGLQSEDEAEYFCVAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT

VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID NO:3178) .

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden las siguientes secuencias pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), en donde el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT incluye cualquiera de los siguientes anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT:

un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.1 VH
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1539);

CHA.7.518.1 VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCQHFHWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544);

CPA.9.086 VH
 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:1634);

CPA.9.086 VL
 QSALTQPRASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639);

un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:3179);

5 CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFVGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

Y

10

CPA.9.086 VH

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:1634);

15 CPA.9.086 VL

QSALTQPRASGNPGQRTVITSCGSSSNMGRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639);

O

20 un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.1 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:1539);

25 CHA.7.518.1 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFVGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544);

y

30

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:1664);

35 CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668);

O

40 un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:3179);

CHA.7.518.4 VL

- 5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

y

- 10 CHA.9.547.18 VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGSGSKQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:1664);

CHA.9.547.18 VL

- 15 DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

- En particular, los anticuerpos anti-PVRIG que comprenden las siguientes secuencias pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), en donde el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT incluye cualquiera de los siguientes anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT:

un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

- 35 CHA.7.518.1 VH
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:1539);

CHA.7.518.1 VL

- 40 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544);

y

CPA.9.086 VH

5 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:1634);

CPA.9.086 VL

10 QSALTQPRASGNPGQRTVITSCGSSSNMGRPVNWWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639);

O

un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.4 VH

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:3179);

CHA.7.518.4 VL

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

y

CPA.9.086 VH

25 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:1634);

CPA.9.086 VL

30 QSALTQPRASGNPGQRTVITSCGSSSNMGRPVNWWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639);

O

un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.1 VH

35 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:1539);

CHA.7.518.1 VL

40 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544);

y

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:1664);

5 CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLT
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668);

O

10 un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:3179);

15 CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLT
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

y

20

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYIAMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:1664);

25 CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLT
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprenden las siguientes secuencias pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de

linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS), en donde el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT incluye cualquiera de los siguientes anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT:

un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

5 CHA.7.518.1 VH
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGGGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1539);

CHA.7.518.1 VL

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544);

y

15 CPA.9.086 VH
EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:1634);

CPA.9.086 VL

20 QSALTQPRASGNPGQRTVITSCGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639);

O

un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.4 VH
25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGGGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:3179);

CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
30 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

Y

CPA.9.086 VH

35 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:1634);

CPA.9.086 VL

QSALTQPRASGNPGQRTVITSCGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
40 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639);

O

un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.1 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1539);

5

CHA.7.518.1 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544);

10 y

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1664);

15

CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMALWSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668);

20 O

un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:3179);

25

CHA.7.518.4 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

30 y

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1664);

35

CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMALWSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

40 En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

En particular, los anticuerpos anti-PVRIG que comprenden las siguientes secuencias pueden usarse en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de hígado (HCC), cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer urotelial, cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (RCC), linfoma (NHL o HL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL), linfoma difuso de linfocitos B grandes, tumores de células germinales de testículo, mesotelioma, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS):

un anticuerpo anti-PVRIG que comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:3179)

y

CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFHWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180).

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama triple negativo, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón (de pulmón de células pequeñas, de pulmón de células no pequeñas), cáncer de células de Merkel, cáncer con alta MSI, tumores mutantes KRAS, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, mieloma y síndromes mielodisplásicos (MDS).

C. Terapias combinadas

Como se conoce en la técnica, las terapias combinadas que comprenden un anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT terapéutico que se dirige a una diana de inmunoterapia y un agente terapéutico adicional, específico para la enfermedad, se muestran muy prometedores. Por ejemplo, en el área de la inmunoterapia, existen varias terapias combinadas prometedores que usan un agente quimioterapéutico (ya sea un fármaco de molécula pequeña o un anticuerpo antitumoral) o un anticuerpo inmunooncológico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención).

Los términos "en combinación con" y "coadministración" no se limitan a la administración de los agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo. En su lugar, significan que el anticuerpo y el otro agente o agentes se administran en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que pueden actuar juntos para proporcionar un beneficio que se incrementa en comparación con el tratamiento ya sea solo con el anticuerpo de la presente invención o con el otro agente o agentes. Se prefiere que el anticuerpo y el otro agente o agentes actúen de forma aditiva, y se prefiere especialmente que actúen sinérgicamente. Tales moléculas están adecuadamente presentes de forma conjunta en cantidades que son efectivas para el propósito previsto. El médico profesional capacitado

puede determinar empíricamente, o en consideración de la farmacocinética y los modos de acción de los agentes, la dosis o dosis adecuadas de cada agente terapéutico, así como los tiempos y métodos de administración adecuados.

En consecuencia, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT GIT de la presente invención pueden administrarse de forma concomitante con uno o más regímenes o agentes terapéuticos. Los agentes o regímenes terapéuticos adicionales pueden usarse para mejorar la eficacia o seguridad del anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT. Además, los agentes o regímenes terapéuticos adicionales pueden usarse para tratar la misma enfermedad o una comorbilidad en lugar de alterar la acción del anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PVRIG, anti-TIGIT y/o anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de la presente invención puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, radioterapia o tanto quimioterapia como radioterapia.

1. PVRIG, TIGIT, y/o anticuerpos biespecíficos PVRIG/TIGIT con moléculas pequeñas quimioterapéuticas

Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la presente invención pueden administrarse en combinación con uno o más agentes profilácticos o terapéuticos, que incluyen, entre otros, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de quinasa, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, inmunoestimuladores, agentes inmunosupresores, agentes que promueven la proliferación de células hematológicas, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la proteína tirosina quinasa (PTK) u otros agentes terapéuticos.

En este contexto, un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida, alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminasas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el topotecán análogo sintético (HYCAMTN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gammall y calicheamicina omegall (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteínas relacionados), aclacinomisinas,

actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (que incluye morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; regenerador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaciuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK.RTM. (JHS Natural Products, Eugene, Oregón); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, Nueva Jersey), ABRAXANE®, formulación de nanopartículas modificadas con albúmina y sin cremóforos de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel (TAXOTERE®; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucil; gemcitabina (GEMZARM®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como **cisplatino** y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona; CVP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN®) en combinación con 5-FU y leucovorina.

De acuerdo con al menos algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención podrían usarse en combinación con cualquiera de los tratamientos contra el cáncer estándares conocidos en la técnica (como puede encontrarse, por ejemplo, en <http://www.cancer.gov/cancertopics>).

Por tanto, en algunos casos, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT descritos en la presente (particularmente aquellos que incluyen CHA.7.538.1.2 y/o CHA.7.518.1 como la porción de unión a PVRIG) pueden combinarse con agentes quimioterapéuticos. De manera similar, los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT descritos en la presente (en particular los que incluyen CPA.9.086, CPA.9.083 y/o CHA.9.547.13 como la porción de unión a TIGIT) pueden combinarse con agentes quimioterapéuticos.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que puede combinarse con agentes quimioterapéuticos comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.1.H4 (S241P) VH IgG1 CH1 IgG4 CH2-CH3 S354C, E356D, M358L, T366W
 10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP
 CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQDELTKNQVSLWCLVKGFYPS
 15 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:3175)

CHA.7.518.1.H4 (S241P) VL Ckappa

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 20 SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO:3176)

CPA.9.086 HC Clambda Crossmab IgG4 Y349C, E356D, M358L, T366S, L368A, Y407V
 EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
 25 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSASGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
 CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSQDELTKNQVS
 LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
 30 SLSLSPGK (SEQ ID NO:3177)

CPA.9.086 LC CH1

QSALTQPRASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
 ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 35 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID
 NO:3178)

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que puede combinarse con agentes quimioterapéuticos comprende las siguientes secuencias:

Secuencia de anticuerpos para PVRIG (definición de IMGT CDR en negrita y subrayada)

CHA.7.518.4 VH
 40 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 3179);

CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180);

Y

5 Secuencia de anticuerpos para TIGIT (definición de IMGT CDR en negrita y subrayada)

CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1664);

CHA.9.547.18 VL

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQOGQSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que puede combinarse con agentes quimioterapéuticos comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.1

VH

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1539)

CHA.7.518.1 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544)

20 Y

CPA.9.086 VH

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:1634)

CPA.9.086 VL

25 QSALTQPRASGNPQGRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que puede combinarse con agentes quimioterapéuticos comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.4 VH

30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:3179)

CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWEYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180)

35 Y

CPA.9.086 VH

EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:1634)

CPA.9.086 VL

40 QSALTQPRASGNPQGRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLT
ISGLQSEDEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVL (SEQ ID NO:1639).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que puede combinarse con agentes quimioterapéuticos comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.1 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS

5 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 1539)

CHA.7.518.1 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI

SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1544)

Y

10 CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN

KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1664)

CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI

15 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT que puede combinarse con agentes quimioterapéuticos comprende las siguientes secuencias:

CHA.7.518.4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTS

20 TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:3179)

CHA.7.518.4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYDVLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTI

SSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:3180)

Y

25 CHA.9.547.18 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGSKGQYYADSVKGRFTISRDN

KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1664)

CHA.9.547.18 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQSMAIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI

30 SSLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1668).

D. Evaluación del tratamiento

Generalmente, los anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT, y/o los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención se administran a pacientes con cáncer, y la eficacia se evalúa de varias maneras descritas en la presente. Por lo tanto, aunque pueden realizarse ensayos estándar de eficacia, tales como carga de cáncer, tamaño del tumor, evaluación de la presencia o extensión de metástasis, etc.; pueden evaluarse además los tratamientos inmunooncológicos en base a las evaluaciones del estado inmunitario. Esto puede realizarse de varias formas, que incluyen ensayos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, puede realizarse una evaluación de los cambios en el estado inmunológico (por ejemplo, presencia de linfocitos T ICOS+ CD4+ después del tratamiento con ipi) junto con mediciones "a la vieja usanza", como masa tumoral, tamaño, invasividad, participación de LN, metástasis, etc. Por lo tanto, puede evaluarse cualquiera de los siguientes o todos ellos: los efectos

inhibidores de PVRIG o TIGIT en la activación o proliferación de linfocitos T CD4⁺, la activación o proliferación de linfocitos T CD8⁺ (CTL), la actividad citotóxica mediada por linfocitos T CD8⁺ y/o la reducción celular mediada por CTL, la actividad de las células NK y la reducción celular mediada por NK, los efectos potenciadores de PVRIG o TIGIT en la diferenciación y proliferación de linfocitos Treg y la inmunosupresión o tolerancia inmunitaria mediadas por células supresoras derivadas de Treg o mieloides (MDSC), y/o los efectos de PVRIG o TIGIT en la producción de citocinas proinflamatorias por parte de células inmunitarias, por ejemplo, producción de IL-2, IFN- γ o TNF- α por linfocitos T u otras células inmunitarias.

En algunas modalidades, la evaluación del tratamiento se realiza al evaluar la proliferación de células inmunitarias, mediante el uso de, por ejemplo, el método de dilución con CFSE, la tinción intracelular con Ki67 de las células efectoras inmunitarias y el método de incorporación de timidina 3H.

En algunas modalidades, la evaluación del tratamiento se realiza al evaluar el aumento de la expresión génica o los niveles aumentados de proteína de marcadores asociados a la activación, que incluyen uno o más de: CD25, CD69, CD137, ICOS, PD1, GITR, OX40 y la desgranulación celular medida por la expresión superficial de CD107A.

En algunas modalidades, la evaluación del tratamiento se realiza al evaluar la cantidad de proliferación de linfocitos T en ausencia de tratamiento, por ejemplo, antes de la administración de los anticuerpos de la invención. Si, después de la administración, el paciente experimenta un aumento de la proliferación de linfocitos T, por ejemplo, un subconjunto de linfocitos T del paciente está proliferando, esto da indicios de que los linfocitos T se activaron.

De manera similar, la evaluación del tratamiento con los anticuerpos de la invención puede realizarse al medir los niveles de IFN γ del paciente antes de la administración y después de la administración para evaluar la eficacia del tratamiento. Esto puede realizarse en horas o días.

En general, los ensayos de expresión génica se realizan como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Goodkind y otros, *Computers and Chem. Eng.* 29(3):589 (2005), Han y otros, *Bioinform. Biol. Insights* 11/15/15 9(Supl. 1):29-46, Campo y otros, *Nod. Pathol.* enero de 2013; 26 supl. 1:S97-S110, cuyas técnicas de medición de la expresión génica se incorporan expresamente en la presente como referencia.

En general, las mediciones de la expresión de proteínas también se realizan de manera similar como se conoce en la técnica; véase, por ejemplo, Wang y otros, *Recent Advances in Capillary Electrophoresis-Based Proteomic Techniques for Biomarker Discovery*, *Methods. Mol. Biol.* 2013:984:1-12; Taylor y otros, *BioMed Res.* volumen 2014, ID del artículo 361590, 8 páginas, Becerk y otros, *Mutat. Res* junio de 2011 17:722(2): 171-182, cuyas técnicas de medición se incorporan expresamente en la presente como referencia.

En algunas modalidades, se realiza la evaluación del tratamiento al evaluar la actividad citotóxica medida por la detección de la viabilidad de las células diana a través de la estimación de numerosos parámetros celulares, tales como la actividad enzimática (que incluye la actividad de proteasa), la permeabilidad de la membrana celular, la adherencia celular, la producción de ATP, la producción de coenzimas y la actividad de absorción de nucleótidos. Los Ejemplos específicos de estos ensayos incluyen, entre otros, tinción con azul de tripano o PI, método de liberación de ⁵¹Cr o ³⁵S, actividad de LDH, ensayos de MTT y/o WST, ensayo de calceína-AM, ensayo de luminiscencia, y otros.

En algunas modalidades, se realiza la evaluación del tratamiento al evaluar la actividad de los linfocitos T medida por la producción de citocinas, ya sea intracelularmente en el sobrenadante del cultivo mediante el uso de citocinas que incluyen, entre otras, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF, IL2, IL6, IL4, IL5, IL10, IL13 mediante técnicas bien conocidas.

- 5 En consecuencia, la evaluación del tratamiento puede realizarse mediante el uso de ensayos que evalúan uno o más de los siguientes: (i) aumentos en la respuesta inmunitaria, (ii) aumentos en la activación de los linfocitos T $\alpha\beta$ y/o $\gamma\delta$, (iii) aumentos en la actividad de linfocitos T citotóxicos, (iv) aumentos en la actividad de las células NK y/o NKT, (v) alivio de la supresión de los linfocitos T $\alpha\beta$ y/o $\gamma\delta$, (vi) aumentos en la secreción de citocinas proinflamatorias, (vii) aumentos en la secreción de IL-2; 10 (viii) aumentos en la producción de interferón- γ , (ix) aumentos en la respuesta de Th1, (x) reducciones en la respuesta de Th2, (xi) reducciones o eliminaciones de número y/o actividad celulares de al menos uno de los linfocitos T reguladores (Treg).

E. Ensayos para medir la eficacia

- 15 En algunas modalidades, la activación de linfocitos T se evalúa mediante un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR) como se describe en los Ejemplos. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la respuesta inmunitaria según la medición, por ejemplo, mediante fosforilación o desfosforilación de diferentes factores, o mediante la medición de otras modificaciones posteriores a la traducción. Un aumento de la 20 actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la activación de los linfocitos T $\alpha\beta$ y/o $\gamma\delta$ según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación, tales como, por ejemplo, CD137, 25 CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la actividad de los linfocitos T citotóxicos según la medición, por ejemplo, mediante destrucción directa de células diana tales como, por ejemplo, células cancerosas, o mediante secreción de citocinas o proliferación o 30 cambios en la expresión de marcadores de activación, tales como, por ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la actividad de las células NK y/o las células NKT según la medición, por ejemplo, mediante destrucción directa de 35 células diana tales como, por ejemplo, células cancerosas, o mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación, tales como, por ejemplo, CD107a, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la supresión 40 de los linfocitos T $\alpha\beta$ y/o $\gamma\delta$ según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación, tales como, por ejemplo, CD137,

CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la secreción de citocinas proinflamatorias según la medición, por ejemplo, mediante ELISA o Luminex o métodos de formato múltiple a base de microesferas o mediante tinción intracelular y análisis FACS o mediante Alispot, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la secreción de IL-2 según la medición, por ejemplo, mediante ELISA o Luminex o métodos de formato múltiple a base de microesferas o mediante tinción intracelular y análisis FACS o mediante Alispot, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la producción de interferón- γ según la medición, por ejemplo, mediante ELISA o Luminex o métodos de formato múltiple a base de microesferas o mediante tinción intracelular y análisis FACS o mediante Alispot, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la respuesta de Th1 según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la respuesta de Th2 según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la cantidad y/o actividad celulares de al menos uno de los linfocitos T reguladores (Treg), según la medición, por ejemplo, mediante citometría de flujo o IHC. Una disminución de la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de los números de células de macrófagos M2 según la medición, por ejemplo, mediante citometría de flujo o IHC. Una disminución de la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la actividad protumorigénica de macrófagos M2 según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación. Una disminución de la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones del aumento de neutrófilos N2 según la medición, por ejemplo, mediante citometría de flujo o IHC. Una disminución

de la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la actividad protumorigénica de neutrófilos N2 según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación. Una disminución de la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la inhibición de la activación de los linfocitos T según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación, tales como, por ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la inhibición de la activación de CTL según la medición, por ejemplo, mediante destrucción directa de células diana tales como, por ejemplo, células cancerosas, o mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación, tales como, por ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la reducción de linfocitos T $\alpha\beta$ y/o $\gamma\delta$ según la medición, por ejemplo, mediante cambios en la expresión de marcadores de activación. Una disminución de la respuesta indica actividad inmunoestimuladora. Las disminuciones adecuadas son las mismas que para los aumentos, descritos a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la respuesta de los linfocitos T $\alpha\beta$ y/o $\gamma\delta$ según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación, tales como, por ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de estimulación de respuestas de memoria específica de antígenos según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación, tales como, por ejemplo, CD45RA, CCR7, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la apoptosis o lisis de células cancerosas según la medición, por ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, por ejemplo, MTT, liberación de CR, calceína AM o mediante ensayos que se basan en citometría de flujo, tales como, por ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la estimulación del efecto citotóxico o citostático en células cancerosas según la medición, por ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, por ejemplo, MTT, liberación de Cr, calceína AM, o

mediante ensayos que se basan en citometría de flujo, tales como, por ejemplo, dilución con CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

- 5 En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la destrucción directa de células cancerosas según la medición, por ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, por ejemplo, MTT, liberación de CR, calceína AM o mediante ensayos que se basan en citometría de flujo, tales como, por ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.
- 10 En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la actividad de Th17 según la medición, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.
- 15 En una modalidad, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o disminuciones de la inducción de citotoxicidad dependiente del complemento y/o citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo según la medición, por ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, por ejemplo, MTT, liberación de Cr, calceína AM, o mediante ensayos que se basan en citometría de flujo, tales como, por ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimuladora. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.
- 20 En una modalidad, la activación de linfocitos T se mide por ejemplo mediante la destrucción directa de células diana tales como, por ejemplo, células cancerosas o mediante la secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación tales como, por ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Para los linfocitos T, los aumentos de la proliferación, los marcadores de activación de la superficie celular (por ejemplo, CD25, CD69, CD137, PD1), la citotoxicidad (capacidad para inactivar células diana) y la producción de citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IFN γ , TNF- α , IL-10, IL-17A) serían indicios de una modulación inmunitaria que sería consistente con una mayor destrucción de células cancerosas.
- 25 En una modalidad, la activación de células NK se mide, por ejemplo, mediante la destrucción directa de células diana tales como, por ejemplo, células cancerosas o mediante la secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación tales como, por ejemplo, CD107a, etc. Para las células NK, los aumentos de la proliferación, de la citotoxicidad (capacidad para inactivar células diana y aumentar la expresión de CD107a, granzima y perforina), de la producción de citocinas (*por ejemplo*, IFN γ y TNF) y de la expresión del receptor de la superficie celular (*por ejemplo*, CD25) serían indicios de una modulación inmunitaria que sería consistente con una mayor destrucción de células cancerosas.
- 30 En una modalidad, la activación de linfocitos T $\gamma\delta$ se mide, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación.
- 35 En una modalidad, la activación de linfocitos Th1 se mide, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de los marcadores de activación.
- 40 Aumentos apropiados de la actividad o respuesta (o reducciones, según sea apropiado como se describió anteriormente), son aumentos de al menos alrededor del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50

%, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 a 99 % por ciento por encima de la señal en ya sea una muestra de referencia o en muestras controles, por ejemplo, muestras de ensayo que no contienen un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT de la invención.

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

X. EJEMPLOS

EJEMPLO 1: GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO BIESPECIFICO ANTI-PVRIG/ANTI-TIGIT

1. Introducción

PVRIG y TIGIT son receptores de puntos de control inmunitarios inhibidores expresados en linfocitos T y células asesinas naturales. El bloqueo mediado por anticuerpos de la interacción de estos receptores con sus respectivos ligandos da como resultado una actividad mejorada de los linfocitos T. La terapia de combinación de anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT da como resultado un efecto sinérgico o aditivo en ensayos funcionales *in vitro*. Aquí generamos y caracterizamos un anticuerpo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT y mostramos que el anticuerpo retiene la afinidad de unión de cada brazo por el antígeno diana respectivo. Además, el BsAb de PVRIG/TIGIT es equivalente a la combinación de anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT en un ensayo funcional *in vitro* basado en linfocitos T.

2. Protocolos

Diseño de constructo biespecífico anti-PVRIG/anti-TIGIT: Se crearon representantes de múltiples anticuerpos biespecíficos inhibidores dobles de PVRIG/TIGIT en tres formatos diferentes mediante el uso de una combinación de modificación por ingeniería genética de Fc "botón en ojal" (KIH) y CrossMab, KIH scFv-Fab ("abrebotellas") y formatos de heterodimerización isovolumétrica ("IH") "abrebotellas" basados en secuencias depositadas en IMGT (<http://www.imgt.org>, posiciones basadas en la numeración Eu; véanse además las Figuras 42-44). Para crear anticuerpos biespecíficos completamente humanos en el formato KIH CrossMab, la cadena pesada variable CPA.9.086 más un enlazador de dos aminoácidos de alanina y serina se fusionó con el dominio Lambda constante humano y los dominios CH2 y CH3 de IgG4 humana que contenía mutaciones S241P, S354C, E356D, M358L y T366W. El dominio de cadena ligera variable CPA.9.086 más un enlazador de dos serinas se fusionó con el CH1 de IgG4 humana. El dominio de cadena pesada variable CHA.7.518.1.H4(S241P) se fusionó con el dominio CH1 de IgG4 humana y los dominios CH2 y CH3 de IgG4 humana que contenían mutaciones Y349C, E356D, M358L, T366S, L368A e Y407V. El dominio de cadena ligera variable CHA.7.518.1.H4(S241P) se fusionó con el dominio Kappa constante humano. Para el formato de "abrebotellas" de KIH, se usaron los mismos constructos de cadena pesada y cadena ligera CHA.7.518.1 anteriores y se emparejaron con un fragmento variable de cadena única (scFv) de CPA.9.086 fusionado a la región bisagra de IgG4 humana y contenía además CH2 y CH3 con las mutaciones de "botón" enumeradas anteriormente. El orden de la cadena pesada y la cadena ligera se varió en el formato de cadena única (VH-VL o VL-VH) para evaluar los efectos sobre la expresión y la estabilidad. Para el formato de abrebotellas de heterodimerización isovolumétrica, se evaluaron varias combinaciones de dominios variables (CPA.9.086 scFv emparejado con CHA.7.518.1, CHA.7.518.1 scFv emparejado con CPA.9.086, CHA.9.547.18 scFv emparejado con CHA.7.518.4, y CHA.7.518.4 scFv emparejados con CHA.547.18). Los constructos que contenían scFv tenían las siguientes

sustituciones en los dominios CH2 y CH3: F234V L235A G236del S267K S357Q S364K. Los constructos Fab contenían las siguientes sustituciones: N208D E233P F234V L235A G236del S267K Q295E L368D K370S N384D Q418E N421D. Se incorporaron las sustituciones E233P F234V L235A G236del S267K and E233P F234V L235A G236del S267K K370S N384D Q418E N421D para reducir la unión al receptor de Fc.

Expresión del anticuerpo biespecífico CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086: El ADN de cada uno de estos constructos se clonó en el vector de expresión pcDNA3.4 (ThermoFisher) para producir cuatro vectores separados. Para expresar anticuerpos biespecíficos, el ADN de cada constructo se transfeció en 3 ml de células Expi293 de crecimiento logarítmico (ThermoFisher) a una concentración total final de 1 ug/ml. Se analizaron diversas relaciones de cadenas pesadas y cadenas ligeras para determinar el rendimiento de expresión mediante electroforesis capilar LabChip (Perkin Elmer) en condiciones tanto reductoras como no reductoras. Esto permite determinar cualitativamente la cantidad relativa de cadena pesada y cadena ligera que no forma complejos para múltiples condiciones. Una vez que se determinaron las relaciones óptimas, se realizaron producciones a mayor escala, y se purificaron los anticuerpos biespecíficos expresados

Purificación del anticuerpo biespecífico CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086: Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT se purificaron mediante el uso de purificación por afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño.

Purificación por afinidad con proteína A: Se realizó cromatografía de afinidad de proteína A (ProA) en el sobrenadante para purificar el anticuerpo biespecífico (BsAb) del sobrenadante del cultivo celular. El sobrenadante se preparó para cromatografía mediante la adición de 20 ml de fosfato de sodio 1 M pH 7.4 (Teknova) y 100 ml de NaCl 5 M (Teknova) por 1000 ml de sobrenadante seguido de filtración de 0.22 µm. La separación se realizó en un AKTA Pure (GE Healthcare) con una columna HiTrap de 5 ml de MabSelect SuRe (GE Healthcare) equilibrada con fosfato de sodio 20 mM pH 7.4, NaCl 0.6 M (Teknova). El sobrenadante se cargó a 1.25 ml/minuto. Después de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio durante 10 CV a 5 ml/min. La elución se realizó en dos etapas. La etapa uno fue con citrato de sodio 20 mM pH 3.6, NaCl 150 mM (Teknova) y la etapa 2 fue con glicina 100 mM pH 2.7, NaCl 150 mM (Teknova). Ambas eluciones se realizaron sobre 4.3 CV a 5 ml/min al recoger fracciones de 12 ml en un tubo precargado con 2.25 ml de Tris 1 M pH 7.5 (Teknova). Las fracciones se analizaron para determinar la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm mediante el uso de un NanoDrop (Thermo) y el contenido de monómero por HPLC-SEC analítica.

Separación de monómeros y componentes de alto peso molecular (HMW): Se realizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) preparativa en el anticuerpo biespecífico purificado con Pro A para separar el monómero de HMW. Se preparó BsAb para cromatografía SEC mediante filtración de 0.22 µm. La separación se realizó en un AKTA Pure (GE Healthcare) con un gradiente isocrático de PBS, pH 7.3 (Teknova). Se cargó BsAb en una columna Superdex 200 pg 26/600 (GE Healthcare) a 2.6 ml/min. La elución se realizó con volumen de columna (CV) 1 de PBS a 2.6 ml/min. Las fracciones se recogieron después del volumen vacío. HMW eluyó antes que el monómero como se esperaba. Las fracciones de los picos se procesaron en HPLC-SEC para determinar el porcentaje de monómero frente a HMW y la concentración se determinó mediante absorbancia a 280 nm. Se combinaron por separado las fracciones que contenían monómero y HMW.

Análisis SEC-HPLC: El análisis se realizó mediante el uso de un sistema Acquity UPLC (Waters) y se usó una Protein BEH SEC, 200 Å, 1.7 µm, 4.6 mm X 150 mm, 10K-450K (Waters) como columna SEC. La separación SEC se realizó a temperatura ambiente isocráticamente mediante el uso de una fase móvil que consiste en PBS, pH 7.4 (Teknova). La velocidad de flujo fue de 0.25 ml min⁻¹. Las cantidades relativas de monómero BiSpAb, agregados y fragmentos se cuantificaron mediante el cálculo de las áreas de pico detectadas por los detectores ultravioleta (UV) a 280 nm.

Ensayo cinético SPR de unión de TIGIT humano y PVRIG humano al anticuerpo biespecífico:

Todos los experimentos se realizaron mediante el uso de un instrumento ProteOn XPR 36 a 22 °C mientras que las muestras se mantuvieron a 4 °C durante el ensayo. Primero, se prepararon superficies de captura de alta densidad con un anticuerpo policlonal anti-Fc humano generado en cabra (Thermo Fisher) inmovilizado sobre todos los carriles de captura verticales y puntos intermedios horizontales en un chip de GLC (Bio Rad) mediante el uso de acoplamiento de amina estándar. Los niveles de inmovilización típicos para el anticuerpo policlonal para cada carril fueron alrededor de 4600 RU. El monómero de TIGIT-HIS humano se obtuvo de Sino Biological, mientras que el PVRIG-HIS humano se preparó internamente. El anticuerpo biespecífico se diluyó a ~1 µg/ml en tampón de corrida, que fue PBST 1x con BSA filtrada añadida a una concentración final de 100 µg/ml. Para cada ciclo de "cinética de disparo único" en el instrumento ProteOn, se capturó un anticuerpo diferente en dos carriles de captura verticales únicos durante dos minutos. Después de cambiar el flujo de tampón de ProteOn a la dirección horizontal, las superficies de captura se estabilizaron por alrededor de 15-20 minutos. En ciclos de captura separados, se inyectaron seis concentraciones de una dilución seriada triple de TIGIT humano (362 pM - 88 nM) o PVRIG humano (460 pM - 112 nM) durante 2 minutos seguido de 15 minutos de disociación a un régimen de flujo de 100 µl/min. Se inyectaron tres réplicas de cada serie de concentración de antígeno sobre dos superficies independientes del anticuerpo biespecífico capturado junto con varios ciclos de inyecciones de tampón para la referencia doble. Las superficies de anticuerpos antihumanos se regeneraron entre cada ciclo con dos pulsos de 30 segundos de ácido fosfórico 146 mM. Los sensogramas de TIGIT y PVRIG inyectados sobre los anticuerpos biespecíficos capturados se procesaron mediante el uso de ProteOn versión de Scrubber y se ajustaron a un modelo de unión cinética de 1:1, que incluye un término para el transporte masivo.

Ensayo sándwich SPR de TIGIT humano y PVRIG humano fijados simultáneamente al anticuerpo

biespecífico: Los experimentos se realizaron mediante el uso de un Biacore 3000 (GE Healthcare) a 22 °C. Se inmovilizó covalentemente TIGIT humano (Sino Biologicals) en los cuatro canales de flujo de un chip CM5 Biacore a niveles de RU que variaban de 800 RU a 1000 RU mediante el uso de acoplamiento de amina estándar. El anticuerpo biespecífico se inyectó sobre una celda de flujo a una concentración molecular de 25 nM durante tres minutos a un régimen de flujo de 25 µl/min. Se inyectó simultáneamente PVRIG humano a una concentración de 116 nM durante tres minutos a un régimen de flujo de 25 µl/min tanto sobre la celda de flujo TIGIT que forma complejos con el anticuerpo biespecífico como sobre una superficie de TIGIT control que no tenía anticuerpo biespecífico unido. La superficie de TIGIT control se resta de referencia mediante el uso del programa Scrubber 2.0 para procesar los sensogramas resultantes.

ELISA de acoplamiento doble: Para preparar placas de ELISA para el análisis de la unión de anticuerpos biespecíficos, las placas se recubrieron durante la noche a 4°C con 100 µl de PVRIG-hFc

1 µg/ml en PBS. Al día siguiente, se descartó la solución de recubrimiento, y se bloqueó la placa con 250 µl de BSA 2 %, Tween 20 0.1 % durante 2 horas. Los pocillos se lavaron 3X con 300 µl de PBS 1X pH 7.4, Tween 20 0.05 % (tampón de lavado). Las muestras se diluyeron serialmente en incrementos de 3 veces en PBS 1X pH 7.4, 0.1 %, Tween 20, 0.2 % BSA (tampón de unión) de 1 µg/ml a 1.4 pg/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación a 300 RPM. Como controles, CHA.7.518.1.H4(S241P), un anticuerpo específico de PVRIG, y CPA.9.086, un anticuerpo específico de TIGIT, se prepararon y evaluaron de manera similar a las muestras biespecíficas. Los pocillos se lavaron como se indicó anteriormente y se evaluó la capacidad para unirse a TIGIT mediante la adición de 100 µl de 1 µg/ml de TIGIT-His (Sino Biological cat # 10917-H08H). Para evaluar la unión del anticuerpo control, se añadieron 100 µl de PVRIG-His de 1 µg/ml (Compugen, lote 20170623) a pocillos con CHA.7.518.1.H4(S241P) y se añadieron 100 µl de TIGIT-His 1 µg/ml a los pocillos de CPA.9.086. La incubación con ligandos solubles se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 300 RPM. Los pocillos se lavaron como se indicó anteriormente, y después se detectó la unión del ligando soluble mediante la adición de 100 µl de conjugado de HRP de anticuerpo anti-His-Tag 1 µg/ml (R&D Systems, catálogo # MAB050H, clon # AD1.1.10) en tampón de unión y se incubó a temperatura ambiente con agitación a 300 RPM durante 1 hora. Los pocillos se lavaron 3X con tampón de lavado como se indicó anteriormente y se añadieron 100 µl de sustrato Ultra-TMB a temperatura ambiente (Moss Inc.). El desarrollo fue durante 7 minutos y la reacción se detuvo por la adición de 100 µl de H₂SO₄ 2 N. La placa se leyó en el lector de placas Molecular Devices SpectraMax 340PC-384 ajustado a una longitud de onda de 450 nm.

Para evaluar la captura de TIGIT y la unión de PVRIG soluble de los anticuerpos biespecíficos, se realizó un ensayo similar al que se usó anteriormente. En este caso, se recubrieron 100 µl/pocillo de 1 µg/ml de la proteína de fusión TIGIT-Fc en PBS 1X pH 7.4 durante una noche a 4°C. Se descartó la solución de recubrimiento, y se bloquearon los pocillos con PBS 1X pH 7.4, BSA 2 % y Tween 20 0.1 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Los controles biespecíficos y monoespecíficos usados anteriormente se diluyeron serialmente en el mismo intervalo que para el experimento de captura PVRIG. El resto del experimento fue el mismo que el indicado anteriormente con la excepción de que se usó PVRIG-His para la detección de todas las muestras excepto CPA.9.086 para la que se usó TIGIT-His.

Expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos de CMV humano: Se descongelaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (CTL) reactivas a CMV, se resuspendieron a razón de 2 x 10⁶ células/ml, y se estimularon con 1 µg/ml del péptido pp65 de CMV (Anaspec) en medio RPMI completo complementado con 2 ng/ml de IL-2 humana recombinante (R&D systems) y 10 ng/ml de IL-7 humana recombinante (R&D systems) a 37 °C con 5 % de CO₂. Después de 6 días, las células se dividieron a razón de 1:2 y descansaron con una dosis baja de IL-2 humana (100 U/ml). El día ocho, las células se recolectaron y se volvieron a sembrar en una dosis baja de IL-2 (100 U/ml) a 2 millones/ml en medio RPMI completo durante dos días. En el día once, las células se fenotipan para determinar la pureza de los linfocitos T CD8⁺ y la reactividad de CMV pp65₍₄₉₅₋₅₀₃₎.

Las células se tiñeron con anti-CD3 (clon: OKT3)-alofococianina siete (APC-Cy7; Biolegend), anti-CD8 (clon: H1T8a)-Alexa Fluor (AF) 488 (Biolegend), un cóctel combinado de anti-CD14 (clon: HCD14)-proteína clorofila de peridina (PerCP-Cy5.5), anti-CD19 (clon: HIBCD14) PerCP-Cy5.5, anti-CD56

(clon: HCD56)-PerCP-Cy5.5 (Biolegend), anti-TIGIT (clon: MBSA43)-aloficocianina (APC; e-Bioscience) o IgG4 (Compugen)-control de isotipo (APC: Biolegend), CHA.7.518.1.H4(S241P)-AF-647 (Compugen) o control de isotipo IgG4-AF647 (Compugen), y anti-PD-1 (clon: EH12.2H7)-violeta brillante 421 (BV421:Biolegend) o IgG1 (clon: MOPC21) BV421 (Biolegend). Para evaluar la frecuencia de linfocitos T CD8⁺reactivos a tetrámero, se tiñeron PBMC con tetrámero de iTA_g - HLA-A*02:01 CMV pp65_(495 – 503) (NLVPMVATV)-ficoeritrina (MBL-BION) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con tampón de PBS/BSA 1 %/azida sódica 0.01 %, los datos se adquirieron mediante el uso de un citómetro de flujo Fortessa (BD Biosciences) y se analizaron mediante el uso de FlowJo (Treestar).

Ensayo de cocultivo de linfocitos T CD8⁺ específicos de CMV humano con líneas celulares de melanoma que expresan pp65: Se utilizó un ensayo de cocultivo *in vitro* con linfocitos T CD8⁺ específicos de CMV humano para evaluar el efecto de los anticuerpos monoclonales (mAb) a PVRIG o TIGIT y un anticuerpo biespecífico (BsAb) a PVRIG y TIGIT en la secreción de citocinas específicas de antígenos. Las células diana usadas en el ensayo de cocultivo fueron una línea celular Mel-624 modificada (ATCC), Mel-624 pp65. Esta línea celular se generó tras expresar ectópicamente la proteína de CMV, pp65. Esto da como resultado la presentación de HLA-A2 de los péptidos derivados de pp65 sin la necesidad de añadir péptidos pp65 exógenos. Se realizó una titulación dependiente de la dosis del bloqueo del receptor inhibidor en linfocitos T CD8 reactivos a pp65 de CMV en cocultivo con la línea celular de cáncer Mel-624 pp65. Se cocultivó una serie de dilución de 10 puntos, 4 veces de anticuerpos, que comienza en 132 nM y termina en 0.001 nM con células Mel624 pp65 y linfocitos T CD8⁺ CMV⁺ en una relación de 5:1 de células diana (75 000) a T células (15 000). Se añadieron linfocitos T, líneas de células tumorales y anticuerpos en una placa de fondo en U de 96 pocillos (Costar), y se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Se evaluaron los siguientes anticuerpos: anti-PVRIG (CHA.7.518.1.H4(S241P)), anti-TIGIT (CPA.9.086), una combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086, anticuerpos biespecíficos (CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.518.4/CPA.9.086 o CHA.9.547.18 BsAb) que se dirige tanto a PVRIG como a TIGIT, y un control de isotipo IgG4 humano. Después de 18 horas de período de incubación, la cantidad de interferón gamma humano (IFN_γ) en el sobrenadante de cocultivo se midió mediante citometría de flujo mediante el uso de un ensayo de microesferas citométricas (BD). Los datos se analizaron mediante regresión no lineal y se ajustaron a un modelo de "Unión específica de un sitio" o "Unión total e inespecífica de un sitio" mediante el uso de GraphPad Prism.

Fluorimetría diferencial de barrido: La temperatura de fusión proporciona una medida de la estabilidad del anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos controles se analizaron para determinar la desnaturalización a temperatura de fusión y la unión del tinte hidrófobo SYPRO Orange (Thermo). Los anticuerpos se diluyeron a una concentración apropiada en el tampón deseado con SYPRO Orange. Se usó un instrumento StepOne Plus RT-PCR (Applied Biosystems) para realizar una fusión controlada (25 °C-95 °C, rampa de 1 grado/minuto) y detectar la fluorescencia de SYPRO Orange a intervalos de 1 minuto. Los anticuerpos se analizaron a pH 6.0 y pH 7.4 para asegurar que los efectos observados no se debían a la formulación.

Análisis LC-MS: LakePharma Inc. realizó espectrometría de masas en Belmont, California, Estados Unidos. Después de la desglucosilación enzimática, las muestras se analizaron en un Agilent Q Exactive

Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un sistema capilar UHPLC. El análisis intacto se realizó en condiciones reducidas y no reducidas para la caracterización de proteínas y se usó el programa Waters MassLynx para analizar los resultados.

Análisis de estabilidad de congelación-descongelación: Las muestras se prepararon mediante el ajuste de la concentración a 1.0 mg/ml en PBS 1X, pH 7.4 mediante dilución o mediante el uso de un concentrador giratorio. Se colocó 100 µl en tiras con tapones de tubos de PCR de 0.2 ml y se congeló a -80 °C durante al menos 24 horas, después se descongeló a temperatura ambiente. Este ciclo se repitió dos veces durante 3 ciclos de congelación y descongelación. Se analizaron 20 µl de cada muestra mediante SEC-UPLC para determinar el monómero, especies de alto peso molecular (HMW) y de bajo peso molecular (LMW). Las muestras también se procesaron en CE-SDS (reducido y no reducido, Lab Chip GXII, Perkin Elmer) y se evaluó la concentración después de la centrifugación para eliminar cualquier proteína precipitada.

Retención de pH bajo: Las muestras se prepararon mediante el ajuste de la concentración a 1.0 mg/ml en PBS 1X, pH 7.4 mediante dilución o mediante el uso de un concentrador giratorio. El pH de cada muestra se ajustó a pH 3.0 mediante la adición de glicina 0.1 M pH 3.2 y se incubó a temperatura ambiente durante 0, 1, 2, 4, y 24 horas. Las muestras se neutralizaron con Tris 1 M pH 7.5 y se analizaron por CE-SDS (reducido y no reducido, Lab Chip GXII, Perkin Elmer), SEC-UPLC y absorbancia a 280 nm por NanoDrop después de centrifugación para eliminar cualquier proteína precipitada.

Resultados

Secuencia de anticuerpos biespecíficos: Los anticuerpos biespecíficos anti-PVRIG/anti-TIGIT se crearon mediante el uso de dos formatos de heterodimerización de Fc diferentes y dos formatos de visualización de dominio variable. La secuencia de cada fragmento se muestra en las Figuras 26, 40 y 41.

Ensayo cinético SPR: La Figura 27 muestra los datos del sensograma de unión de (A) TIGIT y (B) PVRIG al anticuerpo biespecífico capturado sobre dos superficies independientes y los ajustes globales de los datos a un modelo cinético simple 1:1. Debido a que no hubo suficiente desintegración de la señal de disociación para que el modelo cinético estimara adecuadamente la velocidad de disociación para la interacción TIGIT-anticuerpo biespecífico, el valor de k_d se mantuvo arbitrariamente constante en $1.0 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ para ajustar los datos. Por lo tanto, las constantes de afinidad y velocidad de la interacción TIGIT-anticuerpo biespecífico en la Figura 27 solo deben considerarse como estimaciones aproximadas. Las constantes de unión de la interacción TIGIT-anticuerpo biespecífico medidas mediante el uso de SPR con la k_d mantenida constante a $1.0 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ fueron $k_a = 3.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ y $K_D = 2.6 \text{ pM}$. Se estimó que las constantes de unión para la interacción PVRIG-anticuerpo biespecífico eran $k_a = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, $k_d = 2.4 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$, y $K_D = 187 \text{ pM}$.

Ensayo SPR Sándwich: La Figura 28 muestra el sensograma de inyecciones sucesivas del anticuerpo biespecífico (A) inyectado sobre el chip Biacore que tiene TIGIT humano inmovilizado seguido de una inyección de PVRIG humano (B), que muestra por lo tanto la capacidad del anticuerpo biespecífico para unirse simultáneamente tanto TIGIT humano como PVRIG humano. El nivel de respuesta de la unión del anticuerpo biespecífico a la superficie de TIGIT fue de ~ 1100 RU. El nivel de respuesta de la unión

de PVRIG humana al anticuerpo biespecífico previo a la formación de complejos con la superficie de TIGIT fue ~ 230 RU.

Linfocitos T reactivos a pp65 de CMV que expresan PVRIG, TIGIT y PD-1: Los linfocitos T CD8⁺ específicos de la proteína de CMV, pp65, se caracterizaron bien y estos linfocitos T específicos para CMV pueden usarse para estudiar el papel de los receptores moduladores en los linfocitos T. La estimulación de PBMC donantes de HLA-A2⁺ mediante el uso del péptido pp65 de CMV, IL-2 e IL-7 dio como resultado una fuerte expansión de linfocitos T específicos para pp65 CMV hasta purezas de 90-95 % según se determina mediante tinción del tetrámero. La Figura 29A muestra el porcentaje de linfocitos T específicos para pp65 de CMV de varios donantes después de la expansión. Se evaluó la expresión superficial de PVRIG, TIGIT y PD-1 en linfocitos T de estos donantes. El día once de activación, los linfocitos T específicos de pp65 de CMV expresaron la relación de gMFI de PVRIG (MFI_r, definida como la MFI del anticuerpo diana dividida por la MFI del anticuerpo control): 3-5 veces, TIGIT MFI_r: 4 veces y PD-1 MFI_r: 1-2 veces (Figura 29B).

Los anticuerpos anti-PVRIG humano y TIGIT aumentan la secreción de IFN-γ ya sea solos o en combinación a partir de linfocitos T humanos específicos de CMV: Con el fundamento de que la inducción de la expresión de TIGIT y PVRIG en los linfocitos T CD8⁺ se correlaciona con la disfunción de los linfocitos T, nuestro objetivo fue evaluar los efectos del bloqueo de PVRIG y TIGIT sobre la capacidad de producción de citocinas proinflamatorias. Se cultivaron conjuntamente linfocitos T reactivos a CMV de 2 donantes (Donante 4 y Donante 72) con células Mel-624 (PVR⁺PVRL2⁺) pp65. La actividad de CHA.7.518.1.H4(S241P), CPA.9.086, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086, y CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 BsAb en linfocitos T CMV⁺ CD8⁺ se evaluó. Observamos que CHA.7.518.1.H4(S241P) aumentó la producción de IFN-γ (32-46 %) en comparación con el anticuerpo control IgG. La adición del anticuerpo CPA.9.086 dio como resultado un aumento de IFN-γ adicional (55-86 %). Cuando se combinaron, los tratamientos con CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086 aumentó sinérgicamente o en algunos casos, aditivamente la producción de citocinas de linfocitos T CD8⁺ en comparación con el bloqueo único de CHA.7.518.1.H4(S241P) o CPA.9.086 (99-189 %). Los BsAb CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 exhibieron el mismo efecto funcional que la combinación de 2 mAb CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086 (100-191 %). El aumento porcentual de la secreción de IFN-γ en cada anticuerpo sobre los anticuerpos de control de isotipo respectivos se muestra en la Figura 30. También se observó que el BsAb CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 mostró un aumento dependiente de la dosis en la producción de IFN-γ por linfocitos T específicos de pp65 de CMV que es comparable a la combinación de los mAb CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086 (Figura 31). En ambos donantes 4 y 72, los valores promedio ± SEM de EC₅₀ de la producción de IFN-γ para el BsAb CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 y la combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086 fueron similares y se calculó que estaban en el rango nM bajo de un solo dígito. En el donante 4, la EC₅₀ se calculó que era 0.38 nM para la combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086, mientras que la EC₅₀ del BsAb CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 se calculó que era 0.36 nM. En el donante 72, la EC₅₀ se calculó que era 0.58 nM para la combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086, mientras que la EC₅₀ del BsAb CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 se calculó que era 0.53 nM (Figura 31).

ELISA de acoplamiento doble: Se evaluó la capacidad de los anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos para unirse al antígeno recubierto y después unirse a un segundo ligando soluble simultáneamente. La Figura 49 muestra la unión de diluciones seriadas triples de anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos a placas recubiertas con PVRIG con detección mediante la unión de la proteína TIGIT-His biotinilada y estreptavidina-HRP. De manera similar, la Figura 50 muestra la unión de diluciones seriadas triples de anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos a placas recubiertas con TIGIT-His recombinante y la detección mediante la unión de PVRIG biotinilado y estreptavidina HRP. Todos los formatos biespecíficos pudieron acoplarse a ambos ligandos simultáneamente. Los cambios aparentes en la afinidad se debieron a la cantidad relativa de anticuerpo ensamblado correctamente en solución. La Figura 51 muestra las EC50 calculadas mediante el uso del programa SoftMax Pro (Molecular Devices) y corregidas para el anticuerpo biespecífico ensamblado correctamente según lo determinado por LC-MS y se muestra en la Figura 45.

Fluorimetría diferencial de barrido: Los anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos se analizaron para determinar la desnaturalización a la temperatura de fusión y la unión del tinte hidrófobo SYPRO Orange (Thermo). Los anticuerpos se analizaron a pH 6.0 y pH 7.4 para asegurar que los efectos observados no se debían a la formulación. La Tm1, que refleja la disolución del dominio CH2, estaba en el intervalo de 51.7 °C a 60.4 °C a pH 7.4 y de 50.9 °C a 60.5 °C a pH 6.0 para todos los anticuerpos biespecíficos (Figura 52). Todos los anticuerpos monoespecíficos demostraron una Tm1 más alta, de 63.3 °C a 66.2 °C a pH 7.4 y de 62.4 °C a 64.1 °C a pH 6.0. La Tm2 para todos los anticuerpos (fusión de CH3 y Fab) fue > 70 °C (intervalo = 70.2 °C-77.1 °C a pH 7.4 y 70.9 °C a 77.1 °C a pH 6.0).

Análisis LC-MS: Se realizó espectrometría de masas intacta desglicosilada en los anticuerpos biespecíficos de los tres formatos. La heterodimerización mediante el uso de las estrategias de botones en ocales de Fc y CrossMab dio como resultado un anticuerpo biespecífico ensamblado correctamente al 32 % y 73 %, mientras que los dos formatos de "abrebotellas" que contienen un brazo que contiene scFv y un brazo de anticuerpo intacto a través de diferentes enfoques de heterodimerización de Fc (botones en ocales y heterodimerización isovolumétrica, respectivamente) dio como resultado ≥ 95 % de anticuerpos biespecíficos ensamblados correctamente (Figura 45).

Retención de pH bajo: Se incubaron anticuerpos controles biespecíficos y monoespecíficos a pH 3 durante 0, 1, 2, 4, y 24 horas y se evaluó la formación de agregados o productos de menor peso molecular mediante CE-SDS mediante el uso de un LabChip GXII (Perkin Elmer) y SEC-UPLC según lo observado por cambios en el % de contenido de monómero de T = 0. Todos los anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos fueron estables a este estrés, lo que muestra como máximo un 6 % de cambio en el contenido de monómero durante el transcurso de 24 horas.

Análisis de estabilidad de congelación-descongelación: Se evaluó la capacidad de los anticuerpos biespecíficos y monoespecíficos controles que utilizan los diversos enfoques de restricción y heterodimerización de cadenas ligeras para resistir ciclos de congelación y descongelación en serie. Después de tres ciclos de congelación y descongelación, los anticuerpos se analizaron mediante SEC-UPLC para detectar cambios en las especies de bajo peso molecular (LMW), monómero y alto peso molecular presentes en la solución. Los valores positivos representan un aumento en la relación relativa de especies informadas después de los ciclos de congelación/descongelación. El anticuerpo biespecífico BsAb-14 fue la única muestra que mostró una disminución > 5 % en el contenido de

monómero de T = 0 (Figura 53). Todos los demás formatos se mantuvieron estables después de este estrés. **Respuesta a la dosis del ensayo de CMV**

Se evaluaron anticuerpos biespecíficos, monoespecíficos y combinaciones de anticuerpos monoespecíficos en el ensayo de CMV descrito para la figura 30 en una respuesta a la dosis. Se realizaron diluciones seriadas triples de cada anticuerpo o mezcla para proporcionar un intervalo de concentraciones de anticuerpo de 66 nM a 0.003 nM. Los anticuerpos monoespecíficos se mezclaron 1:1 con un anticuerpo control no específico antes de la dilución seriada. Los anticuerpos biespecíficos evaluados fueron BsAb 2 (KIH + CrossMab), BsAb 4 (abrebotellas KIH), BsAb 14, y BsAb 18 (ambos abrebotellas IH). También se evaluaron las combinaciones de CHA.7.518.1 y CHA.7.518.4 con CPA.9.086. Todos los anticuerpos biespecíficos se comportaron al menos por igual a la combinación de anticuerpos en todos los formatos evaluados y fueron superiores a los anticuerpos monoespecíficos en los linfocitos T de tres donantes evaluados en dos ensayos independientes (Figura 54).

Síntesis y conclusiones

La adición de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086, ya sea solo o en combinación, y el BsAb CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 para el ensayo Mel-624 pp65 indujo un aumento dependiente de la dosis en la secreción de IFN- γ en comparación con el anticuerpo IgG control. Cuando se combinaron, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086 aumentó sinérgicamente o en el caso del donante 72, aditivamente la producción de citocinas de linfocitos T CD8 $^{+}$ en comparación con el bloqueo único solo. El BsAb CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 exhibió el mismo efecto funcional que la combinación de mAb CHA.7.518.1.H4(S241P)/CPA.9.086 con valores de EC₅₀ para ambos donantes que se calculó que estaban en el rango nM bajo de un solo dígito. En conjunto, estos datos demuestran que los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086, solos o en combinación, o en un formato de anticuerpo biespecífico pueden mejorar la función efectora de los linfocitos T.

EJEMPLO 2: ENSAYO ELISA

Placa recubierta de PVRIG

Para preparar placas de ELISA para el análisis de la unión de anticuerpos biespecíficos, las placas se recubrieron durante una noche a 4°C con 100 μ l de PVRIG-hFc de 1 μ g/ml en PBS. Al día siguiente, se descartó la solución de recubrimiento, y se bloqueó la placa con 250 μ l de BSA 2 %, Tween 20 0.1 % durante 2 horas. Los pocillos se lavaron 3X con 300 μ l de PBS 1X pH 7.4, Tween 20 0.05 % (tampón de lavado). Las muestras se diluyeron serialmente en incrementos de 3 veces en PBS 1X pH 7.4, 0.1 %, Tween 20, 0.2 % BSA (tampón de unión) de 1 μ g/ml a 1.4 pg/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación a 300 RPM. Como controles, CHA.7.518.1 H4, un anticuerpo específico de PVRIG, y CPA.9.086 H4, un anticuerpo específico de TIGIT, se prepararon y evaluaron de manera similar como las muestras biespecíficas. Los pocillos se lavaron como se indicó anteriormente y se evaluó la capacidad para unirse a TIGIT mediante la adición de 100 μ l de 1 μ g/ml de TIGIT-His (Sino Biological cat # 10917-H08H). Para evaluar la unión del anticuerpo control, se añadieron 100 μ l de PVRIG-His de 1 μ g/ml (Compugen, lote 20170623) a los pocillos de CHA.7.518.1 H4 y se añadieron 100 μ l de TIGIT-His de 1 μ g/ml a los pocillos de CPA.9.086 H4. La incubación con ligandos solubles se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 300 RPM. Los pocillos se lavaron como se indicó anteriormente, y después se detectó la unión del ligando soluble mediante la adición de 100 μ l de 1 μ g/ml de conjugado de HRP de anticuerpo anti-His-Tag (R&D

Systems, catálogo # MAB050H, clon # AD1.1.10) en tampón de unión y se incubó a temperatura ambiente con agitación a 300 RPM durante 1 hora. Los pocillos se lavaron 3X con tampón de lavado como se indicó anteriormente y se añadieron 100 µl de sustrato Ultra-TMB a temperatura ambiente (Moss Inc.). El desarrollo fue durante 7 minutos y la reacción se detuvo por la adición de 100 µl de H₂SO₄ 2 N. La placa se leyó en el lector de placas Molecular Devices SpectraMax 340PC-384 ajustado a una longitud de onda de 450 nM.

Para evaluar la captura de TIGIT y la unión de PVRIG soluble de los anticuerpos biespecíficos, se realizó un ensayo similar al que se usó anteriormente. En este caso, se recubrieron 100 µl/pocillo de 1 µg/ml de la proteína de fusión TIGIT-Fc en PBS 1X pH 7.4 durante una noche a 4°C. Se descartó la solución de recubrimiento, y se bloquearon los pocillos con PBS 1X pH 7.4, BSA 2 % y Tween 20 0.1 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Los controles biespecíficos y monoespecíficos usados anteriormente se diluyeron serialmente en el mismo intervalo que para el experimento de captura PVRIG. El resto del experimento fue el mismo que se indicó anteriormente con la excepción de que se usó PVRIG-His para la detección de todas las muestras excepto CPA.9.086 H4 para la que se usó TIGIT-His.

Los ejemplos expuestos anteriormente se suministran para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se realizan y se usan las modalidades de las composiciones, sistemas y métodos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se pretende que las modificaciones de los modos descritos anteriormente para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en la técnica estén comprendidos dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la descripción son indicativas de los niveles de habilidad de los expertos en la técnica a las cuales se refiere la invención.

Todos los encabezados y designaciones de sección se usan para fines de claridad y referencia únicamente y no deben considerarse limitantes en modo alguno. Por ejemplo, los expertos en la técnica podrán apreciar la utilidad de combinar varios aspectos de diferentes encabezados y secciones según sea apropiado de acuerdo con el espíritu y el alcance de la invención descrita en la presente.

Todas las referencias citadas en la presente se incorporan a la presente como referencia en su totalidad y para todos los propósitos con el mismo alcance como si cada publicación o patente o solicitud de patente individual estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Pueden realizarse muchas modificaciones y variaciones de esta solicitud sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Las modalidades y ejemplos específicos descritos en la presente se ofrecen a modo de ejemplo solamente, y la solicitud solo se verá limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los cuales las reivindicaciones tengan derecho.