Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

P-2021/7446

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2021/0009407**
Solicitud de patente a nombre de **COMPUGEN LTD.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad COMPUGEN LTD., solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **17447** notificado electrónicamente el 11 de noviembre de 2021, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Modificación a las Reivindicaciones

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de siete (7) reivindicaciones y reemplaza completamente el presentado anteriormente. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

2.1. Se modificó la reivindicación 1 de modo que ahora se refiere a anticuerpos anti-PVRIG caracterizados por las secuencias de cadena pesada y ligera. Esta reivindicación encuentra soporte a lo largo de la descripción de la solicitud como fue presentada inicialmente, así como en las reivindicaciones 1 y 7 anteriormente presentadas.

2.2. Se eliminaron las reivindicaciones 3 a 7.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

2.3. Se incluyeron nuevas reivindicaciones 2 a 5. Estas nuevas reivindicaciones encuentran soporte en la descripción tal como se presentó originalmente, particularmente en el párrafo [00373].

2.4. Se ajustó la numeración y la dependencia de las reivindicaciones 2 y 8, de modo que ahora corresponden a las reivindicaciones 6 y 7.

Estas modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, y se realizan con el fin de definir la materia reclamada de forma clara y superar las objeciones planteadas por la examinadora en su concepto técnico.

4. Modificación a la descripción, listado de secuencias y Figuras

Por otra parte, y nuevamente con base en las disposiciones del artículo 34 de la Decisión 486, adjunto al presente escrito una nueva descripción, un nuevo listado de secuencias y un nuevo conjunto de figuras, los cuales reemplazan los documentos antes presentados. Los cambios realizados se muestran a continuación:

- **Descripción:** Se realizaron correcciones en los párrafos [0557] y [0558] para corregir la referencia a las figuras. De esta manera, dichos párrafos ahora se refieren a los resultados mostrados en las figuras 48A-C en lugar de a las figuras 63A-C.
- **Figuras:** Se modificó la figura 1 para incluir la secuencia de aminoácidos que se muestra en el identificador de acceso RefSeq NP_076975. Esta modificación encuentra soporte en la página 49, párrafo [00167] de la descripción originalmente presentada.
- **Listado de secuencias:** De manera similar, la secuencia de aminoácidos del identificador de acceso RefSeq NP_076975 fue incluida en el listado de secuencias, y corresponde a la SEQ ID NO. 612. Esta modificación encuentra soporte en la página 49, párrafo [00167] de la descripción originalmente presentada.

Ahora bien, me permito resaltar que esta modificación no constituye ampliación de materia, toda vez que se realiza con el fin de mejorar la claridad de la materia

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

reclamada, sin incluir materia que no haya estado al alcance de la solicitud originalmente presentada.

2. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, la descripción, el listado de secuencias y las figuras, se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a la solicitud, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020.**

Ahora, en relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito resaltar que junto a la presente respuesta no se realiza el pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene un número de cláusulas menor que el presentado anteriormente.

3. Sobre la solicitud de patente

3.1 Claridad y concisión de las reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones presentadas por la examinadora en su concepto técnico, de modo tal que las nuevas reivindicaciones reclaman de manera clara y concisa la invención descrita. Con respecto a las objeciones específicas de la examinadora, me permito manifestar lo siguiente:

3.1.1 El examinador señala que las reivindicaciones independientes 1, 3, 5 y 7 no son claras porque, a pesar de ser reivindicaciones independientes, no incluyen las características técnicas esenciales de la materia reclamada, es decir, las secuencias que definen los anticuerpos de la invención.

Frente a lo anterior, amablemente me permito señalar que el capítulo reivindicatorio ha sido reestructurado, de manera que la reivindicación 1 ahora es la única reivindicación independiente. De esta manera, esta reivindicación se refiere ahora a anticuerpos anti-

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

PVRIG que están caracterizados por las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera.

De esta manera, las características técnicas esenciales de la materia reclamada se encuentran adecuadamente mencionadas en la reivindicación independiente, por lo que la objeción a este respecto ha quedado superada.

De otro lado, con respecto a las reivindicaciones dependientes 3 a 7, las cuales definen modalidades particulares de la invención referidas a composiciones que comprenden los anticuerpos de la invención en conjunto con un segundo anticuerpo, me permito resaltar que de acuerdo con el numeral 2.6.5.4 de la Guía de Examen de solicitudes de patente emitida por la Superintendencia de Industria y Comercio, las características técnicas esenciales son las que la hacen (o deberían hacerla) diferente del estado de la técnica y, por tanto, constituyen la solución al problema técnico que intenta resolver la invención.

De esta forma, la caracterización estructural del segundo anticuerpo mencionado en las reivindicaciones 3 a 7 no es necesaria ni deseable, puesto que las particularidades que separan la materia reclamada del estado de la técnica son aquellas relacionadas con la estructura de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención, las cuales están definidas en la nueva reivindicación 1. Por lo tanto, amablemente solicito que la objeción al respecto se dé por superada.

3.2 Descripción

El examinador indica que se encontraron algunas inconsistencias entre el contenido del ejemplo 9, párrafos [00557] y [00558], y la Figura 63 allí mencionada.

Frente a lo anterior, me permito reiterar que descripción de la solicitud ha sido modificada a fin de corregir los errores mencionados por la examinadora. De esta manera, los párrafos [00557] y [00558] se refieren ahora a las Figuras 48A-C, las cueles sí se relacionan con los resultados del ejemplo 9.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

En consecuencia, la memoria descriptiva es completamente clara para la persona del campo técnico, y, por lo tanto, la objeción al respecto ha sido superada.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, y dado que en el Oficio No. 17447, no se presentaron objeciones con respecto a la novedad y el nivel inventivo de la materia reclamada, amablemente me permito solicitar que se continue con el trámite de la presente solicitud y se otorgue el privilegio de patente solicitado para la misma.

4. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

i) El nuevo pliego reivindicatorio, la nueva descripción, el nuevo conjunto de figuras y el nuevo listado de secuencias se ajustan a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00; y

ii) La materia reclamada de la presente solicitud es clara y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, a la vez que se encuentra divulgada de manera suficientemente completa, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 30 y 28 de la Decisión 486;

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486 de 2000.

Asimismo, respetuosamente solicito a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

5. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por siete (7) reivindicaciones.
- Nueva memoria descriptiva.

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

- Nuevo conjunto de Figuras.
- Nuevo listado de secuencias.
- Recibo de pago por concepto de modificaciones voluntarias.

Señora Directora,



CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

P-2021-7446
Reivindicaciones modificadas para respuesta a Oficio No. 17447
7 de febrero de 2022

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-PVRIG, en donde dicho anticuerpo comprende:

i) una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:9 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:14; o

ii) una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:19 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:24.

2. Una composición que comprende un anticuerpo anti- PVRIG de acuerdo con la reivindicación 1.

3. La composición de la reivindicación 2 que además comprende un segundo anticuerpo que se une a una proteína receptora de punto de control humana seleccionada del grupo que consiste de PD-1 humana, PD-L1 humana, TIGIT humana, LAG-3 humana, TIM-3 humana, CTLA-4 humana, DNAM1 humana, BTLA humana, ICOS humana, 4-1bb humana, GITR humana, OX40 humana, CD96 humana, B7-H4 humana, B7-H3 humana, VISTA humana, CD27 humana, CD40 humana y CD137 humana.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo antiLAG-3 es BMS-986016, GSK2831781, clon de Merck 22D2, clon de Merck 11C9 o clon de Merck 4A10.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-TIM-3 es TSR-022.

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en atezolizumab, avelumab, y durvalumab.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en pembrolizumab y nivolumab.

P-2021-7446
Descripcion modificada para respuesta a Oficio No. 17447
7 de febrero de 2022

ANTICUERPOS ANTI-TIGIT, ANTICUERPOS ANTI-PVRIG Y COMBINACIONES DE ESTOS

I. SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad a la solicitud estadounidense N.° de serie 62/376.334, presentada el 17 de agosto de 2016, solicitud estadounidense N.° de serie 62/513.771 presentada el 1 de junio de 2017, solicitud estadounidense N.° de serie 62/376.335, presentada el 17 de agosto, 2016, solicitud estadounidense N.° de serie 62/417.217, presentada el 3 de noviembre de 2016, solicitud estadounidense N.° de serie 62/513.775, presentada el 1 de junio de 2017, solicitud estadounidense N.° de serie 62/477.974, presentada el 28 de marzo de 2017, solicitud estadounidense N.° de serie 62/513.916, presentada el 1 de junio de 2017, y solicitud estadounidense N.° de serie 62/538.561, presentada el 28 de julio de 2017, todas los cuales se incorporan por referencia en la presente en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se presentó electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 17 de agosto de 2017, se denomina 114386-5008-WO_SL.txt, y su tamaño es de 590.436 bytes.

II. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] 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 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 señal puede ser ya sea estimulante (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.

[0004] Los pares de moléculas coestimulantes suelen consistir en ligandos expresados en APC y 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 estimulante 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 variable o constante.

[0005] 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 coestimuladoras y se ha demostrado que son útiles para la prevención y el tratamiento del cáncer al activar, o prevenir la desactivación, de las respuestas inmunitarias en pacientes con cáncer y para la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias, así como el rechazo del trasplante alogénico, cada uno desactivando las respuestas inmunitarias no controladas, o mediante la inducción de "señal de desactivación" por coestimulación negativa (o coinhibición) en sujetos con estas condiciones patológicas.

[0006] 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 de trasplante. Las estrategias terapéuticas incluyen el bloqueo de la coestimulación mediante anticuerpos monoclonales contra el ligando o el receptor de un par coestimulador, o 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 una proteína de fusión soluble de un ligando inhibidor. Estos enfoques se basan, al menos parcialmente, en la supresión, tarde o temprano, 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.

[0007] Las vías coestimuladoras desempeñan un papel importante en el desarrollo de tumores. Curiosamente, se ha demostrado que los tumores evaden la inactivación inmunitaria al impedir la activación de los linfocitos T mediante la inhibición de factores coestimulantes en las familias B7-CD28 y TNF, así como 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, et al. (2005), "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol*. 23:515-48; Watts (2005), "TNF/TNFR Family Members in Co-stimulation of T Cell Responses", *Ann. Rev. Immunol*. 23:23-68; Sadum, et al., (2007) "Immune Signatures of Murine and Human Cancers Reveal Unique Mechanisms of Tumor Escape and New Targets for Cancer Immunotherapy", *Clin. Canc. Res.* 13(13): 4016-4025). 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. A medida que las vacunas contra el cáncer modificadas por ingeniería genética continúan mejorando, se está volviendo claro que tales puntos de control inmunológicos son una barrera importante para la capacidad de las vacunas para inducir respuestas terapéuticas antitumorales. En ese sentido, las moléculas coestimuladoras pueden servir como adyuvantes para la inmunoterapia del cáncer activa (vacunación) y pasiva (mediada por anticuerpos), proporcionando estrategias para frustrar la tolerancia inmunitaria y estimular el sistema inmunitario.

[0008] Durante la última década, se han desarrollado agonistas y/o antagonistas de diversas proteínas coestimuladoras para tratar enfermedades autoinmunitarias, rechazo de 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 de 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 están se están haciendo pruebas para aplicarlos en el caso de

infecciones virales.

[0009] Sin embargo, aunque la monoterapia con anticuerpos de anti-inhibidor de punto de control ha resultado prometedora, varios estudios (Ahmadzadeh et al., Blood 114: 1537 (2009), Matsuzaki et al., PNAS 107 (17): 7875-7880 (2010), Fourcade et al., Cancer Res. 72 (4): 887-896 (2012) y Gros et al., 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 múltiples puntos de control 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 de-represión 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.

[0010] 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 citoplásmico (que abarca del aminoácido 191 hasta 326). PVRIG se fija a la proteína 2 relacionada con el receptor de poliovirus (PVLR2, también conocida como nectina-2, CD112 o mediador de entrada de herpesvirus B, (HVEB) una glicoproteína de membrana plasmática humana), el componente de fijación de PVRIG.

[0011] Otra diana de interés es TIGIT. TIGIT es un receptor coinhibidior que se expresa altamente en linfocitos T CD4+ efectores y reguladores (Treg), linfocitos T CD8+ efectores y linfocitos NK. Se ha demostrado que TIGIT atenúa la respuesta inmunitaria mediante (1) señalización directa, (2) inducción de señalización de ligando y (3) competencia con la señalización por el receptor coestimulador CD226 (también conocido como DNAM-1), e interrupción de esta. La señalización de TIGIT ha sido la más estudiada en los linfocitos NK, donde se ha demostrado que el compromiso con su ligando cognado, el receptor del poliovirus (PVR, también conocido como CD155) suprime directamente la citotoxicidad de los linfocitos NK a través de su dominio ITIM citoplásmico. El bloqueo del gen TIGIT o el bloqueo de anticuerpos de la interacción

TIGIT/PVR ha demostrado mejorar la inactivación de linfocitos NK in vitro, así como exacerbar enfermedades autoinmunes in vivo. Además de sus efectos directos sobre los linfocitos T y NK, TIGIT puede inducir la señalización mediada por PVR en células dendríticas o tumorales, lo que lleva al aumento en la producción de citocinas antinflamatorias como la 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 fijarse a PVR.

[0012] TIGIT es altamente expresado en linfocitos, incluidos los linfocitos que infiltran tumores (TIL) y Tregs, que infiltran diferentes tipos de tumores. La 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 competencia por la fijación del ligando con un receptor coestimulador.

[0013] En consecuencia, TIGIT es una diana atractiva para el tratamiento con anticuerpos monoclonales, y además en combinación con anticuerpos adicionales que incluyen anticuerpos anti-PVRIG.

III. BREVE DESCRIPCIÒN DE LA INVENCIÓN

[0014] Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden un dominio de fijación al antígeno que se fija a TIGIT humano (SEQ ID NO:97) que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:160 y un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:165. Además, el dominio de fijación al antígeno comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:150 y un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:155. Además, el dominio de fijación al antígeno comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:560 y un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:565.

[0015] En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende anticuerpos que comprenden una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicha VH comprende la SEQ ID NO:160 y una cadena liviana que comprende VL-VC, en donde dicha VL comprende la SEQ ID NO:165 y VC es ya sea kappa o lambda. Además, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde VH comprende la SEQ

ID NO:150; y una cadena liviana que comprende VL-VC, en donde dicho VL que comprende la SEQ ID NO:159 y VC es ya sea kappa o lambda. Además, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde VH comprende la SEQ ID NO:560; y una cadena liviana que comprende VL-VC, en donde dicho VL que comprende la SEQ ID NO:565 y VC es ya sea kappa o lambda.

[0016] En algunos aspectos, la secuencia de CH1-bisagra-CH2-CH3 se selecciona de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas y sus variantes. En algunos aspectos, la cadena pesada tiene la SEQ ID NO:164 y la cadena liviana tiene la SEQ ID NO:169.

[0017] En un aspecto adicional, las composiciones pueden comprender además un segundo anticuerpo que se fija a una proteína receptora de punto de control humano, que puede ser PD-1 humana o PVRIG humana. El segundo anticuerpo puede comprender un dominio de fijación al antígeno que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:5 y un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:10, o una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:9 y una cadena liviana que tiene la SEQ ID NO:14.

[0018] En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones de ácido nucleico que comprenden un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:160 y un segundo ácido nucleico que codifica un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:165. Alternativamente, las composiciones de ácido nucleico comprenden un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:150 y un segundo ácido nucleico que codifica un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:155. Alternativamente, las composiciones de ácido nucleico comprenden un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:560 y un segundo ácido nucleico que codifica un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:565.

[0019] En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones de vectores de expresión que comprenden estas composiciones de ácido nucleico, como un primer vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico y un segundo vector de expresión que comprende un segundo ácido nucleico, o alternativamente un vector de expresión que comprende tanto el primer como el segundo ácido nucleico.

[0020] En un aspecto adicional, la invención proporciona células huésped que comprenden las composiciones del vector de expresión y métodos para producir los

anticuerpos que comprenden cultivar las células huésped en condiciones en donde los anticuerpos se producen y recuperar el anticuerpo.

[0021] En un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos anti-PVRIG que comprenden una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:9 y una cadena liviana que tiene la SEQ ID NO:14. La invención proporciona además anticuerpos que tienen una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:19; y una cadena liviana que tiene ID SEQ NO:24.

[0022] En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-PVRIG (ya sea CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538.1.2.H4(S241P) se coadministra con un segundo anticuerpo que se fija a una proteína receptora del punto de control humano tal como un anticuerpo que se fija a PD-1.

[0023] En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-PVRIG (ya sea CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538.1.2.H4(S241P)) se coadministra con un segundo anticuerpo que se fija a una proteína receptora del punto de control humano, tal como un anticuerpo que se fija a TIGIT humano, tal como CPA.9.086 o CPA.9.083 o CHA.9.547.13.

[0024] En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones de ácido nucleico que comprenden un primer ácido nucleico que codifica la cadena pesada de ya sea CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538.1.2.H4(S241P) y un segundo ácido nucleico que codifica la cadena liviana de ya sea CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538.1.2.H4(S241P), respectivamente.

[0025] En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones de vectores de expresión que comprenden estas composiciones de ácido nucleico, como un primer vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico y un segundo vector de expresión que comprende un segundo ácido nucleico, o alternativamente un vector de expresión que comprende tanto el primer como el segundo ácido nucleico.

[0026] En un aspecto adicional, la invención proporciona células huésped que comprenden las composiciones del vector de expresión y métodos para producir los anticuerpos que comprenden cultivar las células huésped en condiciones en donde los anticuerpos se producen y recuperar el anticuerpo.

[0027] En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos que comprenden:

a) proporcionar una población de células de una muestra de tumor de un

paciente; b) teñir dicha población con anticuerpos etiquetados que se fijan a: i) proteína TIGIT; ii) proteína PVR; iii) proteína PD-1; iv) proteína PD-L1; y v) un control de isotipo; c) ejecutar la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS); d) para cada uno de TIGIT, PVR, PD-1 y PD-L1, determinar el porcentaje de células en dicha población que expresa la proteína relacionada con dicho anticuerpo de control de isotipo; en donde si el porcentaje de células positivas es $\geq$ 1 % para los 4 receptores, e) administrar anticuerpos a TIGIT y PD-1 a dicho paciente.

[0028] En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos que comprenden: a) proporcionar una población de células de una muestra de tumor de un paciente; b) teñir dicha población con anticuerpos etiquetados que se fijan a: i) proteína PVRIG; ii) proteína PVRL2; iii) proteína PD-1; iv) proteína PD-L1; y v) un control de isotipo; c) ejecutar la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS); d) para cada uno de PVRIG, PVRL2, PD-1 y PD-L1, determinar el porcentaje de células en dicha población que expresa la proteína relacionada con dicho anticuerpo de control de isotipo; en donde si el porcentaje de células positivas es $\geq$ 1 % para los 4 receptores, e) administrar anticuerpos a PVRIG y PD-1 a dicho paciente.

[0029] En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos que comprenden: a) proporcionar una población de células de una muestra de tumor de un paciente; b) teñir dicha población con anticuerpos etiquetados que se fijan a: i) proteína PVRIG; ii) proteína PVRL2; iii) proteína TIGIT; iv) proteína PVR; y v) un control de isotipo; c) ejecutar la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS); d) para cada uno de PVRIG, PVRL2, TIGIT y PVR, determinar el porcentaje de células en dicha población que expresa la proteína relacionada con dicho anticuerpo de control de isotipo; en donde si el porcentaje de células positivas es $\geq$ 1 % para los 4 receptores, e) administrar anticuerpos a PVRIG y TIGIT a dicho paciente.

IV. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0030] La Figura 1 representa la secuencia de longitud completa del PVRIG humano (que muestra dos puntos de partida de metionina diferentes). El péptido de señal está subrayado, el ECD tiene subrayado doble.

[0031] 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 fijación de PVRIG. PVLR2 es una glicoproteína de membrana plasmática humana.

[0032] Las Figuras 3A y B representan las cadenas pesadas y livianas 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).

[0033] Los anticuerpos PVRIG de las Figuras 4A y B aumentan la proliferación de linfocitos T en la MLR. Los porcentajes de células bajas en CFSE se muestran a partir de ensayos de MLR tratados con los anticuerpos PVRIG indicados. Cada gráfico representa un donante de linfocitos T CD3 individual. Los experimentos se describen en el Ejemplo 23 de USSN 15/048.967, incorporado en la presente como referencia.

[0034] Las Figuras 5A y B representan características de fijación del anticuerpo de hibridoma PVRIG a líneas celulares modificadas por ingeniería genética HEK hPVRIG, células de origen HEK y células Jurkat. HEK OE denota células HEK hPVRIG, par HEK denota células de origen HEK. Para los datos de Jurkat, gMFIr indica la relación de diferencia en la MFI geométrica de la tinción del anticuerpo PVRIG con respecto a sus controles. Concentración indica la concentración a razón de la cual se calculó la gMFIr. Sin fijación indica que el anticuerpo no se fija a la línea celular probada. Los anticuerpos resaltados son los cuatro primeros anticuerpos de interés.

[0035] Las Figuras 6A y B representan características de fijación del anticuerpo de hibridoma PVRIG a las PBMC humanas primarias, las células con sobreexpresión de *Macaca fascicularis* y las PBMC primarias de *Macaca fascicularis*. OE de *Macaca fascicularis* Expi denota células expi transfectadas transitoriamente con cPVRIG, expi par denota células de origen expi. La gMFIr indica la relación de diferencia en el MFI geométrico de la tinción del anticuerpo PVRIG con respecto a sus controles. Concentración indica la concentración a razón de la cual se calculó la gMFIr. No analizado indica que los anticuerpos no se analizaron debido a la ausencia de fijación a hPVRIG de HEK humana o a células expi PcRVRIG, o a no cumplir con los requisitos de fijación a subconjuntos de PBMC. Los anticuerpos resaltados son los cuatro primeros anticuerpos de interés. Los experimentos se describen en el Ejemplo 21 de USSN 15/048.967, incorporado en la presente como referencia.

[0036] Las Figuras 7A y B muestran el resumen de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos PVRIG en el ensayo de competición en función de FACS. Se indica el IC_{50} de inhibición. Ningún IC_{50} indica que estos anticuerpos no son bloqueadores. Los anticuerpos resaltados son los cuatro primeros anticuerpos de interés. Los experimentos se describen en el Ejemplo 21 de USSN 15/048.967, incorporado en la presente como

referencia.

[0037] Las Figuras 8A y B muestran que los TIL se cocultivaron con células de melanoma 624 a E:D de 1:1 E:T durante 18 horas en presencia de anticuerpos anti-PVRIG (CPA.7.021; 10ug/ml), anti-TIGIT (clon 10A7; 10 ug/ml) o en combinación. El sobrenadante se recogió y se analizó en un ensayo de matriz de microesfera citométrica Th1 Th2 Th17 para detectar citocinas secretadas. Se detectaron niveles de IFNγ **(A)** y TNF **(B)**. Los tratamientos se compararon mediante la prueba t de Student (*P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01) de muestras por triplicado.

[0038] En las Figuras 9A a F, los TIL MART-1 o 209 se cocultivaron con células de melanoma 624 a E:D de 1:1 durante 18 horas en presencia de anticuerpos anti-PVRIG (CPA.7.021; 10 ug/ml), anti-DNAM1 (clon DX11, BD Biosciences n.° de cat. 559787; 10 ug/ml) o en combinación. El sobrenadante se recogió y se analizó en un ensayo de matriz de microesfera citométrica Th1 Th2 Th17 para detectar citocinas secretadas. Se detectaron niveles de IFNγ **(A, D)** y TNF **(B, E)**. Los TIL se tiñeron para la expresión superficial de CD137 **(C, F)**.

[0039] En las Figuras 10A y B, los TIL (F4) se cocultivaron con células de melanoma 624 a E:D de 1:3 durante 18 horas en presencia de anticuerpos anti-PVRIG (CPA.7.021; 10 ug/ml), anti-TIGIT (clon 10A7; 10 ug/ml), anti-PD1 (mAb 1B8, Merck; 10 ug/ml) o en combinación. El sobrenadante se recogió y se analizó en un ensayo de matriz de microesfera citométrica Th1 Th2 Th17 para detectar citocinas secretadas. Se detectaron niveles de IFNγ **(A)** y TNF **(B)**.

[0040] Las Figuras 11A a E 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 liviana 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 están AbM de la página web www.bioinf.org.uk/abs/. Línea germinal humana y secuencias de fijación 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 (seq) o según 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 (n.° de sustituciones de desamidación: Q/S/A; esto puede prevenir la desamidación de asparagina (N). @ sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H; estas pueden prevenir la oxidación del triptófano; @ sustituciones de oxidación de metionina: L/F/A).

[0041] Las Figuras 12A a E representan una compilación de las secuencias humanizadas de tres anticuerpos Cha: CHA.7.518, CHA.7.538.1, y CHA.7.538.2.

[0042] La Figura 13. representa esquemas para combinar los anticuerpos VH y VL CHA humanizados. “ChimVH” y “chimVL” son las secuencias pesada y liviana variables de ratón unidas a un dominio constante de IgG humana.

[0043] Figura 14. Las características de fijación del anticuerpo de hibridoma PVRIG a las PBMC humanas primarias, a las células de sobreexpresión de *Macaca fascicularis*, y a las PBMC primarias de *Macaca fascicularis*. OE de *Macaca fascicularis* Expi denota células expi transfectadas transitoriamente con cPVRIG, expi par denota células de origen expi. La gMFIr indica la relación de diferencia en el MFI geométrico de la tinción del anticuerpo PVRIG con respecto a sus controles. Concentración indica la concentración a razón de la cual se calculó la gMFIr. No analizado indica que los anticuerpos no se analizaron debido a la ausencia de fijación a hPVRIG de HEK humana o a células expi cPVRIG, o a no cumplir con los requisitos de fijación a subconjuntos de PBMC. Los anticuerpos destacados son cuatro anticuerpos para los cuales se realizó humanización (Véase Figura 24). Los experimentos se describen en el Ejemplo 21 de USSN 15/048.967, incorporado en la presente como referencia.

[0044] Figura 15. Resumen de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos PVRIG en el ensayo de competición en función de FACS. Se indica el IC50 de inhibición. Ningún IC50 indica que estos anticuerpos no son bloqueadores. Los anticuerpos destacados son cuatro anticuerpos para los cuales se realizó humanización (Ver Figura 24).

[0045] Figura 16. Resumen de la actividad de anticuerpos seleccionados de PVRIG en ensayos de citotoxicidad de linfocitos NK contra células Reh y MOLM-13. La relación de cambio en la citotoxicidad respecto al control se calculó al dividir el nivel absoluto de inactivación (%) en la condición con el anticuerpo PVRIG, por el nivel absoluto de inactivación (%) con el anticuerpo de control. La relación de cambio se calcula a partir

de la relación 5:1 del efector con respecto a la diana.

[0046] Figura 17. 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.

[0047] Figura 18. Fijación de anticuerpos anti-PVRIG humano a variantes PVRIG híbridas de *Macaca fascicularis,* humano, *Macaca fascicularis*/humano. Se muestra la fijación de anticuerpos a PVRIG de *Macaca fascicularis* de tipo silvestre (●), PVRIG de *Macaca fascicularis* H61R (■), PVRIG de *Macaca fascicularis* P67S (▲), PVRIG de Macaca fascicularis L95R/T97I (▼), y PVRIG humano de tipo silvestre (♦). Las señales de ELISA se grafican en función de la concentración de anticuerpos.

[0048] Figura 19. La correlación del grupo epítopo y la reactividad cruzada de *Macaca fascicularis* de anticuerpos anti-PVRIG humano.

[0049] Figura 20A a B (A) Especificidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) hacia células HEK modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar células de origen PVRIG y HEK. Los datos muestran mediciones de MFI geométricas absolutas (gMFI) como una función del aumento de la concentración de anticuerpos. (B) Especificidad de CHA.7.538.1.2.H4(S241P) hacia células HEK modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar células de origen PVRIG y HEK. Los datos muestran mediciones de MFI geométricas absolutas (gMFI) como una función del aumento de la concentración de anticuerpos.

[0050] Las Figuras 21 A a B ilustran la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) (A) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (B) de fijarse a células Jurkat que expresan endógenamente PVRIG confirmado por la expresión de ARN. (A) Fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) a células Jurkat. Los datos muestran mediciones de MFI geométricas absolutas (gMFI) como una función del aumento de la concentración de anticuerpos. La tinción de isotipos se muestra como un control negativo. (B) Fijación de CHA.7.538.1.2.H4(S241P) a células Jurkat. Los datos muestran mediciones de MFI geométricas absolutas (gMFI) como una función del aumento de la concentración de anticuerpos. La tinción de isotipos se muestra como un control negativo. Ambos anticuerpos son capaces de fijarse a células Jurkat con una afinidad comparable a las células HEK hPVRIG.

[0051] La Figura 22 ilustra la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para fijarse a los linfocitos T CD8 que se expandieron por

exposición al péptido de CMV (494-503, NLVPMVATV) y expresan endógenamente PVRIG confirmado por la expresión de ARN. Fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) a linfocitos T CD8 expandidos con péptido de CMV. Los datos muestran mediciones de MFI geométricas absolutas (gMFI) como una función del aumento de la concentración de anticuerpos. La tinción de isotipos se muestra como un control negativo.

[0052] Figuras 23A a B. (A) Especificidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) hacia células expi modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar células de origen PVRIG y expi de *Macaca fascicularis*. Los datos muestran mediciones de MFI geométricas absolutas (gMFI) como una función del aumento de la concentración de anticuerpos. Especificidad de CHA.7.538.1.2.H4(S241P) hacia células expi modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar células de origen PVRIG y expi de *Macaca fascicularis*. Los datos muestran mediciones de MFI geométricas absolutas (gMFI) como una función del aumento de la concentración de anticuerpos.

[0053] Figuras 24A a B. (A) Bloqueo de Fc PVRIG a células HEK por CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Los datos muestran el porcentaje de fijación de Fc PVRIG a las células HEK como una función del aumento de la concentración de anticuerpos en relación con la señal máxima inducida por Fc PVRIG y el fondo solamente secundario. (B) Efecto de CHA.7.544 sobre la fijación de Fc PVRIG a células HEK. Los datos muestran la gMFI absoluta derivada de la fijación de Fc PVRIG a células HEK en presencia de concentraciones crecientes de CHA.7.544. La cantidad de fijación de Fc PVRIG fue detectada por un anti-Fc de ratón conjugado con Alexa 647.

[0054] Figuras 25A a B. (A) Bloqueo de células Fc PVRL2 a HEK hPVRIG por CHA.7.518.1.H4(S241P), CHA.7.538.1.2.H4(S241P) y CHA.7.530.3. Los datos muestran el porcentaje de fijación de Fc PVRL2 a las células HEK hPVRIG como una función del aumento de la concentración de anticuerpos en relación con la señal máxima inducida por Fc PVRL2 y el fondo solamente secundario. (B) Efecto de CHA.7.544 sobre la fijación de Fc PVRL2 a células HEK hPVRIG. Los datos muestran el porcentaje de fijación de Fc PVRL2 a las células HEK hPVRIG como una función del aumento de la concentración de anticuerpos en relación con la señal máxima inducida por Fc PVRL2 y el fondo solamente secundario.

[0055] Figura 26. Muestra el porcentaje de fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) conjugados con Alexa 647 con respecto a su señal máxima en la preincubación de células Jurkat con CHA.7.518.1 no conjugado H4 (S241P),

CHA.7.538.1.2.H4(S241P) y un control de isotipo.

[0056] Figuras 27A a B A) Los anticuerpos humanizados PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), aumentan la proliferación de linfocitos T CD4+. Los datos representativos (n≥2) muestran el porcentaje de linfocitos T CD4+ que proliferan, de CFSE bajo, (media más desviación estándar) de un solo donante de linfocitos T CD4+ humanos cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo-DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo IgG. La línea discontinua indica el porcentaje de valor inicial de linfocitos T CD4+, de CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano. Los números se refieren al porcentaje de aumento o disminución de la proliferación de los tratamientos con anticuerpos anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipo relevantes (B) Los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), aumentan la proliferación de linfocitos T CD4+ de una manera dependiente de hPVRL2. Los datos representativos (n≥2) muestran el porcentaje de linfocitos T CD4+ que proliferan, de CFSE bajo, (media más desviación estándar) de un solo donante de linfocitos T CD4+ humanos en respuesta al cocultivo con las células CHO-S OKT3 de origen, o CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo-DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo IgG. La línea discontinua indica el porcentaje de valor inicial de linfocitos T CD4+, de CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con los anticuerpos de ya sea isotipo IgG4 humano o IgG1 de ratón. Los números se refieren al porcentaje de aumento o disminución de la proliferación de los tratamientos con anticuerpos anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipos relevantes.

[0057] Figuras 28A a C. A) Los anticuerpos humanizados PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), aumentan la proliferación de linfocitos T CD8+. Los datos representativos (n≥2) muestran el porcentaje de linfocitos T CD8+ que proliferan, de CFSE bajo, (media más la desviación estándar) de un solo donante de linfocitos T CD8+ humanos (donante 232) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo IgG. La línea discontinua indica el porcentaje de valor inicial de linfocitos T CD8+, de CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con los anticuerpos de isotipo IgG1 de ratón o IgG4 humano. Los

números se refieren al porcentaje de aumento o disminución de la proliferación de los tratamientos con anticuerpos anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipos relevantes. (B) Los anticuerpos humanizados PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), aumentan la proliferación de linfocitos T CD8+. Los datos representativos (n≥2) muestran el porcentaje de linfocitos T CD8+ que proliferan, de CFSE bajo, (media más la desviación estándar) de un solo donante de linfocitos T CD8+ humanos (donante 234) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo-DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo IgG. La línea discontinua indica el porcentaje de valor inicial de linfocitos T CD8+, de CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con los anticuerpos de isotipo IgG1 de ratón o IgG4 humano. Los números se refieren al porcentaje de aumento o disminución de la proliferación de los tratamientos con anticuerpos anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipos relevantes. (C) Los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), aumentan la secreción de IFNγ de los linfocitos T CD8+. Los datos representativos (n≥2) muestran la pg/ml de IFNγ producido (media más desviación estándar) por tres donantes de linfocitos T CD8+ humanos diferentes (donantes 231, 232 y 234) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2 en presencia de un anticuerpo anti-DNAM-1 o diferentes anticuerpos anti-PVRIG o controles de isotipo IgG. La línea discontinua indica la producción inicial de IFNγ después del tratamiento con el anticuerpo de isotipo IgG4 humano. Los números se refieren al aumento porcentual de la secreción de IFNγ de los tratamientos con anticuerpos anti-PVRIG en comparación con el control de isotipo IgG4.

[0058] Figura 29. Los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), aumentan constantemente la proliferación de linfocitos T CD4+ en múltiples donantes, mientras que CHA.7.530.3 y CHA.7.544 no lo hacen. El porcentaje de proliferación en relación con el control de isotipos se calculó al dividir el porcentaje de linfocitos T CD4+ de CFSE bajo después del tratamiento con anticuerpos PVRIG sobre el tratamiento con anticuerpos de isotipos para cada donante. El porcentaje de proliferación para el tratamiento con anticuerpos de isotipo se estableció en cero. Cada símbolo en la gráfica representa un donante diferente.

[0059] Figuras 30A a D. (A) Efecto dependiente de la dosis de los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), sobre la proliferación de linfocitos T CD4+. Los datos representativos (n≥2) con 2 donantes

humanos diferentes muestran el porcentaje medio de linfocitos T CD4+ en proliferación después de una titulación de dosis de 66nM a 0,726nM con el isotipo IgG4 humano, anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538.1.2.H4(S241P). La EC50 estimada está dentro del rango de un solo dígito nM. (B) Efecto dependiente de la dosis de los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), sobre la proliferación de linfocitos T CD8+. Los datos representativos (n≥2) con 2 donantes humanos diferentes muestran el porcentaje medio de linfocitos T CD8+ en proliferación después de una titulación de dosis de 66 nM a 0,264nM con el isotipo IgG4 humano, anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P), CHA.7.38.1.2, o CHA.7.544. La EC50 estimada está dentro del rango de un solo dígito nM.

[0060] Figuras 31A a C. (A) Análisis de citometría de flujo de la expresión de TIGIT y PVRIG en los TIL y PVR, expresión de PVRL2 en la línea celular de melanoma 624. Los valores representan la relación de intensidad de fluorescencia media (MFI) frente al control de isotipo. (B-C) Experimento representativo que muestra la secreción de IFNγ (B) y TNF (C) por los TIL en cocultivo con células de melanoma 624 a E:D de 1:3 durante 18 horas en presencia de control de isotipo, anticuerpos anti-TIGIT (30 µg/ml) o anti-PVRIG (10 ug/ml) como monotratamiento (histogramas azules) o en combinación con anti-TIGIT (histogramas verdes). El porcentaje del efecto del monotratamiento con anticuerpos se comparó con el tratamiento con control de isotipo mIgG1 y el porcentaje del efecto del tratamiento combinado con anticuerpos se comparó con el monotratamiento con anti-TIGIT.

[0061] Figuras 32A a H. Los TIL (209-gp100/463-F4-gp100) se cocultivaron con células de melanoma 624 en E:D de 1:3 durante 18 horas en presencia de los anticuerpos anti PVRIG CHA.7.518.1.H4(S241P) o CHA.7.538 con o sin combinación con anti-TIGIT (aTIGIT) y probado para la secreción de citocinas. El porcentaje del efecto del tratamiento con abdominales se comparó con el tratamiento de control de isotipo y se graficó la media de 5 experimentos (F4) o 6 experimentos (209). Se calculó la prueba T pareada de dos colas para cada tratamiento en comparación con el isotipo o en combinación, en comparación con el anti-TIGIT solo; se indican los valores p.

[0062] Figuras 33A a B. (A) El anticuerpo PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y un anticuerpo anti-TIGIT aumentan la proliferación de linfocitos T CD4+ en comparación con los tratamientos con anticuerpos individuales. Los datos representativos (n≥2) muestran el porcentaje de linfocitos T CD4+ que proliferan,

de CFSE bajo, (media más desviación estándar) de un solo donante de linfocitos T CD3+ humanos (donante 143) cuando se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. La línea discontinua indica el porcentaje de valor inicial de linfocitos T CD4+, de CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano. (B) El anticuerpo PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y el anticuerpo anti-TIGIT aumentan la proliferación de linfocitos T CD4+ en comparación con los tratamientos con anticuerpos individuales. Los datos representativos (n≥2) muestran el porcentaje de linfocitos T CD4+ que proliferan, de CFSE bajo, (media más desviación estándar) de un solo donante de linfocitos T CD4+ humanos (donante 201) cuando se cocultivan con células CHP-S OKT3 hPVRL2. La línea discontinua indica el porcentaje de valor inicial de linfocitos T CD4+, de CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano. Los números se refieren al porcentaje de aumento o disminución de la proliferación de los tratamientos con anticuerpos anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipos relevantes.

[0063] Figuras 34A a B. (A): La combinación del anticuerpo PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y el anticuerpo anti-TIGIT aumenta la proliferación de linfocitos T CD8+. Los datos representativos (n≥2) muestran el porcentaje de linfocitos T CD8+ que proliferan, de CFSE bajo, (media más desviación estándar) de un donante de linfocitos T CD8+ humanos representativo (donante 232) cuando se cocultivan con células CHP-S OKT3 hPVRL2. La línea discontinua indica el porcentaje de valor inicial de linfocitos T CD8+, de CFSE bajo, que proliferan después del tratamiento con el anticuerpo de isotipo IgG4 humano. Los números se refieren al porcentaje de aumento o disminución de la proliferación de los tratamientos con anticuerpos anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipos relevantes. (B) La combinación del anticuerpo PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y el anticuerpo anti-TIGIT aumenta la secreción de IFNy de linfocitos T CD8+. Los datos representativos (n≥2) muestran el pg/ml de IFNy producido (media más desviación estándar) por un donante de linfocitos T CD8+ humanos representativo (donante 232) al cocultivarse con células CHP-S OKT3 hPVRL2. La línea discontinua indica la producción inicial de IFNγ después del tratamiento con el anticuerpo de isotipo IgG4 humano. Los números se refieren al porcentaje de aumento o disminución de la secreción de IFNy de los tratamientos con anticuerpos anti-PVRIG o anti-DNAM-1, respectivamente, en comparación con los anticuerpos de control de isotipos relevantes.

[0064] La Figura 35 representa el diseño del sistema experimental del Ejemplo 2(3).

[0065] Las Figuras 36A a C muestran un histograma que representa los niveles de expresión de PVRIG (mediante el uso de anti-PVRIG humano CHA.7.538.AF647), TIGIT (mediante el uso de anti-TIGIT humano Cat. 17-9500-41 eBioscience) y DNAM-1 (mediante el uso de anti-CD226-APC humano Cat.338312 biolegend) en los TIL. La relación de expresión se compara con el control de isotipo (Iso).

[0066] Figura 37. Diagrama resumido del efecto de los anticuerpos anti PVRIG en la secreción de IFNγ de los TIL. Los TIL se cocultivaron con células CHO-S HLA-A2/B2M que sobreexpresan PVRL2 en una relación E:D de 1:3 durante 18 horas en presencia de anticuerpos anti PVRIG (c518, c538 y 544) o con un anticuerpo anti TIGIT. Cada punto representa un promedio de datos de la secreción de IFNγ del mismo TIL de diferentes experimentos. El porcentaje indicado es el diferente entre cada tratamiento con anticuerpos en comparación con el control de isotipo. Se calculó la prueba T pareada de dos colas para cada tratamiento en comparación con 544 o en combinación, en comparación con anti TIGIT solo, se indican los valores p. Número de experimentos realizados por cada TIL; 209 (N=3), F4 (N=2), F5 (N=3) y MART1 (N=2).

[0067] Figura 38. Diagrama resumido del efecto de la respuesta de dosis de c518 y c538 sobre la secreción de TNF-α de los TIL. Los TIL se cocultivaron con células CHO-S HLA-A2/B2M que sobreexpresan PVRL2 en una relación de efector con respecto a diana de 1:3 durante 18 horas en presencia de anticuerpos anti PVRIG (c518, c538 o control de isotipo) como se describe en el Ejemplo 2(3).

[0068] Figuras 39A a C. Los TIL se cocultivaron con células CHO-S HLA-A2/B2M diana que sobreexpresan PVRL2 en una relación E:D de 1:3 durante 18 horas en presencia de anticuerpos anti PVRIG (c518, c538 y 544) o con un anticuerpo anti TIGIT. El porcentaje indicado en las tablas anteriores es la diferencia en el efecto de la secreción de citocinas de los TIL de cada tratamiento con anticuerpos en comparación con su control de isotipo. El primer experimento se representa en las Figuras A y B, y el segundo experimento en la Figura C.

[0069] Figura 40. Diseño de ensayo de cocultivo CHO-S OKT3. Los linfocitos T CD3+ etiquetados con CSFSE se cocultivaron con CHO-S-OKT3-PVRL2 o con células transfectadas de forma simulada durante 5 días. Se analizó el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas.

[0070] Figura 41. Efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la secreción de IFNγ

sobre células PVRL2 CHO-OKT3 en donantes respondedores frente a donantes no respondedores. Las células CD3+ de 2 donantes diferentes se cocultivaron con células CHO-S-PVRL2 en E:D de 5:1 durante 5 días en presencia de anticuerpos anti PVRIG y se analizaron la secreción de citocinas y la proliferación de linfocitos T. (A) "donante respondedor" en el que observamos un efecto relacionado con los anticuerpos anti-PVRIG. (B) 'donante no respondedor' en el cual no observamos efectos relacionados con el tratamiento con anticuerpos.

[0071] Figura 42. Efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la proliferación de CD4 y CD8 del donante respondedor. Los linfocitos T CD3+ etiquetados con CFSE se cocultivaron con células CHO-S-PVRL2 en E:D de 5:1 durante 5 días en presencia de anticuerpos anti PVRIG o anticuerpos anti-TIGIT. El efecto sobre la regulación de la proliferación de linfocitos T en CD4 o CD8 se evaluó mediante citometría de flujo. Se presenta el porcentaje de células en proliferación (CFSE bajo) (A) o el número total de células (B) de CD4+ CFSE bajo o CD8+CFSE bajo.

[0072] Figura 43. Muestra el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG sobre la secreción de IFNγ o la proliferación de CD8 del donante respondedor. Las células CD3+ se cocultivaron con células CHO-S-PVRL2 en E:D de 5:1 durante 5 días en presencia de anticuerpos anti PVRIG y se analizaron para determinar (A) la secreción de citocinas y la (B) proliferación de linfocitos T. El porcentaje del efecto del tratamiento con anticuerpos se comparó con el tratamiento de control de isotipo y se presenta la media de 5 donantes "respondedores" (respondedores). (C) Niveles de secreción de IFNγ de los mismos 5 donantes en el cocultivo con CHOS-OKT3 PVRL2 como se describe en las secciones A y B luego del tratamiento con isotipo versus anticuerpos anti-PVRIG. El valor p representa la prueba T pareada en relación.

[0073] La Figura 44 es una tabla de resumen del efecto del tratamiento con anticuerpos a través de los donantes analizados (n=10). Los porcentajes indicados representan el efecto del tratamiento con anticuerpo en una lectura específica (indicada en los títulos de las columnas) en comparación con el control de isotipo pertinente. Los donantes "respondedores" (donantes n.° 3, 72.226.345 y ES_001) se consideraron como "respondedores», que algunos anticuerpos anti-PVRIG (principalmente CHA.7.518) mejoraron el IFNγ o la proliferación frente a los controles de isotipo.

[0074] Las Figuras 45A a B representan los resultados de los experimentos con varios anticuerpos. Las afinidades (nM) se muestran en A, en donde las células HEK hPVRIG son células HEK transformadas con hPVRIG, como se analiza en la presente, y las

células Jurkat expresan hPVRIG endógena. (B) representa la gMFI mediante el uso de 4 anticuerpos diferentes contra los linfocitos T CD8 primarios del donante 1 y (C) siendo linfocitos T CD8 primarios del donante 2.

[0075] Las Figuras 46A a B representan interacciones de TIGIT con células CHO. (A) La proteína de Fc de TIGIT humano se fija a las células CHO. Se evaluaron las concentraciones clasificadas de Fc de TIGIT humano y el control de synagis IgG1 para determinar su capacidad para fijarse a células CHO en un ensayo de fijación basado en FACS. (B) La PVR humana se expresa en linfocitos T CD4 activados. Los linfocitos T CD4 se cocultivaron con células CHO que expresan el scFv del anticuerpo OKT3 y se activaron durante 5 días. En el día 5, los linfocitos T CD4 se analizaron para determinar la expresión de PVR y la dilución de CFSE.

[0076] Las Figuras 47A a C representan las respuestas antitumorales de los anticuerpos anti-mPVRIg y anti-PDL-1 en el modelo de tumor CT26. A-B. Los grupos de 10 ratones BALB/c recibieron inyección por vía subcutánea de 5 x 10^5 células CT26. Después de medir los tumores el día 4, los ratones se aleatorizaron (40 mm3 de volumen tumoral medio por grupo) y luego se trataron con el mAb designado (100 o 200 µg/dosis IP) seguido de dosis adicionales los días 7, 11, 14, 18 y 21. A. Los grupos fueron tratados con 6 dosis de agentes individuales. Anti-PDL-1 vs control *** p <0,0001. Los volúmenes tumorales se representan como el volumen medio + SEM. B. Los volúmenes del tumor se midieron dos veces por semana. Se indica el número de ratones libres de tumor (TF) por grupo. C. proporciones de supervivencia de los grupos asignados; Anti-PDL-1 vs control ** p = 0,005.

[0077] Las Figuras 48A a C representan las respuestas antitumorales de la combinación de los anticuerpos anti-PVRIG y anti-PDL-1 en el modelo de tumor CT26. A-B. Los grupos de 10 ratones BALB/c recibieron inyección por vía subcutánea de 5 x 10^5 células CT26. Después de medir los tumores el día 7, los ratones se aleatorizaron (75 mm3 de volumen tumoral medio por grupo) y luego se trataron con el mAb designado (300 µg/dosis IP) seguido de dosis adicionales los días 11, 14, 18,21 y 25. A. Los grupos fueron tratados con 6 dosis de agentes combinados. Anti-PDL-1+mAb 407 vs control p = 0,0005; anti-PDL-1 y mAb 406 vs control p = 0,056. B. Los volúmenes tumorales se midieron tres veces por semana. Se indica el número de ratones libres de tumor (TF) por grupo. C. proporciones de supervivencia de los grupos asignados; Anti-PDL-1 + mAb 407 vs control *p =0,0088.

[0078] Las Figuras 49A a D 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 liviana variable (C y D, respectivamente) para AB-407 (BOJ-5G4-F4).

[0079] La Figura 50 representa las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de IgG1 (con algunas sustituciones de aminoácidos útiles), IgG2, IgG3, IgG4, IgG4 humanas con una variante de bisagra que encuentra uso particular en la presente invención, y los dominios constantes de las cadenas livianas kappa y lambda.

[0080] La Figura 51 representa las secuencias de TIGIT ECD humano y de *Macaca Fascicularis* y de las proteínas PVR ECD humanas.

[0081] Figura 52. Muestra el resumen de fijación de citometría de flujo para los fab anti-TIGIT. Todas los fab positivos únicos según ELISA se analizaron mediante citometría de flujo. La media de intensidad de fluorescencia (MFI) se midió para las células Expi293 que sobreexpresan el TIGIT humano o de *Macaca Fascicularis*, así como las células Expi293 de origen. Se calculó la relación de MFI para la fijación de diana específica frente a la fijación de diana secundaria. Se muestran los datos de los clones seleccionados.

[0082] Las Figuras 53A y B 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).

[0083] Figura 54. Muestra los resultados de KD de FACS de la fijación de los mAb anti-TIGIT a las células que sobreexpresan TIGIT humano Expi293 como se describe en el Ejemplo 12.

[0084] Figura 55. Muestra los resultados de KD de FACS de la fijación de los mAb a las células que sobreexpresan TIGIT de *Macaca fascicularis* Expi293.

[0085] Figura 56. Muestra los resultados del Ejemplo 14, en donde se muestran las constantes de velocidad cinética resultantes y las constantes de disociación de equilibrio donde los datos fueron lo suficientemente confiables como para estimar las constantes de fijación.

[0086] Las Figuras 57A a B muestran los resultados de fijación de variante PVR humana-Fc a células que sobreexpresan TIGIT humano Expi293 en el Ejemplo 4. Figura A (izquierda): curva de fijación generada para el constructo de PVR humana-m2aFc titulado con células que sobreexpresan TIGT humano Expi293. Se muestran la KD y el

intervalo de confianza del 95 %. Figura B (derecha): curva de fijación generada para el constructo de PVR humana-h1Fc titulada con células que sobreexpresan TIGT humano Expi293. Se muestran la KD y el intervalo de confianza del 95 %.

[0087] Figura 58. Muestra una tabla de anticuerpos de fagos que inhiben la fijación de PVR humana-m2aFc a TIGIT humano sobreexpresado en células Expi293. Los mAb se probaron frente al anticuerpo de referencia de bloqueo conocido (BM26) y el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano (Synagis). Un "Sí" indica que el mAb inhibió el hPVR análogo al BM26.

[0088] Figura 59. Muestra una tabla de valores de IC50 de anticuerpos de hibridoma anti-TIGIT que inhiben la fijación de PVR humana-h1Fc a TIGIT humano sobreexpresado en células Expi293. Los valores son representativos de uno de dos experimentos independientes. Los resultados de IC50 para los dos experimentos realizados de forma independiente mostraron un rango de diferencias de solo 1,2-2 veces.

[0089] Figura 60. Muestra los resultados del Ejemplo 6, que los anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de fago y BM, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, BM26 y BM29, aumentan la señalización de IL-2. BM26 y BM29 son ambos el isotipo IgG4 humano (hIgG4 con una variante S241P). Los datos representativos (n≥2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células TIGIT humanas de luciferasa Jurkat IL-2-RE y células de PVR humana aAPC CHO-K1. La concentración de cada anticuerpo fue de 10 µg/ml.

[0090] Figura 61. Muestra resultados adicionales del Ejemplo 6, que los anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de fago y de BM hIgG4, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, BM26 y BM29, aumentan la señalización de IL-2 de una manera dependiente de la dosis. BM26 y BM29 son ambos el isotipo hIgG4. Los datos representativos (n≥2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células TIGIT humanas de luciferasa Jurkat IL-2-RE y células de PVR humana aAPC CHO-K1. Se usó una serie de dilución de 10 puntos y 2 veces a partir de 20 µg/ml para cada anticuerpo.

[0091] Figura 62. Muestra los resultados del Ejemplo 6, que los anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y BM, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, CHA.9.560, BM26 y BM29, aumentan la señalización de IL-2. BM26 y BM29 son ambos el isotipo mIgG1. El anticuerpo anti-TIGIT humano no bloqueador, CHA.9.543, no mejora

la señalización de IL-2 Los datos representativos (n≥2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células TIGIT humanas de luciferasa Jurkat IL-2-RE y células de PVR humana aAPC CHO-K1. La concentración de cada anticuerpo fue de 10 µg/ml.

[0092] Figura 63. Muestra los resultados del Ejemplo 6, que los anticuerpos anti-TIGIT humano mIgG1 derivados de hibridoma y de referencia, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, CHA.9.560 y BM26, aumentan la señalización de IL-2 en una forma dependiente de la dosis. BM26 es el isotipo mIgG1. Los datos representativos (n≥2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células TIGIT humanas de luciferasa Jurkat IL-2-RE y células de PVR humana aAPC CHO-K1. Se usó una serie de dilución de 10 puntos y 2 veces a partir de 20 µg/ml para cada anticuerpo.

[0093] Figura 64. Muestra que los anticuerpos anti-TIGIT humano de fago, hibridoma y BM, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, CHA.9.560, BM26 y BM29 aumentan la señalización de IFNγ específica de antígeno. BM26 se analiza como ambos isotipos hIgG4 y mIgG1, mientras que BM29 solo se analiza como isotipo hIgG4. Los datos representativos (n=2) muestran la cantidad de IFNγ (media +/- desviación estándar) en el sobrenadante del cultivo después de un cocultivo de 24 horas de linfocitos T CD8+ específicos de CMV con células PVR humanas Mel624. La concentración de cada anticuerpo fue de 10 µg/ml. La PVR humana Mel624 utilizada en el ensayo se pulsó con 0,0033 µg/ml o 0,001 µg/ml de péptido.

[0094] Figura 65. Muestra que los anticuerpos anti-TIGIT humano de fago, hibridoma y BM, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560, así como BM26, aumentan la señalización de IFNγ específica de antígeno ya sea en soledad (barras abiertas) o en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P) (barras rayadas). BM26 es el isotipo mIgG1. Para los tratamientos de control de anticuerpo de isotipo, la barra abierta se refiere al anticuerpo de isotipo en soledad, y la barra rayada se refiere al anticuerpo de isotipo en combinación con CHA.7.518.1.H4(S241P). Los datos representativos (n=2) muestran la cantidad de IFNγ (media +/- desviación estándar) en el sobrenadante del cultivo después de un cocultivo de 24 horas de linfocitos T CD8+ específicos de CMV con células Mel624 que sobreexpresan PVR humano y PVRL2 humano. La concentración de cada anticuerpo fue de 10 µg/ml. Las células de PVR humana/PVRL2 humana Mel624

utilizadas en el ensayo se pulsaron con 0,0033 µg/ml o 0,001 µg/ml de péptido.

[0095] Figura 66. Muestrael porcentaje de aumento de la secreción de IFN con anticuerpos anti-TIGIT humano, CHA.7.518.1.H4(S241P), y la combinación de anticuerpos anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P), sobre los respectivos anticuerpos de control de isotipo.

[0096] La Figura 67 es el dendrograma para los experimentos de clasificación de epítopos del Ejemplo 7.

[0097] La Figura 68 es el agrupamiento de los anticuerpos de los experimentos de clasificación de epítopos del Ejemplo 7.

[0098] Figura 69. Muestra la fijación de alta afinidad a las células que sobreexpresan TIGIT humano en una titulación de la dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), anticuerpos de referencia (BM26, BM29) y el control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis) en células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano, como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. Todos los anticuerpos se valoraron mediante el uso de una dilución en serie de 2 veces en 11 puntos a partir de 10 µg/ml (133,33 nM [sitio de fijación]). Se agregó anti-F(ab') humano de cabra etiquetado con AF647 (Jackson Immunoresearch) a las células para detectar la fijación de anticuerpos anti-TIGIT. Se muestran la gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT fijados a las células Expi293 que sobreexpresan TIGIT (línea negra) y las células Expi293 de origen (línea gris). Los valores de K_D +/- 95 % CI, y los ajustes de curva se indican debajo de cada gráfico.

[0099] Figura 70. Muestra que los anticuerpos anti-TIGIT son reactivos cruzados a TIGIT de *Macaca fascicularis* en una titulación de la dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), anticuerpos de referencia (BM26, BM29), y el control del isotipo hIgG4 (anti-Synagis) en las células expi293 que sobreexpresan TIGIT de *Macaca fascicularis*, como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. Todos los anticuerpos se titularon mediante el uso de una dilución en serie de 2 veces en 11 puntos a partir de 10 µg/ml (133,33 nM [sitio de fijación]). Se agregó anti-F(ab') humano de cabra etiquetado con AF647 (Jackson Immunoresearch) a las células para detectar la fijación de anticuerpos anti-TIGIT. Se muestran la gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT fijados a las células Expi293 que sobreexpresan TIGIT de *Macaca fascicularis*

(línea negra), y las células Expi293 de origen (línea gris). Los valores de K_D +/- 95 % CI, y los ajustes de curva se indican debajo de cada gráfico.

[00100] Figura 71. Muestra que los anticuerpos de fago madurados por afinidad son reactivos cruzados a TIGIT de ratón en una titulación de dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad reformateados como IgG1 de ratón (mIgG1) (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos anti-TIGIT de ratón de referencia (BM27 mIgG1, BM30 mIgG1), y el control de isotipo mIgG1 (anti-Synagis) se muestran, como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. A) La gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT fijados a las células HEK que sobreexpresan TIGIT de ratón (línea negra) y las células HEK de origen (línea gris). B) La gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT (línea negra) o Synagis mIgG1 (línea gris) fijados a los linfocitos T CD4+CD25+Foxp3+ reguladores aislados de tumores Renca implantados en s.c. en ratones Balb/c. Los anticuerpos anti-TIGIT se titularon mediante una serie de dilución en serie de 2 o 3 veces a partir de 15 µg/ml (200 nM [sitio de fijación]), o 10 µg/ml (132 nM [sitio de fijación]), respectivamente. Se agregó anti-IgG-Fc de ratón en cabra etiquetada con AF647 (Southern Biotech) a las células para detectar la fijación de los anticuerpos anti-TIGIT en células que sobreexpresan TIGIT de ratón. Los anticuerpos anti-TIGIT se conjugaron directamente con AF647 para la fijación de Treg de ratón. Se indican los valores de K_D para cada anticuerpo anti-TIGIT.

[00101] Figura 72. Muestra una titulación de la dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13) y anticuerpos de referencia (BM26, BM29) en linfocitos T CD95+CD28-CD8+CD3+ efectores de memoria humanos de 3 PBMC de donantes sanos (donantes 321, 322 y 334), como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. Las PBMC se tiñeron en la superficie con anticuerpos contra los siguientes marcadores de linaje CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD28, CD56 y CD95 (BD Biosciences, BioLegend), así como colorante live/dead fixable aqua (Life Technologies). Los anticuerpos anti-TIGIT etiquetados con AF647 y el anticuerpo de control del isotipo hIgG4 (anti-Synagis) se titularon luego mediante el uso de una dilución en serie de 3 veces en 12 puntos, a partir de 30 µg/ml (396 nM [sitio de fijación]). Se muestra la gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT fijados a los linfocitos T efectores de memoria. Los valores de KD para cada anticuerpo en los 3 donantes diferentes se informan en la tabla. Los anticuerpos de fagos maduros por afinidad (CPA.9.083 y CPA.9.086) tuvieron la mayor afinidad de fijación a los linfocitos T efectores de memoria humanos.

[00102] Figura 73. Muestra una titulación de dosis de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.103), anticuerpo de hibridoma humanizado (CHA.9.547.1), y el anticuerpo de referencia (BM26) en linfocitos T $CD95^{+}CD28^{-}CD8^{+}CD3^{+}$ efectores de memoria de *Macaca fascicularis* de las PBMC aisladas de 2 monos *Macaca fascicularis* sin tratamiento previo (BioreclamationIVT), como se describe en los experimentos del Ejemplo 3. Las PBMC se tiñeron en la superficie con anticuerpos contra los siguientes marcadores de linaje CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD28, CD56 y CD95 (BD Biosciences, BioLegend), así como colorante live/dead fixable aqua (Life Technologies). Los anticuerpos anti-TIGIT etiquetados con AF647 y el anticuerpo de control del isotipo hIgG4 (anti-Synagis) se titularon luego mediante el uso de una dilución en serie de 3 veces en 12 puntos, a partir de 30 µg/ml (396 nM [sitio de fijación]). La gMFI de los anticuerpos anti-TIGIT fijados a los linfocitos T efectores de memoria se muestra con la gMFI del anticuerpo de control de isotipo hIgG4 anti-Synagis sustraído. Los valores de K_D para cada anticuerpo en los 2 donantes se informan en la tabla. Los anticuerpos de fagos maduros por afinidad (CPA.9.083 y CPA.9.086) tuvieron la afinidad de fijación más alta a los linfocitos T efectores de memoria de *Macaca fascicularis*.

[00103] Figura 74. Muestra la cinética SPR de la fijación del anticuerpo anti-TIGIT a TIGIT humano, de *Macaca fascicularis* y de ratón, como se describe en los experimentos del Ejemplo 5. La velocidad cinética y las constantes de disociación de equilibrio para los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.103), los anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.1 y CHA.9.547.7) y los anticuerpos de referencia (BM26 BM29) se determinaron mediante SPR en el instrumento ProteOn.

[00104] La Figura 75 muestra que los anticuerpos anti-TIGIT bloquean las interacciones PVR/TIGIT, como se describe en los experimentos del Ejemplo 4. Las células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano se preincubaron con los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), anticuerpos de referencia (BM26, BM29), o el control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis). Todos los anticuerpos se titularon con una dilución en serie de 2,5 veces en 11 puntos a partir de 10 µg/ml (133,33 nM [sitio de fijación]). Después de la preincubación del anticuerpo, se agregó PVR-m2aFc humano a las células a 158 nM [sitio de fijación] o EC_{90}. A continuación, se agregó anti-IgG-Fc de ratón en cabra etiquetada con AF647 (Southern Biotech) a las células para detectar

la fijación de anticuerpos anti-TIGIT. El porcentaje de inhibición de la fijación de PVR-m2aFc a las células Expi293 que sobreeexpresan TIGIT humano se muestra para cada anticuerpo. Los valores de IC_{50} para cada anticuerpo anti-TIGIT humano se informan en la tabla (n=2 experimentos).

[00105] Figura 76. Muestra los resultados del Ejemplo 6, que los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), los anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13) y el anticuerpo de referencia (BM26) aumentan la señalización de IL-2 de una manera dependiente de la dosis. Synagis hIgG4 es el anticuerpo de control de isotipo. Los datos representativos (n≥2) muestran la RLU (media +/- desviación estándar) de la señal de luciferasa de un cocultivo de 6 horas de células TIGIT humanas de luciferasa Jurkat IL-2-RE y células PVR humanas CHO-K1. Se usó una serie de dilución de 19 puntos y 1,5 veces, a partir de 20 µg/ml para cada anticuerpo.

[00106] Figura 77. Muestra que los anticuerpos anti-TIGIT inducen IFNγ en linfocitos T CD8+ específicos de CMV. Se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con linfocitos T CD8+ específicos de CMV humano para evaluar el efecto de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), y anticuerpos de referencia (BM26, BM29) en la secreción de citocinas específica de antígeno, como se describe en los experimentos del Ejemplo 6. La línea celular diana utilizada en el ensayo fueron las células de adenocarcinoma pancreático HLA-A2+, Panc.05.04 que expresa endógenamente PVR y PVRL2 humanos. Se pulsaron células Panc.05.04 con el péptido pp65 de CMV a 0,03 µg/ml o 0,01 µg/ml a 37 °C durante 1 hora. Las células se lavaron entonces y se colocaron en placas a razón de 50.000 células/cavidades en placas tratadas con cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 cavidades. Se agregaron anticuerpos anti-TIGIT humano o el anticuerpo hIgG4 de control de isotipo (anti-Synagis) a una concentración de 0,1 µg/ml. Los linfocitos T CD8+ específicos de CMV humanos de un solo donante se expandieron de acuerdo con el protocolo anterior. Se agregaron 50.000 linfocitos T CD8+ humanos a cada cavidad. Los cocultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO2 durante 24 horas. La cantidad de interferón gamma humano (IFNγ) en el sobrenadante de cocultivo se midió mediante citometría de flujo con un ensayo de microesferas citométricas (BD Biosciences). El porcentaje de aumento de la secreción de IFNγ para cada anticuerpo sobre el isotipo hIgG4 se resume en la tabla (n=2 experimentos).

[00107] Figura 78. Muestra que los anticuerpos anti-TIGIT aumentan el IFNγ cuando se combinan con un anticuerpo PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P). Se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con linfocitos T CD8+ específicos de CMV humano para evaluar el efecto de los anticuerpos de fago madurados por afinidad (CPA.9.083, CPA.9.086), anticuerpos de hibridoma humanizados (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), y anticuerpos de referencia (BM26, BM29) en la secreción de citocinas específicas de antígeno en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG, CHA.7.518.1. La línea celular diana utilizada en el ensayo fueron las células de adenocarcinoma pancreático HLA-A2+, Panc.05.04 que expresa endógenamente PVR y PVRL2 humanos. Se pulsaron células Panc.05.04 con el péptido pp65 de CMV a 0,03 µg/ml o 0,01 µg/ml a 37 °C durante 1 hora. Las células se lavaron entonces y se colocaron en placas a razón de 50.000 células/cavidades en placas tratadas con cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 cavidades. Se agregaron anticuerpos anti-TIGIT humano o el anticuerpo de control de isotipo hIgG4 (anti-Synagis) a una concentración de 0,1 µg/ml en combinación con CHA.7.518.1 (barras rayadas) o un anticuerpo de isotipo hIgG4 de control a 10 µg/ml (barras sólidas). Los linfocitos T CD8+ específicos de CMV humanos de un solo donante se expandieron de acuerdo con el protocolo anterior. Se agregaron 50.000 linfocitos T CD8+ humanos a cada cavidad. Los cocultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO2 durante 24 horas. La cantidad de IFNγ humano en el sobrenadante de cocultivo se midió mediante citometría de flujo con un ensayo de microesferas citométricas (BD Biosciences). El porcentaje de aumento de la secreción de IFNγ para cada anticuerpo sobre el isotipo hIgG4 se resume en la tabla (n=2 experimentos).

[00108] Figura 79. Muestra el análisis de correlación de la expresión de PVRIG y TIGIT en linfocitos T CD4+ y CD8+ de tumores disociados. Para cada muestra de tumor, se calculó una relación de intensidad de fluorescencia media (MFIr), se realizó un análisis de correlación de Spearman, y se informaron un valor r2 y un valor p.

[00109] Figura 80. Muestra los resultados de inhibición del crecimiento tumoral y supervivencia en ratones KO con inactivación de TIGIT tratados con un anticuerpo anti-PVRIG de ratón. Grupos de 7-10 ratones KO con inactivación de TIGIT y C57BL/6 WT recibieron inyección de 1×10^5 células B16/Db-hmgp100. Los ratones se trataron dos veces por semana durante 3 semanas, a partir del día de la inoculación (día 0), con el anticuerpo designado. A) Los volúmenes medios de tumor +/- error estándar de la media (SEM) se muestran en el gráfico superior, en donde *** indica un valor p <0,001 para KO con inactivación de TIGIT tratado con anticuerpo anti-PVRIG de ratón (Clon 407) en

comparación con C57BL/6 WT tratado con el anticuerpo de control de isotipo mIgG1. Los volúmenes de tumores para ratones individuales dentro de cada grupo de tratamiento con anticuerpos se muestran como gráficos de araña en los gráficos inferiores. B) Tabla que resume la TGI medido en los días indicados en comparación con los ratones C57BL/6 WT de control tratados con el control de isotipo mIgG1. C) Supervivencia de ratones después de la inyección s.c. de células B16/Db-hmgp100.

[00110] Las Figuras 81A a C representan los tratamientos de combinación con los anticuerpos indicados en comparación con el control en las células Mel-624, Colo205, y Panc.05.04. Linfocitos T específicos de gp100 o CMVpp65 se cocultivaron con células Mel-624, Colo205 y Panc.05.04, péptido gp100 o CMVpp65 y los anticuerpos indicados a 10 mg/ml. La concentración de IFN-γ en los medios condicionados se determinó a las 24 h. Se muestra promedio + desviación estándar de los triplicados. Se muestra el % de cambio en IFN-γ para cada condición en relación con hIgG4.

[00111] Las Figuras 82A a C representan la expresión de PD-1/TIGIT/PVRIG en linfocitos T CD8 y la expresión de PD-L1, PVR, PVRL2 en células Colo205, Panc.05.04. A) Expresión de PVRIG, TIGIT y PD-1 en linfocitos T reactivos a CMVpp65 expandidos con péptido pp65 con IL-2 e IL-7 durante 10 días. Se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT y PD-1 en linfocitos T reactivos a CMVpp65. B) Se muestra la expresión de PD-L1, PVR y PVRL2 en células Colo205 y Panc.05.04. C) Los linfocitos T específicos de CMVpp65 se cocultivaron con células Colo205 y Panc.05.04, el péptido de CMVpp65 y los anticuerpos indicados a 10 mg/ml. La concentración de IFN-γ en los medios condicionados se determinó a las 24 h. Se muestra promedio + desviación estándar de los triplicados. Se muestra el % de cambio en IFN-γ para cada condición en relación con hIgG4.

[00112] Figura 83. PVRIG tiene su mayor expresión en los subconjuntos de linfocitos citotóxicos de cáncer humano. A) Se muestra la expresión de PVRIG en subconjuntos de células leucocitarias de 5-8 PBMC de donantes sanos. La expresión de PVRIG se define como la relación de MFI de PVRIG en relación con la MFI de control de isotipo. B) Se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT, CD96 y PD-1 en los Treg de sangre periférica en comparación con los subconjuntos de linfocitos T CD8 de 5 PBMC de donantes sanos. C) Los linfocitos T específicos de pp65 de CMV de 3 donantes sanos se expandieron in vitro con el péptido pp65 (495 - 503), IL-2 e IL-7 hasta por 7 días. Se muestra la expresión de TIGIT (azul) y PVRIG (negro) en células tetraméricas HLA-

A2/pp65 (495 - 503). D) Los linfocitos T humanos se cultivaron con DC alogénicas y la expresión de TIGIT y PVRIG se muestra en los linfocitos T CD4+ los días 0, 1, 2 y 7 después de la activación. E) Gráficos representativos de FACS que muestran la expresión de PVRIG (azul) en comparación con el control de isotipo (rojo) en los TIL (linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y linfocitos NK) de un cáncer de pulmón y riñón representativo. F) Se muestra la coexpresión de PVRIG, TIGIT y PD-1 en los TIL CD4 y CD8 de una muestra de cáncer de pulmón. G) Se muestra la expresión de PVRIG en los TIL CD8+ y CD4+ de tumores humanos disociados de diversos tipos de cáncer. Cada punto representa un tumor distinto de un paciente individual. H) Se evaluó la expresión relativa en los TIL CD8 frente a los TIL Treg para PVRIG, TIGIT y PD-1 de tumores de endometrio, riñón y pulmón. Para cada tumor, la expresión del plegamiento en los TIL CD8 se normalizó hasta alcanzar la relación de expresión en los TIL Treg y se graficó. Para A, B, C, G y H, la media $\pm$ SEM se muestra mediante las barras de error.

[00113] Figura 84. La expresión de PVRL2 se potencia en el microentorno tumoral. A) La expresión de PVRL2 se evaluó por IHC en los tumores de pulmón, ovario/endometrio, mama, colon, riñón y melanoma. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Para cada tumor, un patólogo evaluó 2 núcleos y se calificaron según la prevalencia e intensidad de la tinción membranosa en linfocitos tumorales, tal como se describe en los métodos complementarios. Para cada tumor, se muestra la calificación promedio de 2 núcleos. B) Se muestra un tumor de melanoma representativo que muestra la expresión de PVRL2 en células tumorales (flecha) y en las células inmunitarias (*) en el estroma. C) Se muestra la expresión de PVRL2 en una escala log2 a partir de tumores disociados determinados por FACS en los subconjuntos de células $CD45^-$, $CD14^+$ TAM y $Lin^-CD14^-CD33^{hi}$ mDC. La media $\pm$ SEM se muestra para cada tipo de cáncer. La línea de puntos representa que no se observó tinción. Para cada tipo de celda, se requirieron al menos 100 eventos para llevar adelante el análisis. D) Se muestran gráficos representativos de FACS para la expresión de PVRL2 (azul) en comparación con IgG (rojo) para un cáncer de pulmón. E) Para muestras de tumores donde hemos sido capaces de evaluar la expresión tanto de PVRIG como de PVRL2, la expresión de PVRIG en los linfocitos T $CD8^+$ se grafica frente a la expresión de PVRL2 en células $CD14^+$ TAMS y $CD45^-$para cada tumor. Cada punto representa una muestra tumoral individual. La línea roja representa una expresión doble de PVRIG o PVRL2 en comparación con IgG. La Tabla en la Figura 84F muestra la prevalencia de PVRL2 en diversas muestras de tumores.

[00114] Figura 85. Regulación distinta de PVRL2 y PD-L1 en células tumorales. A) IHC evaluó la expresión de PD-L1 y PVRL2 en secciones en serie. Se agruparon las muestras de tumores de la Figura 84 A según el tipo de tejido y se muestra la expresión de PVRL2 en PD-L1 negativo y PD-L1 positivo. Los tumores PD-L1 negativos se definieron como la ausencia de tinción membranosa en linfocitos tumorales o inmunes de cualquiera de los núcleos duplicados para un tumor dado. La tinción PD-L1 positiva se definió como la tinción membranosa en al menos 1 núcleo de un tumor. Las barras representan la media $\pm$ SEM para cada grupo. B, C) expresión representativa de un tumor de endometrio (B) PVRL2^{+}PD-L1^{-} y un tumor de pulmón (C) PVRL2^{+}PD-L1. D) Las BM-DC inmaduras se cultivaron con los estímulos indicados y la expresión de PVR, PVRL2 y PD-L1 se evaluó mediante FACS en el día 2 de cultivo. Para cada condición, la expresión se normalizó a la condición de control de medios solamente. E) Se muestra la expresión de PVR, PVRL2 y PD-L1 en células HT-29 tratadas con IFN-γ o medios solamente. PD-L1 o PVRL2 se muestra en azul y la tinción de control de isotipo IgG se muestra en rojo.

[00115] Figura 86. CHA.7.518.1.H4(S241P) es un anticuerpo de alta afinidad que mejora la activación de los linfocitos T. A) Se muestra la fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) o del control de isotipo IgG a las células de origen PVRIG HEK293 o HEK293 por FACS. Se muestran los valores de FACS KD para la fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) a las células HEK293 hPVRIG, HEK293 cPVRIG y Jurkat. B) CHA.7.518.1.H4(S241P) interrumpe la fijación de Fc PVRL2 a las células HEK293 que expresan ectópicamente PVRIG. Se muestra la media $\pm$ desviación estándar de los valores por triplicado. C) CHA.7.518.1.H4(S241P) bloquea la fijación de Fc PVRIG a las células HEK293 que expresan de manera endógena PVRL2. D) Los linfocitos T CD4 humanos se cocultivaron con células CHO aAPC que expresan un anticuerpo anti-CD3 fijado a la superficie celular y hPVRL2 en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo anti-PVRIG y anticuerpos de control de isotipo de IgG humana. Se muestra el efecto del anticuerpo de anti-PVRIG en la proliferación de linfocitos T CD4 aislados de 11 donantes diferentes. Las barras representan la media $\pm$ SEM. E) las líneas de linfocitos T específicos de gp100 (TIL-209, TIL-463) se cocultivaron con células CHO modificadas por ingeniería genética para expresar HLA-A2 y PVRL2 junto con 10 µg/ml de anticuerpo anti- PVRIG o de control de isotipo IgG. La producción de IFN-γ TN y TNF-α se analizó 24 horas después del cocultivo. Se muestra la media $\pm$ desviación estándar de los valores por triplicado. El porcentaje de cambio en IFN-γ y TNF-α para cada condición relativa al control de isotipo se representa mediante el número sobre cada barra F) Se

muestra la expresión de PVR, PVRL2 y PD-L1 (rojo) con respecto a IgG (azul) en células MEL624, Colo205, y Panc.05.04. Para los linfocitos T, se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT y PD-1 (rojo) en relación con IgG (azul) en linfocitos T específicos de TIL-209 y TIL-463 gp100 y en linfocitos T específicos de CMVpp65. Para expandir los linfocitos T reactivos a CMVpp65, se cultivaron PBMC con péptido de pp65 (495-503), IL-2 e IL-7 durante 10 días. Se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT, PD-1 en las células positivas para tetrámero de HLA-A2/pp65. G) Los linfocitos T específicos de gp100 (TIL-209, TIL-463) expandidos a partir de los TIL derivados de tumores de melanoma se cocultivaron con células MEL624 en presencia de 10 µµg/ml de los anticuerpos indicados. La concentración de IFN-γ en los medios condicionados se determinó a las 24 horas. H, I) Los linfocitos T específicos de CMVpp65 expandidos se cocultivaron con células Colo205 y Panc.05.04, el péptido de CMVpp65 y los anticuerpos indicados a 10 µg/ml. La concentración de IFN-γ en los medios condicionados se determinó a las 24 horas. Para E, G, H, I, se muestra promedio + desviación estándar de triplicados. El porcentaje de cambio en IFN-γ para cada condición relativa al control de isotipos se representa mediante el número que se encuentra sobre cada barra.

[00116] Figura 87. Los ratones con deficiencia de PVRIG han aumentado la función de los linfocitos T. A) Se evaluó la expresión de ARN de PVRIG medida por qRT-PCR a partir de subconjuntos de células inmunitarias de ratón purificadas. La expresión relativa al mantenimiento se determinó mediante el método □Ct. B) los linfocitos T transgénicos $CD8^+$ TCR^+ pmel se activaron con gp100 (25-33) y los niveles de transcripción de ARN de PVRIG y TIGIT se evaluaron mediante qRT-PCR en los puntos temporales indicados. El gráfico muestra la media $\pm$ SEM de los resultados de 5 experimentos diferentes. C) Los bazos se recolectaron de las camadas de $PVRIG^{-/-}$ y WT y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de PVRIG en linfocitos NK, y T CD4+ y $CD8^+$ (células "en reposo"). Además, los linfocitos T $CD3^+$ se aislaron de esplenocitos y se activaron durante 11 días con microesferas anti-CD3/anti-CD28. Después de la activación, la expresión de PVRIG en linfocitos T CD4+ y $CD8^+$ (células "activadas") se analizó mediante citometría de flujo. Cada punto representa células derivadas de un ratón individual. D) Los esplenocitos derivados de WT y $PVRIG^{-/-}$ se etiquetaron con colorante de proliferación celular eFluor450 y se cultivaron en presencia de Control-Fc (IgG2a de ratón) o con Fc PVRL2 de ratón. Después de 4 días de cultivo, se analizó la división celular mediante citometría de flujo. Se presentan gráficos representativos de FACS de un experimento (izquierda) y el

resumen del porcentaje de inhibición mediante Fc PVRL2 (definida como % de proliferación Control-Fc sustraído del % de proliferación de Fc PVRL2) 3 experimentos independientes (derecha). * indica un valor p < 0,05, prueba t de Student pareada para el cambio en la proliferación en presencia de PVRL2-FC en relación con la proliferación en presencia de control de proteínas en WT frente a linfocitos T de PVRIG$^{-/-}$. E) Se activaron los linfocitos T CD8+ derivados de pmel PVRIG$^{-/-}$o pmel PVRIG WT durante 11 días con su péptido e IL2 cognados. Las células pmel CD8^{+} activadas se cocultivaron luego con células B16-Db/gp100 durante 18 horas y después del cocultivo se evaluó la expresión de CD107 y la producción de citocinas. Se presentan cuatro experimentos independientes según lo indicado por cada punto pareado. * indica un valor p < 0,05, la prueba t de Student que compara PVRIG$^{-/-}$ frente a WT.

[00117] Figura 88. La deficiencia de PVRIG reduce el crecimiento tumoral y aumenta el mecanismo de los linfocitos T efectores de CD8+. A) Los ratones C57BL/6 WT o PVRIG$^{-/-}$ recibieron inyección por vía subcutánea de 5×10^5 células MC38. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana. n = 10 ratones por grupo, se muestra Ave $\pm$ SEM, * Indica un valor p <0,05 mediante la prueba t desapareada de Student para ratones WT frente a ratones PVRIG$^{-/-}$(ANOVA). B) Se muestran las curvas de crecimiento tumoral individuales. n = 10 ratones por grupo, se muestra un experimento representativo (n=2). C) Ratones C57BL/6 WT o PVRIG$^{-/-}$ recibieron inyección por vía subcutánea de 5×10^5 células MC38. En el día 14 después de la inoculación, los ratones se trataron con anti-PD-L1, dos veces por semana durante 2 semanas. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana. n = 10 ratones por grupo, se muestra Ave $\pm$ SEM, valor p = 0,052 mediante la prueba t desapareada de Student para ratones WT frente a ratones PVRIG $^{-/-}$, ambos tratados con anti-PD-L1. D) Se muestran las curvas de crecimiento tumoral individuales. Se muestra un experimento representativo (n=2). E-H) En experimentos duplicados separados, los tumores se recolectaron el día 18 después de que los ratones recibieran 2 dosis de anti-PD-L1 o el control de isotipo relevante. Los tumores disociados se enriquecieron para células CD45^{+} antes de la estimulación durante 4 horas con PMA e ionomicina en presencia de Brefeldin A. Los gráficos ilustran los números totales por mg de tejido tumoral de células CD45^{+} inmunitarias, linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD8+ productores-γ-de interferón de ratones (E) tratados con isotipo de tipo silvestre y PVRIG$^{-/-}$ y de ratones tratados con anti-PD-L1 de tipo silvestre y PVRIG$^{-/-}$ (F). GH) Se muestra la frecuencia de células efectoras CD8+ IFN-γ^{+} TNF-□$^{+}$ en ganglios linfáticos que drenan tumores de ratones PVRIG$^{-/-}$ tratados con isotipo y anti-PD-L1, en relación con su

correspondiente cohorte de tipo silvestre. Para EH, se muestra Ave ± SEM y se muestran los valores p de una prueba t desapareada de Student.

[00118] Figura 89. Los anticuerpos anti-PVRIG antagonistas inhiben sinérgicamente el crecimiento tumoral en combinación con inhibidores de PD-1 o deficiencia genética de TIGIT. A) Se muestra la fijación de la proteína de fusión Fc mPVRL2 a células modificadas por ingeniería genética mPVRIG HEK293 que fueron preincubadas con diluciones en serie de mAb anti-mPVRIG o anticuerpos de control de isotipo IgG. B) Ratones BALB/c recibieron inyección por vía subcutánea de 5 x 10^5 células CT26. El día 14 después de la inoculación, se sacrificaron los ratones y se recolectaron el bazo, los ganglios linfáticos de drenaje y los tumores. Las células se analizaron por citometría de flujo para la expresión de PVRIG en linfocitos T $CD3^+$ CD4+, linfocitos T $CD3^+$ CD8+, linfocitos NK $CD3^-CD49b^+$, células supresoras derivadas de mieloide (MDSC) $CD11b^+Gr\text{-}1^+$ y macrófagos $CD11b^+F4/80^+$. C,D) Ratones BALB/c recibieron inyección por vía subcutánea de 5 x 10^5 células CT26. En el día 7 después de la inoculación, los ratones se trataron con anticuerpos anti-PD-L1 y/o anti-PVRIG, 2 veces por semana durante 3 semanas (las flechas indican tratamiento con anticuerpos). C) Se muestran los volúmenes tumorales. *** indica un valor p < 0,001 (ANOVA) para aPD-L1 + IgG2b de rata en comparación con los grupos tratados con □PD-L1+aPVRIG. Las flechas indican cuándo se dosificaron los anticuerpos. D. Análisis de supervivencia de ratones respondedores completos. * indica un valor p < 0,05 (prueba de rango log) para □PD-L1 + IgG2b de rata en comparación con grupos tratados con □PD-L1+ □PVRIG. Se muestra un estudio representativo de 3 estudios. E. Los ratones C57BL/6 o $TIGIT^{-/-}$ recibieron inyección por vía subcutánea de 1×10^5 células B16/Db-hmgp100. Los ratones se trataron 2 veces por semana durante 3 semanas con el mAb designado a partir del día de la inoculación (día 0). E. Los volúmenes de los tumores se midieron 2 veces por semana y se muestra el promedio ± SEM. Inhibición del crecimiento tumoral medido en los días indicados en comparación con el control de isotipo WT+mIgG1. *** indica un valor p<0,001 para $TIGIT^{-/-}$ + aPVRIG comparado con el control de isotipo WT+mIgG1. Las flechas indican cuándo se dosificaron los anticuerpos. F. Se muestran las curvas de crecimiento tumoral individuales de cada ratón. Se muestra un experimento representativo de 2 realizados.

[00119] Figura 90. PVRIG se expresa en linfocitos T y NK de TIL en cáncer humano. A) Se muestra la expresión de PVRIG, TIGIT, CD96 y PD-1 en subconjuntos de linfocitos T CD4 de PBMC de donantes sanos. Se muestra la media ± SEM. B) Los

linfocitos T humanos se cocultivaron con PBMC alogénicas y se mostró la expresión de la proteína PVRIG en linfocitos T CD4 y CD8 (arriba). C) Los tumores se disociaron y las células individuales se activaron con anti-CD3 y anti-CD28. La expresión de PVRIG (azul) en relación con el control del isotipo IgG (rojo) se evaluó el día 0 (directamente ex vivo) y el día 5 posterior a la activación. D) Se muestra la expresión de PVRIG en linfocitos NK de tumores humanos disociados. Cada punto representa un tumor distinto de un paciente individual. Se muestra la media $\pm$ 95 % de intervalo de confianza. D) Las células tumorales disociadas se activaron con microesferas anti-CD3 y anti-CD28 durante 5 días. La expresión de PVRIG (azul) relativa al control de IgG (rojo) en linfocitos T CD4 y CD8 en el día 0 directamente ex vivo y en el día 5 posterior a la activación se muestra para 2 muestras de tumores disociados. E) La expresión de PVRIG se evaluó en linfocitos T CD4 y CD8 de tumores disociados y de tejido adyacente normal emparejado con el donante disociado. Cada línea representa tejidos emparejados obtenidos de un paciente individual. Se realizó una prueba t de Student pareada. F) Se muestra un análisis de correlación de la relación de expresión de PVRIG, TIGIT y PD-1 en relación con el control de isotipo IgG en linfocitos T CD4 y CD8 de tumores. Cada punto representa una muestra tumoral individual. Se muestran el coeficiente de correlación de Spearman y el valor p.

[00120] Figura 91. La expresión de PVRL2 está mejorada en los tipos de cáncer de colon, piel y mama. A) Fotomicrografías que muestran la fijación del anticuerpo Sigma anti PVRL2 humano a las secciones FFPE de células positivas, el PVRL2 humano CHO-S (derecha) se compara con las células negativas, CHO-S (izquierda), luego de la recuperación del antígeno a pH de 9. B) El anticuerpo anti-PVRL2 se analizó en un panel de líneas celulares PVRL2$^+$ (HT29, MCF7, PC3, PANC1, RT4, NCI-H1573) y PVRL2$^-$ (Jurkat, OPM2, Daudi, CA46). CF) Ejemplo de expresión de PVRL2 en tejidos normales y cancerosos de pulmón. C) Tejido normal que no muestra tinción. D) Adenocarcinoma de pulmón que muestra una tinción positiva parcial. E) Adenocarcinoma de pulmón que muestra una tinción positiva. F) Adenocarcinoma de pulmón que muestra una fuerte tinción positiva.

[00121] Figura 92. PVRL2 se regula en forma ascendente en células TAM y CD45$^-$ en el tumor en comparación con el tejido adyacente normal. Se muestra la expresión de PVRL2 en células CD45 y TAM de tumor emparejado de donante y tejido normal adyacente. Se muestra el valor p de una prueba t de Student pareada.

[00122] Figura 93. PVRIG y PVRL2 se expresan conjuntamente en la misma

muestra de tumor. La expresión de PVRIG en linfocitos T CD4 (A) y NK (B) se grafica frente a la expresión de PVRL2 en TAM para un tumor individual.

[00123] Figura 94. Actividad de CHA.7.518.1.H4(S241P) en linfocitos T humanos. A) Expresión de PVRIG en linfocitos T CD4 activados con células CHO que expresan anti-CD3 y PVRL2 fijados a la superficie celular. B) La expresión de HLA-A2, B-2m y PVRL2 se muestra en las líneas celulares CHO-S de origen y modificadas por ingeniería genética. La relación de expresión relativa al isotipo se representa mediante el número. C) Las células CHO que expresan ectópicamente anti-CD3 y PVRL2 fijados a la superficie celular se cocultivaron con linfocitos T CD8 purificados en presencia de concentraciones variables de anticuerpos anti-PVRIG o control de IgG relevante. Se muestra % de proliferación. Cada punto representa un promedio de valores por triplicado. D) La células CHO ectópicamente expresadas HLA-A2/B2m y PVRL2 se cocultivaron con 2 líneas de linfocitos T específicas de gp100 (TIL F4, TIL 209) en presencia de 1 ug/ml de gp100 y concentraciones variables de anticuerpo anti-PVRIG o control de IgG relevante. Bajaron las concentraciones de TNF-α en el día 3 del cocultivo. Cada valor representa un promedio de triplicados.

[00124] Figura 95. Caracterización de las interacciones de fijación mPVRIG y un anticuerpo anti-mPVRIG sustituto. A, B) La fijación de mPVRIG a mPVRL2 se evaluó mediante resonancia de plasmón de superficie. C) El receptor Fc soluble o las proteínas de control se incubaron en una respuesta de dosis con mPVRL2 HIS inmovilizado en un formato ELISA. Se muestra el receptor Fc fijado. D) La proteína PVRL2 HIS soluble se incubó en una respuesta de dosis con placas recubiertas con Fc PVRIG o DNAM Fc. E) Se muestra la fijación de Fc mPVRIG o la proteína de fusión Fc de control a la línea celular B16-F10 transfectada con siARN mPVRL2, mPVRsARN o siARN mezclado. F) La caracterización por afinidad de mAb anti-PVRIG de ratón en rata se realizó al examinar la fijación de anti-mPVRIG a células HEK293 que sobreexpresan mPVRIG. G) La caracterización de afinidad de mAb anti-PVRIG de ratón en rata se realizó al examinar la línea celular anti-mPVRIG a D10.G4.1 que expresa endógenamente mPVRIG frente a control de isotipo de IgG de rata. H) Fijación de anti-mPVRIG a células D10.G4.1 transfectadas con PVRIG-siARN de ratón (histograma verde) frente a scr siARN (histograma de naranja). I) Fijación de mFc PVRIG preincubado con anticuerpo anti-mPVRIG a células B16-F10, que expresan de forma endógena PVRL2

[00125] Figura 96. Generación de ratones knockout de PVRIG y TIGIT transgénicos. Ozgene Pty Ltd (Bentley WA, Australia) generó las líneas de ratón

knockout de Tigit y knockout condicional de PVRIG. A) El constructo de direccionamiento en el que los exones 1 a 4 de PVRIG se sometieron a flotación se electroporó en una línea celular C57BL/6 ES, Bruce4 (Koentgen et al., Int Immunol 5: 957-964, 1993). B) El constructo de direccionamiento en donde la región de codificación del exón 1 de Tigit (incluido el ATG) y los exones 2 y 3 se reemplazaron por un casete neo flanqueado con FRT se electroporó en una línea celular C57BL/6 ES, Bruce4. Se identificaron clones de células ES recombinantes homólogas mediante hibridación Southern y se inyectaron en blastocistos goGermline (Koentgen et al., Génesis 54: 326–333, 2016). Se obtuvieron ratones quiméricos macho y se cruzaron con hembras C57BL/6J para establecer descendientes de línea germinal heterocigotos en el fondo C57BL/6. Los ratones de la línea germinal se cruzaron con una línea de ratón FLP C57BL/6 ubicua para eliminar el casete marcador seleccionable flanqueado FRT y generar los alelos condicionales o knockout (para PVRIG y Tigit, respectivamente). Para el knockout de PVRIG, los ratones se cruzaron más hacia una línea de ratón Cre C57BL/6 ubicua para eliminar los exones flanqueados loxP y generar el alelo knockout.

[00126] Figura 97. Los ratones knockout de PVRIG son inmuno-fenotípicamente similares a los ratones de tipo silvestre. Los ratones (n= 5 por cohortes de tipo silvestre y knockout de PVRIG) se sacrificaron antes de que se recolecte la sangre venosa en tubos recubiertos con anticoagulante y se extrajeran los órganos. Se recuperaron células individuales de médula ósea, timo, bazo, ganglios linfáticos cutáneos y mesentéricos recién recolectados. Las células se tiñeron con anticuerpos marcadores de superficie conjugados con fluorocromo y se adquirieron en un citómetro de flujo Fortessa BD LSR. Los paneles ilustran frecuencias comparables de células mieloides (A), células dendríticas (B), células B (C), linfocitos T (D), linfocitos T CD4 (E), linfocitos T CD8 (F) y linfocitos NK (G) a través de tipos de tejido linfoide. (HI) Se ejecutó sangre venosa completa en un sistema de hematología veterinaria Hemavet 950 para comparar los recuentos diferenciales y las frecuencias de los subconjuntos de células sanguíneas de ratones de tipo silvestre y con deficiencia de PVRIG.

[00127] Figura 98. Aumento de la función efectora de linfocitos T en ratones PVRIG$^{-/-}$ tratados con anti-PDL1 en comparación con WT con anti-PD-L1. Los tumores MC38 se inocularon en ratones WT o PVRIG$^{-/-}$ y posteriormente se trataron con control de isotipo anti-PD-L1 o IgG2b de rata. En el día 18, los linfocitos que infiltran tumores CD45+ se purificaron a partir de tumores, se extrajo ARN y se realizaron perfiles de transcripción. Se muestran varios genes relacionados con los linfocitos T, y cada punto

representa un ratón individual. Se muestran los valores p de la prueba t de Student.

[00128] Figura 99. Los anticuerpos anti-TIGIT y anti-PVRIG inducen la inactivación de células tumorales. Se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con linfocitos T CD8+ específicos de CMV humano expandido para evaluar el efecto del anticuerpo anti-TIGIT de referencia y CHA.7.518.1.H4(S241P) sobre la inactivación de células tumorales específicas de antígeno. Las líneas celulares diana HLA-A2+ utilizadas en el ensayo fueron Mel624 (A) y Panc05.04 (B). Synagis hIgG4 es el anticuerpo de control de isotipo. La actividad de la luciferasa en las células diana se midió con el sustrato de luciferasa Bio-Glo. Los datos representativos (n≥2) muestran el porcentaje de inactivación específica (media +/- desviación estándar) de las células Mel624 o Panc05.04 después de un cocultivo de 16 horas con linfocitos T CD8+ humanos específicos de CMV de tres donantes diferentes.

[00129] Figura 100. Inactivación de células tumorales dependientes de la dosis de anticuerpos anti-TIGIT con CHA.7.518.1.H4(S241P). Se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con linfocitos T CD8+ específicos de CMV humano para evaluar el efecto de dos anticuerpos anti-TIGIT diferentes, BM26 y CPA.9.086, al combinarse con CHA.7.518.1.H4(S241P) sobre la inactivación de células Mel624 específicas de antígeno. La actividad de la luciferasa en las células diana se midió con el sustrato de luciferasa Bio-Glo. Los datos representativos (n≥2) muestran el porcentaje de inactivación específica (media +/- desviación estándar) de las células Mel624 después de un cocultivo de 16 horas con linfocitos T CD8+ humanos específicos de CMV de un donante.

[00130] Figura 101. Secuencias CPA.9.086 CDR, numeración Kabat e IMGT.

[00131] Figura 102. La combinación anti-TIGIT hIgG4 + CHA.7.518.1.H4(S241P) induce la inactivación de linfocitos tumorales. Cocultivo de linfocitos T CD8+ reactivos a CMV con Mel624 PVR, PVRL2 y dosis única de luciferasa de 10 µg/ml de anticuerpo ATIGIT y 10 µg/ml de CHA.7.518.1.H4(S241P) con el donante 4 reactivo a CMV, mientras la titulación de la dosis comienza a 0,5 µg/ml de anticuerpo ATIGIT y 10 µg/ml de CHA.7.518.1.H4(S241P) con el donante reactivo a CMV 156.

V. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A. Descripción general

[00132] La presente invención proporciona varios anticuerpos útiles, para uso en soledad o en combinación, para el tratamiento del cáncer. El cáncer puede considerarse

como una incapacidad del paciente para 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 prevenir la actividad no restringida de los linfocitos T, los cuales pueden ser aprovechados 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 inmuno-oncología, 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 normalmente negativos de la inmunidad de los linfocitos T. En general, se entiende que se puede utilizar una variedad de señales inmunomoduladoras, tanto coestimuladoras como coinhibidoras, para orquestar una respuesta inmunitaria óptima específica del antígeno. En general, estos anticuerpos se fijan a las proteínas inhibidoras del punto de control, como CTLA-4 o PD-1, que en circunstancias normales previenen 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, se puede lograr una mayor respuesta de los linfocitos T contra tumores. Es decir, estas proteínas de punto de control de cáncer suprimen la respuesta inmunitaria; cuando las proteínas se bloquean, por ejemplo, mediante el uso anticuerpos contra la proteína del punto de control, el sistema inmunitario se activa, lo que lleva a la estimulación inmunológica, lo que resulta en el tratamiento de enfermedades como el cáncer y las enfermedades infecciosas.

[00133] La presente invención está dirigida al uso de anticuerpos para proteínas de punto de control adicionales, PVRIG y TIGIT. PVRIG se expresa en la superficie celular de los linfocitos NK y T y comparte varias similitudes con otros puntos de control inmunitarios conocidos. La identificación y los métodos utilizados para mostrar que PVRIG es un receptor de punto de control se tratan en WO2016/134333, que se incorpora expresamente en la presente como referencia. Los anticuerpos contra el PVRIG humano que bloquean la interacción y/o la fijación de PVLR2 se proporcionan en la presente. Cuando la PVRIG está fijada por su ligando (PVRL2), se genera una señal inhibidora que actúa para atenuar la respuesta inmunitaria de los linfocitos NK y T contra una célula diana (es decir, análoga a PD-1/PDL1). El bloqueo de la fijación de PVRL2 a PVRIG apaga esta señal inhibidora de PVRIG y, como resultado, modula la

respuesta inmunitaria de los linfocitos NK y T. El uso de un anticuerpo contra PVRIG que bloquea la fijación a PVRL2 es un enfoque terapéutico que mejora la inactivación de las células cancerosas por los linfocitos NK y T. Se han generado anticuerpos de bloqueo que se unen a PVRIG y bloquean la fijación de su ligando, PVRL2. Se proporcionan anticuerpos anti-PVRIG en combinación con otros anticuerpos inhibidores del punto de control, como PD-1.

[00134] De manera similar, se ha demostrado que TIGIT también tiene atributos de un receptor de punto de control, y la presente invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que bloquean la interacción y/o la fijación 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 NK y T contra una célula diana (es decir, análoga a PD-1/PDL1). El bloqueo de la fijación de PVR a TIGIT desactiva esta señal inhibidora de TIGIT y, como resultado, modula la respuesta inmunitaria de los linfocitos NK y T. Utilizar un anticuerpo contra TIGIT que bloquea la fijación a PVR es un enfoque terapéutico que mejora la inactivación de células cancerosas por los linfocitos NK y T. Se han generado anticuerpos de bloqueo que se fijan a TIGIT y bloquean la fijación de su ligando, PVR. Se proporcionan anticuerpos anti-TIGIT en combinación con otros anticuerpos inhibidores de punto de control, como PD-1.

[00135] Además, la invención proporciona combinaciones de anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT para usar en el tratamiento del cáncer.

B. Definiciones

[00136] Para que la aplicación se entienda de forma más completa, a continuación se exponen varias definiciones. Estas definiciones pretenden abarcar los equivalentes gramaticales.

[00137] En la presente, “ablación” significa una disminución o eliminación de la actividad. En algunas formas de realización, es útil eliminar la actividad de los dominios constantes de los anticuerpos. De esta manera, por ejemplo, “ablación de la fijación a FcγR” significa que la variante de aminoácido de la región Fc tiene menos de 50 % de fijación 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 fijación detectable en un ensayo Biacore. Como se muestra en la Figura 50, una variante de ablación en la región constante IgG1 es la variante N297A, que elimina el sitio de glicosilación nativa y reduce significativamente la fijación a FcγRIIIa y, por lo tanto, reduce la citotoxicidad

mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

[00138] Por “dominio de fijación al antígeno” o “ABD” en la presente se entiende un conjunto de seis **R**egiones **D**eterminantes de la **C**omplementariedad (CDR) que, cuando está presente como parte de una secuencia de polipéptido, fija específicamente un antígeno diana como se analiza en la presente. Por lo tanto, un "dominio de fijación al antígeno TIGIT" se fija al antígeno TIGIT (cuya secuencia se muestra en la Figura 51) como se describe en la presente. De manera similar, un "dominio de fijación al anticuerpo PVRIG" se fija 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 livianas variables (vlCDR o V_LCDR), comprendiendo cada una tres CDR: vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3 para la cadena pesada y vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3 para la liviana. Las CDR están presentes en los dominios pesado variable y liviano variable, respectivamente, y juntos forman una región Fv. Por lo tanto, en algunos casos, las seis CDR del dominio de fijación al antígeno son contribuidas por una cadena pesada variable y liviana 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 la vhCDR1, vhCDR2 y VHCDR3) y el dominio liviano variable (VL o V_L; que contiene la vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3), con el terminal C del dominio vh fijado al terminal N del dominio CH1 de la cadena pesada y el terminal C del dominio vl fijado al terminal N del dominio liviano constante (y formando así la cadena liviana).

[00139] 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 con un aminoácido codificado por ADN, por ejemplo, los 20 aminoácidos que tienen codones en ADN y ARN.

[00140] En la presente, "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" significa el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos de origen por un aminoácido distinto. En particular, en algunas formas de

realización, 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 donde la asparagina en la posición 297 se reemplaza por alanina. Para mayor claridad, una proteína que fue modificada por ingeniería genética para cambiar la secuencia codificante de ácidos nucleicos pero no para cambiar el aminoácido de inicio (por ejemplo, intercambio de CGG (que codifica arginina) con CGA (que también 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 comenzó, no es una sustitución de aminoácidos.

[00141] 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 de origen. 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.

[00142] 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 de origen. Por ejemplo, E233- o E233#, E233() o E233del designan una eliminación de ácido glutámico en la posición 233. Además, EDA233- o EDA233# designan una eliminación de la secuencia GluAspAla que comienza en la posición 233.

[00143] Como se usan en la presente, "proteína variante", "variante de proteína" o "variante" significan una proteína que es diferente de la proteína de origen en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Variante de proteína se puede referir 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 de origen, 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 de origen. Como se describe a continuación, en algunas formas de realización, el polipéptido de origen, por ejemplo, un polipéptido de origen Fc, es una secuencia de tipo silvestre humana, como la región

Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, aunque las secuencias humanas con variantes también pueden servir como “polipéptidos de origen”. La secuencia variante de proteína en la presente preferentemente poseerá al menos alrededor de 80 % de identidad con una secuencia de proteína de origen, y con mayor preferencia al menos alrededor de 90 % de identidad, más preferentemente 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 proteica, 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 de origen 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 de origen (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 de origen 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. Así, por ejemplo, S241P o S228P es una variante de bisagra con la prolina de sustitución en la posición 228 con respecto al polipéptido bisagra IgG4 de origen, en donde la numeración S228P está conforme al índice EU y el S241P es la numeración de Kabat. El índice EU o índice EU según Kabat o esquema de numeración de EU se refieren a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 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 estadounidense n.° 6.586.207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11: 1135-1137; J. W. Chin, et al., (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.

[00144] 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 peptidilo puede comprender aminoácidos y enlaces peptídicos naturales, o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, "análogos", tales como peptoides (véase Simon et al., PNAS USA 89(20): 9367 (1992), incorporado como referencia en su totalidad). Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos (por ejemplo, no un aminoácido codificado por ADN); como comprenderán las personas del oficio del nivel medio. Por ejemplo, homo-fenilalanina, citrulina, ornitina y noreleucina se consideran aminoácidos sintéticos para los propósitos de la invención, y se pueden usar aminoácidos con configuración D- y L- (R o S). Las variantes de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos sintéticos incorporados usando, 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 et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101 (2): 7566-71, Zhang et al., 2003, 303 (5656): 371-3, y Chin et al., 2003, Science 301 (5635): 964-7, todos incorporados como referencia en su totalidad. Además, los polipéptidos pueden incluir derivatización sintética de una o más cadenas o terminales laterales, glucosilación, PEGilación, permutación circular, ciclización, ligadores a otras moléculas, fusión a proteínas o dominios de proteínas, y adición de etiquetas de péptidos.

[00145] 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 residuo en la posición 297 en el anticuerpo IgG1 humano.

[00146] 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 se puede referir a esta región aislada o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

[00147] Como se usan en la presente, "Fv", "fragmento Fv" o "región Fv" significan un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un único anticuerpo. Como comprenderán las personas del oficio de nivel medio, estos, en general, están formados por dos cadenas.

[00148] Por "cadena simple Fv" o "scFv" en la presente se entiende un dominio pesado variable unido covalentemente a un dominio liviano variable, generalmente mediante un ligador scFv como se describe en la presente, para formar un dominio scFv o scFv. Un dominio scFv puede estar en orientación desde el terminal N al terminal C (vh-ligador-vl o vl-ligador-vh). En general, el ligador es un ligador scFv como se conoce

generalmente en la técnica, y el péptido ligador incluye predominantemente los siguientes restos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido ligador debería tener una longitud adecuada para ligar dos moléculas de modo que asuman la conformación correcta con respecto a la otra, para que retengan la actividad deseada. En una forma de realización, el ligador tiene de alrededor de 1 a 50 aminoácidos de longitud, preferentemente de alrededor de 1 a 30 aminoácidos de longitud. En una forma de realización, se pueden usar ligadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud, en donde alrededor de 5 a alrededor de 10 aminoácidos se pueden usar en algunas formas de realización. Los ligadores útiles incluyen polímeros glicina-serina, que incluyen, por ejemplo, (GS)n, (GSGGS)n, (GGGGS)n y (GGGS)n, en donde n es un entero de al menos uno y, generalmente, 3 a 4 polímeros glicina-alanina, polímeros alanina-serina y otros ligadores flexibles. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen, entre otros, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden encontrar uso como ligadores, es decir, pueden ser usados como ligadores.

[00149] 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 allí, 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.

[00150] 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.

[00151] 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.

[00152] 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.

[00153] Como se usa en la presente, "ligando de IgG Fc" significa una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se fija a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo de ligando Fc/Fc. Los ligandos de Fc incluyen, entre otros, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcRn, C1q, C3, lectina de fijación a manosa, receptor de manosa, proteína estafilocócica A, proteína estafilocócica G y FcγR viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos de receptores Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc homólogos con los FcγR (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190: 123-136, incorporado en su totalidad como referencia). Los ligandos Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se fijan a Fc. Los ligandos de IgG Fc particulares son receptores gamma Fc y FcRn. Como se usa en la presente, "ligando Fc" significa una molécula, preferentemente, un polipéptido, de cualquier organismo que se fija a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo de ligando Fc/Fc.

[00154] Como se usa en la presente, "polipéptido de origen" significa un polipéptido de inicio que se modifica posteriormente para generar una variante. El polipéptido de origen puede ser un polipéptido natural o una variante o una versión modificada por ingeniería genética de un polipéptido natural. Polipéptido de origen se puede referir al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido de origen, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En consecuencia, como se usa en la presente, "inmunoglobulina de origen" significa un polipéptido de inmunoglobulina no modificado que se modifica para generar una variante, y "anticuerpo de origen", 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 de origen" incluye anticuerpos comerciales conocidos producidos de forma recombinante como se describe a continuación.

[00155] 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 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 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, en general, 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 formas de realización, como se describe en detalle más adelante, se realizan modificaciones de aminoácidos en la región Fc, por ejemplo, para alterar la fijación a uno o más receptores FcγR o al receptor FcRn.

[00156] En la presente, “región constante pesada” significa la porción CH1-bisagra-CH2-CH3 de un anticuerpo.

[00157] 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 a un formato establecido, por ejemplo, el índice EU para numeración de anticuerpos.

[00158] Como se usa en la presente, "antígeno diana" significa la molécula que se fija de manera específica mediante la región variable de un anticuerpo determinado. En el presente caso, un antígeno diana de interés en la presente es TIGIT, generalmente TIGIT humano y opcionalmente TIGIT de *Macaca fascicularis*, como se define a continuación. Otro antígeno diana de interés es PVRIG, generalmente PVRIG humana y, opcionalmente, PVRIG de *Macaca fascicularis*, como se define a continuación.

[00159] Como se usa en la presente, "célula diana" significa una célula que expresa un antígeno diana.

[00160] Como se usa en la presente, "región variable" significa la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes Vκ (V.kappa), Vλ (V.lamda), y/o VH que forman los locus genéticos de inmunoglobulina de cadena kappa, lambda y pesada, respectivamente.

[00161] Por "tipo silvestre 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 una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no fue modificada de manera intencional.

[00162] 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 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 técnicas de ácidos nucleicos recombinantes en células huésped exógenas.

[00163] “Fijación específica” o “se fijan específicamente a” o son “específicas para” un antígeno o epítopo particular significa una fijación que difiere de manera mensurable de una interacción no específica. La fijación específica se puede medir, por ejemplo, mediante la determinación de la fijación a una molécula en comparación con la fijación a una molécula de control, que en general es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de fijación. Por ejemplo, la fijación específica se puede determinar mediante competencia con una molécula de control que es similar a la diana.

[00164] La fijación específica para un antígeno particular o un epítopo puede exhibirse, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KD para un antígeno o epítopo 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 tasa de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Normalmente, un anticuerpo que se fija específicamente a un antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1000, 5.000, 10.000 o más veces mayor para una molécula de control en relación con el antígeno o epítopo.

[00165] Además, la fijación específica para un antígeno o epítopo particular puede ser exhibida, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KA o Ka para un antígeno o epítopo al menos 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5000-, 10.000- veces mayor o más para el epítopo en función de un control, en donde KA o Ka se refieren a una velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. La afinidad de fijación 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

[00166] El listado de secuencias proporciona una serie de secuencias que se basan en el Formato de la Figura 53; se hace referencia a la Figura 4 de 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.0.86"), y la siguiente secuencia sigue el formato de la Figura 53 de la presente memoria (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 liviano variable, vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3 y la cadena liviana de longitud completa. Así, 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) (WO2016/028656A1, clon 31C6) e IgG1 de ratón BM29 (BM29-M1) (US2016/0176963A1, clon 22G2). A menos que se indique, las secuencias de HC de longitud completa de los anticuerpos TIGIT están en formato H4(S241P).

D. Proteínas PVRIG

[00167] La presente invención proporciona anticuerpos que se fijan específicamente a proteínas PVRIG y previenen 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 fijación de PVRIG (como se muestra en el Ejemplo 5 de la publicación estadounidense 2016/0244521), se muestra en la Figura 2. Los anticuerpos de la invención son específicos para el dominio extracelular de PVRIG de manera que se bloquea la fijación de PVRIG y PVLR2.

[00168] 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 citoplásmico (que abarca del aminoácido 191 al 326). Hay dos metioninas que pueden ser codones de inicio, pero las proteínas maduras son idénticas.

[00169] 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 silvestre, 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.

[00170] Como se indica en la presente y se describe con más detalle a continuación, se utilizan anticuerpos anti-PVRIG (incluidos los fragmentos de fijación al antígeno) que se unen a PVRIG y evitan la activación mediante PVRL2 (por ejemplo, lo más normal es que bloqueen la interacción de PVRIG y PVLR2) para mejorar la activación de linfocitos T o NK en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y la infección por patógenos.

E. Proteínas TIGIT

[00171] La presente invención proporciona anticuerpos que se fijan específicamente a proteínas TIGIT y previenen la activación mediante su proteína ligando, PVR, receptor de poliovirus (también conocido como 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 de 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 51. Los anticuerpos de la invención son específicos para el ECD de TIGIT de modo que la fijación de TIGIT y PVR se bloquea

[00172] 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 silvestre, 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.

[00173] Como se indica en la presente y se describe con más detalle a continuación, se utilizan anticuerpos anti-TIGIT (incluidos los fragmentos de fijación al antígeno) que se fijan a TIGIT y evitan la activación mediante PVR (por ejemplo, lo más normal es que bloqueen la interacción de TIGIT y PVR) para mejorar la activación de linfocitos NK o T en el tratamiento de enfermedades como el cáncer y la infección por patógenos.

VI. Anticuerpos

[00174] Como se analiza más adelante, el término “anticuerpo” se usa de manera general. En general, las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales comprenden un tetrámero. En general, cada tetrámero está compuesto por dos pares

idénticos de cadenas de polipéptidos, en donde cada par tiene una cadena “liviana” (que generalmente tiene un peso molecular de alrededor de 25 kDa) y una cadena “pesada” (que generalmente tiene un peso molecular de alrededor de 50-70 kDa). Las cadenas livianas humanas se clasifican como cadenas livianas kappa y lambda. La presente invención se refiere 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. Cabe señalar 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.

[00175] 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 de antígeno, generalmente denominada en el estado de 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 liviana para formar un sitio de fijación al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de la complementariedad (en adelante denominada “CDR”), en donde la variación en la secuencia de aminoácidos tiene mayor relevancia. El término “variable” se refiere a que determinados 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 en forma pareja. 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.

[00176] Cada VH y VL se compone de tres regiones hipervariables ("regiones determinantes de complementariedad", "CDR") y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3 -FR4.

[00177] La región hipervariable generalmente abarca residuos de aminoácidos de los residuos de aminoácidos alrededor de 24-34 (LCDR1; “L” indica cadena liviana), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de cadena liviana y alrededor de 31-35B (HCDR1; “H” indica cadena pesada), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en la

región variable de cadena pesada; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ta ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o aquellos residuos que forman un bucle hipervariable (por ejemplo, residuos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3) en la región variable de cadena liviana y 26-32 (HCDR1), 53 -55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917. Las CDR específicas de la invención se describen más adelante.

[00178] Como será evidente para las personas del oficio de nivel medio, la numeración y ubicación exactas de las CDR pueden ser diferentes entre los diferentes sistemas de numeración. Sin embargo, debe entenderse que la divulgación de una secuencia variable pesada y/o variable liviana incluye la divulgación de las CDR asociadas (inherentes). Por consiguiente, la divulgación de cada región pesada variable es una divulgación de las vhCDR (por ejemplo, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3) y la divulgación de cada región liviana variable es una divulgación de las vlCDR (por ejemplo, vlCDR1, vlCDR2 y vlCDR3). Una comparación útil de la numeración de CDR es la siguiente, véase Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27 (1): 55-77 (2003):

	Kabat+Clothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
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

[00179] A lo largo de la presente memoria descriptiva, 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 cadena liviana y los residuos 1-113 de la región variable de cadena pesada) y la bisagra y el sistema de numeración EU para las regiones Fc (por ejemplo, Kabat et al., supra (1991)).

[00180] La presente invención proporciona un gran número de diferentes conjuntos de CDR. En este caso, un “conjunto de CDR completo” comprende las tres CDR livianas variables y las tres CDR pesadas variables, por ejemplo, vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 y vhCDR3. Estas pueden ser parte de un dominio liviano

variable o pesado variable más grande, respectivamente. Además, como se indica en mayor detalle en la presente, los dominios pesado variable y liviano variable pueden estar en cadenas de polipéptidos separadas, cuando se usa una cadena liviana y pesada o en una única cadena de polipéptidos en el caso de secuencias scFv.

[00181] Las CDR contribuyen a la formación de fijación de los antígenos, o, más específicamente, del sitio de fijación de epítopo de los anticuerpos. El término “epítopo” se refiere a un determinante que interactúa con un sitio de fijación al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como paratopo. Los epítopos son agrupamientos de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcar y, generalmente, tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un único antígeno puede tener más de un epítopo.

[00182] El epítopo puede comprender residuos de aminoácidos directamente implicados en la fijación (también denominados componente inmunodominante del epítopo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la fijación, tales como residuos de aminoácidos que son bloqueados de manera eficaz por el péptido de fijación específica al antígeno; en otras palabras, el residuo de aminoácidos está dentro de la huella del péptido de fijación específica al antígeno.

[00183] Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de distintos segmentos de la cadena de polipéptidos lineal. Un epítopo lineal es aquel producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. Los epítopos conformacionales o no conformacionales se pueden distinguir en que la fijación a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes.

[00184] En general, un epítopo incluye al menos 3, y, con mayor frecuencia, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo se pueden verificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la fijación de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo, “clasificación”. Como se describe a continuación, la invención no solo incluye los dominios de fijación al antígeno enumerados y los anticuerpos de la presente, sino también aquellos que compiten por la fijación con los epítopos fijados por los dominios de fijación al antígeno enumerados.

[00185] La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Kabat et al. recolectaron numerosas

secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas livianas. En función del 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, 5ta edición, publicación de NIH, n.° 91-3242, E.A. Kabat et al., incorporado como referencia en su totalidad).

[00186] En la subclase de inmunoglobulinas IgG, 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 anticuerpos IgG, cada uno de los isotipos de IgG tiene tres regiones CH. Por consiguiente, 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.

[00187] Otro tipo de dominio Ig de la cadena pesada es la región bisagra. En la presente, “bisagra” o “región bisagra” o “región bisagra de anticuerpo” o “región bisagra de inmunoglobulina” significan 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.

[00188] La cadena liviana generalmente comprende dos dominios, el dominio liviano variable (que contiene las CDR de cadena liviana y que forma, junto con los dominios pesados variables, la región Fv), y una región constante de cadena liviana (con frecuencia denominada CL o Cκ). En general, se puede usar tanto el dominio lambda constante como el dominio kappa constante, y lambda generalmente encuentra uso en la invención.

[00189] Otra región de interés para sustituciones adicionales, que se describe a continuación, es la región Fc.

A. Anticuerpos quiméricos y humanizados

[00190] En algunas formas de realización, los anticuerpos 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, la expresión “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. Por lo general, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto las CDR, es codificado por un polinucleótido de origen 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 dichos anticuerpos se describe, por ejemplo, en WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321: 522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536, todos 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 (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 generalmente toda, de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y por lo tanto típicamente comprenderá una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar usando ratones con un sistema inmunitario modificado por ingeniería genética. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654, que se incorpora como referencia en su totalidad. Se conoce en la técnica una variedad de técnicas y métodos para humanizar y dar nueva forma a anticuerpos no humanos (véase Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EE. UU.), y las referencias allí citadas, todo incorporado como referencia en su totalidad). Los métodos de humanización incluyen, entre otros, los métodos descritos en Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al.,1988; Nature 332: 323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239: 1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86: 10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285-9,

Presta et al., 1997, Cancer Res. 57 (20): 4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl Acad Sci. USA 88: 4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11: 321-8, todos incorporados como referencia en su totalidad. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de anticuerpo no humano pueden incluir métodos de reconstrucción, como se describe, por ejemplo, en Roguska et al., 1994, Proc. Natl Acad Sci. USA 91: 969-973, incorporado como referencia en su totalidad.

[00191] 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).

[00192] En algunas formas de realización, 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 liviana de un gen particular de inmunoglobulina de cadena liviana de línea germinal. Por ejemplo, tales anticuerpos pueden comprender o consistir en un anticuerpo humano que comprende regiones variables de cadena pesada o liviana 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 se puede identificar como tal al comparar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas de línea germinal humana y al 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 es, en general, al menos 90 % idéntico en cuanto a la 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 lo que respecta a la secuencia de aminoácidos a los aminoácidos de marco codificados por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana.

[00193] Por lo general, 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).

[00194] En una forma de realización, el anticuerpo de origen maduró por afinidad, como se conoce en la técnica. Se pueden usar métodos en función de la estructura para la humanización y la maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en USSN 11/004.590. Se pueden usar métodos en función de la selección para humanizar y/o madurar por afinidad regiones variables del anticuerpo, que incluyen, entre otros, los métodos descritos en Wu et al., 1999, J. Mol. Mol. Biol. 294: 151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272 (16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271 (37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl Acad Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16 (10): 753-759, todos incorporados en su totalidad como referencia. Otros métodos de humanización pueden involucrar el injerto únicamente de partes de las CDR, incluidos, entre otros, los métodos descritos en USSN 09/810,510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169: 3076-3084, todos incorporados en su totalidad como referencia.

B. Ingeniería de anticuerpos opcional

[00195] Los anticuerpos 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, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos para alterar la afinidad de las CDR por la proteína (por ejemplo, TIGIT o PVRIG, que incluye tanto la fijación creciente como la decreciente), 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, como la semivida del suero, la fijación del complemento, la fijación al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de acuerdo con al menos algunas formas de realización de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden fijar una o más porciones químicas al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glicosilación, para alterar, una vez más, una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Tales formas de realización se describen más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

[00196] En una forma de realización, la región bisagra de CH1 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 más detalle en la patente estadounidense n.° 5.677.425 de Bodmer et al. La cantidad de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas liviana y pesada, o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

[00197] En aún otra forma de realización, el anticuerpo puede 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 medias moléculas de IgG4 (una cadena pesada más una cadena liviana) entre otros anticuerpos IgG4 que dan como resultado anticuerpos biespecíficos que son funcionalmente monovalentes. Las mutaciones en la región de la 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 encuentra un uso particular en la presente invención es S241P en el contexto de un dominio constante 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 fijación del receptor a su ligando sin agotamiento celular (por ejemplo, PVRIG a PVRL2 o TIGIT a PVR).

[00198] En algunas formas de realización, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos en la región Fc, en general para alterar la fijación a los receptores FcγR. Como se usan en la presente, "receptor gamma Fc", "FcγR" o "FcgammaR" significa cualquier miembro de la familia de proteínas que se fija 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 isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluye isoformas FcγRIIa (que incluye alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye isoformas FcγRIIIa (que incluye alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65, incorporada en su totalidad como referencia), así como cualesquiera FcγR humanos o isoformas o alotipos de FcγR no descubiertos. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, incluso, entre otros, 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 cualesquiera FcγR de ratón o isoforma o alotipo de FcγR no descubiertos.

[00199] Existen varias sustituciones útiles de Fc que se pueden realizar para alterar la fijación a uno o más de los receptores de FcγR. Tanto las sustituciones que producen mayor fijación como las que producen menor fijación pueden ser útiles. Por ejemplo, se sabe que el aumento de la fijación a FcRIIIa generalmente produce el aumento de ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos; 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 fijación a FcγRIIb (un receptor inhibidor) también puede ser beneficiosa en algunas circunstancias. Las sustituciones de aminoácidos que encuentran uso en la presente invención incluyen las enumeradas en los documentos estadounidenses n.° 11/124.620 (en particular, la Figura 41) y la patente estadounidense n.° 6.737.056, las cuales se incorporan expresamente en la presente como referencia en su totalidad y específicamente para las variantes descritas en estos.

[00200] En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo con respecto a un receptor Fcɣ y/o aumentar la fijación 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 más detalle en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de fijación en IgG1 humana para FcɣRI, FcɣRII, FcɣRIII y

FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con fijación mejorada (véase Shields, R. L. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604). Las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la fijación a FcyRIII Además, se muestra que los siguientes mutantes de combinación mejoran la fijación de FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A. Además, mutaciones como M252Y/S254T/T256E o M428L/N434S mejoran la fijación a FcRn y aumentan la semivida de circulación del anticuerpo (véase Chan CA y Carter PJ (2010) *Nature Rev Immunol* 10: 301-316).

[00201] Además, los anticuerpos de la invención se modifican para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente estadounidense n.° 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región C_{H1} o C_L para contener un epítopo de fijación 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 n.° 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al. Las mutaciones adicionales para aumentar la semivida en suero se describen en las patentes estadounidenses n.° 8.883.973, 6.737.056 y 7.371.826 e incluyen 428L, 434A, 434S y 428L/434S.

[00202] En aun otra forma de realización, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno o reducir la función efectora, como la ADCC. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, al alterar uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo, por ejemplo N297. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de marco de región variable, para así eliminar la glicosilación en ese sitio, en donde un reemplazo de alanina encuentra uso en algunas formas de realización.

[00203] De manera adicional o alternativa, se puede producir un anticuerpo 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 dichos patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en

una célula huésped que tenga una maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y pueden usarse como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de acuerdo con al menos algunas formas de realización de la invención para producir así un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.° 20040110704 y WO 2003/035835.

[00204] Otra modificación de los anticuerpos en la presente que se contempla en la invención es la PEGilación o la adición de otros restos solubles en agua, típicamente polímeros, por ejemplo, para mejorar la semivida. Un anticuerpo puede PEGilarse, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (por ejemplo, suero) del anticuerpo como se conoce en la técnica.

[00205] Además de las sustituciones realizadas para alterar la afinidad de fijación a FcγRs y/o FcRn y/o aumentar la semivida en suero in vivo, se pueden realizar modificaciones adicionales de anticuerpos, como se describe con más detalle a continuación.

[00206] En algunos casos, se realiza la maduración por afinidad. Las modificaciones de aminoácidos en las CDR a veces se denominan "maduración por afinidad". Un anticuerpo de "maduración por afinidad" es uno que tiene una o más alteraciones en una o más CDR que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo de origen que no posee esas alteraciones. En algunos casos, puede ser deseable disminuir la afinidad de un anticuerpo a su antígeno.

[00207] En algunas formas de realización, se realizan una o más modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR de los anticuerpos de la invención (anticuerpos PVRIG o TIGIT). En general, solo 1 o 2 o 3 aminoácidos están sustituidos en cualquier CDR individual, y generalmente no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 9 o 10 cambios se realizan dentro de un conjunto de 6 CDR (por ejemplo, vhCDR1-3 y vlCDR1-3). Sin embargo, debe apreciarse que cualquier combinación de no sustituciones, 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier CDR puede ser independiente y opcionalmente combinada con cualquier otra sustitución.

[00208] La maduración por afinidad se puede hacer para aumentar la afinidad de fijación del anticuerpo para 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 "de origen". Los anticuerpos

madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos. La correlación de afinidad y eficacia se analiza a continuación.

[00209] 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 para el antígeno. Estos se pueden hacer por varios motivos, incluida la expresión de optimización (como se puede hacer para los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención)

[00210] Por lo tanto, se incluyen dentro de la definición de las CDR y los anticuerpos de la invención las CDR y anticuerpos variantes; es decir, los anticuerpos 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 también pueden realizarse de forma independiente y opcional en cualquier región fuera de las CDR, incluidas las regiones de marco y constantes.

a. Generación de anticuerpos adicionales

[00211] Se pueden hacer anticuerpos adicionales contra PVRIG humano como es bien conocido en la técnica, mediante métodos bien conocidos tales como los descritos en los ejemplos. Por lo tanto, se pueden generar anticuerpos anti-PVRIG adicionales mediante métodos tradicionales, como la inmunización de ratones (a veces mediante inmunización con ADN, por ejemplo, como la que utiliza Aldevron), seguido de un cribado contra la proteína PVRIG humana y la generación de hibridomas, con purificación y recuperación de anticuerpos.

VII. Anticuerpos TIGIT de la invención

[00212] La presente invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT. (Por conveniencia, "anticuerpos anti-TIGIT" y "anticuerpos TIGIT" se usan indistintamente). Los anticuerpos anti-TIGIT de la invención se fijan específicamente a TIGIT humano, y preferentemente al ECD de TIGIT humano. La invención proporciona además dominios de fijación al antígeno, que incluyen anticuerpos de longitud completa, que contienen una serie de conjuntos enumerados específicos de 6 CDR, que se fijan a TIGIT.

[00213] La fijación específica para TIGIT o un epítopo 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^{-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 particular anticuerpo-antígeno. Normalmente, un anticuerpo que se fija específicamente a un antígeno tendrá una K_D que es 20, 50, 100, 500, 1000, 5.000, 10.000 o más veces mayor para una molécula de control en relación con el antígeno o epítopo TIGIT.

[00214] Sin embargo, para una fijación óptima a TIGIT expresada en la superficie de los linfocitos NK y T, los anticuerpos tienen preferentemente una KD inferior a 50 nM y, con máxima preferencia, inferior a 1 nM, y menos de 0,1 nM y menos de 1 pM tienen uso en los métodos de la invención.

[00215] Además, la fijación específica para un antígeno particular o un epítopo puede ser exhibida, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una ka (que se refiere a la constante de velocidad de asociación) para un antígeno o epítopo TIGIT al menos 20, 50, 100, 500-, 1000-, 5.000, 10.000 o más veces mayor para el epítopo en relación con un control, donde ka se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

[00216] En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TIGIT de la invención se fijan a un TIGIT 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 fijación), 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 comúnmente, SPR a 25 º o 37 ºC.

[00217] Los anticuerpos TIGIT descritos en la presente están etiquetados de la siguiente manera. Los anticuerpos tienen números de referencia, por ejemplo, "CPA.9.086". Esto representa la combinación de las cadenas pesadas variables y livianas variables, como se muestra en la Figura 53, por ejemplo, con el entendimiento de que estos anticuerpos incluyen dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. "CPA.9.086.VH" se refiere a la porción pesada variable de CPA. 9. 086, mientras que “CPA. 9. 086.VL” es la cadena liviana 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 los CDR indicados. "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 liviana (por ejemplo, dominio variable y constante) de la misma molécula. En general, la cadena liviana kappa humana se usa para el dominio constante de cada anticuerpo de fago (o hibridoma humanizado) en la presente, aunque en algunas formas de realización se usa el dominio constante liviano de lambda. "CPA. 9. 086.H1" se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende los dominios pesados y livianos variables, que incluyen el dominio constante de IgG**1 H**umana (por lo tanto, las secuencias H1; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se muestran en la Figura 50). En consecuencia, "CPA. 9. 086.H2" serían los dominios variables CPA. 9. 086 ligados a una IgG**2 H**umana**.** "CPA. 9. 086.H3" serían los dominios variables CPA. 9. 086 ligados a una IgG**3 H**umana, y "CPA. 9. 086.H4" serían los dominios variables CPA. 9. 086 ligados a una IgG**4 H**umana. Ha de tenerse en cuenta que, en algunos casos, las IgG humanas pueden tener mutaciones adicionales, las cuales se describen a continuación, y esto se puede anotar. Por ejemplo, en muchas formas de realización, 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 50 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 fijación a FcγRIIIa) e IgG1 (D265A), que reduce la fijación a los receptores FcγR.

[00218] La invención proporciona además dominios pesados y livianos variables, así como cadenas pesadas y livianas de longitud completa.

[00219] En algunas formas de realización, la invención proporciona scFv que se fijan a TIGIT que comprenden un dominio pesado variable y un dominio liviano variable ligados por un ligador 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-ligador-VL" o "VL-ligador"VH". Estos son nombrados en virtud de sus partes componentes; por ejemplo, "scFv-CPA. 9.086.VH-ligador-VL" o "scFv-CPA.9.086.VL-ligador-VH". Por lo tanto, "scFv-CPA.9.086" puede estar en cualquiera de las dos orientaciones.

[00220] En muchas formas de realización, los anticuerpos de la invención son humanos (derivados de fagos) y bloquean la fijación de TIGIT y PVR. Como se muestra en las Figuras 58 y 75, los anticuerpos CPA que se fijan a la interacción receptor-ligando, y que la bloquean, son los que figuran a continuación, donde también se describen sus componentes (como se analiza en la sección "Secuencia", están en el listado de

secuencias las secuencias de todos los constructos a excepción de los scFv):

[00221] 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.vlCDR1, CPA.9.018.vlCDR2, CPA.9.018.vlCDR3 y scFv-CPA.9.018;

[00222] 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.vlCDR1, CPA.9.027.vlCDR2, CPA.9.027.vlCDR3 y scFv-CPA.9.027;

[00223] 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.vlCDR1, CPA.9.049.vlCDR2, CPA.9.049.vlCDR3 y scFv-CPA.9.049;

[00224] 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.vlCDR1, CPA.9.057.vlCDR2, CPA.9.057.vlCDR3 y scFv-CPA.9.057;

[00225] 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.vlCDR1, CPA.9.059.vlCDR2, CPA.9.059.vlCDR3 y scFv-CPA.9.059;

[00226] 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.vlCDR1, CPA.9.083.vlCDR2, CPA.9.083.vlCDR3 y scFv-CPA.9.083;

[00227] 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.vlCDR1, CPA.9.086.vlCDR2, CPA.9.086.vlCDR3 y scFv-CPA.9.086;

[00228] 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.vlCDR1, CPA.9.089.vlCDR2, CPA.9.089.vlCDR3 y scFv-CPA.9.089;

[00229] 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.vlCDR1, CPA.9.093.vlCDR2, CPA.9.093.vlCDR3 y scFv-CPA.9.093;

[00230] 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.vlCDR1, CPA.9.101.vlCDR2, CPA.9.101.vlCDR3 y scFv-CPA.9.101; y

[00231] 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.vlCDR1, CPA.9.103.vlCDR2, CPA.9.103.vlCDR3 y scFv-CPA.9.103.

[00232] Además, la presente invención proporciona una serie de anticuerpos CHA, que son anticuerpos murinos generados a partir de hibridomas. Como es bien sabido en la técnica, las seis CDR son útiles cuando se colocan en regiones pesadas variables y livianas variables de marco humanas o cuando se humanizan los dominios pesados y livianos variables.

[00233] En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos, generalmente dominios de longitud completa o scFv, que comprenden los siguientes conjuntos de CDR, cuyas secuencias se muestran en la Figura 53 y/o el listado de secuencias:

[00234] 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.vlCDR1, CHA.9.536.1.vlCDR2 y CHA.9.536.1.vhCDR3;

[00235] 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.vlCDR1, CHA.9.536.3.vlCDR2 y CHA.9.536.3.vhCDR3;

[00236] 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.vlCDR1, CHA.9.536.4.vlCDR2 y CHA.9.536.4.vhCDR3;

[00237] 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.vlCDR1, CHA.9.536.5.vlCDR2 y CHA.9.536.5.vhCDR3;

[00238] 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.vlCDR1, CHA.9.536.6.vlCDR2 y CHA.9.536.6.vhCDR3;

[00239] 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.vlCDR1, CHA.9.536.7.vlCDR2 y CHA.9.536.7.vhCDR3;

[00240] 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, CHA.9.536.8.vhCDR2, CHA.9.536.8.vhCDR3, CHA.9.536.8.vlCDR1, CHA.9.536.8.vlCDR2 y CHA.9.536.8.vhCDR3;

[00241] 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.vlCDR1, CHA. 9.560.1.vlCDR2 y CHA. 9.560.1.vhCDR3;

[00242] 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.vlCDR1, CHA. 9.560. 3.vlCDR2 y

CHA. 9.560. 3.vhCDR3;

[00243] 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.vlCDR1, CHA. 9.560. 4.vlCDR2 y CHA. 9.560. 4.vhCDR3;

[00244] 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, 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.vlCDR1, CHA. 9.560. 5.vlCDR2 y CHA. 9.560. 5.vhCDR3;

[00245] 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.vlCDR1, CHA. 9.560. 6.vlCDR2 y CHA. 9.560. 6.vhCDR3;

[00246] 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.vlCDR1, CHA. 9.560. 7.vlCDR2 y CHA. 9.560. 7.vhCDR3;

[00247] 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.vlCDR1, CHA. 9.560. 8.vlCDR2 y CHA. 9.560. 8.vhCDR3;

[00248] 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, 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.vlCDR1, CHA. 9. 546.1.vlCDR2 y CHA. 9. 546.1.vhCDR3;

[00249] 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, CHA. 9. 547.1.vhCDR2, CHA. 9. 547.1.vhCDR3, CHA. 9. 547.1.vlCDR1, CHA. 9. 547.1.vlCDR2 y CHA. 9. 547.1.vhCDR3;

[00250] 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.vlCDR1, CHA. 9. 547. 2.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 2.vhCDR3;

[00251] 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.vlCDR1, CHA. 9. 547. 3.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 3.vhCDR3;

[00252] 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.vlCDR1, CHA. 9. 547. 4.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 4.vhCDR3;

[00253] 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.vlCDR1, CHA. 9. 547. 6.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 6.vhCDR3;

[00254] 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.vlCDR1, CHA. 9. 547. 7.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 7.vhCDR3;

[00255] 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.vlCDR1, CHA. 9. 547. 8.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 8.vhCDR3;

[00256] 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.vlCDR1, CHA.9.547.9.vlCDR2 y CHA.9.547.9.vhCDR3;

[00257] 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.vlCDR1, CHA. 9. 547.13.vlCDR2 y CHA. 9. 547. 13.vhCDR3;

[00258] 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.vlCDR1, CHA. 9. 541.1.vlCDR2 y CHA. 9.541.1.vhCDR3;

[00259] 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.vlCDR1, CHA. 9. 541. 3.vlCDR2 y CHA. 9.541. 3.vhCDR3;

[00260] 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.vlCDR1, CHA. 9. 541. 4.vlCDR2 y CHA. 9.541. 4.vhCDR3;

[00261] 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.vlCDR1, CHA. 9. 541. 5.vlCDR2 y CHA. 9.541. 5.vhCDR3;

[00262] 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.vlCDR1, CHA. 9. 541. 6.vlCDR2 y CHA. 9.541. 6.vhCDR3;

[00263] 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.vlCDR1, CHA. 9. 541. 7.vlCDR2 y CHA. 9.541. 7.vhCDR3; y

[00264] 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. 8vhCDR1, CHA. 9. 541. 8.vhCDR2, CHA. 9. 541. 8.vhCDR3, CHA. 9. 541. 8.vlCDR1, CHA. 9. 541. 8.vlCDR2 y CHA. 9.541. 8.vhCDR3.

[00265] 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 ligador y un dominio liviano variable con los vlCDR, nuevamente como lo anterior 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.

[00266] Además, CHA.9.543 se fija a TIGIT pero no bloquea la interacción TIGIT-PVR.

[00267] Como se analiza en la presente, la invención proporciona además variantes de los componentes anteriores (CPA y CHA), incluso 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 fije a TIGIT. Se conocen en la técnica ensayos adecuados para probar

si un anticuerpo anti-TIGIT que contiene mutaciones en comparación con las secuencias CDR descritas en la presente, tales como los ensayos Biacore.

[00268] Adicionalmente, la invención proporciona además variantes de las cadenas pesadas y livianas 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 livianas variables que pueden ser 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de "VL" de la presente (y en particular CPA.9.086), y/o que 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 formas de realización, la invención incluye estas variantes siempre que el anticuerpo aún se fije a TIGIT. Se conocen en la técnica ensayos adecuados para probar si un anticuerpo anti-TIGIT que contiene mutaciones en comparación con las secuencias CDR descritas en la presente, tales como los ensayos Biacore.

[00269] De manera similar, se proporcionan cadenas pesadas y livianas que son 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de "HC" y "LC" de longitud completa de la presente (y en particular CPA.9.086), y que 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 formas de realización, la invención incluye estas variantes siempre que el anticuerpo aún se fije a TIGIT. Se conocen en la técnica ensayos adecuados para probar si un anticuerpo anti-TIGIT que contiene mutaciones en comparación con las secuencias CDR descritas en la presente, tales como los ensayos Biacore.

[00270] Además, las regiones de marco de las cadenas pesadas variables y livianas 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 se puedan realizar métodos de humanización alternativos) como se conoce en la técnica (con variantes ocasionales generadas en las CDR según sea necesario) y, por lo tanto, se pueden generar variantes humanizadas de las cadenas VH y VL de la Figura 53 (y en particular CPA.9.086). Además, los dominios pesados y livianos variables humanizados pueden entonces fusionarse con regiones constantes humanas, tales como las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (incluso la IgG4 (S241P)).

[00271] 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 programa IgBLAST del sitio web del NCBI, como se describe en Ye et al. Nucleic Acids Res. 41:

W34-W40 (2013), incorporado en la presente por 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 utilizadas 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 a modo de ejemplo: CHA.9.536, CHA9.560, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.541 (véase la Figura 53). Para esta forma de realización de la humanización, la línea germinal humana IGHV1-46 (alelo1) se eligió para todas las 5 como la secuencia aceptora y la región de fijación 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 liviana humana IGKJ2 (alelo1) (gen J). El gen J se eligió de secuencias de regiones de fijación 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/).

[00272] En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TIGIT de la presente invención incluyen anticuerpos anti-TIGIT en donde las secuencias de V_H y V_L de diferentes anticuerpos anti-TIGIT se pueden "mezclar y emparejar" para crear otros anticuerpos anti-TIGIT. La fijación a TIGIT de dichos anticuerpos "mezclados y emparejados" se puede probar mediante los ensayos de fijación descritos anteriormente, por ejemplo, ensayos ELISA o Biacore. En algunas formas de realización, cuando se mezclan y emparejan cadenas V_H y V_L, una secuencia V_H de un emparejamiento V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_H estructuralmente similar. Del mismo modo, en algunas formas de realización, una secuencia de V_L de un emparejamiento V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_L estructuralmente similar. Por ejemplo, las secuencias de V_H y V_L de anticuerpos homólogos son particularmente susceptibles a la mezcla y emparejamiento.

[00273] Por consiguiente, los anticuerpos 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 ácido nucleico que codifica los aminoácidos como se enumeran en la presente. En particular, el anticuerpo CPA.9.086 puede tener secuencias seleccionadas de (a), (b), (c) o (d).

[00274] Se incluyen adicionalmente en la definición de anticuerpos TIGIT los anticuerpos que comparten identidad con los anticuerpos TIGIT enumerados en la presente. Es decir, en ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-TIGIT de acuerdo con la invención comprende regiones variables de cadena pesada y liviana que comprenden secuencias de aminoácidos que son idénticas a la totalidad o parte 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 de origen. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología=N.° de posiciones idénticas/número total de posiciones X 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 porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr mediante un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos a continuación.

[00275] El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.,* 4: 11-17 (1988)) que se incorporó al programa ALIGN (versión 2.0), mediante una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible comercialmente), mediante 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.

[00276] Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención pueden usarse adicionalmente como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicos para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar con el programa

XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J Mol. Biol.* 215: 403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar 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 formas de realización de la invención. A fin de obtener alineaciones espaciadas para su comparación, puede usarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

[00277] En general, el porcentaje de identidad para la comparación entre los anticuerpos TIGIT es 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 liviana o a lo largo de una porción de las cadenas. Por ejemplo, se incluyen dentro de la definición de los anticuerpos anti-TIGIT 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 TIGIT que tienen al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, y se prefiere al menos alrededor de 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad, con el anticuerpo CPA.9.086.

[00278] Además, también se incluyen secuencias que pueden tener CDR idénticas pero cambios en las porciones de marco del dominio variable (o toda la cadena pesada o liviana). Por ejemplo, los anticuerpos TIGIT incluyen aquellos con CDR idénticas a las mostradas en la Figura 53 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 TIGIT que tienen CDR idénticas a CPA.9.086 pero con regiones de marco que son 95 o 98% idénticas a CPA.9.086.

A. Anticuerpos TIGIT que compiten por la fijación

[00279] La presente invención proporciona no solo los anticuerpos enumerados sino también anticuerpos adicionales que compiten con los anticuerpos enumerados (los números de CPA enumerados en la presente que se fijan específicamente a TIGIT) para fijarse específicamente a la molécula TIGIT. Como se muestra en el Ejemplo 16, los anticuerpos TIGIT de la invención se "clasifican" en diferentes categorías de epítopos.

Entre los 44 anticuerpos TIGIT en el estudio de clasificación de epítopos, hay cuatro comunidades, cada una con patrones de bloqueo por pares relacionados, que se separan en 12 categorías separadas totales descritas en la presente y que se muestran en las Figuras 67 y 68. Hay doce categorías separadas 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.

[00280] Por lo tanto, la invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que compiten por la fijación con anticuerpos que se encuentran en las categorías de epítopos separadas 1 a 12. En una forma de realización particular, la invención proporciona anticuerpos anti-TIGIT que compiten por la fijación con CPA.9.086 y son al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticos a CPA.9.086.

[00281] Se generan anticuerpos adicionales que compiten con los anticuerpos enumerados, como se conoce en la técnica y se describe en líneas generales a continuación. Los estudios de fijación competitiva se pueden realizar como se conoce en la técnica, generalmente mediante los ensayos de fijación SPR/Biacore®, así como los ensayos ELISA y a base de células.

VIII. Anticuerpos PVRIG

[00282] La presente invención proporciona anticuerpos anti-PVRIG. (Por conveniencia, "anticuerpos anti-PVRIG" y "anticuerpos PVRIG" se usan indistintamente). Los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se fijan específicamente a PVRIG humano, y preferentemente al ECD de PVRIG humano.

[00283] La fijación específica para PVRIG o un epítopo 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 anticuerpo-antígeno particular. Normalmente, un anticuerpo que se fija específicamente a un

antígeno tendrá una KD que es 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10.000 o más veces mayor para una molécula de control en relación con el antígeno o epítopo PVRIG.

[00284] Sin embargo, como se muestra en los Ejemplos de WO2016/134333, para la fijación óptima a PVRIG expresada en la superficie de los linfocitos NK y T, 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 tienen uso en los métodos de la invención.

[00285] Además, la fijación específica para un antígeno particular o un epítopo puede exhibirla, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una KA o Ka para un antígeno o epítopo PVRIG de al menos 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10.000 o más veces mayor para el epítopo en relación con un control, donde KA o Ka se refieren a una velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

[00286] En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se fijan 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 fijación), 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 comúnmente, SPR a 25 º o 37 ºC.

[00287] Es importante tener en cuenta que la afinidad de fijación a los anticuerpos anti-PVRIG está sorprendentemente relacionada con la actividad. Un análisis acumulativo de los datos de cribado muestra que la afinidad de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se correlacionó de forma significativa con su capacidad de fijación a los linfocitos T humanos primarios. Más específicamente, los anticuerpos que dieron la señal máxima más alta en los linfocitos T fueron aquellos con afinidades en el rango picomolar. Los anticuerpos que tenían afinidades en el rango nanomolar bajo y superiores dieron señales máximas relativamente débiles en los linfocitos T. Por lo tanto, los datos indican que la utilidad de los anticuerpos anti-PVRIG para la inmunoterapia a base de linfocitos T puede probablemente definirse, en parte, en función de su afinidad. Se hace referencia a las secuencias de anticuerpos de WO2016/134333, incorporadas a la presente por referencia y en particular para los dominios de fijación a antígeno anti-PVRIG descritos en las Figuras 38 (que muestran secuencias que se fijan a PVRIG y bloquean la interacción de PVRIG y PVRL2), la Figura 39 (que muestra secuencias que se fijan a PVRIG y no bloquean la interacción de PVRIG y PVRL2), la Figura 40 (que muestra las CDR y los datos de estos anticuerpos) y la Figura 41 (que muestra las CDR

de hibridomas que se fijan y bloquean). 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 (incluso las CDR, VH y VL y secuencias de longitud completa) de WO2016/134333 se incorporan expresamente en la presente.

[00288] Las Figuras 45 ilustra la capacidad de dos anticuerpos anti-PVRIG de diferentes afinidades de fijarse a linfocitos T CD8 primarios. Como se muestra en Las Figuras 45, CHA.7.518 tiene una afinidad alrededor de 8 veces mayor que CPA.7.021 (secuencia en WO2016/13433) según la medición mediante la fijación a células HEK modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar PVRIG (HEK hPVRIG). De acuerdo con esto, CHA.7.518 tiene una afinidad alrededor de 13 veces mayor que CPA.7.021, según la medición mediante la fijación a células Jurkat. La mayor afinidad de CHA.7.518 sí correspondió a una mayor señal máxima de fijación de las células HEK hPVRIG, pero no de las células Jurkat.

[00289] En contraste, CHA.7.518 brindó consistentemente una señal máxima de fijación mayor de los linfocitos T CD8 primarios, en comparación con CPA.7.021. Esto se ilustra en un experimento de titulación de fijación donde se agregaron diferentes concentraciones de isotipo o anticuerpos anti-PVRIG a los linfocitos T CD8 primarios, y se midió la señal máxima de fijación resultante. En los dos donantes representados (Las Figuras 45), CHA.7.518 brindó consistentemente una señal máxima mayor (media geométrica de intensidad de fluorescencia, gMFI) que CPA.7.021 de una manera dependiente de titulación. gMFIr = intensidad de fluorescencia geométrica del anticuerpo de interés/intensidad de fluorescencia geométrica del anticuerpo de control. La gMFIr mide la señal que el anticuerpo de interés brinda en relación con un anticuerpo de isotipo a razón de una concentración fija de ambos.

[00290] Por consiguiente, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención tienen afinidades de fijación (según la medición mediante las técnicas descritas en la presente) en el rango picomolar, por ejemplo, de 0,1 a 9 pM, en donde se prefiere de alrededor de 0,2 a alrededor de 2, y en donde de alrededor de 0,2 a alrededor de 0,5 es de uso particular.

[00291] En cuanto a los anticuerpos TIGIT, los anticuerpos PVRIG se etiquetan de manera similar de la siguiente manera. Los anticuerpos tienen números de referencia, por ejemplo, "CHA.7.518.1". Esto representa la combinación de las cadenas pesadas variables y livianas variables, como se muestra en la Las Figuras 3, por ejemplo, con el entendimiento de que estos anticuerpos incluyen dos cadenas pesadas

y dos cadenas livianas. "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 liviana 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 están indicadas. "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 liviana (por ejemplo, dominio variable y constante) de la misma molécula. En general, la cadena liviana kappa humana se usa para el dominio constante de cada anticuerpo de fago (o hibridoma humanizado) en la presente, aunque en algunas formas de realización se usa el dominio constante liviano de lambda. "CPA. 7.518.1.H1” se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende los dominios pesados y livianos variables, que incluyen el dominio constante de IgG**1 H**umana (por lo tanto, las secuencias H1; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se muestran en la La Figura 50). En consecuencia, “CPA. 7.518.1.H2” serían los dominios variables CPA. 7.518.1 ligados a una IgG**2 H**umana**.** "CPA. 7.518.1.H3” serían los dominios variables CPA. 7.518.1 ligados a una IgG**3 H**umana, y “CPA. 7.518.1.H4” serían los dominios variables CPA. 7.518.1 ligados a una IgG**4 H**umana. Ha de tenerse en cuenta que, en algunos casos, las IgG humanas pueden tener mutaciones adicionales, las cuales se describen a continuación, y esto se puede anotar. Por ejemplo, en muchas formas de realización, puede haber una mutación S241P en la IgG4 humana, y esto puede anotarse, por ejemplo, como "CPA. 7.518.1.H4(S241P)". Se muestra en la La Figura 50 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 fijación a FcγRIIIa) e IgG1 (D265A), que reduce la fijación a los receptores FcγR.

[00292] La invención proporciona además dominios pesados y livianos variables, así como cadenas pesadas y livianas de longitud completa.

[00293] En algunas formas de realización, la invención proporciona scFv que se fijan a PVRIG que comprenden un dominio pesado variable y un dominio liviano variable ligados por un ligador 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-ligador-VL” o “VL-ligador”VH”. Estos son nombrados en virtud de sus partes componentes; por ejemplo, “scFv-CHA.7.518.1VH-ligador-VL” o “scFv-CPA. 7.518.1.VL-ligador-VH”. Por lo tanto, "scFv-CPA. 7.518.1" puede estar en cualquiera de

las dos orientaciones.

IX. Ácidos nucleicos que codifican anticuerpos

[00294] También se proporcionan composiciones de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención, así como vectores de expresión que contienen los ácidos nucleicos y células huésped transformados con las composiciones de ácido nucleico y/o vector de expresión. Como apreciarán las personas del oficio de nivel medio, las secuencias de proteínas representadas en la presente pueden ser codificadas por cualquier número de posibles secuencias de ácido nucleico, debido a la degeneración del código genético.

[00295] Las composiciones de ácido nucleico que codifican los anticuerpos dependerán del formato del anticuerpo. Para los anticuerpos tetraméricos tradicionales que contienen dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas están codificados por dos ácidos nucleicos diferentes, uno que codifica la cadena pesada y otro que codifica la cadena liviana. 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 formas de realización, por ejemplo, cuando se usan constructos scFv, se usa generalmente un único ácido nucleico que codifica la cadena pesada variable-ligador-cadena liviana variable, que puede insertarse en un vector de expresión para la transformación en células huésped. Los ácidos nucleicos se pueden poner en vectores de expresión que contienen las secuencias de control de transcripción y traducción apropiadas, incluso, entre otras, secuencias de señal y secreción, secuencias reguladoras, promotores, orígenes de replicación, genes de selección, etc.

[00296] Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de acuerdo con al menos algunas formas de realización de la invención incluyen ovario de hámster chino (células CHO), PER.C6, HEK293 y otras, como se conoce en la técnica.

[00297] Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aísla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se lo separa mediante purificación de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluso el tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica.

[00298] Con el objetivo de crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H- y V_L- se ligan operativamente a otro fragmento que codifica un ligador 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 se puedan expresar como una proteína monocatenaria contigua, en donde las regiones V_L y V_H están unidas mediante el ligador flexible.

X. Formulaciones

[00299] Las composiciones terapéuticas utilizadas en la puesta en práctica de los métodos anteriores (y en particular CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086) pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un portador adecuado para el método deseado de administración. Los portadores adecuados incluyen cualquier material que, al combinarse con la composición terapéutica, retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y que no es generalmente 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 amortiguadas con fosfato, agua bacteriostática, y similares (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, A. Osal., Ed., 1980). Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y pueden incluir amortiguadores.

[00300] En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la invención puede estar en una forma soluble en agua, tal como estar presente en forma de sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, que se pretende que incluyan tanto sales de adición ácida y básica. "Sal de adición ácida aceptable desde el punto de vista farmacéutico" 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 aceptables desde el punto de vista farmacéutico" incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas y similares.

[00301] La administración de la composición farmacéutica que comprende anticuerpos 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.

[00302] Las cantidades de dosis y las frecuencias de administración, en una forma de realización preferida, se seleccionan para ser terapéutica o profilácticamente

eficaz. 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 condición pueden ser necesarios y se podrán determinar mediante experimentación rutinaria por parte de las personas del oficio de nivel medio.

[00303] Con el fin de 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 una persona del oficio de nivel medio la podrá determinar mediante técnicas conocidas.

XI. Métodos para el uso de anticuerpos

[00304] Los anticuerpos de la invención, incluso tanto los anticuerpos PVRIG como los TIGIT, pueden usarse en varias aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. En algunos casos, la decisión de qué anticuerpo administrar a un paciente se realiza mediante una evaluación de los niveles de expresión (ya sea los niveles de expresión génica o los niveles de expresión de proteínas, en donde se prefiere este último) de biopsias de tumores de muestra para determinar si la muestra está sobreexpresando TIGIT o PVRIG, o ambos, para determinar qué anticuerpos terapéuticos administrar.

A. Usos de diagnóstico

[00305] Por consiguiente, los anticuerpos de la invención también tienen uso en el diagnóstico in vitro o in vivo, lo que incluye la formación de imágenes de tumores que sobreexpresan PVRIG o TIGIT, respectivamente. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, como se analiza en la presente, tanto TIGIT como PVRIG, como proteínas diana de inmuno-oncología, no están necesariamente sobreexpresadas en las células cancerosas, sino más bien en los infiltrados inmunes en el cáncer. Por lo tanto, es el mecanismo de acción, por ejemplo, la activación de células inmunes tales como los linfocitos T y NK, lo que resulta en el diagnóstico de cáncer. Por consiguiente, estos anticuerpos pueden usarse para diagnosticar cáncer. El diagnóstico con anticuerpos PVRIG también se describe en WO 2016/134333, [0434 a 0459], que se incorpora a la presente por referencia.

[00306] Generalmente, el diagnóstico se puede hacer de varias maneras. En una forma de realización, un tejido de un paciente, tal como una muestra de biopsia, se pone en contacto con un anticuerpo TIGIT, etiquetado generalmente, de manera que el

anticuerpo se fija 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.).

[00307] En general, en esta forma de realización, el anti-TIGIT se etiqueta, por ejemplo, con un fluoróforo u otra etiqueta óptica, que se detectan mediante un fluorómetro u otro sistema de detección óptica como se conoce bien en la técnica. En una forma de realización alternativa, un anticuerpo etiquetado secundario se pone en contacto con la muestra, por ejemplo, mediante un anticuerpo anti-IgG humana de un mamífero diferente (ratón, rata, conejo, cabra, etc.) para formar un ensayo tipo sándwich como se conoce en la técnica. Alternativamente, el mAb anti-TIGIT se puede etiquetar directamente (es decir, biotina) y la detección se puede realizar mediante un Ab secundario dirigido al agente de etiquetado de la técnica.

[00308] Una vez que se observa la sobreexpresión de TIGIT, el tratamiento puede proceder con la administración de un anticuerpo anti-TIGIT de acuerdo con la invención como se describe en la presente.

[00309] En otras formas de realización, se realiza el diagnóstico in vivo. Generalmente, en esta forma de realización, el anticuerpo anti-TIGIT (que incluye fragmentos de anticuerpo) se inyecta en el paciente y se realiza la formación de imágenes. En esta forma de realización, por ejemplo, el anticuerpo está generalmente etiquetado con una etiqueta óptica o una etiqueta de MRI, tal como un quelato de gadolinio, etiquetado radioactivo de mAb (que incluye fragmentos).

[00310] En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente se usan tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, o solo para el diagnóstico. Cuando los anticuerpos anti-TIGIT se usan tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, algunas formas de realización se basan en dos anticuerpos anti-TIGIT diferentes en relación a dos epítopos diferentes, de modo que el anticuerpo de diagnóstico no compite por la fijación con el anticuerpo terapéutico, aunque en algunos casos el mismo anticuerpo puede usarse para ambos. Por ejemplo, esto se puede hacer mediante anticuerpos que están en diferentes categorías, por ejemplo, que se fijan a diferentes epítopos en TIGIT, como se describe en la presente. De este modo, en la invención se incluyen composiciones que comprenden un anticuerpo de diagnóstico y un anticuerpo terapéutico, y, en algunas formas de realización, el anticuerpo de

diagnóstico se etiqueta como se describe en la presente. Además, la composición de los anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico también se puede coadministrar con otros fármacos como se describe en la presente.

[00311] Los anticuerpos particularmente útiles para uso en el diagnóstico incluyen, entre otros, estos anticuerpos enumerados, o anticuerpos que utilizan las CDR con secuencias variantes, o aquellos que compiten por la fijación con cualquiera de los anticuerpos en la Las Figuras 53.

[00312] En muchas formas de realización, un anticuerpo de diagnóstico está etiquetado. Por "etiquetado" en la presente se entiende que los anticuerpos 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, las etiquetas se clasifican en varias clases: a) etiquetas inmunitarias, que pueden ser un epítopo incorporado como un socio de fusión reconocido por un anticuerpo, b) etiquetas isotópicas, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados, c) etiquetas de moléculas pequeñas, que pueden incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como la biotina que permiten otros métodos de etiquetado, y d) etiquetas tales como partículas (incluso burbujas para el etiquetado por ultrasonido) o etiquetas paramagnéticas que permiten formar imágenes del cuerpo. Las etiquetas pueden incorporarse en los anticuerpos en cualquier posición y pueden incorporarse in vitro o in vivo durante la expresión de proteínas, como se conoce en la técnica.

[00313] 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. "Muestra" en este contexto incluye cualquier número de cosas, incluso, entre otras, fluidos corporales (incluso, entre otros, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, transpiración y semen), así como muestras de tejidos como resultado de biopsias de tejidos relevantes.

[00314] 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 o TIGIT, o ambos, o PVRIG y PD-1, o TIGIT y PD-1, se puede usar para determinar qué anticuerpos deberían administrarse a un paciente.

B. Tratamiento contra el cáncer

[00315] Los anticuerpos de la invención tienen un uso particular en el tratamiento

del cáncer. En general, los anticuerpos 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 los tumores, que tienen como objetivo inhibir las vías moleculares que son cruciales para el crecimiento y desarrollo de los tumores, y/o agotar los linfocitos tumorales, la inmunoterapia contra el cáncer está dirigida a estimular el propio sistema inmunitario del paciente para eliminar las células cancerosas, lo que proporciona una destrucción de larga vida del tumor. Se pueden usar 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 inmunoestimulantes (es decir, antagonistas de receptores inhibidores = puntos de control inmunitarios) para eliminar las vías inmunosupresoras.

[00316] 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 pocos 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).

[00317] 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 microentorno de tumor inmunosupresor a través de diversos mecanismos y una variedad de células inmunes.

[00318] Por consiguiente, los anticuerpos de la invención son útiles en el tratamiento del cáncer. Debido a la naturaleza de un mecanismo inmuno-oncológico de acción, 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 NK, de modo que el sistema inmunitario persiga los cánceres.

[00319] "Cáncer", como se usa en la presente, 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). Los términos "cáncer" o "canceroso", como se usan en la presente, deben entenderse como 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 limitativos en la presente. Esto incluye cualquier condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Se ejemplifican ejemplos de tipos de cáncer en los ejemplos de trabajo y se describen también dentro de la especificación.

[00320] Ejemplos no limitativos de tipos de cáncer que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales tipos de cáncer incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluso cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluso cáncer gastrointestinal), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de piel no melanoma (carcinoma de células escamosas y basales), cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de células B (incluso linfoma no Hodgkin de grado bajo/folicular (NHL); 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 no escindidas pequeño 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; mieloma múltiple y trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD).

[00321] 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 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, incluso, 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 (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.

[00322] En particular, CHA.7.518.1H4(S241P) tiene uso en el tratamiento de 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 (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (CCR), linfoma (NHL o 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, cáncer de vejiga y cáncer de esófago.

[00323] En particular, CHA.7.538.1.2.H4(S241P) tiene uso en el tratamiento de 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 (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (CCR), linfoma (NHL o 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, cáncer de vejiga y cáncer de esófago.

[00324] En particular, CPA.9.086H4(S241P) tiene uso en el tratamiento de 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 (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (CCR), linfoma (NHL o 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, cáncer de vejiga y cáncer de esófago.

[00325] En particular, CPA.9.083H4(S241P) tiene uso en el tratamiento de 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 (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (CCR), linfoma (NHL o 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, cáncer de vejiga y cáncer de esófago.

[00326] En particular, CHA.9.547.7.H4(S241P) tiene uso en el tratamiento de 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 (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (CCR), linfoma (NHL o 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, cáncer de vejiga y cáncer de esófago.

[00327] En particular, CHA.9.547.13.H4(S241P) tiene uso en el tratamiento de 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 (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (CCR), linfoma (NHL o 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, cáncer de vejiga y cáncer de esófago.

C. Monoterapia de anticuerpos TIGIT

[00328] Los anticuerpos TIGIT de la invención encuentran un uso particular en el tratamiento del cáncer como una monoterapia. Debido a la naturaleza de un mecanismo inmuno-oncológico de acción, TIGIT no necesariamente tiene que estar sobreexpresado o correlacionado con un tipo particular de cáncer; es decir, el objetivo es hacer que los anticuerpos anti-TIGIT eliminen la supresión de la activación de los linfocitos T y NK, de

modo que el sistema inmunitario persiga los cánceres.

[00329] Mientras que cualquier anticuerpo anti-TIGIT de la Las Figuras 53 tiene uso en el tratamiento contra el cáncer (incluso la activación de los linfocitos T como se describe a continuación), CPA.9.086.H4(S241P), CPA.9.083.H4(S241P), CHA.9.547.7.H4(S241P), y CHA.9.547.13.H4(S241P), tienen un uso particular en algunas formas de realización.

D. Monoterapia con anticuerpos PVRIG

[00330] Los anticuerpos PVRIG de la invención tienen un uso particular en el tratamiento del cáncer como una monoterapia. Debido a la naturaleza de un mecanismo inmuno-oncológico de acción, TIGIT no necesariamente tiene que estar sobreexpresado o correlacionado con un tipo particular de cáncer; es decir, el objetivo es hacer que los anticuerpos anti-TIGIT eliminen la supresión de la activación de los linfocitos T y NK, de modo que el sistema inmunitario persiga los cánceres.

[00331] En particular, CHA.7.518.1H4(S241P) tiene uso como monoterapia.

[00332] De manera similar, particularmente, CHA.7.538.1.2.H4(S241P) tiene uso como monoterapia en el tratamiento de 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 (carcinoma de células escamosas y basales), glioma, cáncer de riñón (CCR), linfoma (NHL o 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, cáncer de vejiga y cáncer de esófago.

E. Tratamientos conjuntos

[00333] Como se sabe en la técnica, los tratamientos conjuntos que comprenden un anticuerpo 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 varios tratamientos conjuntos prometedoras que utilizan un agente quimioterapéutico (ya sea un fármaco de molécula pequeña o un anticuerpo antitumoral) o que tienen un anticuerpo de inmuno-oncología.

[00334] Los términos "conjuntamente con" y "coadministración" no se limitan a la administración de dichos 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 tales que pueden actuar conjuntamente para proporcionar un beneficio que se incrementa en comparación con el tratamiento con ya sea solo el anticuerpo de la presente invención o 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. Dichas 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.

[00335] Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar de forma concomitante con uno o más regímenes o agentes terapéuticos. Los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden usarse para mejorar la eficacia o seguridad del anticuerpo. Además, los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden usarse para tratar la misma enfermedad o una comorbilidad en lugar de alterar la acción del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención se puede administrar al paciente junto con quimioterapia, radioterapia o tanto quimioterapia como radioterapia.

[00336]

1. Anticuerpos TIGIT con moléculas quimioterapéuticas pequeñas

[00337] Los anticuerpos TIGIT de la presente invención pueden administrarse conjuntamente 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 la quinasa, agentes antiangiogénicos, agentes cardioprotectores, agentes inmunoestimulantes, 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.

[00338] En este contexto, un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida, alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, 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 (incluso el topotecán análogo sintético (HYCAMTN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluso sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluso 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 ranimnustina; 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, incluso 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 (incluso morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, 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; diacicuona;

elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinán; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacáridos PSK.RTM. (JHS Natural Products, Eugene, Oregón); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; 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, Schaumberg, 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; leucovovina; 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 un tratamiento conjunto de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona; CVP, una abreviatura para un tratamiento conjunto de ciclofosfamida, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN®) conjuntamente con 5-FU y leucovorina.

[00339] De acuerdo con al menos algunas formas de realización, las moléculas inmunitarias anti TIGIT se podrían usar conjuntamente con cualquiera de los tratamientos contra el cáncer que son estándares y conocidos en la técnica (como se puede encontrar, por ejemplo, en http://www.cancer.gov/cancertopics).

[00340] Por lo tanto, en algunos casos, los anticuerpos anti-PVRIG descritos en la presente (en particular, que incluyen CHA.7.538.1.2.H4(S241P) o CHA.7.518.1.H4(S241P)) se pueden combinar con agentes quimioterapéuticos. De manera similar, los anticuerpos anti-TIGIT descritos en la presente (en particular, que incluyen CPA.9.086H4(S241P), CPA.9.083H4(S241P) y CHA.9.547.13.H4(S241P)

pueden combinarse con agentes quimioterapéuticos.

[00341] Además, los anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT de la invención también pueden administrarse con otros inhibidores o activadores de punto de control.

2. Tratamiento conjunto con anticuerpos TIGIT y de punto de control

[00342] Como se muestra en la presente, los anticuerpos TIGIT de la invención se pueden combinar con uno de una serie de anticuerpos receptores de punto de control. En algunas formas de realización, el tumor de un paciente puede evaluarse para determinar la expresión de receptores y los resultados se pueden usar entonces para informar a un médico qué anticuerpos administrar: PVRIG y PD-1, TIGIT y PD-1 o TIGIT y PVRIG. Estos ensayos se describen a continuación.

a. Anticuerpos anti-TIGIT conjuntamente con anticuerpos anti-PD-1

[00343] En una forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-PD-1.

[00344] En una forma de realización, se toma una biopsia de un tumor de un paciente con cáncer y se disocia como se sabe en la técnica para el análisis de FACS. Las células se tiñen con anticuerpos etiquetados para (1) TIGIT (por ejemplo, mediante cualquiera de los descritos en la presente u otros en la técnica, como MBSA43); (2) PD-1 (por ejemplo, mediante los conocidos en la técnica, incluso EH12.2H7, Keytruda®, Opdivo®, etc.); (3) PD-L1 (por ejemplo, mediante los conocidos en la técnica, tales como BM-1 descrito aquí) y (4) PVR (por ejemplo, mediante los conocidos en la técnica, tales como SKII.4); y (5) un anticuerpo de control de isotipo. Se realiza el FACS y, para cada receptor, se calcula el porcentaje de células que expresan el receptor en relación con el anticuerpo de control. Si el porcentaje de células positivas para TIGIT, PD-1, PD-1 y PVR es $\geq$ 1 % para los 4 receptores, entonces el paciente se trata con anticuerpos para TIGIT y PD-1 como se describe en la presente.

[00345] Por consiguiente, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-PD-1. Hay dos anticuerpos anti-PD-1 aprobados, pembrolizumab (Keytruda®) y nivolumab (Opdivo®), y muchos más en desarrollo que se pueden usar conjuntamente con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

[00346] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) (como se muestra en la Las Figuras 53B) con pembrolizumab; CPA.9.083.H4(S241P) como se muestra en la Las Figuras 53B con

nivolumab; CPA.9.086.H4(S241P) como se muestra en la Las Figuras 53A con pembrolizumab; CPA.9.086.H4(S241P) como se muestra en la Las Figuras 53A con nivolumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con pembrolizumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con nivolumab; CHA.9.547.13.H4 (S241P) con pembrolizumab y CHA.9.547.13.H4(S241P) con nivolumab. (Se hace referencia al listado de secuencias).

b. Anticuerpos anti-TIGIT conjuntamente con anticuerpos anti-CTLA-4

[00347] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-CTLA-4. Hay dos anticuerpos anti-CTLA-4 aprobados, ipilimumab (Yervoy®) y tremelimumab, así como otros en desarrollo, que se pueden usar conjuntamente con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

[00348] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con ipilimumab; CPA.9.083.H4(S241P) con tremelimumab; CPA.9.086.H4(S241P) con ipilimumab; CPA.9.086.H4(S241P) con tremelimumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con ipilimumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con tremelimumab; CHA.9.547.13.H4(S241P) con ipilimumab y CHA.9.547.13.H4(S241P) con tremelimumab.

c. Anticuerpos anti-TIGIT conjuntamente con anticuerpos anti-PD-L1

[00349] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-PD-L1. Hay tres anticuerpos anti-PD-L1 aprobados, atezolizumab (TECENTRIQ®), avelumab (BAVENCIO®) y durvalumab (IMFINZI™), así como otros anticuerpos anti-PD-L1 en desarrollo, que se pueden usar conjuntamente con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

[00350] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con atezolizumab; CPA.9.083.H4(S241P) con avelumab; CPA.9.083.H4(S241P) con durvalumab; CPA.9.086.H4(S241P) con atezolizumab; CPA.9.086.H4(S241P) con avelumab; CPA.9.086.H4(S241P) con durvalumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con atezolizumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con avelumab; CHA.9.547.7H4(S241P) con durvalumab; CHA.9.547.13.H4(S241P) con atezolizumab; CHA.9.547.13.H4(S241P) con avelumab; y CHA.9.547.13.H4(S241P) con durvalumab.

d. Anticuerpos anti-TIGIT conjuntamente con anticuerpos anti-LAG-3

[00351] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de

los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-LAG-3. Hay varios anticuerpos anti-LAG-3 en desarrollo, los cuales incluyen BMS-986016 (véase la solicitud de patente Internacional N.° WO2010/019570A2, incorporada a la presente por referencia en su totalidad), GSK2831781 (véase la solicitud de patente estadounidense N.° 2016/0017037A, incorporada a la presente por referencia en su totalidad), y los clones de Merck 22D2, 11C9, 4A10 y/o 19E8 (véase WO2016/028672A1, incorporada a la presente por referencia en su totalidad) y GSK2831781, así como otros en desarrollo, que se pueden usar conjuntamente con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

[00352] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con BMS-986016; CPA.9.083.H4(S241P) con GSK2831781; CPA.9.086.H4(S241P) con BMS-986016; CPA.9.086.H4(S241P) con GSK2831781; CHA.9.547.7H4(S241P) con BMS-986016; CHA.9.547.7H4(S241P) con GSK2831781; CHA.9.547.13.H4(S241P) con BMS-986016 y CHA.9.547.13.H4(S241P) con GSK2831781.

[00353] Por consiguiente, la invención también proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9 y/o 4A10; CPA.9.086.H4(S241P) con clones de Merck 22D2, 11C9 y/o 4A10; CHA.9.547.7H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9 y/o 4A10; CHA.9.547.13.H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9 y/o 4A10.

e. Anticuerpos anti-TIGIT conjuntamente con anticuerpos anti-TIM-3

[00354] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-TIM-3. Hay al menos un anticuerpo anti-TIM-3 en desarrollo, TSR-022, así como otros en desarrollo, que se puede usar conjuntamente con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

[00355] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con TSR-022; CPA.9.086.H4(S241P) con TSR-0226; CHA.9.547.7H4(S241P) con TSR-022; y CHA.9.547.13.H4(S241P) con TSR-022.

f. Anticuerpos anti-TIGIT conjuntamente con anticuerpos anti-BTLA

[00356] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-TIGIT de la invención y anticuerpos anti-BTLA; véase WO2011/014438, incorporado a la presente por referencia en su totalidad, y particularmente para las CDR y las secuencias de longitud completa de los anticuerpos

anti-BTLA descritos en esta. Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CPA.9.083.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA; CPA.9.086.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA; CHA.9.547.7H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA; y CHA.9.547.13.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA.

g. Anticuerpos TIGIT con anticuerpos antitumorales

[00357] En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-TIGIT de la invención se coadministran con anticuerpos que, a diferencia de los inhibidores de inmuno-oncología/punto de control que generalmente actúan en el sistema inmunitario para aumentar la respuesta inmunitaria nativa de un paciente, se dirigen, en cambio, contra un antígeno diana específico de tumor (TTA). Existe una gran cantidad de anticuerpos anti-TTA ya sea aprobados o en desarrollo que pueden combinarse con los presentes anticuerpos TIGIT. Los anticuerpos aprobados actualmente incluyen, entre otros, cetuximab, panitumumab, nimotuzumab (todos para EGFR), rituximab (CD20), trastuzumab y pertuzumab (HER2), alemtuzumab (CD52), bevacizumab (VEGF), ofatumumab (CD20), denosumab (ligando RANK), brentuximab (CD30), daratumumab (CD38), ibritumomab (CD20) e ipilimumab (CTLA-4). Los anticuerpos de oncología diana específicos en ensayos clínicos que pueden combinarse con los anticuerpos anti-TIGIT de la presente incluyen, entre otros, mAb anti-CTLA4, tales como ipilimumab, tremelimumab; anti-PD-1 tales como nivolumab BMS-936558/MDX-1106/ONO-4538, AMP224, CT-011, MK-3475, antagonistas anti-PDL-1 tales como BMS-936559/MDX-1105, MEDI4736, RG-7446/MPDL3280A; Anti-LAG-3 tales como IMP-321), anti-TIM-3, anti-BTLA, anti-B7-H4, anti-B7-H3, anti-VISTA; anticuerpos agonistas dirigidos a proteínas inmunoestimuladoras, que incluyen mAb anti-CD40 tales como CP-870,893, lucatumumab, dacetuzumab; mAb anti-CD137 tales como urelumab BMS-663513 (anti-4-1BB; véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.° 7.288.638 y 8.962.804, incorporadas a la presente por referencia en su totalidad); utomilumab PF-05082566 (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.° 8.821.867, 8.337.850, y 9.468.678, así como la publicación de solicitud de patente internacional N.° WO 2012/032433, incorporada a la presente por referencia en su totalidad); mAb anti-OX40, tales como anti-OX40 (véase, por ejemplo, WO2006/029879 o WO2010096418, incorporadas a la presente por referencia en su totalidad); mAb anti-GITR tales como TRX518 (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.° 7.812.135, incorporada a la presente por referencia en su totalidad); mAb anti-CD27, tales como varlilumab CDX-1127 (véase, por ejemplo, WO 2016/145085 y las publicaciones de patente estadounidenses N.° US 2011/0274685 y US 2012/0213771, incorporadas a la presente

por referencia en su totalidad); mAb anti-ICOS (por ejemplo, los anticuerpos MEDI-570, JTX-2011 y anti-TIM3 (véase, por ejemplo, WO 2013/006490 o la publicación de patente estadounidense N.° US 2016/0257758, incorporada a la presente por referencia en su totalidad), así como anticuerpos monoclonales para cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de endometrio, mieloma múltiple, melanoma, linfomas, tipos de cáncer de pulmón, que incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de cerebro, (véase en general www.clinicaltrials.gov).

3. Tratamiento conjunto de PVRIG y PD-1

[00358] Como se muestra en la presente, los anticuerpos PVRIG de la invención se pueden combinar con uno de una serie de anticuerpos receptores de punto de control.

a. Anticuerpos anti-PVRIG conjuntamente con anticuerpos anti-PD-1

[00359] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-PD-1.

[00360] En una forma de realización, se toma una biopsia de un tumor de un paciente con cáncer y se disocia como se sabe en la técnica para el análisis de FACS. Las células se tiñen con anticuerpos etiquetados para (1) PVRIG (generalmente mediante CHA.7.518.1H4(S241P), por ejemplo, aunque se puede usar cualquiera de los descritos en WO2016/134333 (incluso específicamente cualquiera que fije, incluso si no bloquea) o WO2017/041004); (2) PD-1 (por ejemplo, mediante los conocidos en la técnica, incluso EH12.2H7, Keytruda®, Opdivo®, etc.); (3) PD-L1 (por ejemplo, mediante los conocidos en la técnica, tales como BM-1 descrito en la presente) y (4) PVRL2 (por ejemplo, mediante los conocidos en la técnica, tales como TX11); y (5) un anticuerpo de control de isotipo. Se realiza el FACS y, para cada receptor, se calcula el porcentaje de células que expresan el receptor en relación con el anticuerpo de control. Si el porcentaje de células positivas para PVRIG, PD-1, PD-1 y PVRL2 es $\geq$ 1 % para los 4 receptores, entonces el paciente recibe tratamiento con anticuerpos para PVRIG y PD-1 como se describe en la presente.

[00361] Hay dos anticuerpos anti-PD-1 aprobados, pembrolizumab (Keytruda®) y nivolumab (Opdivo®), y muchos más en desarrollo que se pueden usar conjuntamente con los anticuerpos anti-PVRIG de la invención.

[00362] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) (como se muestra en la Las Figuras 3) con pembrolizumab;

CHA.7.518.1.H4(S241P) como se muestra en la Las Figuras 3 con nivolumab; CHA.7.538.1.2.H4(S241P) como se muestra en la Las Figuras 3 con pembrolizumab y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) como se muestra en con nivolumab.

b. Anticuerpos anti-PVRIG conjuntamente con anticuerpos anti-CTLA-4

[00363] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-CTLA-4. Hay dos anticuerpos anti-CTLA-4 aprobados, ipilimumab (Yervoy®) y tremelimumab, así como otros en desarrollo, que se pueden usar conjuntamente con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

[00364] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con ipilimumab; CHA.7.518.1.H4(S241P) con tremelimumab; CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con ipilimumab y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con tremelimumab.

c. Anticuerpos anti-PVRIG conjuntamente con anticuerpos anti-PD-L1

[00365] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-PD-L1. Hay tres anticuerpos anti-PD-L1 aprobados, atezolizumab (TECENTRIQ®), avelumab (BAVENCIO®) y durvalumab, así como otros anticuerpos anti-PD-L1 en desarrollo, que se pueden usar conjuntamente con los anticuerpos anti-TIGIT de la invención.

[00366] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con atezolizumab; CPA.7518.1.H4(S241P) con avelumab; CHA.7.518.1.H4(S241P) con durvalumab; CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con atezolizumab; CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con avelumab y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con durvalumab.

d. Anticuerpos anti-PVRIG conjuntamente con anticuerpos anti-LAG-3

[00367] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-LAG-3. Hay varios anticuerpos anti-LAG-3 en desarrollo, los cuales incluyen BMS-986016 (véase la solicitud de patente Internacional N.° WO2010/019570A2, incorporada a la presente por referencia en su totalidad), GSK2831781 (véase la solicitud de patente estadounidense N.° 2016/0017037A, incorporada a la presente por referencia en su totalidad), y los clones de Merck 22D2, 11C9, 4A10 y/o 19E8 (véase WO2016/028672A1, incorporada a la presente por referencia en su totalidad) y GSK2831781, así como otros en

desarrollo, que se pueden usar conjuntamente con los anticuerpos anti-PVRIG de la invención.

[00368] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con BMS-986016; CHA.7.518.1.H4(S241P) con GSK2831781; CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con BMS-986016 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con GSK2831781.

[00369] En consecuencia, la invención también proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9 y/o 4A10 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con los clones de Merck 22D2, 11C9 y/o 4A10.

e. Anticuerpos anti-PVRIG conjuntamente con anticuerpos anti-TIM-3

[00370] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-TIM-3. Hay al menos un anticuerpo anti-TIM-3 en desarrollo, TSR-022, así como otros en desarrollo, que puede usarse conjuntamente con los anticuerpos anti-PVRIG de la invención.

[00371] Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con TSR-022 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con TSR-0226.

f. Anticuerpos anti-PVRIG conjuntamente con anticuerpos anti-BTLA

[00372] En otra forma de realización, la invención proporciona combinaciones de los anticuerpos anti-PVRIG de la invención y anticuerpos anti-BTLA; véase WO2011/014438, incorporado a la presente por referencia en su totalidad, y particularmente para las CDR y las secuencias de longitud completa de los anticuerpos anti-BTLA descritos en esta. Por consiguiente, la invención proporciona las combinaciones específicas de: CHA.7.518.1.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con un anticuerpo anti-BTLA.

g. Anticuerpos PVRIG con anticuerpos antitumorales

[00373] En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-PVRIG de la invención se coadministran con anticuerpos que, a diferencia de los inhibidores de inmuno-oncología/punto de control que generalmente actúan en el sistema inmunitario para aumentar la respuesta inmunitaria nativa de un paciente, se dirigen, en cambio, contra un antígeno diana específico de tumor (TTA). Existe un gran número de anticuerpos anti-TTA ya sea aprobados o en desarrollo que pueden combinarse con los presentes anticuerpos PVRIG, incluso CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Los anticuerpos aprobados actualmente incluyen, entre

otros, cetuximab, panitumumab, nimotuzumab (todos para EGFR), rituximab (CD20), trastuzumab y pertuzumab (HER2), alemtuzumab (CD52), bevacizumab (VEGF), ofatumumab (CD20), denosumab (ligando RANK), brentuximab (CD30), daratumumab (CD38), ibritumomab (CD20) e ipilimumab (CTLA-4). Los anticuerpos de oncología diana específicos en ensayos clínicos que pueden combinarse con los anticuerpos anti-PVRIG de la presente incluyen, entre otros, mAb anti-CTLA4, tales como ipilimumab, tremelimumab; anti-PD-1 tales como nivolumab BMS-936558/MDX-1106/ONO-4538, AMP224, CT-011, MK-3475, antagonistas anti-PDL-1 tales como BMS-936559/MDX-1105, MEDI4736, RG-7446/MPDL3280A; Anti-LAG-3 tales como IMP-321), anti-TIM-3, anti-BTLA, anti-B7-H4, anti-B7-H3, anti-VISTA; anticuerpos agonistas dirigidos a proteínas inmunoestimuladoras, que incluyen mAb anti-CD40 tales como CP-870,893, lucatumumab, dacetuzumab; mAb anti-CD137 tales como urelumab BMS-663513 (anti-4-1BB; véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.° 7.288.638 y 8.962.804, incorporadas a la presente por referencia en su totalidad); utomilumab PF-05082566 (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.° 8.821.867, 8.337.850, y 9.468.678, así como la publicación de solicitud de patente internacional N.° WO 2012/032433, incorporada a la presente por referencia en su totalidad); mAb anti-OX40, tales como anti-OX40 (véase, por ejemplo, WO2006/029879 o WO2010096418, incorporadas a la presente por referencia en su totalidad); mAb anti-GITR tales como TRX518 (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.° 7.812.135, incorporada a la presente por referencia en su totalidad); mAb anti-CD27, tales como varlilumab CDX-1127 (véase, por ejemplo, WO 2016/145085 y las publicaciones de patente estadounidenses N.° US 2011/0274685 y US 2012/0213771, incorporadas a la presente por referencia en su totalidad); mAb anti-ICOS (por ejemplo, los anticuerpos MEDI-570, JTX-2011 y anti-TIM3 (véase, por ejemplo, WO 2013/006490 o la publicación de patente estadounidense N.° US 2016/0257758, incorporada a la presente por referencia en su totalidad), así como anticuerpos monoclonales para cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de endometrio, mieloma múltiple, melanoma, linfomas, tipos de cáncer de pulmón, que incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de cerebro, (véase en general www.clinicaltrials.gov).

4. Tratamiento conjunto de PVRIG y TIGIT

[00374] Existen combinaciones específicas de anticuerpos anti-TIGIT y anti-PVRIG que tienen uso en formas de realización particulares.

[00375] En una forma de realización, se toma una biopsia de un tumor de un paciente con cáncer y se disocia como se sabe en la técnica para el análisis de FACS. Las células se tiñen con anticuerpos etiquetados para (1) PVRIG (generalmente mediante CHA.7.518.1H4(S241P), por ejemplo, aunque se puede usar cualquiera de los descritos en WO2016/134333 (incluso específicamente cualquiera que fije, incluso si no bloquea) o WO2017/041004); (2) TIGIT (por ejemplo, mediante cualquiera de los descritos en la presente u otros en la técnica, tales como MBSA43); (3) PVR (por ejemplo, mediante los conocidos en la técnica tales como SKII.4) y (4) PVRL2 (por ejemplo, mediante los conocidos en la técnica, tales como TX11); y (5) un anticuerpo de control de isotipo. Se realiza el FACS y, para cada receptor, se calcula el porcentaje de células que expresan el receptor en relación con el anticuerpo de control. Si el porcentaje de células positivas para PVRIG, TIGIT, PVR y PVRL2 es $\geq$ 1 % para los 4 receptores, entonces el paciente recibe tratamiento con anticuerpos para PVRIG y TIGIT. En este sentido, las combinaciones preferidas son CHA.7.518.1.H4(S241P) y CPA.9.086.

[00376] En una forma de realización, los anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 se combinan con anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.518.1. En una forma de realización particular, los anticuerpos que contienen las secuencias de VH y VL del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 se combinan con anticuerpos que contienen las VL y VL del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.518.1. En una forma de realización, CPA.9.086.H4(S241P), como se muestra en la Las Figuras 53 se combina con CHA.7.518.1H4(S241P) como se muestra en la Las Figuras 3.

[00377] En una forma de realización, los anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.083 se combinan con anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.518.1. En una forma de realización particular, los anticuerpos que contienen las secuencias de VH y VL del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.083 se combinan con anticuerpos que contienen las VL y VL del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.518.1. En una forma de realización, CPA.9.086.H4(S241P) se combina con CHA.7.518.1H4(S241P).

[00378] En una forma de realización, los anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 se combinan con anticuerpos que contienen los conjuntos de CDR del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.538.1.2.H4(S241P). En una forma de realización particular, los anticuerpos que contienen las secuencias de VH y VL del anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 se combinan con anticuerpos que

contienen las VL y VL del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.538.1.2.H4(S241P). En una forma de realización, CPA.9.086.H4(S241P) se combina con CHA.7.538.1.2.H4(S241P).

[00379] En una forma de realización, CHA.518.1.H4(S241P) se combina con un anticuerpo anti-TIGIT como se menciona en el listado de secuencias (con referencia a todos los anticuerpos enumerados en la Figura 4 de USSN 62/513.916), específicamente 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.9.546.1, 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

[00380] En una forma de realización, CPA.9.086 se combina con un anticuerpo anti-PVRIG como se describe en WO2017/041004, lo que incluye, entre otros, aquellos que tienen a) una secuencia de HC SEQ ID NO:5 y una secuencia de LC SEQ ID NO:3 (o los conjuntos de CDR contenidos en estas); b) una secuencia de HC SEQ ID NO:32 y una secuencia de LC SEQ ID NO:33 (o los conjuntos de CDR contenidos en estas); y c) una secuencia de HC SEQ ID NO:32 y una secuencia de LC SEQ ID NO:40 (o los conjuntos de CDR contenidos en estas).

[00381] En algunas formas de realización, la combinación comprende un anticuerpo anti-TIGIT seleccionado del grupo que consiste en CPA.9.086, CPA.9.083, CHA.9.547.7 y CHA.9.547.13 y el anticuerpo PVRIG se selecciona del grupo que consiste en CHA7.518.1 y CHA.7.538.1.2. En algunas formas de realización, la combinación comprende un anticuerpo anti-TIGIT seleccionado del grupo que consiste en CPA.9.086, CPA.9.083, CHA.9.547.7 y CHA.9.547.13 y el anticuerpo PVRIG es CHA7.518.1. En algunas formas de realización, la combinación comprende un anticuerpo anti-TIGIT seleccionado del grupo que consiste en CPA.9.086, CPA.9.083, CHA.9.547.7 y CHA.9.547.13 y el anticuerpo PVRIG es CHA7.538.1.2. En algunas formas de realización, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 y el anticuerpo PVRIG CHA7.518.1. En algunas formas de realización, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.083 y el anticuerpo PVRIG CHA7.518.1. En algunas formas de realización, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CHA.9.547.7 y el anticuerpo PVRIG CHA7.518. En algunas formas de realización, la

combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CHA.9.547.13 y el anticuerpo PVRIG CHA7.518.1. En algunas formas de realización, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.086 y el anticuerpo PVRIG CHA7.538.1.2. En algunas formas de realización, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CPA.9.083 y el anticuerpo PVRIG CHA7.538.1.2. En algunas formas de realización, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CHA.9.547.7 y el anticuerpo PVRIG CHA7.538.1.2. En algunas formas de realización, la combinación comprende el anticuerpo anti-TIGIT CHA.9.547.13 y el anticuerpo PVRIG CHA7.538.1.2.

[00382] Las Figuras 20-24 proporcionan anticuerpos PVRIG, como se describe en la solicitud de patente estadounidense N.° 15/277.978, presentada el 27 de septiembre de 2016 Los anticuerpos TIGIT de la presente invención se pueden usar conjuntamente con los anticuerpos PVRIG como se describe en estas figuras, así como los descritos a lo largo de esta solicitud.

5. Evaluación del tratamiento

[00383] En general, los anticuerpos de la invención, solos o conjuntamente (PVRIG con PD-1, TIGIT con PD-1 o TIGIT con PVRIG) se administran a pacientes con cáncer, y la eficacia se evalúa de varias maneras como se describe en la presente. Por lo tanto, aunque se pueden realizar ensayos estándar de eficacia, tales como carga de cáncer, tamaño del tumor, evaluación de la presencia o extensión de la metástasis, etc.; también se pueden evaluar los tratamientos de inmuno-oncología sobre la base de las evaluaciones del estado inmune. Esto se puede hacer de varias formas, que incluyen ensayos in vitro e in vivo. Por ejemplo, se puede realizar 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, se puede evaluar 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 linfocitos 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-ɣ o TNF-α por linfocitos T u otras células inmunitarias.

[00384] En algunas formas de realización, la evaluación del tratamiento se realiza al evaluar la proliferación de células inmunitarias, mediante, por ejemplo, el método de dilución CFSE, la tinción intracelular Ki67 de las células efectoras inmunitarias y el método de incorporación de timidina 3H.

[00385] En algunas formas de realización, la evaluación del tratamiento se realiza al evaluar el aumento de la expresión génica o los niveles aumentados de proteína de los 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.

[00386] En algunas formas de realización, 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.

[00387] De manera similar, la evaluación del tratamiento con los anticuerpos de la invención se puede realizar al medir los niveles de IFNγ del paciente antes de la administración y después de la administración para evaluar la eficacia del tratamiento. Esto se puede hacer en horas o días.

[00388] En general, los ensayos de expresión génica se realizan como se sabe en la técnica. Véase, por ejemplo, Goodkind et al., Computers and Chem. Eng. 29 (3): 589 (2005), Han et al., Bioinform. Biol. Insights 11/15/15 9 (supl. 1): 29-46, Campo et al., Nod. Pathol. 2013 enero; 26 supl. 1: S97-S110, cuyas técnicas de medición de expresión génica se incorporan expresamente a la presente por referencia.

[00389] En general, las mediciones de la expresión de proteínas también se realizan de manera similar como se sabe en la técnica; véase, por ejemplo, Wang et al., Recent Advances in Capillary Electrophoresis-Based Proteomic Techniques for Biomarker Discovery, Methods. Mol. Biol. 2013: 984: 1-12; Taylor et al, BioMed Res. Volumen 2014, ID de artículo 361590, 8 páginas, Becerk et al., Mutat. Res. junio de 2011 17: 722 (2): 171-182, cuyas técnicas de medición se incorporan expresamente a la presente por referencia.

[00390] En algunas formas de realización, 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 (incluso 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 captación de nucleótidos. Ejemplos específicos de estos ensayos incluyen, entre otros, tinción con azul de tripano o PI, método de liberación de ^{51}Cr o ^{35}S, actividad de LDH, ensayos de MTT y/o WST, ensayo de calceína-AM, ensayo de luminiscencia y otros.

[00391] En algunas formas de realización, se realiza la evaluación del tratamiento al evaluar la actividad de los linfocitos T medida por la producción de citocinas, ya sea intracelularmente en cultivo sobrenadante mediante citocinas que incluyen, entre otros, IFNγ, TNFα, GM-CSF, IL2, IL6, IL4, IL5, IL10, IL13 mediante técnicas bien conocidas.

[00392] Por consiguiente, la evaluación del tratamiento se puede realizar mediante ensayos que evalúan uno o más de los siguientes: (i) aumentos en la respuesta inmunitaria, (ii) aumentos en la activación de los linfocitos T αβ y/o γδ, (iii) aumentos en la actividad de linfocitos T citotóxicos, (iv) aumentos en la actividad de los linfocitos NK y/o NKT, (v) alivio de la supresión de los linfocitos T αβ y/o γδ, (vi) aumentos en la secreción de citocinas proinflamatorias, (vii) aumentos en la secreción de IL-2; (viii) aumentos en la producción de interferón-ɣ, (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).

[00393] Ensayos para medir la eficacia.

[00394] En algunas formas de realización, 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 inmunoestimulante. Los aumentos adecuados de la actividad se describen a continuación.

[00395] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la respuesta inmunitaria según la medición para un ejemplo mediante fosforilación o desfosforilación de diferentes factores, o mediante la medición de otras modificaciones postraduccionales. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00396] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la activación de los linfocitos T αβ y/o γδ según la medición,

para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00397] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la actividad de los linfocitos T citotóxicos según la medición, para un ejemplo, mediante inactivación directa de células diana como, para un ejemplo, células de cáncer o mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00398] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la actividad de los linfocitos NK y/o NKT según la medición, para un ejemplo, mediante inactivación directa de células diana como, para un ejemplo, células de cáncer o mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD107a, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00399] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la supresión de los linfocitos T αβ y/o γδ según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00400] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la secreción de citocinas proinflamatorias según la medición, para un ejemplo, mediante ELISA o Luminex o métodos multiplex 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.

[00401] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la secreción de IL-2 según la medición, para un ejemplo, mediante ELISA o Luminex o métodos multiplex 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.

[00402] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la producción de interferon-γ según la medición, para un ejemplo, mediante ELISA o Luminex o métodos multiplex 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.

[00403] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la respuesta de Th1 según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de los marcadores de activación. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00404] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la respuesta de Th2 según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de los marcadores de activación. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00405] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones del número y/o actividad de células de al menos uno de los linfocitos T regulatorios (Treg), según la medición, por ejemplo, mediante citometría de flujo o IHC. Una reducción de la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las reducciones apropiadas son las mismas que para los aumentos, que se describen a continuación.

[00406] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de los números de macrófagos M2 según la medición, por ejemplo, mediante citometría de flujo o IHC. Una reducción de la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las reducciones apropiadas son las mismas que para los aumentos, que se describen a continuación.

[00407] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la actividad oncogénica de macrófagos M2 según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión

de los marcadores de activación. Una reducción de la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las reducciones apropiadas son las mismas que para los aumentos, que se describen a continuación.

[00408] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones del aumento de neutrófilos N2 según la medición, por ejemplo, mediante citometría de flujo o IHC. Una reducción de la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las reducciones apropiadas son las mismas que para los aumentos, que se describen a continuación.

[00409] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la actividad oncogénica de neutrófilos N2 según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de los marcadores de activación. Una reducción de la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las reducciones apropiadas son las mismas que para los aumentos, que se describen a continuación.

[00410] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la inhibición de la activación de los linfocitos T según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00411] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la inhibición de la activación de CTL según la medición, para un ejemplo, mediante inactivación directa de células diana como, para un ejemplo, células de cáncer o mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00412] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones del agotamiento de linfocitos T αβ y/o γδ según la medición, para un ejemplo, mediante cambios en la expresión de los marcadores de activación. Una reducción de la respuesta indica actividad inmunoestimulante. Las reducciones apropiadas son las mismas que para los aumentos, que se describen a continuación.

[00413] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los

aumentos o reducciones de la respuesta de los linfocitos T αβ y/o γδ según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00414] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de estimulación de respuestas de memoria específica de antígenos según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación como, para un ejemplo, CD45RA, CCR7, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00415] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la apoptosis o lisis de células cancerosas según la medición, para un ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, para un ejemplo, MTT, liberación de CR, calceína AM o mediante ensayos que se basan en citometría de flujo, tales como, para un ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00416] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la estimulación del efecto citotóxico o citostático en células cancerosas según la medición, para un ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, para un ejemplo, MTT, liberación de CR, calceína AM o mediante ensayos que se basan en citometría de flujo, tales como, para un ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00417] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la inactivación directa de células cancerosas según la medición, para un ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, para un ejemplo, MTT, liberación de CR, calceína AM o mediante ensayos que se basan en citometría de flujo, tales como, para un ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00418] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de actividad de Th17 según la medición, para un ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00419] En una forma de realización, el ensayo de vía de señalización mide los aumentos o reducciones de la inducción de citotoxicidad dependiente de complementos y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, según la medición, para un ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad tales como, para un ejemplo, MTT, liberación de CR, calceína AM o mediante ensayos que se basan en citometría de flujo, tales como, para un ejemplo, dilución de CFSE o tinción con yoduro de propidio, etc. Un aumento de la actividad indica actividad inmunoestimulante. Los aumentos apropiados de la actividad se describen a continuación.

[00420] En una forma de realización, la activación de linfocitos T se mide para un ejemplo mediante la inactivación directa de células diana tales como, para un ejemplo, células cancerosas o mediante la secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de marcadores de activación tales como, para un ejemplo, CD137, CD107a, PD1, etc. Para los linfocitos T, los aumentos de la proliferación, de los marcadores de activación de la superficie celular (por ejemplo, CD25, CD69, CD137, PD1), de la citotoxicidad (capacidad para inactivar células diana) y de la producción de citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL- 6, IFNγ, TNF-a, IL-10, IL-17A) serían indicios de una modulación inmune que sería consistente con una mayor inactivación de células cancerosas.

[00421] En una forma de realización, la activación de linfocitos NK se mide, por ejemplo, mediante la inactivación directa de células diana tales como, para un ejemplo, células cancerosas o mediante la secreción de citocinas o cambios en la expresión de marcadores de activación tales como, para un ejemplo, CD107a, etc. Para los linfocitos 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, IFNγ y TNF) y de la expresión del receptor de la superficie celular (por ejemplo, CD25) serían indicios de una modulación inmune que sería consistente con una mayor inactivación de células cancerosas.

[00422] En una forma de realización, la activación de linfocitos T γδ se mide, por

ejemplo, mediante secreción de citocinas o proliferación o cambios en la expresión de los marcadores de activación.

[00423] En una forma de realización, la activación de linfocitos Th1 se mide, por ejemplo, mediante secreción de citocinas o cambios en la expresión de los marcadores de activación.

[00424] 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 de control, por ejemplo, muestras de prueba que no contienen un anticuerpo anti-PVRIG de la invención. Los aumentos específicos de la actividad se muestran en las Figuras 27 a 34. Por ejemplo, con respecto a los aumentos de la proliferación de linfocitos T, CHA.7.518.1.H4(S241P) muestra un aumento de alrededor del 60 % y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) muestra un aumento del 47 %; se muestran aumentos relevantes en ya sea la proliferación de linfocitos T o IFN-γ de alrededor de 10 a 70 %, en donde el rango de alrededor de 20 a 60 % también encuentra uso.

[00425] De manera similar, los aumentos de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco veces en comparación con las muestras de referencia o control muestran eficacia.

XII. LISTA DE FORMAS DE REALIZACIÓN

1. Una composición que comprende un dominio de fijación a antígeno que se fija al TIGIT humano (SEQ ID NO:97) que comprende:

a) un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:160; y

b) un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:165.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha composición es un anticuerpo que comprende:

a) una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho VH comprende la SEQ ID NO:160; y

b) una cadena liviana que comprende VL-VC, en donde dicho VL comprende la SEQ ID NO:165 y VC es ya sea kappa o lambda.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en donde la secuencia de dicha CH1-bisagra-CH2-CH3 se selecciona de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas, y sus variantes.

4. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3 en donde dicha cadena pesada tiene la SEQ ID NO:164 y dicha cadena liviana tiene la SEQ ID NO:169.

5. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 que

comprende además un segundo anticuerpo que se fija a una proteína receptora del punto de control humano.

6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en donde dicho segundo anticuerpo se fija a la PD-1 humana.

7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 en donde dicho segundo anticuerpo se fija al PVRIG humano (SEQ ID NO:2).

8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 en donde dicho segundo anticuerpo comprende un dominio de fijación a antígeno que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:5 y un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:10.

9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 en donde la cadena pesada de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:9 y la cadena liviana de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:14.

10. Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:160; y

b) un segundo ácido nucleico que codifica un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:165.

11. Una composición de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10 en donde dicho primer ácido nucleico codifica una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho VH comprende la SEQ ID NO:160; y dicho segundo ácido nucleico codifica una cadena liviana que comprende VL-VC, en donde dicho VL comprende la SEQ ID NO:165 y VC es el dominio lambda.

12. Una composición de vector de expresión que comprende un primer vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11 y un segundo vector de expresión que comprende dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, respectivamente.

13. Una composición de vector de expresión que comprende un vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11 y dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, respectivamente.

14. Una célula huésped que comprende dicha composición de vector de expresión de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13.

15. Un método para hacer un anticuerpo anti-TIGIT que comprende:

a) cultivar dicha célula huésped de acuerdo con la reivindicación 14 en

condiciones en donde se expresa dicho anticuerpo; y

b) recuperar dicho anticuerpo.

16. Un método para tratar el cáncer mediante la activación de linfocitos T que comprende administrar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

17. Una composición que comprende un dominio de fijación a antígeno que se fija al TIGIT humano (SEQ ID NO:97) que comprende:

a) un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:150; y

b) un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:155.

18. Una composición de acuerdo con la reivindicación 17 en donde dicha composición es un anticuerpo que comprende:

a) una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho VH comprende la SEQ ID NO:150; y

b) una cadena liviana que comprende VL-VC, en donde dicho VL comprende la SEQ ID NO:159 y VC es ya sea kappa o lambda.

19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 en donde la secuencia de dicha CH1-bisagra-CH2-CH3 se selecciona de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas, y sus variantes.

20. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 17 o 18 en donde dicha cadena pesada tiene la SEQ ID NO:154 y dicha cadena liviana tiene la SEQ ID NO:159.

21. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20 que comprende además un segundo anticuerpo que se fija a una proteína receptora del punto de control humano.

22. Una composición de acuerdo con la reivindicación 21 en donde dicho segundo anticuerpo se fija a la PD-1 humana.

23. Una composición de acuerdo con la reivindicación 21 en donde dicho segundo anticuerpo se fija al PVRIG humano (SEQ ID NO:2).

24. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 en donde dicho segundo anticuerpo comprende un dominio de fijación a antígeno que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:5 y un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:10.

25. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 en donde la cadena pesada de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:9 y la cadena liviana de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:14.

26. Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que

comprende la SEQ ID NO:150; y

b) un segundo ácido nucleico que codifica un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:155.

27. Una composición de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 26, en donde dicho primer ácido nucleico codifica una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho VH comprende la SEQ ID NO:150; y dicho segundo ácido nucleico codifica una cadena liviana que comprende VL-VC, en donde dicho VL comprende la SEQ ID NO:155 y VC es el dominio lambda.

28. Una composición de vector de expresión que comprende un primer vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 26 o 27 y un segundo vector de expresión que comprende dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 26 u 27, respectivamente.

29. Una composición de vector de expresión que comprende un vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 26 u 27 y dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 26 o 27, respectivamente.

30. Una célula huésped que comprende dicha composición de vector de expresión de acuerdo con las reivindicaciones 27 o 28.

31. Un método para hacer un anticuerpo anti-TIGIT que comprende:

a) cultivar dicha célula huésped de acuerdo con la reivindicación 30 en condiciones en donde se expresa dicho anticuerpo; y

b) recuperar dicho anticuerpo.

32. Un método para tratar el cáncer mediante la activación de linfocitos T que comprende administrar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25.

33. Un anticuerpo que comprende:

a) una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:9; y

b) una cadena liviana que tiene la SEQ ID NO:14.

34. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33 que comprende además un segundo anticuerpo que se fija a una proteína receptora del punto de control humano.

35. Una composición de acuerdo con la reivindicación 34 en donde dicho segundo anticuerpo se fija a la PD-1 humana.

36. Una composición de acuerdo con la reivindicación 34 en donde dicho segundo anticuerpo se fija al TIGIT humano (SEQ ID NO:97).

37. Una composición de acuerdo con la reivindicación 36 en donde dicho segundo anticuerpo comprende un dominio de fijación a antígeno que comprende un dominio

pesado variable que comprende la SEQ ID NO:160 y un dominio liviano variable de que comprende la SEQ ID NO:165.

38. Una composición de acuerdo con la reivindicación 36 en donde la cadena pesada de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:164 y la cadena liviana de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:169.

39. Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:9;

b) un segundo ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:14; y

40. Una composición de vector de expresión que comprende un primer vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 39 y un segundo vector de expresión que comprende dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 39.

41. Una composición de vector de expresión que comprende un vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 39 y dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 39.

42. Una célula huésped que comprende dicha composición de vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 41.

43. Un método para hacer un anticuerpo anti-PVRIG que comprende:

a) cultivar dicha célula huésped de acuerdo con la reivindicación 42 en condiciones en donde se expresa dicho anticuerpo; y

b) recuperar dicho anticuerpo.

44. Un método para tratar el cáncer al activar linfocitos T que comprende administrar el anticuerpo de la reivindicación 33.

45. Un anticuerpo que comprende:

a) una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:19; y

b) una cadena liviana que tiene la SEQ ID NO:24.

46. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 45 que comprende además un segundo anticuerpo que se fija a una proteína receptora del punto de control humano.

47. Una composición de acuerdo con la reivindicación 46 en donde dicho segundo anticuerpo se fija a la PD-1 humana.

48. Una composición de acuerdo con la reivindicación 46 en donde dicho segundo anticuerpo se fija al TIGIT humano (SEQ ID NO:97).

49. Una composición de acuerdo con la reivindicación 48 en donde dicho segundo anticuerpo comprende un dominio de fijación a antígeno que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:160 y un dominio liviano variable que

comprende la SEQ ID NO:165.

50. Una composición de acuerdo con la reivindicación 49 en donde la cadena pesada de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:164 y la cadena liviana de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:169.

51. Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:19;

b) un segundo ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:24.

52. Una composición de vector de expresión que comprende un primer vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 51 y un segundo vector de expresión que comprende dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 51.

53. Una composición de vector de expresión que comprende un vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 51 y dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 51.

54. Una célula huésped que comprende dicha composición de vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 53.

55. Un método para hacer un anticuerpo anti-TIGIT que comprende:

a) cultivar dicha célula huésped de la reivindicación 54 en condiciones en donde dicho anticuerpo se expresa; y

b) recuperar dicho anticuerpo.

56. Un método para tratar el cáncer al activar linfocitos T que comprende administrar el anticuerpo de la reivindicación 45.

57. Un método que comprende:

a) proporcionar una población celular de una muestra de tumor de un paciente;

b) teñir dicha población con anticuerpos etiquetados que fijan:

i) proteína TIGIT;

ii) proteína PVR;

iii) proteína PD-1;

iv) proteína PD-L1; y

v) un control de isotipo relevante para los anticuerpos en i)-iv);

c) ejecutar la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS);

d) para cada uno de TIGIT, PVR, PD-1 y PD-L1, determinar el porcentaje de células en dicha población que expresa la proteína con respecto a dicho anticuerpo de control de isotipo;

en donde si el porcentaje de células positivas es > 1 % para los 4 receptores,

e) administrar anticuerpos para TIGIT y PD-1 a dicho paciente.

58. Un método de acuerdo con la reivindicación 57, en donde dicho anticuerpo TIGIT es CPA.9.086.

59. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 57 o 58, en donde dicho anticuerpo PD-1 se selecciona de pembrolizumab y nivolumab.

60. Un método que comprende:

a) proporcionar una población celular de una muestra de tumor de un paciente;

b) teñir dicha población con anticuerpos etiquetados que fijan:

i) proteína PVRIG;

ii) proteína PVRL2;

iii) proteína PD-1;

iv) proteína PD-L1; y

v) un control de isotipo relevante para los anticuerpos en i)-iv);

c) ejecutar la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS);

d) para cada uno de PVRIG, PVRL2, PD-1 y PD-L1, determinar el porcentaje de células en dicha población que expresa la proteína con respecto a dicho anticuerpo de control de isotipo;

en donde si el porcentaje de células positivas es > 1 % para los 4 receptores,

e) administrar anticuerpos para PVRIG y PD-1 a dicho paciente.

61. Un método de acuerdo con la reivindicación 60, en donde dicho anticuerpo PVRIG es CHA.7.518.1.H4(S241P).

62. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 60 o 61, en donde dicho anticuerpo PD-1 se selecciona de pembrolizumab y nivolumab.

63. Un método que comprende:

a) proporcionar una población celular de una muestra de tumor de un paciente;

b) teñir dicha población con anticuerpos etiquetados que fijan:

i) proteína PVRIG;

ii) proteína PVRL2;

iii) proteína TIGIT;

iv) proteína PVR; y

v) un control de isotipo;

c) ejecutar la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS);

d) para cada uno de PVRIG, PVRL2, TIGIT y PVR, determinar el porcentaje de células en dicha población que expresa la proteína con respecto a dicho anticuerpo de control de isotipo;

en donde si el porcentaje de células positivas es > 1 % para los 4 receptores,

e) administrar anticuerpos para PVRIG y TIGIT a dicho paciente.

64. Un método de acuerdo con la reivindicación 63, en donde dicho anticuerpo PVRIG es CHA.7.518.1.H4(S241P).

65. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 63 o 64, en donde dicho anticuerpo TIGIT es CPA9.086.

66. Una composición que comprende un dominio de fijación a antígeno que se fija al TIGIT humano (SEQ ID NO:97) que comprende:

a) un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:560; y

b) un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:565.

67. Una composición de acuerdo con la reivindicación 66, en donde dicha composición es un anticuerpo que comprende:

a) una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho VH comprende la SEQ ID NO:560; y

b) una cadena liviana que comprende VL-VC, en donde dicho VL comprende la SEQ ID NO:565 y VC es ya sea kappa o lambda.

68. Una composición de acuerdo con la reivindicación 67 en donde la secuencia de dicha CH1-bisagra-CH2-CH3 se selecciona de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas, y sus variantes.

69. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 67 o 68, en donde dicha cadena pesada tiene la SEQ ID NO:564 y dicha cadena liviana tiene la SEQ ID NO:569.

70. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 67 a 69, que comprende además un segundo anticuerpo que se fija a una proteína receptora del punto de control humano.

71. Una composición de acuerdo con la reivindicación 70 en donde dicho segundo anticuerpo se fija a la PD-1 humana.

72. Una composición de acuerdo con la reivindicación 70 en donde dicho segundo anticuerpo se fija al PVRIG humano (SEQ ID NO:2).

73. Una composición de acuerdo con la reivindicación 72 en donde dicho segundo anticuerpo comprende un dominio de fijación a antígeno que comprende un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:5 y un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:10.

74. Una composición de acuerdo con la reivindicación 72 en donde la cadena pesada de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:9 y la cadena liviana de dicho segundo anticuerpo tiene la SEQ ID NO:14.

75. Una composición de ácido nucleico que comprende:

a) un primer ácido nucleico que codifica un dominio pesado variable que comprende la SEQ ID NO:560; y

b) un segundo ácido nucleico que codifica un dominio liviano variable que comprende la SEQ ID NO:565.

76. Una composición de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 75 en donde dicho primer ácido nucleico codifica una cadena pesada que comprende VH-CH1-bisagra-CH2-CH3, en donde dicho VH comprende la SEQ ID NO:560; y dicho segundo ácido nucleico codifica una cadena liviana que comprende VL-VC, en donde dicho VL comprende la SEQ ID NO:565 y VC es el dominio lambda.

77. Una composición de vector de expresión que comprende un primer vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 75 o 76 y un segundo vector de expresión que comprende dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 75 o 76, respectivamente.

78. Una composición de vector de expresión que comprende un vector de expresión que comprende dicho primer ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 75 o 76 y dicho segundo ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 75 o 76, respectivamente.

79. Una célula huésped que comprende dicha composición de vector de expresión de acuerdo con las reivindicaciones 77 o 78.

80. Un método para hacer un anticuerpo anti-TIGIT que comprende:

a) cultivar dicha célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79 en condiciones en donde se expresa dicho anticuerpo; y

b) recuperar dicho anticuerpo.

81. Un método para tratar el cáncer mediante la activación de linfocitos T que comprende administrar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 66 a 74.

XIII. EJEMPLOS

[00426] Se hace referencia a PCT/US2016/18809, presentado el 19 de febrero de 2016, titulado “PVRIG ANTIBODIES AND METHODS OF TREATMENT”, incorporado expresamente a la presente por referencia en su totalidad, y en particular para la incorporación de los Ejemplos 1-5, 7-8, 11-13, 16-20 y 26-28, y las figuras adjuntas.

A. EJEMPLO 1: ESTUDIOS DE RESONANCIA DE PLASMON DE SUPERFICIE DE PVR, PVRL2 Y PVRL3 PARA LA FIJACIÓN A PVRIG, DNAM Y TIGIT

<u>Materiales y métodos</u>

[00427] Se realizaron todos los experimentos con un instrumento ProteOn XPR 36 a 22 °C.

[00428] **Etapa 1:** se preparó una superficie de anticuerpo policlonal de anti-fc humano de cabra de alta densidad (Invitrogen H10500) sobre todas las seis líneas de un chip GLC mediante un biosensor ProteOn XPR 36. La etapa de activación para la superficie de anti-fc humano ocurrió en la dirección de flujo horizontal, mientras que la etapa de inmovilización para el pAb de alta densidad ocurrió en la dirección de flujo vertical. La etapa de bloqueo se produjo tanto en la posición vertical como en la horizontal, de modo que los "puntos intermedios" horizontales podrían utilizarse como superficies de referencia. Se inmovilizó un promedio de ~4400 RU de anti-pAb humano de cabra en cada carril.

[00429] **Etapa 2**: para cada ciclo, tres lotes diferentes de proteína de fusión PVRIG humana (fc humano, lotes GenScript 451, 448, 125), proteína de fusión DNAM-1 humana (fc humano, R&D Systems), proteína de fusión TIGIT humana (fc humano, R&D Systems), e IgG humana de control (Synagis), fueron capturados en una línea vertical diferente por dos minutos a una concentración de 2 µg/ml. PVR, dos lotes de PVRL2 y PVRL3 se inyectaron cada uno en la dirección de flujo horizontal a razón de seis concentraciones diferentes sobre todos los seis ligandos capturados en diferentes ciclos de captura de ligandos. Las inyecciones fueron de dos minutos, y fueron seguidas de 10 minutos de disociación a una velocidad de flujo de 50 µl/min. El rango de concentración de PVR fue de 1,4nM-332nM en una serie de dilución de 3 veces; ambos lotes de PVRL2 se inyectaron a razón de un rango de concentración de 1,3nM-322nM en una serie de dilución de 3 veces, y PVRL3 se inyectó a razón de un rango de concentración de 1,4nM-334nM en una serie de dilución de 3 veces. Todos los reactivos de proteínas se prepararon en un amortiguador de corrida que fue amortiguador de PBS desgasificado con Tween 20 al 0,05 % y con BSA agregado al 0,01 %. Las superficies de captura de anti-fc humano se regeneraron con dos pulsos de 30 segundos de 146 mM de ácido fosfórico después de cada ciclo.

[00430] **Etapa 3**: se procesaron y verificaron dos veces los datos de sensograma de la fijación de los analitos a cada ligando capturado con ProteOn Manager versión 3.1.0.6 mediante el uso de referencia de puntos intermedios y una inyección anterior al blanco idéntica a las inyecciones de analito.

Resultados

[00431] **a) PVR**: se fija débilmente a los DNAM-1 y TIGIT capturados y no muestra fijación a los tres lotes de PVRIG y la IgG de control. No se generó suficiente información para estimar la KD de las interacciones de PVR con DNAM-1 y TIGIT (datos no mostrados).

[00432] **b) PVRL2**: ambos lotes de PVRL2 mostraron una fijación a los tres lotes de PVRIG y a DNAM-1, pero una fijación mínima o nula a TIGIT y ninguna fijación a la IgG de control. Los sensogramas mostraron una cinética compleja, por lo que no se pudieron estimar las constantes de fijación (datos no mostrados).

[00433] **c) PVRL3**: mostró una fijación mínima a TIGIT y no se fijó a las otras proteínas (datos no mostrados)

B. EJEMPLO 2: EFECTO DE LA INHIBICIÓN (KD) DE PVRIG Y DEL ANTICUERPO ANTI-PVRIG SOBRE LA FUNCIÓN DE TIL ESPECÍFICOS DEL MELANOMA HUMANO

[00434] El objetivo de estos ensayos es evaluar la capacidad funcional de PVRIG en los TIL derivados de humanos, según las mediciones de los marcadores de activación y la secreción de citocinas, tras el cocultivo con células diana de melanoma.

1. Ejemplo 2 (1):

[00435] Se evaluó el efecto del anticuerpo anti-PVRIG (CPA.7.021), que se ha demostrado que bloquea la interacción de PVRIG y PVRL2, solo o en combinación con otros anticuerpos (por ejemplo, anti-TIGIT, Anti-DNAM1). PD1 se usó como un punto de control inmunitario de referencia para los estudios de inhibición (siARN).

[00436] Materiales y métodos: TIL: se utilizaron linfocitos que se infiltran en tumores (TIL) de tres pacientes con melanoma (1) específicos de TIL-412-HLA-A2-Mart1, (2) específicos de TIL-F4-HLA-A2-gp100 y (3) específicos de TIL-209-HLA-A2-gp100. Los TIL se descongelaron en medio completo IMDM (BI, 01-058-1A) complementado con 10 % de suero humano (Sigma, H3667) + 1 % de Glutamax (Life technologies, 35050-038) + 1 % de piruvato de Na (Biological Industries, 03-042-1B) + 1 % de aminoácidos no esenciales (Biological Industries, 01-340-1B) + 1 % de Pen-Strep (Biological Industries, 03-031-1B) + 300 U/ml de rhIL2 (Biolegend, 509129).

[00437] Líneas de celulares tumorales: las células de melanoma humano Mel-624 expresan los antígenos MART-1 y gp-100 en el contexto del haplotipo de MHC-I HLA-A2. Las células se cultivaron en un medio DMEM completo complementado con 10 %, 25 mM de amortiguador HEPES, 1 %, y 1 % de Pen-Strep.

[00438] Inhibición en TIL: la inhibición (KD) de PVRIG humano y PD1 humano en TIL se realizó mediante 100 pmol de ON-TARGETplus siARN de PVRIG humano - SMARTpool de Dharmacon (L-032703-02) o siARN de PD1 humana - SMARTpool (L-004435) o siARN no dirigido (D-001810-01-05). Los siARN se electroporaron a TIL (AMAXA, programa X-005). La electroporación se realizó en TIL en reposo cultivados en IMDM completo complementado con IL-2 24 h después del descongelamiento. Después de la electroporación, los TIL se sembraron en una placa TC de 96 cavidades para recuperarse por 24 horas. Después de 24 h, se recolectaron las células y se tiñeron con un colorante de viabilidad (BD Horizon; N.° de cat. 562247, BD biosciences), se lavaron con PBS y se tiñeron con anti-PVRIG humana - CPA.7.021 (CPA.7.021 IgG2 A647, 7,5 ug/ml) o con anti-PD-1 humano (Biolegend, N.° 329910 AF647, 5 ug/ml) a temperatura ambiente por 30 minutos. Los controles de isotipo utilizados son sinagis (IgG2 A647, 7,5 ug/ml) e IgG1 de ratón (Biolegend N.° 400130 A647, 5 ug/ml) respectivamente. Todas las muestras se ejecutaron en un analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron mediante el software FlowJo (v10.0.8).

[00439] Cocultivo de TIL con células de melanoma 624: los TIL electroporados con siARN se recolectaron y sembraron en una placa TC de 96 5x104/cavidad. Las células de Mel-624 también se recolectaron y se sembraron en relaciones E:D de 1:1/1:3 en cocultivo. La placa se incubó durante la noche (18 h) a 37 °C, 5 % de CO2.

[00440] Para evaluar el efecto del anticuerpo anti-PVRIG (CPA.7.021), anti-TIGIT (clon 10A7; de la solicitud de patente estadounidense de Genentech N.° US 2009/0258013) y anti-DNAM1 (clon DX11, descrito por primera vez en Shibuya et al Immunity volumen 4, número 6, 1 de junio de 1996, páginas 573–581; BD Biosciences; clon DX11 del anti- DNAM-1 humano de ratón, N.° de cat. 559787) en la actividad de TIL específicas del melanoma, los TIL (1x105 células/cavidad) se incubaron previamente con anticuerpos probados o con controles de isotipo relevantes en monotratamiento (10 µg/ml) o en tratamiento de combinación (10 µg/ml finales para cada uno) antes de la adición de 624 células diana de melanoma a una relación de efector:diana de 1:1. La placa se incubó durante la noche (18 h) a 37 °C, 5 % de CO2.

[00441] Evaluación de la activación de los TIL: 16 horas después del cocultivo, las células se tiñeron con colorante de viabilidad (BD Horizon; N.° de cat. 562247, BD biosciences), se lavaron con PBS y se expusieron a una solución de bloqueo de Fc (N.° de cat. 309804, Biolegend), seguido de una tinción de superficie con anti-CD8a (N.° de cat. 301048, Biolegend) y anti-CD137 (N.° de cat. 309804, Biolegend) a 4 °C por 30

minutos. Todas las muestras se ejecutaron en un analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron mediante el software FlowJo (v10.0.8). Los sobrenadantes de los cultivos se recolectaron y analizaron para determinar la secreción de citocinas mediante un kit de CBA (N.° de cat. 560484, BD).

Resultados

[00442] Inhibición de PVRIG en los TIL: El TIL MART-1 y el TIL F4 se cultivaron por 24 horas con IL-2. 100 pmol de ON-TARGETplus siARN de PVRIG humano - SMART pool (L-032703-02) o siARN de PD1 humana - SMARTpool (L-004435) o siARN no dirigido (D-001810-01-05) se electroporaron a TIL (AMAXA, programa X-005). La detección de PVRIG o PD-1 se realizó 24 horas después de la electroporación (y antes del cocultivo). Las células se tiñeron para determinar el colorante de viabilidad seguido de una incubación de RT de 30 min con anti PVRIG o anti PD-1. El porcentaje de población de KD se indica en la Figura 82 de USSN 15/048.967, incorporado a la presente por referencia.

[00443] Ensayo funcional que utiliza TIL atenuados: TIL humanos, cultivados por 24 horas con IL2, se electroporaron con siARN que codifica para PVRIG o PD-1 humanos o secuencia mezclada como control. Los TIL se pusieron a prueba para determinar la expresión de PVRIG y PD-1 24 horas después de la electroporación. Se observó una inhibición del ~80 % de PVRIG y una inhibición del ~50 % de PD-1 en comparación con los TIL electroporados mezclados, como se demuestra en la Figura 82 de USSN 15/048.967, incorporado a la presente por referencia.

[00444] Los TIL atenuados se cultivaron con células de Mel-624 en E:D de 1:1 o 1:3 por 18 horas y se tiñeron para la expresión de CD137. Los niveles elevados del marcador de activación CD137 se mostraron en TIL MART-1 electroporado con siARN de PVRIG, de manera similar a los TIL que se electroporaron con siARN de PD-1, en comparación con el siARN mezclado (como se muestra en la Figura 83A de USSN 15/048.967, incorporado a la presente por referencia). El sobrenadante de cocultivo se recolectó y se analizó para determinar la presencia de citocinas secretadas. Los TIL que se electroporaron con siARN de PVRIG muestran un aumento significativo de los niveles de IFNγ y TNF en comparación con el siARN de SCR de control. Se mostró un efecto similar en los TIL que se electroporaron con siARN de PD-1 (como se demuestra en la Figura 83B-C de USSN 15/048.967, incorporada a la presente por referencia).

[00445] La misma tendencia de aumento de los niveles de activación se observó

en TIL F4. El cocultivo de TIL F4 electroporado con siARN de PVRIG con Mel-624 en E:D de 1:3 condujo a un aumento de los niveles de expresión superficial de CD137 así como a una mayor secreción de IFNγ en el sobrenadante de cocultivo como se muestra en las Figuras 84A y 84B de USSN 15/048.967, incorporado a la presente por referencia. Se observaron tendencias similares en los TIL que se electroporaron con siARN de PD-1.

[00446] Ensayo funcional mediante anticuerpos de bloqueo:

[00447] La monoterapia in vitro y el tratamiento combinado de anti-PVRIG y anti-TIGIT: 209 TIL se cultivaron con células Mel-624 en E:D de 1:1 por 18 horas. El sobrenadante de cocultivo se recolectó y se analizó para determinar la presencia de citocinas secretadas. El tratamiento con anti TIGIT no afectó los niveles de secreción de IFNγ o TNF. Sin embargo, se observó un aumento en los niveles de IFNγ y TNF cuando se agregaron anti TIGIT y anti PVRIG al cocultivo en combinación (Figuras 8A-B).

[00448] La monoterapia in vitro y el tratamiento combinado de anti-PVRIG y anti-TIGIT: 209 TIL se cultivaron con células Mel-624 en E:D de 1:1 por 18 horas. Los TIL se tiñeron para la expresión superficial del marcador de activación CD137 y mostraron un nivel de expresión reducido en el tratamiento con anti DNAM-1. El sobrenadante de cocultivo se recolectó y se analizó para determinar la presencia de citocinas secretadas. El tratamiento de anti DNAM-1 medió una tendencia a aumentar las citocinas IFNγ y TNF secretadas. El tratamiento con anti DNAM-1 y anti PVRIG en combinación invirtió parcialmente el efecto sobre la expresión de CD137 (Figura 9C) y mejoró el efecto sobre la secreción de citocinas IFNγ y TNF (Figuras 9A-B). TIL MART-1 se cultivaron con células Mel-624 en E:D de 1:1 por 18 horas. El sobrenadante de cocultivo se recolectó y se analizó para determinar la presencia de citocinas secretadas. El tratamiento con anti DNAM-1 redujo la expresión superficial de CD137 en los TIL y también las citocinas IFNγ y TNF secretadas. El tratamiento con anti DNAM-1 y anti PVRIG en combinación revirtió parcialmente estos efectos (Figuras 9D-F).

[00449] Síntesis y conclusiones: la KD de PD1 mejoró la actividad de TIL, según lo medido por IFNγ y la secreción en los TIL F4 y MART-1. Se observó un aumento (~20 %) de la secreción de IFNγ y TNF tras la KD de PVRIG en los TIL MART-1 en comparación con el siARN de control. La misma tendencia se observó en la expresión de CD137 tras el cocultivo con 624 células de melanoma en los TIL F4.

[00450] El tratamiento de anti-TIGIT no afectó los niveles de secreción de IFNγ o

TNF de TIL cocultivados con 624 células de melanoma, sin embargo, se observó un aumento en los niveles de IFNγ y TNF cuando se agregaron anti TIGIT y anti PVRIG (CPA.7.021) al cocultivo en combinación.

[00451] El tratamiento anti DNAM-1 redujo la activación de TIL-MART-1 manifestada por la reducción de CD137 y secreción de citocinas y anti-PVRIG (CPA.7.021) podría revertir parcialmente este efecto en el tratamiento combinado con anticuerpo DNAM-1. En el TIL 209, los niveles de secreción de IFNγ y TNF estaban ligeramente elevados (~10 %) con anti DNAM-1, y se observó un aumento de los niveles de IFNγ y TNF (~40 % y 30 %, respectivamente) cuando se agregaron anti DNAM1 y anti PVRIG (CPA.7.021) al cocultivo en combinación. En conjunto, nuestros resultados mostraron que PVRIG es un nuevo receptor coinhibidor para PVRL2.

2. Ejemplo 2 (2):

[00452] Se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG adicionales (CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538), que se ha demostrado que bloquea la interacción de PVRIG y PVRL2, solo o en combinación con otros anticuerpos (por ejemplo, anti-TIGIT, PD1) sobre la actividad de TIL-209, TIL-412 y TIL-463-F4 tras el cocultivo con 624 líneas celulares de melanoma.

[00453] Los anticuerpos funcionales utilizados en este ensayo fueron los anticuerpos hibridoma anti hPVRIG (estructura principal de mIgG1) - CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538 (N.° de lote de M1 30816); anti hTIGIT (estructura principal de mIgG1) - clon 10A7 (Genescript), clon anti-TIGIT MBSA43 (e-biosciences) y mIgG1 (N.° de cat. 400166, clon MOPC-21, Biolegend)

[00454] Cocultivo de TIL y 624 células de melanoma: los TIL se descongelaron y se cultivaron como se describe en 2.1 24 horas antes del cocultivo. Los anticuerpos probados se agregaron en monotratamiento (10 µg/ml) o en combinación con anti-TIGIT (20 µg/ml) a los TIL sembrados y se incubaron (en un total de 100 µl) por 1 hora a 37 °C, 5 % de CO2. Las células Mel-624 se recolectaron y sembraron en una relación efector:diana de 1:3 en el cocultivo con TIL. La placa se incubó durante la noche (18 horas) a 37 °C, 5 % de CO2.

[00455] Evaluación de la capacidad funcional de los TIL: la actividad de los linfocitos T se evaluó en función de la detección de IFNγ en sobrenadantes de cocultivo. Los sobrenadantes de cultivo se recolectaron y analizaron para detectar citocinas con el kit de CBA (N.° de cat. 560484, BD) o con el kit de IFNγ/TNFα humano MAGPIX. Se

calcularon dos pruebas T no emparejadas de dos colas. P<0,05 se consideró de importancia estadística.

Resultados

[00456] Ensayo funcional mediante TIL y células de melanoma en presencia de anticuerpos hibridoma anti PVRIG: Los TIL humanos, cultivados durante 24 horas con IL2 se cocultivaron con células Mel-624 en E:D de 1:3 por 18 horas y se analizaron para determinar la secreción de citocinas. La Figura 31 describió un experimento representativo de 5-6 realizados. Los TIL se cocultivaron con células de melanoma 624 en presencia de anticuerpos anti-TIGIT o anti-PVRIG (azul) o en combinación de anti-TIGIT y anti PVRIG (verde) y se analizaron para determinar la secreción de IFNγ/TNF. En este experimento, los 4 monotratamientos con anticuerpos anti-PVRIG aumentaron (20-30 %) la secreción de IFNγ en 2 de los 3 TIL probados (TIL-209 y TIL463-F4) mientras que, en combinación con anti-TIGIT, todos los anticuerpos anti-PVRIG CHA.7.518.1.H4(S241P), CHA.7.530, CHA.7.538, aumentaron la secreción de IFNγ en comparación con el tratamiento con anti-TIGIT por sí solo.

[00457] El efecto del anticuerpo CHA.7.518.1.H4(S241P) resultó ser de importancia significativa en todos los experimentos en TIL 463-F4-gp100 a lo largo de 5 experimentos como monotratamiento y en combinación con anti-TIGIT (Figuras 9E, G). El tratamiento combinado del efecto del anticuerpo anti-PVRIG CHA.7.518.1.H4(S241P) también fue de importancia significativa en TIL 209 (Figura 9C). El efecto del tratamiento combinado del anticuerpo anti PVRIG CHA.7.538 resultó ser de importancia significativa en TIL 463-F4-gp100 (Figura 9F).

[00458] Síntesis y conclusiones: en los sistemas experimentales descritos en la presente, observamos un efecto del anti PVRIG en los TIL en respuesta a las células diana de melanoma como se ve mediante los cambios de la secreción de IFNγ. Los anticuerpos de hibridoma Anti-PVRIG puestos a prueba mediaron un aumento de la secreción de IFNγ en comparación con el control de isotipo relevante. El anticuerpo CHA.7.518.1.H4(S241P) parece tener una ventaja en la mediación de un aumento de la secreción de IFNγ como un monotratamiento y en comparación con otros anticuerpos aPVRIG puestos a prueba; sin embargo, la magnitud de estos efectos varía entre los diferentes TIL. Este efecto se potencia en combinación con el tratamiento anti-TIGIT.

3. Ejemplo 2(3):

[00459] El objetivo es evaluar la actividad funcional de los anticuerpos anti-PVRIG

humana (CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.544; o CHA.7.538) sobre la actividad de los TIL humanos tras el cocultivo con células CHO-S pulsadas con péptidos que expresan de forma estable HLA-A2, microglobulina b2 (B2M) y PVRL2.

[00460] Se usaron TIL de metástasis extirpadas de tres pacientes con melanoma: específico de TIL-412- HLA-A2-Mart1(26-35), específico de TIL-463-F4- HLA-A2-gp100(209-217), específico de TIL-463-F5 - HLA-A2-gp100 (209-217), y específico de TIL-209- HLA-A2-gp100(209-217).

[00461] Los TIL se descongelaron en medio completo IMDM complementado con 10 % de suero humano + 1 % de Glutamax + 1 % de piruvato de Na + 1 % de aminoácidos no esenciales + 1 % de Pen-Strep + 300 U/ml de rhIL2 (Biolegend, 589106).

[00462] Las células CHO-S (células diana) se transdujeron de forma estable con un HLA-A2/B2M que expresa lentivirus (N.° de cat. de vector de lentivirus CD515B-1-SBI, system biosciences) y se cultivaron en 600 µg/ml de selección de higromicina B en medio CD CHO (N.° de cat. 10743-011) complementado con 8mM de GlutaMax 1 % y 1 % de Pen/Strep. Las células que expresan HLA-A2/B2M se clonaron luego al limitar la dilución. El clon 3E8 con alta expresión de HLA-A2 y B2M se transdujo luego con una PVRL2 humana que expresa lentivirus (N.° de cat. de vector de lentivirus CD510B-1-SBI, system biosciences), y se cultivó con 6 µg/ml de selección de puromicina.

[00463] En el sistema experimental descrito en la presente (representado en la Figura 35), los TIL reactivos con gp100 o MART-1 que expresan endógenamente TIGIT, DNAM-1 y PVRIG (Figura 37) se cocultivaron con células CHO-S HLA-A2/B2M/PVRL2 pulsadas con péptido.

[00464] Los anticuerpos funcionales utilizados en este ensayo fueron anti PVRIG humano; anticuerpo 461 (Aldeveron): que se refiere al 544 en este ejemplo, anticuerpo de quimera anti PVRIG humana (estructura principal de hIgG4) - CHA.7.538; CHA.7.518 (que se refiere a c538 y c518 en este ejemplo, lo que significa que las regiones pesada y liviana variables de 7.538 y 7.518 se fusionaron con las regiones constantes de IgG4 humana anti TIGIT humano (estructura principal de mIgG1), clon MBSA43 (e-biosciences), mIgG1 (biolegend) y hIgG4 (biolegend).

[00465] Los TIL se descongelaron y se cultivaron como se describe en la presente por 24 horas antes del cocultivo con células diana. Los anticuerpos probados se agregaron en monotratamiento (10 µg/ml) o en combinación con anti-TIGIT (total de 20

µg/ml) a los TIL sembrados y se incubaron (en un total de 100 µl) por 30 minutos a 37 °C, 5 % de CO2. Se recolectaron células CHO-S y se pulsaron con 0,1 o 0,5 µg/ml de gp-100 (gp100209-217) o con 20 µg/ml de péptidos MART-126-35, por 1 hora a 37 °C en medios séricos reducidos Opti-MEM™. Después de los lavados de árboles con medios séricos reducidos Opti-MEM™, las células diana pulsadas con péptidos se cocultivaron durante la noche (18 horas) con los TIL a una relación de efector:diana de 1:3 (33k:100k).

[00466] Evaluación de la capacidad funcional de los TIL: el efecto de los anticuerpos anti PVRIG (10 ug/ml) como monotratamiento o como tratamiento combinado con anti TIGIT en la actividad de los TIL se evaluó mediante la medición de la secreción de citocinas de sobrenadantes de cocultivo nocturno al usar un kit de matriz de microesferas combinadas (CBA) (N.° de cat. 560484, BD). Todas las muestras se adquirieron en el analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron con el software FlowJo (v10.0.8).

[00467] Respuesta a la dosis de los anticuerpos anti PVRIG: el efecto de los anticuerpos anti PVRIG c518, c538 (o control de isotipo hIgG4) se evaluó en el ensayo descrito en una concentración de anticuerpos de 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 ug/ml. Se calcularon dos pruebas T no emparejadas de dos colas. $P<0,05$ se consideró de importancia estadística.

Resultados

[00468] Efecto de los anticuerpos anti PVRIG sobre la actividad de los TIL tras el cocultivo con células CHO-S HLA-A2/B2M que expresan PVRL2: el efecto de tres anticuerpos anti PVRIG (544, c538 y c518) sobre la actividad de cuatro TIL diferentes (412, 463, 462 y 209) de dos experimentos diferentes se resume en la Figura 37. El anticuerpo sirvió como control de anticuerpo no bloqueador. Se presentan los resultados detallados de los experimentos en la Figura 39. El tratamiento con los anticuerpos 544, c538 y c518 aumentó los niveles de secreción de IFN de los TIL (en promedio un 6 %, 28 % y 23 %, respectivamente) en comparación con el tratamiento con anticuerpo de isotipo. Se detectó un aumento de la secreción de IFN en los TIL tratados con c538 o c518 en comparación con 544, el control no bloqueador. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con los anticuerpos c538 a c518. El tratamiento con anti TIGIT aumentó la secreción de IFN a partir de los TIL (en promedio un 49 %) en comparación con el isotipo. El tratamiento combinado de c518 y c538 con anti TIGIT indujo un efecto aditivo en la secreción de IFN a partir de los TIL, pero el efecto

combinado no fue de importancia estadística en comparación con el tratamiento con monotratamiento de TIGIT.

[00469] Efecto de la respuesta a la dosis de anticuerpos anti-PVRIG sobre la capacidad funcional de los TIL: se evaluó el efecto de agregar anticuerpos anti PVRIG (c538 y c518) en la respuesta a la dosis sobre la actividad de los TIL F4 y 209 (figura 80). La EC50 de los anticuerpos c518 y c538 está en el nM de un solo dígito en comparación con el control de isotipo medido por el efecto de la secreción de TNFα a partir de los TIL.

[00470] Síntesis y conclusiones: en el sistema experimental descrito en la presente, observamos el efecto de los anticuerpos anti PVRIG sobre la actividad de los TIL en respuesta al cocultivo con células diana CHO-S HLA-A2/B2M pulsadas con péptido que sobreexpresan PVRL2. Los anticuerpos anti PVRIG que fueron puestos a prueba mediaron un aumento de la secreción de IFN y TNF a partir de los TIL en comparación con el control de isotipo relevante. Los anticuerpos c518 y c538 tienen una ventaja estadísticamente importante (p-0,0063 y p-0,0034 respectivamente) sobre la actividad de los TIL, como se manifiesta por la secreción de IFN, en comparación con 544, que es un anticuerpo no bloqueador de PVRIG (en función de un experimento de competencia realizado en células que expresan PVRIG). Tanto los anticuerpos c518 como los c538 tuvieron un efecto aditivo con el anticuerpo anti TIGIT (no estadísticamente importante).

4. Ejemplo 2(4)

[00471] El objetivo de este ejemplo fue evaluar la capacidad funcional de PVRIG en TIL derivadas de humanos, medida por la secreción de citocinas tras el cocultivo con células diana de melanoma. Se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG (CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538), que se ha demostrado que bloquea la interacción de PVRIG y PVRL2, solo o en combinación con otros anticuerpos (por ejemplo, anti-TIGIT, PD1).

[00472] Los linfocitos T CD3+ purificados se obtuvieron mediante el kit de cóctel de enriquecimiento de linfocitos T Rossetesep (Stem cell technologies) en muestras de sangre de capa leucocitaria. Las células se descongelaron y se etiquetaron con CFSE (sondas Moleculare) para poder rastrear la proliferación en el cocultivo.

[00473] Células CHO-S-OKT3: las células CHO-S se transdujeron con CD5L-OKT3-scFv-CD14 en CD710B-1 (SBI, n.° de cat. CS965A-1, n.° de lote 151014-005,

1,40x108 ifus/ml). Las células se cultivaron en presencia de CD CHO (Gibco, life technologies N.° de cat. 10743-011) con la adición de 8 mM de GlutaMax y 6 µg/ml de puromicina. Los niveles de OKT3 superficiales se evaluaron con citometría de flujo mediante F(ab)'2 de anti-IgG de ratón en cabra-PE a razón de una dilución de 1:200 (Jackson Immunoresearch, N.° de cat. 115-116-146). Las células CHO-S-OKT3 fueron luego transfectadas transitoriamente con PVRL2 humana (isoforma delta) o vector vacío mediante el sistema de electroporación Amaxa (Lonza, Walkersville, MD, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 5 µg de plásmido pcDNA3.1 (vector vacío o hPVRL2) por 2X106 células en la solución de electroporación Ingenio™ (Mirus, N.° de cat. MC-MIR-50115) y el programa de pulso U-024. La expresión de PVRL2 en células CHOS-S-OKT3 transfectadas se evaluó con citometría de flujo mediante anticuerpos anti-PVRL2 (N.° de cat. 337412, Biolegend).

[00474] Los anticuerpos funcionales utilizados en este ensayo fueron los anticuerpos hibridoma anti hPVRIG (estructura principal de mIgG1) - CHA.7.518.1.H4(S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538, clon anti-TIGIT MBSA43 (e-biosciences) y mIgG1 (N.° de cat. 400166, clon MOPC-21, Biolegend)

[00475] Cocultivo de linfocitos T CD3 y células CHO-OKT3: los linfocitos T CD3+ se descongelaron e inmediatamente se etiquetaron con CFSE. En paralelo, se recolectaron células CHO-S-OKT3-PVRL2 y se trataron con mitomicina-C por 1 hora a 37 °C, se lavaron y se agregaron al cocultivo con linfocitos T E:D de 1:5 (linfocitos T de 1x105 y CHO-OKT3-PVRL2 de 2x104 o de control). Los anticuerpos se agregaron en monotratamiento (10 µg/ml) o en combinación con anti-TIGIT (10 µg/ml) y las placas de cocultivo se incubaron a 37 °C, 5 % de CO2 por 5 días. Después de 5 días, se recolectaron las células y se analizó la proliferación de linfocitos T mediante regulación por FACS en subpoblaciones de CD4 y CD8.

[00476] Efecto de los anticuerpos anti-PVRIG en el ensayo de cocultivo CHOS-OKT3: los linfocitos T etiquetados con CFSE se estimularon con células estimuladoras (células CHO que expresan fragmentos de mAb anti-CD3 fijados a la membrana). Células estimuladoras de CHOS que expresan PVRL2 humana y células estimuladoras de control (vector vacío) tratadas con mitomicina C (50 µg/ml por 1 hora) antes del cocultivo con linfocitos T humanos etiquetados con CFSE en una relación de 1:5. Después de 5 días a 37 °C y 5,0 % de CO2, se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG (10 ug/ml) sobre la proliferación de linfocitos T (dilución de CFSE) y la secreción de citocinas (ELISA o kits de CBA de TH1/2/17) en sobrenadantes de cultivo. Todas las

muestras se adquirieron en el analizador MACSQuant (Miltenyi) y los datos se analizaron con el software FlowJo (v10.0.8). Los sobrenadantes de los cultivos se recolectaron y analizaron para determinar la secreción de citocinas mediante un kit de CBA (N.° de cat. 560484, BD).

Resultados

[00477] Efecto de los anticuerpos anti-PVRIG en la sobreexpresión de PVRL2 en el ensayo CHOS-OKT3: células CHOS-OKT3 que sobreexpresan PVRL2 o de control (vector vacío) se cocultivaron con linfocitos CD3+ y se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG como monotratamiento o como tratamiento en combinación con anti-TIGIT en la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas (figura 40). Después de 5 días, las células se recolectaron y analizaron para determinar la dilución de CFSE. En paralelo, se recolectó el sobrenadante del cocultivo y se puso a prueba para determinar la secreción de citocinas. La Figura 41 muestra el efecto de los anticuerpos anti-PVRIG en donantes respondedores frente a no respondedores. Se evaluó el efecto de diversos anticuerpos anti-PVRIG sobre la proliferación de linfocitos T como monotratamiento en combinación con anti-TIGIT. Mientras que algunos anticuerpos anti-PVRIG aumentan la proliferación de linfocitos T, no se observó ningún efecto aditivo con el anticuerpo anti-TIGIT en este sistema (Figura 42). Estos efectos no se observaron cuando los anticuerpos se pusieron a prueba en el cocultivo de linfocitos CD3+ con células CHO-S de control (transfectadas con vector vacío) (datos no mostrados).

[00478] Se puso a prueba un total de 10 donantes y 5 de cada 10 donantes respondieron a los anticuerpos anti-PVRIG. El tratamiento con anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) dio consistentemente como resultado un aumento de la secreción de IFNγ, en un rango de entre el 20-50 % en 5 donantes que respondieron y que fueron evaluados, mientras que el tratamiento con otros anticuerpos no mostró una tendencia clara (Figura 43). Se observaron efectos similares en la proliferación de linfocitos CD8+. Se sintetizan los efectos del tratamiento con anticuerpos en la Figura 44.

C. EJEMPLO 3: EFECTO DEL ANTICUERPO ANTI-PVRIG SOBRE LA FUNCIÓN DE TIL ESPECÍFICOS DEL MELANOMA HUMANO EN COMBINACIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-TIGIT Y ANTI-PD1

1. Ejemplo 3(1):

Materiales y métodos

[00479] TIL: se utilizaron linfocitos que se infiltran en tumores (TIL) de tres pacientes con melanoma (1) específicos de TIL-412-HLA-A2-Mart1, (2) específicos de TIL-F4-HLA-A2-gp100 y (3) específicos de TIL-209-HLA-A2-gp100.

[00480] Los TIL se descongelaron en medio completo IMDM (BI, 01-058-1A) complementado con 10 % de suero humano (Sigma, H3667) + 1 % de Glutamax (Life technologies, 35050-038) + 1 % de piruvato de Na (Biological Industries, 03-042-1B) + 1 % de aminoácidos no esenciales (Biological Industries, 01-340-1B) + 1 % de Pen-Strep (Biological Industries, 03-031-1B) + 300 U/ml de rhIL2 (Biolegend, 509129).

[00481] Líneas de celulares tumorales: las células de melanoma humano Mel-624 expresan los antígenos MART-1 y gp-100 en el contexto del haplotipo de MHC-I HLA-A2. Las células se cultivaron en un medio DMEM completo (Biological Industries, 01-055-1A) complementado con 10 % de FBS (BI, 04-127-1A), 25 mM de amortiguador HEPES (BI, 03-025-1B), 1 % de Glutamax (Life technologies, 35050-038), y 1 % de Pen-Strep (Biological Industries, 03-031-1B).

[00482] Cocultivo de TIL con 624 células de melanoma en presencia de anticuerpos de bloqueo de PD1, anti-PVRIG, anti-TIGIT: para evaluar el efecto del anticuerpo anti-PVRIG (CPA.7.021), anti-TIGIT (clon 10A7) y anti PD1 (mAb 1B8, Merck) en la actividad de TIL específica del melanoma, los TIL (3x104 células/cavidad) se preincubaron con anticuerpos probados o controles de isotipo relevantes en monotratamiento (10 µg/ml) o en tratamiento de combinación (10 µg/ml finales para cada uno) antes de la adición de 624 células diana de melanoma a una relación de efector:diana de 1:3. La placa se incubó durante la noche (18 horas) a 37 °C, 5 % de CO2.

[00483] Evaluación de la activación de TIL: se recolectaron los sobrenadantes de cultivo y se analizaron para determinar la secreción de citocinas mediante el kit de CBA (N.° de cat. 560484, BD).

[00484] Monoterapia in vitro anti-PVRIG y terapia combinada con anticuerpos de bloqueo de PD1 y anti-TIGIT: se cultivaron TIL F4 (específicos de gp100) con células Mel-624 en E:D de 1:3 por 18 h. El sobrenadante de cocultivo se recolectó y se analizó para determinar la presencia de citocinas secretadas. El tratamiento de anti-TIGIT o anti-PD1 no afectó los niveles de secreción de IFNγ o TNF. Sin embargo, se observó un aumento en los niveles de IFNγ y TNF cuando se agregaron anti TIGIT o anti-PD1 en combinación con anti PVRIG al cocultivo en combinación (Figuras 10A-B).

[00485] El tratamiento con anti-PVRIG, anti-TIGIT y PD1 por sí solo no afectó los niveles de secreción de IFNγ o TNF de un cocultivo de TIL con 624 células de melanoma; sin embargo, se observó un aumento de los niveles de IFNγ y TNF cuando se agregaron anticuerpos anti-TIGIT o anti-PD1 en combinación con anti PVRIG (CPA.7.021). Los datos presentados sugieren que existe un efecto sinérgico para el tratamiento en combinación con anticuerpos anti-TIGIT o anti-PD1.

2. Ejemplo 3(2):

[00486] De nuevo, se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-PVRIG para mejorar la función de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en combinación con un anticuerpo anti-TIGIT en un ensayo primario a base de células in vitro.

[00487] Ensayo CHO-S OKT3: el ensayo CHO-S OKT3 se utilizó para determinar si la combinación de un anticuerpo PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y un anticuerpo anti-TIGIT disponible comercialmente podría aumentar la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas más que un solo tratamiento con anticuerpos anti-PVRIG o anti-TIGIT. Las células diana utilizadas en el ensayo de cocultivo fueron la línea celular de ovario de hámster chino, CHO-S (ATCC), que sobreexpresa de forma estable el fragmento variable monocatenario del clon OKT3 del anticuerpo anti-CD3 humano (abreviado como OKT3) y PVRL2 humana (abreviada como hPVRL2). Las células de origen CHO-S OKT3 se cultivaron en medio CD-CHO sin suero complementado con 40 mM de glutamax, penicilina/estreptomicina y 6 µg/ml de puromicina. Las células CHO-S OKT3 hPVRL2 se cultivaron en medio CD-CHO sin suero complementado con 40 mM de glutamax, penicilina/estreptomicina, 6 µg/ml de puromicina y 600 µg/ml de higromicina B.

[00488] Se aislaron linfocitos T CD3+ y CD8+ primarios de donantes humanos sanos mediante el cóctel de enriquecimiento de linfocitos T CD3+ humanos RosetteSep™ (Stemcell Technologies) y las microesferas CD8+ humanas (Miltenyi Biotec), respectivamente, y se congelaron en nitrógeno líquido. El día del ensayo de cocultivo, los linfocitos T CD3+ o CD8+ se descongelaron, se contaron y se etiquetaron con 1 µM de CFSE (Life Technologies) durante 10 minutos a 37 °C. Después de esta incubación, los linfocitos T se lavaron y se resuspendieron en un medio completo que contenía RPMI, complementado con FBS inactivado por calor al 10 %, glutamax, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y 50 µM de β-mercaptoetanol. Las células CHO-S OKT3 hPVRL2 se recolectaron del cultivo y se trataron con mitomicina C durante 1 hora a 37 °C con mezcla periódica. Después de la

incubación, las células diana se lavaron exhaustivamente, se contaron y se resuspendieron en medio RPMI completo. El ensayo se estableció con una relación de 5:1 de linfocitos T (100.000) con respecto a células diana (20.000). Las células diana, los linfocitos T y 10 µg/ml de cada tratamiento con anticuerpo se agregaron conjuntamente en una placa de 96 cavidades con fondo en forma de U (Costar) y se incubaron durante 3 días (linfocitos T CD8+) o 5 días (linfocitos T CD4+) a 37 °C. Los tratamientos con anticuerpos incluyeron CHA.7.518.1.H4(S241P) IgG4 humano por sí solo, un control de isotipo IgG4 humano combinado con el anti-TIGIT humano de ratón (clon MBSA43, eBioscience) y una combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y anti-TIGIT (clon MBSA43). Además, también se evaluó la actividad de la anti-DNAM-1 IgG1 humana de ratón (clon DX11, BioLegend), el control de isotipo IgG1 de ratón (clon MOPC21, BioLegend) y un control de isotipo IgG4 humano.

[00489] Después del período de incubación de 3 o 5 días, se analizaron los sobrenadantes del cocultivo para detectar citocinas secretadas, que incluyen IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL -17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNFα e IFNγ, con el kit de citocinas Th1/Th2/Th17 humanas de la matriz de microesferas citométricas (CBA) (BD Biosciences), o con el kit de citocinas Th humanas LEGENDplex™ (BioLegend). La proliferación de linfocitos T se midió al teñir los linfocitos T CD4+ o CD8+ con el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Aqua (ThermoFisher Scientific), el anticuerpo anti-CD4 (clon RPA-T4, BioLegend) y el anticuerpo anti-CD8 (clon HIT8a, BioLegend), y la regulación del porcentaje de linfocitos T CD4+ o CD8+ vivos con baja proliferación en CFSE. Se adquirieron los datos mediante un FACS Canto II (BD Biosciences) y se analizaron mediante el software FlowJo (Treestar) y el software Prism (Graphpad).

[00490] Resultados: la combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y un anticuerpo anti-TIGIT aumenta la proliferación de linfocitos T CD4+ en comparación con los tratamientos con un solo anticuerpo: la capacidad del anticuerpo PVRIG derivado de hibridoma CHA.7.518.1.H4(S241P) humanizado para mejorar la proliferación de linfocitos T CD4+ primarios in vitro cuando al combinarse con un anticuerpo anti-TIGIT se evaluó con el ensayo CHO-S OKT3.

[00491] Las Figuras 33A y B muestran el porcentaje de linfocitos T CD4+ en proliferación de dos donantes diferentes en respuesta al cocultivo con las células diana CHP-S OKT3 hPVRL2, y tratados con anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT ya sea por sí solos o en combinación. En estos dos donantes representativos de linfocitos T CD3+

humanos, la combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y el anticuerpo anti-TIGIT aumenta la proliferación de linfocitos T CD4+ en comparación con CHA.7.518.1.H4(S241P) por sí solo, o con la combinación del isotipo IgG4 y el anticuerpo anti-TIGIT. El anticuerpo anti-DNAM-1 reduce la proliferación de linfocitos T CD4+ en comparación con el control de isotipo IgG1 en ambos donantes.

[00492] CHA.7.518.1.H4(S241P) y un anticuerpo anti-TIGIT mejoran la proliferación de linfocitos T CD8+ y la secreción de IFN-g. La Figura 34A ilustra la capacidad del anticuerpo PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), de aumentar la proliferación de linfocitos T CD8+ en combinación con el anticuerpo anti-TIGIT en el ensayo CHO-S OKT3. En un donante representativo de linfocito T CD8+ humano, la combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y el anticuerpo anti-TIGIT aumenta la proliferación de linfocitos T CD8+ cuando los linfocitos T se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. La combinación de los anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT aumenta la proliferación más que CHA.7.518.1.H4(S241P) por sí solo, o que el tratamiento con el isotipo hIgG4 sumado al anticuerpo anti-TIGIT. La Figura 34B muestra que, en el mismo donante representativo de linfocito T CD8+ humano que se describió anteriormente, el anticuerpo PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), en combinación con el anticuerpo anti-TIGIT, también aumenta la secreción de IFNγ en el ensayo CHO-S OKT3. La combinación de los anticuerpos anti-PVRIG y anti-TIGIT aumenta la secreción de IFNγ más que CHA.7.518.1.H4(S241P) por sí solo, o que el tratamiento con el isotipo hIgG4 sumado al anticuerpo anti-TIGIT. El anticuerpo anti-DNAM-1 reduce tanto la proliferación de linfocitos T CD8+ como la producción de IFNγ en comparación con el anticuerpo de control de isotipo IgG1.

Síntesis y conclusiones

[00493] Juntos, el anticuerpo PVRIG humanizado, CHA.7.518.1.H4(S241P), y el anticuerpo anti-TIGIT tuvieron actividad funcional in vitro en el ensayo CHO-S OKT3 a base de células primarias. La combinación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y el anticuerpo anti-TIGIT condujo a una mayor proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+, así como a la secreción de IFNγ a partir de linfocitos T CD8+ en comparación con el tratamiento ya sea con CHA.7.518.1.H4(S241P) o el anticuerpo anti-TIGIT solo. Juntos, estos datos demuestran que el bloqueo conjunto de los dos receptores de punto de control, PVRIG y TIGIT, aumentaron la función de linfocitos T en comparación con el bloqueo de un solo receptor.

[00494] Cabe señalar que TIGIT no interactúa con CD112 (PVRL2; ver Figuras

4E y 4F de Zhu et al., J. Exp. Med. (2016): 1-10); más bien, interactúa con PVR, un ligando diferente. PVR se expresa en el sistema CHO/CD112 de Zhu et al. Por consiguiente, nuestra interpretación del efecto combinado del aCD112R (anticuerpo anti-PVRIG) y el anti TIGIT es que el aCD112R/aPVRIG bloquea la interacción del CD112R humano con el CD112 humano, pero el anticuerpo anti TIGIT bloquea la interacción del TIGIT humano con la PVR humana o de hámster (en linfocitos T o células CHO); Zhu et al. no dan realmente una hipótesis de por qué se produce el efecto de combinación de anti CD112R/anti TIGIT en el ensayo CHO CD112. Es decir, el efecto de combinación no es a través del ligando PVRL2/CD112 solo.

D. EJEMPLO 4: MAPEO DE EPÍTOPOS DE ANTICUERPOS ANTI-PVRIG HUMANA EN FUNCIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA DE *MACACA FASCICULARIS*

Fundamentos y objetivos

[00495] El objetivo de este estudio es identificar los epítopos en la proteína PVRIG que determinan la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-PVRIG humana contra el ortólogo del mono *Macaca fascicularis*. Muchos de los anticuerpos contra la diana de PVRIG humana muestran grados variados de reactividad cruzada de *Macaca fascicularis*, a pesar del hecho de que muchos de estos anticuerpos pertenecen a la misma categoría de epítopos. Para aportar claridad sobre las bases moleculares de la reactividad cruzada de humano/*Macaca fascicularis* (o la falta de esta), se diseñaron, expresaron y purificaron varias mutaciones de tipo *Macaca fascicularis* a humano de las proteínas recombinantes PVRIG, y se analizaron para determinar su fijación a un panel de anticuerpos anti-PVRIG humana en ELISA.

Métodos

[00496] Diseño de variantes de PVRIG de tipo *Macaca fascicularis* a humano: la alineación de secuencias de ECD de PVRIG y humanos muestra una identidad de secuencia del 90 % y una homología de secuencia del 93 % entre ortólogos humanos y de *Macaca fascicularis*. En función de la naturaleza de las mutaciones (conservadas en comparación con no conservadas) y la predicción de la estructura secundaria (en bucle en comparación con extendida) de la región de mutación, se diseñaron tres mutantes dirigidos al sitio del PVRIG de *Macaca fascicularis* para sondar el mapeo de epítopos enfocado en la reactividad cruzada con *Macaca fascicularis*. Estos mutantes incluyen H61R, P67S y PVRIG de *Macaca fascicularis* L95R/T97I. También se generaron PVRIG de *Macaca fascicularis* y humanas de tipo silvestre.

[00497] Expresión y purificación de variantes de PVRIG de *Macaca fascicularis*, humanas e híbridas: todas las variantes de PVRIG se expresaron como fusiones de ECD con una etiqueta 6XHis de terminal C en células de mamíferos. Las proteínas se purificaron mediante purificación por afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño. Las proteínas purificadas se intercambiaron por amortiguador en amortiguador PBS (pH de 7,4) y se almacenaron a 4 °C.

[00498] ELISA para determinar la interacción PVRIG-anticuerpo: el ELISA funcional se realizó de la siguiente manera: las proteínas recombinantes PVRIG híbridas (etiquetadas con His) de *Macaca fascicularis*, humanas y *Macaca fascicularis*/humanas se adsorbieron en una placa IA durante la noche a 4 °C. Las cavidades de las placas recubiertas se enjuagaron dos veces con PBS y se incubaron con 300 µl de amortiguador de bloqueo (leche descremada en polvo al 5 % en PBS de pH de 7,4) a temperatura ambiente (RT) durante 1 hora. El amortiguador de bloqueo se eliminó y las placas se enjuagaron dos veces más con PBS. Las variantes de PVRIG fijadas a la placa se incubaron con mAb PVRIG humana (isotipo IgG1 humano) en una solución (rango lineal que va de 0,1 µg/ml a 8 µg/ml en un volumen de 50 µl/cavidad) a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T (PBS 7,4, Tween20 al 0,05 %), luego tres veces con PBS y se agregaron 50 µl/cavidad de un anticuerpo secundario conjugado con HRP (específico del dominio Fc de IgG humana, Jackson ImmunoResearch). Esto se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y las placas se lavaron de nuevo. Las señales de ELISA se desarrollaron en todas las cavidades al agregar 50 µl de sustrato Sureblue TMB (KPL Inc) e incubar durante 5-20 minutos. La reacción de HRP se detuvo al agregar 50 µl de H2SO4 2N (VWR) y las señales de absorbancia a 450 nm se leyeron en un espectrofotómetro SpectraMax (Molecular Devices) o EnVision (PerkinElmer). Los datos se exportaron a Excel (Microsoft) y se representaron en GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

[00499] Residuos de S67, R95 e I97 como determinantes de la reactividad cruzada con *Macaca fascicularis*: los datos de fijación que se muestran en la Figura 18 muestran claramente que los residuos de S67, R95 y I97 afectan la reactividad cruzada con *Macaca fascicularis* de diversos anticuerpos. Mientras que la mutación de *Macaca fascicularis* a humano P67S tiene un impacto negativo en la fijación de CPA.7.002 y CPA.7.041, la mutación de *Macaca fascicularis* a humano L95R/T97I mejora significativamente la fijación de CPA.7.002, CPA.7.021, CPA.7.028 y CPA.7.041. Por

otro lado, la mutación de *Macaca fascicularis* a humano H61R no afecta la fijación de ninguno de los anticuerpos probados.

[00500] La fijación relativa a las variantes de *Macaca fascicularis* a humano sugiere tres grupos de epítopos: la fijación relativa de los anticuerpos a las variantes de PVRIG de *Macaca fascicularis*, humana e híbrida sugiere 3 grupos de epítopos distintos: el Grupo 1 se fija a los residuos R95/I97 (CPA.7.021 y CPA.7.028). El grupo 2 se fija a los residuos S67 y R95/I97 (CPA.7.002 y CPA.7.041). El grupo 3 no se fija a los residuos S67 o R95/I97 (CPA.7.024 y CPA.7.050). Los grupos de epítopos muestran una fuerte correlación con el grado de reactividad cruzada de *Macaca fascicularis* de estos anticuerpos (Figura 19).

[00501] Síntesis y conclusiones: el mapeo restringido de epítopos en función de las variaciones de *Macaca fascicularis* a humano en el ECD de PVRIG determinó que los residuos S67, R95 e I97 son determinantes de la reactividad cruzada de *Macaca fascicularis* de los anticuerpos anti-PVRIG humana. La restauración completa de la fijación a PVRIG de *Macaca fascicularis* L95R/T97I para los anticuerpos CPA.7.021 y CPA.7.028 y la mejora de la fijación de CPA.7.002 a este mutante son un importante indicio de que los residuos R95 e I97 son epítopos de PVRIG humana críticos para estos anticuerpos. Estos hallazgos también sugieren una posible forma de predecir la reactividad cruzada con respecto a los ortólogos de PVRIG de primates no humanos en función de su secuencia de aminoácidos primaria.

E. EJEMPLO 5: ANTICUERPOS HUMANIZADOS: ANÁLISIS DE FIJACIÓN Y BLOQUEO DE LIGANDO RECEPTOR DE ANTICUERPOS DERIVADOS DE HIBRIDOMA ANTI-PVRIG HUMANIZADA, CHA.7.518.1.H4(S241P) Y CHA.7.538.1.2.H4(S241P)

[00502] Este experimento se realizó para caracterizar la fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) a la proteína PVRIG humana y de *Macaca fascicularis* en líneas celulares y leucocitos primarios, para caracterizar la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) de bloquear la interacción entre PVRIG y PVRL2 y para caracterizar el espacio de epítopos de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) en relación al otro, al evaluar la competencia por la fijación al antígeno PVRIG expresado en células Jurkat.

[00503] Análisis de FACS de células que sobreexpresan hPVRIG: se utilizaron las siguientes líneas celulares para evaluar la especificidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P): células de origen HEK y células que sobreexpresan HEK

hPVRIG. Se cultivaron estas células en DMEM (Gibco) + suero fetal de ternero al 10 % (Gibco) + glutamax (Gibco). Para las células que sobreexpresan HEK hPVRIG, también se agregaron 0,5 µg/ml de puromicina (Gibco) a los medios para la selección positiva. Para el análisis de FACS, se recolectaron todas las líneas celulares en el crecimiento en fase log y se sembraron 50.000-100.000 células por cavidad en placas de 96 cavidades. La fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) no conjugados y sus respectivos controles se evaluaron en una serie de titulación de 8 puntos que comenzó a 10 µg/ml en hielo durante 30 minutos-1 hora. La serie de titulación se realizó como diluciones en serie de 3 veces. Se detectaron anticuerpos primarios no conjugados con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 647 (Jackson Laboratories). Los datos se adquirieron mediante un FACS Canto II (BD Biosciences), FACS LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences), o IntelliCyt (IntelliCyt Corporation) y se analizaron con el software FlowJo (Treestar) y el software Prism (Graphpad).

[00504] Análisis de FACS de líneas celulares humanas para determinar hPVRIG: se utilizaron las siguientes líneas celulares para evaluar la expresión y especificidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P): Jurkat y HepG2. Se cultivaron células Jurkat en medio RPMI + suero fetal de ternero al 10 %, glutamax, aminoácidos no esenciales (Gibco), piruvato de sodio (Gibco) y penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células HepG2 se cultivaron en DMEM + suero fetal de ternero al 10 % + glutamax. Para el análisis de FACS, se recolectaron todas las líneas celulares en el crecimiento en fase log y se sembraron 50.000-100.000 células por cavidad en placas de 96 cavidades. La fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) no conjugados y sus respectivos controles se evaluaron en una serie de titulación de 8 puntos que comenzó a 10 µg/ml en hielo durante 30 minutos-1 hora. Se detectaron los anticuerpos primarios no conjugados mediante un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 647. Las series de titulación se realizaron como diluciones en serie de 3 veces. Se adquirieron los datos mediante un FACS Canto II o IntelliCyte y se analizaron mediante el software FlowJo y el software Prism.

[00505] Análisis de FACS de PVRIG en linfocitos T CD8 expandidos por CMV: los donantes reactivos a CMV se adquirieron de Cellular Technology Limited (CTL). Las PBMC suministradas se pulsaron durante 2 horas con 10 µM del péptido de CMV 494-503 (NLVPMVATV, Anaspec). Las PBMC se lavaron posteriormente tres veces, después de lo cual se colocaron en placas de 24 cavidades durante 9 días en RPMI +

suero AB humano (Sigma) al 10 %, glutamax, penicilina/estreptomicina y un cóctel de crecimiento de citocinas que consiste en 2 ng/ml de IL-2 (R&D systems) y 10 ng/ml de IL-7 (R&D systems). Después de 9 días, las células no adherentes se recolectaron, se fenotipificaron para el enriquecimiento de linfocitos T CD8 y se almacenaron en nitrógeno líquido.

[00506] Para evaluar la expresión en linfocitos T CD8 expandidos por CMV, la fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) no conjugado y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) y sus controles respectivos se evaluó en una serie de titulación de 8 puntos que comienza a 666 nM en hielo durante 30 minutos-1 hora. La serie de titulación se realizó como una serie de dilución en serie de 4 veces. Se detectaron anticuerpos primarios no conjugados con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 647. Se analizaron los datos con el software FlowJo y el software Prism y se recopilaron en un BD LSR Fortessa X-20.

[00507] Análisis de FACS de células de sobreexpresión modificadas por ingeniería genética con PVRIG de *Macaca fascicularis*: se utilizaron las siguientes líneas celulares para evaluar la reactividad cruzada de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) con PVRIG de *Macaca fascicularis* (cPVRIG): células de origen expi y células que sobreexpresan expi cPVRIG. Estas células se cultivaron en DMEM + suero fetal de ternero al 10 % + glutamax. Células de sobreexpresión transitoria de expi cPVRIG se generaron al electroporar el ADN de cPVRIG en células de origen expi mediante el sistema de transfección Neon. Para el análisis de FACS, se usaron células expi cPVRIG entre 1 y 3 días después de la transfección. Las células de origen expi se recolectaron de la fase de crecimiento log. Se sembraron 50.000-100.000 células por cavidad de cada tipo en placas de 96 cavidades. La fijación de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) no conjugados y sus respectivos controles se evaluaron en una serie de titulación de 8 puntos que comenzó a 10 µg/ml en hielo durante 30 minutos-1 hora. Las series de titulación se realizaron como series de dilución de 3 veces. Se detectaron anticuerpos primarios no conjugados con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 647. Se adquirieron los datos mediante un FACS Canto II o IntelliCyte y se analizaron mediante el software FlowJo y el software Prism.

[00508] Ensayos de bloqueo de receptor-ligando de base celular: la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para inhibir la interacción de PVRIG con su ligando PVRL2 se evaluó en un ensayo de competencia celular realizado

en dos orientaciones.

[00509] En la primera orientación, PVRL2 se expresa de forma endógena en células HEK no manipuladas, y se midió la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para bloquear la fijación de PVRIG Fc biotinilada soluble en bloque a células HEK. Más específicamente, la proteína PVRIG Fc biotilinada (33 nM) y CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (1,03-198 nM, hIgG4) se agregaron simultáneamente a 100.000 células HEK y se incubaron durante 1 hora sobre hielo. La extensión de la fijación de PVRIG Fc biotinilada se detectó posteriormente mediante la adición de estreptavidina Alexa 647 (Jackson Laboratories) durante 20-30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces en PBS para su adquisición mediante un FACS Canto II. Los datos se analizaron mediante FlowJo, Excel (Microsoft) y Prism.

[00510] En la segunda orientación, las células HEK se modificadas por ingeniería genética para expresar PVRIG humano (HEK hPVRIG) y la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (hIgG4) para inhibir la PVRL2 humana soluble Fc fue evaluado. Más específicamente, las células HEK hPVRIG se incubaron previamente con CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (0,66-66nM) durante 30 minutos en hielo, después de lo cual PVRL2 mFc (PVRL2 humana con un Fc de ratón) se agregó (durante 1 hora en hielo) y se midió su capacidad para unirse a HEK hPVRIG. La extensión de la fijación de PVRL2 mFc se detectó mediante la posterior adición de anti-Fc A647 de ratón en cabra (Jackson Laboratories) durante 20-30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces en PBS para su adquisición mediante un FACS Canto II. Los datos se analizaron mediante FlowJo, Excel y Prism.

[00511] Análisis del espacio de epítopo de base celular: el espacio de epítopo para CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) se evaluó por su capacidad para competir con otro para fijarse a células Jurkat. Brevemente, las células Jurkat se recolectaron en fase de crecimiento log y se tiñeron con □□µg/ml de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) sin etiquetar durante 30 minutos en hielo. Las células Jurkat se hicieron girar posteriormente hacia abajo, se lavaron, y se contratiñeron con □µg/ml de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) etiquetados con Alexa 647 durante 30 minutos en hielo. La competencia de los anticuerpos etiquetados para la fijación de PVRIG con anticuerpos no etiquetados en células Jurkat se evaluó mediante la magnitud de la señal de Alexa 647 por citometría de flujo. Se adquirieron los datos mediante un FACS Canto II y se analizaron mediante FlowJo, Excel y Prism.

Resultados

[00512] CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) reconocen PVRIG en células de sobreexpresión, células Jurkat y linfocitos T humanos: la capacidad de los anticuerpos PVRIG derivados de hibridoma humanizados CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para fijarse a PVRIG humana se evaluó mediante células HEK que sobreexpresan PVRIG humana, células Jurkat y linfocitos T primarios. La Figura 20 ilustra la especificidad de tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) (A) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (B). Ambos anticuerpos se fijan muy específicamente a las células HEK hPVRIG y no se fijan a las células de origen HEK.

[00513] Afinidades de fijación: tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también expresan fijación a células HEK hPVRIG con alta afinidad con sus valores Kd asociados: 0,29 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y 0,86 nM para CHA7.538.1.2 para fijarse a las células HEK hPVRIG.

[00514] La Figura 21 ilustra la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) (A) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (B) para fijarse a células Jurkat que expresan de forma endógena PVRIG. Ambos son capaces de fijarse a células Jurkat con una afinidad comparable a las células HEK hPVRIG.

[00515] La afinidad de estos anticuerpos con respecto a las células Jurkat es de 0,15 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y 0,59 nM para CHA.7.538.1.2.H4(S241P).

[00516] La Figura 22 ilustra la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para fijarse a los linfocitos T CD8 que se expandieron por exposición al péptido de CMV (494-503, NLVPMVATV) y expresar endógenamente PVRIG.

[00517] CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) detectan PVRIG de *Macaca fascicularis* (cPVRIG) expresada en células expi: la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para fijarse a cPVRIG se evaluó mediante células expi que sobreexpresan cPVRIG. La Figura 23 ilustra la especificidad de tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) (A) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (B). Ambos anticuerpos se fijan muy específicamente a las células expi cPVRIG y no se fijan a las células de origen expi. Tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también expresan fijación a células expi cPVRIG con alta afinidad con sus valores Kd asociados: 0,24 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y 0,58 nM para CHA7.538.1.2.

[00518] Ensayos de bloqueo de receptor-ligando de base celular: la capacidad de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) para inhibir la interacción de PVRIG con PVRL2 se evaluó en dos orientaciones, como se describe en la sección de protocolos. En la primera permutación, tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) pudieron inhibir completamente la fijación de PVRIG Fc a las células HEK (Figura 24A). Los valores de IC50 asociados con esta capacidad de bloqueo son de 15 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y de 16,1 nM para CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Es importante destacar que no todos los anticuerpos derivados de la campaña de hibridomas confirmada para fijarse a PVRIG fueron capaces de bloquear la fijación de PVRIG Fc a las células HEK. Como se muestra en la Figura 24B, un clon de anticuerpo designado CHA.7.544 no puede bloquear la fijación de PVRIG Fc a las células HEK.

[00519] En la segunda permutación, tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también pudieron inhibir completamente la fijación de PVRL2 Fc a las células HEK hPVRIG (Figura 25A). Los valores de IC50 asociados con esta inhibición son de 1,8 nM para CHA.7.518.1.H4(S241P) y de 2,53 nM para CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Aunque CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) fueron capaces de inhibir completamente la fijación de PVRL2 Fc en esta permutación, de manera consistente con su capacidad para inhibir la fijación de PVRIG Fc en la primera permutación, otros anticuerpos no mostraron esta misma tendencia. Más específicamente, otro anticuerpo derivado de hibridoma humanizado, CHA.7.530.3, que fue capaz de inhibir completamente la fijación de PVRIG Fc a las células HEK (primera permutación, datos no mostrados), no pudo inhibir completamente la fijación de PVRL2 Fc a las células HEK hPVRIG (Figura 25A). En conjunto, estos datos indican que la segunda permutación del ensayo de bloqueo de receptor/ligando de base celular es capaz de distinguir la potencia de los anticuerpos de bloqueo del receptor-ligando con más sensibilidad en comparación con la primera permutación. Es importante destacar que se demostró que CHA.7.544 no puede bloquear la fijación de PVRL2 Fc a las células HEK hPVRIG (Figura 25B), de manera consistente con su incapacidad para bloquear la fijación de PVRIG Fc a las células HEK.

[00520] Análisis del espacio de epítopo de base celular: como se describe en la sección de protocolos, se realizó un análisis del espacio de epítopo de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) al evaluar su capacidad para competir por la fijación a PVRIG. La Figura 26 muestra la capacidad de las versiones no

conjugadas de los anticuerpos para inhibir la fijación de las versiones conjugadas con Alexa 647 (A647) de los mismos anticuerpos. Los datos en la Figura 26 representan el porcentaje de fijación de los anticuerpos conjugados con A647 en relación con la señal máxima que producen sin competencia. La señal producida a partir de CHA.7.518.1.H4(S241P) A647 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) A647 no se vio afectada por la preincubación de las células Jurkat con el control de isotipo (datos no mostrados). Como se esperaba, la señal producida a partir de CHA.7.518.1.H4(S241P) A647 y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) A647 se redujo significativamente al competir con versiones no conjugadas de sí mismos (datos no mostrados). Curiosamente, tras el análisis de la señal A647 de CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) en el contexto de la preincubación con la versión no conjugada del anticuerpo opuesto, también hubo una reducción significativa. Esto indica que CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) pueden compartir un espacio de epítopo similar en PVRIG expresada endógenamente.

[00521] Síntesis y conclusiones: las versiones de ratón de los anticuerpos anti-PVRIG designados CHA.7.518 y CHA.7.538 se humanizaron exitosamente en un isotipo IgG4 humano (CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P)), el cual retuvo propiedades de fijación hacia el antígeno PVRIG humana. Mediante células de sobreexpresión modificadas por ingeniería genética, células Jurkat y linfocitos T CD8 primarios expandidos por CMV, se demostró que CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) son altamente específicos de PVRIG humana endógena y se fijan con una alta afinidad. Además, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también mostraron reactividad con respecto al antígeno PVRIG de *Macaca fascicularis* y se fijaron a células de sobreexpresión con alta afinidad. Funcionalmente, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) fueron capaces de inhibir la interacción de PVRIG con PVRL2 en ensayos a base de FACS. Por último, se demostró que CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) comparten potencialmente espacio de epítopo en PVRIG humana endógena debido a su capacidad para competir entre sí por la fijación a células Jurkat.

F. EJEMPLO 6: ANTICUERPOS HUMANIZADOS: ANÁLISIS FUNCIONAL DE ANTICUERPOS HUMANIZADOS

[00522] Se validó la actividad funcional de varios anticuerpos humanizados de la invención.

[00523] Ensayo de CHO-S OKT3: se utilizó el ensayo de CHO-S OKT3 para

determinar si los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), podrían mejorar la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+, y la secreción de citocinas. Las células diana utilizadas en el ensayo de cocultivo fueron la línea celular de ovario de hámster chino, CHO-S (ATCC), ya sea con sobreexpresión estable del fragmento variable monocatenario del clon OKT3 del anticuerpo anti-CD3 humano (abreviado como OKT3), o con sobreexpresión estable tanto de OKT3 como de PVRL2 humana (abreviada como hPVRL2). Las células de origen CHO-S OKT3 se cultivaron en medio CD-CHO libre de suero (Gibco) complementado con 40 mM de glutamax (Gibco), penicilina/estreptomicina (Gibco) y 6µg/ml de puromicina (Gibco). Las células CHO-S OKT3 hPVRL2 se cultivaron en el mismo medio CD-CHO que las células de origen, pero también se complementaron con 600 µg/ml de higromicina B (Gibco).

[00524] Se aislaron linfocitos T CD4+ y CD8+ primarios de donantes humanos sanos mediante el cóctel de enriquecimiento de linfocitos T CD4+ humanos RosetteSep™ (Stemcell Technologies) y las microesferas CD8+ humanas (Miltenyi Biotec), respectivamente, y se congelaron en nitrógeno líquido. El día del ensayo de cocultivo, los linfocitos T CD4+ o CD8+ se descongelaron, se contaron y se etiquetaron con 1 µM de CFSE (Life Technologies) durante 10 minutos a 37 °C. Después de esta incubación, los linfocitos T se lavaron y se resuspendieron en un medio completo que contenía RPMI (Gibco), complementado con FBS inactivado por calor al 10 %, glutamax, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales (Gibco), piruvato de sodio (Gibco) y 50 µM de β-mercaptoetanol (Gibco). Las células CHO-S OKT3 y CHO-S OKT3 hPVRL2 se recolectaron del cultivo y se trataron con mitomicina C (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 37 °C con mezcla periódica. Después de la incubación, las células diana se lavaron exhaustivamente, se contaron y se resuspendieron en medio RPMI completo. El ensayo se estableció con una relación de 5:1 de linfocitos T (100.000) con respecto a células diana (20.000). Las células diana, los linfocitos T y 10 µg/ml de cada tratamiento con anticuerpo se agregaron conjuntamente en una placa de 96 cavidades con fondo en forma de U (Costar) y se incubaron durante 3 días (linfocitos T CD8+) o 5 días (linfocitos T CD4+) a 37 °C. Los tratamientos con anticuerpos PVRIG incluyeron CHA.7.518.1.H4(S241P) IgG4 humana, CHA.7.538.1.2.H4(S241P) IgG4 humana, CHA.7.530.3 IgG4 humana (anticuerpo de bloqueo de receptor/ligando parcial) e CHA.7.544 IgG1 de ratón (anticuerpo de bloqueo no de receptor/ligando). Además de los anticuerpos PVRIG, también se evaluó la actividad de la anti-DNAM-1 IgG1 humana de ratón (clon DX11, BioLegend), el control de isotipo IgG1 de ratón (clon MOPC21,

BioLegend) y un control de isotipo IgG4 humano. Para las titulaciones de dosis de anticuerpos, se utilizaron diluciones de 3 veces de 66 nM a 0,264 nM de los anticuerpos PVRIG, y el anticuerpo de control de isotipo respectivo.

[00525] Después del período de incubación de 3 o 5 días, se analizaron los sobrenadantes del cocultivo para detectar citocinas secretadas, que incluyen IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL -17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNFα e IFNγ, con el kit de citocinas Th1/Th2/Th17 humanas de la matriz de microesferas citométricas (CBA) (BD Biosciences), o con el kit de citocinas Th humanas LEGENDplex™ (BioLegend). La proliferación de linfocitos T se midió al teñir los linfocitos T CD4+ o CD8+ con el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Aqua (ThermoFisher Scientific), el anticuerpo anti-CD4 (clon RPA-T4, BioLegend) y el anticuerpo anti-CD8 (clon HIT8a, BioLegend), y la regulación del porcentaje de linfocitos T CD4+ o CD8+ vivos con baja proliferación en CFSE. Se adquirieron los datos mediante un FACS Canto II (BD Biosciences) y se analizaron mediante el software FlowJo (Treestar) y el software Prism (Graphpad).

Resultados

[00526] CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) mejoran la proliferación de linfocitos T CD4+ de manera dependiente de hPVRL2: la capacidad de los anticuerpos PVRIG derivados de hibridoma humanizados CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA. 7.538.1.2.H4 (S241P) para mejorar la proliferación de linfocitos T CD4+ primarios in vitro se evaluó con el ensayo CHO-S OKT3. La Figura 27A muestra el porcentaje de linfocitos T CD4+ en proliferación de un donante representativo en respuesta al cocultivo con las células diana CHP-S OKT3 hPVRL2 y diferentes anticuerpos PVRIG. En este donante, los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) humanizados aumentan la proliferación de linfocitos T CD4+ en comparación con el control del isotipo IgG4 humano (línea discontinua). El anticuerpo de bloqueo de receptor/ligando parcial, CHA.7.530.3 IgG4 humana, solo aumenta débilmente la proliferación de linfocitos T, mientras que el anticuerpo de bloqueo de ligando/receptor no, CHA.7.544 IgG1 de ratón no tiene efecto en comparación con los anticuerpos de control de isotipo El anticuerpo anti-DNAM-1 reduce la proliferación de linfocitos T CD4+. La Figura 27B demuestra que los efectos de los anticuerpos PVRIG CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) humanizados, y el anticuerpo anti-DNAM-1 dependen de la sobreexpresión de hPVRL2 en las células diana. Después del tratamiento con los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.1, se

observa un aumento mayor en la proliferación de linfocitos T CD4+ cuando los linfocitos T CD4+ se cocultivan con las células CHP-S OKT3 hPVRL2, en comparación con el cocultivo con las células de origen CHO-S OKT3. De manera similar, el anticuerpo anti-DNAM-1 solo disminuye la proliferación de linfocitos T CD4+ cuando los linfocitos T se cocultivan con las células CHT-OKT3 que expresan hPVRL2.

[00527] CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) mejoran la proliferación de linfocitos T CD8+ y la secreción de IFN-g: la Figura 28A-B ilustra la capacidad de los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1. H4 (S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), para aumentar la proliferación de linfocitos T CD8+ en el ensayo CHO-S OKT3. En dos donantes diferentes de linfocitos T CD8+ humanos, los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) aumentan la proliferación de los linfocitos T CD8+ en comparación con el control del isotipo IgG4 humano cuando los linfocitos T se cocultivan con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. Sin embargo, CHA.7.544 IgG1 de ratón tiene poco o ningún efecto. Como se observó con los linfocitos T CD4+, el anticuerpo anti-DNAM-1 reduce la proliferación de linfocitos T CD8+. La Figura 28C muestra que los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), también aumentan la secreción de IFNγ en el ensayo CHO-S OKT3. En tres diferentes donantes de linfocitos T CD8+ humanos, los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) aumentan la producción de IFNγ en comparación con el control de isotipo IgG4 humano (línea discontinua). También se observaron aumentos en IL-10, IL22 y TNFα después del tratamiento con anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (datos no mostrados).

[00528] CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) mejoran consistentemente la proliferación de linfocitos T CD4+ en múltiples donantes humanos: a continuación, para demostrar que los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) podrían mejorar de forma reproducible la función de los linfocitos T, se examinaron los efectos de los anticuerpos PVRIG humanizados en la proliferación de linfocitos T CD4+ en 11 donantes diferentes en el ensayo CHO-S OKT3. La Figura 29 demuestra que tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) aumentaron consistentemente la proliferación de linfocitos T CD4+ en la mayoría de los donantes probados en comparación con el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano cuando los linfocitos T se cocultivaron con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. Además, el anticuerpo de bloqueo de receptor/ligando parcial,

CHA.7.530.3, y el anticuerpo de bloqueo de no receptor/ligando, CHA.7.544, no aumentan de manera consistente la proliferación de linfocitos T CD4+ en los mismos donantes.

[00529] CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) tienen un efecto dependiente de la dosis sobre la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+: finalmente, se midió el efecto dependiente de la dosis de los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), en el ensayo CHO-S OKT3. La disminución de la dosis de los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) disminuye el porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4+ (Figura 30A) y linfocitos T CD8+ (Figura 30B) cuando se cocultivan los linfocitos T con las células CHO-S OKT3 hPVRL2. Este efecto dependiente de la dosis sobre la proliferación de linfocitos T no se observa con el anticuerpo CHA.7.544, ni con el control de isotipo IgG4. Además, no se observó efecto bifásico alguno con la titulación de la dosis, lo que sugiere una falta de actividad agonista de los anticuerpos PVRIG humanizados.

Síntesis y conclusiones

[00530] Los anticuerpos PVRIG humanizados, CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P), tuvieron actividad funcional in vitro en el ensayo CHO-S OKT3 a base de células primarias. Tanto CHA.7.518.1.H4(S241P) como CHA.7.538.1.2.H4(S241P) aumentaron la proliferación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de una manera dependiente de la dosis. CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) también fueron capaces de aumentar la secreción de IFNγ en el ensayo CHO-S OKT3. Se mostró que la actividad de los anticuerpos CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) dependía de la sobreexpresión de hPVRL2 en las células diana. CHA.7.518.1.H4(S241P) y CHA.7.538.1.2.H4(S241P) aumentaron consistentemente la actividad de los linfocitos T en múltiples donantes humanos, mientras que el anticuerpo CHA.7.544 no bloqueador tuvo poco efecto o ninguno.

G. EJEMPLO 7: DESARROLLO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE RATA PARA PVRIG DE RATÓN

[00531] El desarrollo de anticuerpos monoclonales de rata (mAb) se realizó en Aldevron Freiburg (Alemania). Los anticuerpos contra la proteína PVRIG de ratón se generaron mediante tecnología de inmunización de ADN. Vector de inmunización que expresa PVRIG de ratón introducido en el organismo huésped (rata). Se expresó PVRIG

de ratón y se generó una respuesta de inmunización. La identificación de antisueros positivos y el cribado de hibridomas se analizaron en células que expresan transitoriamente PVRIG de ratón.

Generación de pAb anti-PVRIG de ratón en rata

[00532] El desarrollo de anticuerpos policlonales de rata contra la proteína PVRIG de ratón incluyó la clonación del dominio extracelular de PVRIG de ratón en un vector de inmunización patentado por Aldevron, y la clonación de la longitud completa y del dominio extracelular en vectores de cribado patentados por Aldevron. Los diversos vectores de expresión usados para las inmunizaciones y para el cribado se confirmaron mediante FACS en células que expresan de forma transitoria PVRIG de ratón. Luego se inmunizaron tres ratas con el vector de inmunización. Se tomaron sueros inmunes y los sueros diluidos se analizaron con FACS mediante células transfectadas transitoriamente con los vectores de selección. Se realizaron extracciones de sangre de producción de cada rata y se llevó a cabo la purificación con proteína A.

Generación de mAb anti-PVRIG de ratón en rata

[00533] Se llevó adelante la fusión de linfocitos de rata y la selección mediante sistemas de prueba de Aldevron. Esto incluyó: fusión de placas de 20 x 96 cavidades seguida de cribado inicial mediante ELISA a base de células (cELISA), en células transfectadas transitoriamente con PVRIG ECD (dominio extracelular) o FL (longitud completa) de ratón. 108 clones positivos (fijados a células que expresan PVRIG ECD\FL de ratón) se propagaron adicionalmente y se volvieron a analizar. Se propagaron 30 clones positivos en matraces T-25 y los sobrenadantes se analizaron en ELISA a base de células. Se seleccionaron 23 clones de hibridoma para su posterior subclonación. El sobrenadante libre de suero se analizó con cELISA y con FACS. Se generó un total de 21 clones y se confirmó la fijación en células que sobreexpresaban la proteína PVRIG de ratón.

Caracterización de anticuerpos

[00534] Se analizaron las extracciones de sangre de análisis de la fijación de anti-PVRIG de ratón en rata, los pAb purificados, los sobrenadantes preclonales y clonales, así como los mAb purificados, mediante citometría de flujo, con células HEK293 estables que sobreexpresaban la PVRIG de ratón. También se analizó la fijación de los anticuerpos a las células D10.G4.1 que expresan de forma endógena la PVRIG de ratón. Se confirmó la expresión específica de la superficie celular de PVRIG de ratón. Las

células (1-2x10^5) se tiñeron con tinción de viabilidad Fixable diluido a razón de 1:1000 en PBS, durante 10 min a temperatura ambiente, seguido por el lavado de las células con PBS. Luego se agregaron los anticuerpos a las células (diluidos en amortiguador FACS), seguido de tinción con anti-PE de rata en cabra (con dilución de 1:100 en amortiguador FACS).

[00535] Se analizó la especificidad de los mAb mediante siARN para la transfección con PVRIG de la línea celular D10.G4.1 que expresa de forma endógena la PVRIG de ratón. Se observó una reducción de la superficie celular después de la inhibición de PVRIG de ratón.

La fijación de mAb a linfocitos NK también se analizó mediante FACS.

Se realizó un ensayo de clasificación para demostrar la diversidad de los mAb.

[00536] La afinidad de los mAb purificados (Kd) se determinó mediante la titulación de FACS en células estables que sobreexpresan la PVRIG de ratón en comparación con las células transducidas con vector vacío, y en la línea celular D10.G4.1. Las células (1x10^5) se tiñeron con tinción de viabilidad Fixable diluido a razón de 1:1000 en PBS, durante 10 min a temperatura ambiente, seguido por el lavado de las células con PBS. Luego se agregaron los anticuerpos a las células (8 concentraciones en serie con dilución de 1:3, 10-0,01 µg/ml diluidos en amortiguador FACS), seguido de tinción con anti-PE de rata en cabra (con dilución de 1:100 en amortiguador FACS).

Caracterización de mAb - Tabla de síntesis

[00537] La **Tabla 7** (columnas 1-10) sintetiza los datos generados para la caracterización de los anticuerpos anti-PVRIG de ratón.

- La columna 1 representa la ID en código del anticuerpo
- La columna 2 representa el nombre del anticuerpo proporcionado por Aldevron
- La columna 3 representa los datos de FACS como relación de MFI en células de sobreexpresión estables sobre células transducidas con vectores vacíos a razón de una concentración de mAb de 10 µl/ml
- La columna 4 representa la afinidad (nM) en las células HEK de sobreexpresión
- La columna 5 representa la fijación a linfocitos NK a una concentración de

mAb de 10 ug/ml

- La columna 6 representa la relación MFI de fijación de la línea celular D10.G4.1 sobre el control de isotipo
- La columna 7 representa la afinidad (nM) con respecto a la línea celular D10.G4.1
- La columna 8 representa las distintas categorías en el ensayo de clasificación de epítopos
- La columna 9 representa el % del ensayo de bloqueo del receptor-ligando (proteína de fusión PVRIG-Fc de ratón que se fija a células que sobreexpresan PVRL2 de ratón) e IC50 (nM)
- La columna 10 representa el % del ensayo de bloqueo del receptor-ligando (proteína de fusión PVRL2-Fc de ratón que se fija a células que sobreexpresan PVRIG de ratón) e IC50 (nM)

[00538] AB-406 y AB-407 demostraron actividad de bloqueo en ambos ensayos de fijación de receptor-ligando, tienen una afinidad relativamente alta, se unen a células NK y D10.G4.1.

[0001] Estos anticuerpos fueron seleccionados para la expresión del TME y para estudios in vivo.

[00539] **Tabla 7.** Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-PVRIG de ratón.

ID de LIMS	Nombre de anticuerpo	MFIr (HEK OX\EV) 10ug/ml	Kd (nM) en células OX	Expresión en NK MFIr (anticuerpo/ isotipo)	Expresión en D10.G4.1 (anticuerpo/ isotipo)	Kd (nM) en células D10.G4.1	Clasificación de epítopos	% de bloqueo R-L (029-Fc) (IC50)	% de bloqueo R-L (mPVRL2-Fc) (IC50)
AB-400	BOJ-1F11-H6	10	0,1393	NT	13,2	35,68	1	Agonista	Agonista
AB-401	BOJ-3E2-F4	55,7	2,4	NT	7,5	NT	1	Agonista	Inconsistente
AB-402	BOJ-4F11-H6	4,8	0,08974	NT	20	NT	1	Agonista	Agonista
AB-403	BOJ-4G1-E3	28	57,64	-	2	NT	4	78% (2,782)	Inconsistente
AB-404	BOJ-4H8-E3	18,6	0,386833	1,5	6,8	NT	1	Inerte	93-98%
AB-405	BOJ-5A4-E3	13,5	0,08871	NT	6,7	4,596	1	Agonista	Agonista
AB-406	BOJ-5C7-B3	54,5	1,884667	2,2	10	8,577	3	77% (3,679)	97-100%
AB-407	BOJ-5G4-F4	50	0,334427	2,8	8	1,325	3	95% (3,992)	95-100%
AB-408	BOJ-8G1-G1	18,9	5,098	1,7	8	NT	4	90% (3,585)	Agonista
AB-409	BOJ-9B1-D9	24,8	0,1555	NT	10	NT	1	Agonista	Inconsistente
AB-410	BOJ-11C2-G9	16,6	0,2218	2,4	6,8	NT	1	Agonista	Inconsistente
AB-411	BOJ-12E2-F8	36	5,3405	NT	5,4	NT	3	94% (4,311)	96-100% (1,189)
AB-412*	BOJ-14H2-F4	3,3*	NT	NT	2	NT	2	Agonista	62-67% (23,87)
AB-413*	BOJ-15B3-E11	49,3	1,09345	2,1	12	4,693	3	73% (2,836)	95-100% (0,58)
AB-414	BOJ-15F8-C6	24,8	2,0395	1,6	8,5	16,48	3	90% (2,907)	95-100% (1,164)
AB-415	BOJ-16E7-G8	24	17,573	2,2	5	NT	5	95% (6,727)	93-100% (5,643)
AB-416	BOJ-17C4-D4	26,3	6,357	1,5	5	NT	1	Inerte	92-94% (1,963)
AB-417*	BOJ-17C7-H5	15	59,16	-	2,5	NT	4	72% (3,455)	Inerte
AB-418	BOJ-18C1-C10	64,8	62,98	NT	4,4	NT	5	94% (18,18)	100% (8,055)
AB-419	BOJ-18D2-F5	17	0,3169	1,5	6,3	NT	1	Agonista	57-64%
AB-420	BOJ-19D9-C7	33,6	3,172	1,2	20	NT	4	78% (9,805)	Agonista

H. EJEMPLO 8: PRUEBAS DE COMBINACIÓN CON INHIBIDORES DE PUNTOS DE CONTROL INMUNITARIOS ADICIONALES

Antecedentes

[00540] Si bien el bloqueo de anticuerpos de las vías CTLA4 y PD1 ha surgido como una modalidad efectiva de tratamiento contra el cáncer, la mayoría de los pacientes no obtiene beneficios a largo plazo, lo que sugiere la necesidad de direccionamiento a puntos de control inmunitarios adicionales. Al emplear nuestros algoritmos computacionales únicos para definir nuevos miembros de la familia B7/CD28, identificamos PVRIG, que se expresa mediante múltiples subconjuntos de linfocitos T y NK. Presentamos aquí su patrón de expresión, caracterización funcional y actividad antitumoral de anticuerpos de bloqueo dirigidos a esta molécula.

Métodos

[00541] Mediante la plataforma Predictive Discovery, PVRIG fue identificada como un potencial punto de control inmunitario novedoso, después de lo cual se usó una colección de cribado de células retrovirales para identificar su contraparte de fijación cognada. Los efectos de la diana en la modulación de linfocitos T se evaluaron con

ensayos de linfocitos T primarios y derivados de tumores, aprovechando los enfoques de sobreexpresión de la diana, de inhibición y de anticuerpos antagonistas. Los anticuerpos contra la proteína humana se examinaron para determinar su capacidad para mejorar la activación de linfocitos T in vitro, mientras que los anticuerpos dirigidos al ortólogo de ratón se evaluaron in vivo para determinar los efectos sobre la inhibición de crecimiento tumoral en modelos singénicos.

Resultados

[00542] Se encontró que una proteína de fusión PVRIG-Fc se fijaba a PVRL2, con la especificidad de fijación confirmada tanto por ELISA como por análisis de citometría de flujo. PVRIG demostró una cinética de expresión única en la activación de linfocitos T, con la detección de la diana en linfocitos T de memoria, así como en células NK y linfocitos T γδ. Se generó un panel de anticuerpos humanos de alta afinidad con la capacidad de bloquear la interacción de PVRIG con PVRL2, que cuando se analizaron in vitro se demostró que mejoran la activación de tanto los linfocitos T CD4+ primarios como los CD8+ derivados de tumor mediante un mecanismo dependiente de PVRL2.

[00543] Dado que CHA.7.518.1.H4(S241P) no tiene reactividad cruzada de ratón, se realizaron estudios in vivo con un anticuerpo anti-PVRIG de ratón de bloqueo sustituto. Cuando se combina con el bloqueo anti-PDL-1, el anti-PVRIG de ratón inhibe el crecimiento de tumores establecidos en los modelos de cáncer colorrectal CT26 y MC38. Están en curso pruebas de combinación con inhibidores de puntos de control inmunitarios adicionales, así como en ratones knockout de PVRIG.

Conclusiones

[00544] El anticuerpo antagonista de alta afinidad es capaz de mejorar la activación de los linfocitos T humanos, y un anticuerpo sustituto con características similares muestra sinergia con PD-L1 in vivo en múltiples modelos singénicos. En general, nuestros datos demuestran la utilidad del direccionamiento a PVRIG además de a otros puntos de control de la familia B7 para el tratamiento contra el cáncer.

I. EJEMPLO 9: ESTUDIO POC *IN VIVO*: EFICACIA DE MAB ANTI MPVRIG EN MODELO DE TUMOR CT26

[00545] Este ejemplo describe la eficacia del tratamiento con mAB anti mPVRIg en el modelo murino de carcinoma de colon CT26 como monoterapia o en combinación con el tratamiento con anti-PDL-1.

Materiales y métodos

Experimentos de desafío tumoral:

[00546] El carcinoma de colon CT26 se adquirió de ATCC (CRL-2638). Las células se cultivaron en RPMI 1640 (Biological Industries, 01-100-1A) con 10 % de FBS (Biological Industries, 04-127-1A) y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Biological Industries, 03-031-1B). Para la implantación del tumor, las células se recolectaron y lavaron, se contaron y se suspendieron a razón de 10^7 células/ml en RPMI 1640 frío y se colocaron en hielo. Ratones BALB/c ((hembra, 8 semanas) Envigo) recibieron como anestesia una mezcla de ketamina al 10 % (Clorketam; SAGARPA Q-7090-053) y xilazina al 10 % (Sedaxylan; BE-V254834), la cual se inyectó por vía intraperitoneal. A continuación, se afeitó la parte posterior de los ratones y se desinfectó con una solución de etanol al 70 %. Los linfocitos tumorales se inyectaron por subcutánea como 50 µl de 5×10^5 células CT26 en el flanco posterior derecho de los ratones. La administración de mAb comenzó en el día 4 (monotratamiento) o el día 7 (tratamiento combinado) después de la inoculación del tumor cuando los tumores tenían un volumen de 30-50 mm^3 (monotratamiento) o llegaron a tener un volumen de 60-90 mm^3 (tratamiento combinado); y se administró por vía intraperitoneal (i.p.) a razón de un volumen/inyección final de 200 ul, durante 3 semanas para un total de 6 administraciones. El crecimiento del tumor se midió con un calibre electrónico cada 2-3 días y se informó como 0,5 X W^2 X L mm^3. Los ratones se sacrificaron con CO_2 al final de cualquiera de los dos estudios o al cumplirse cualquiera de los siguientes criterios clínicos de valoración: volumen del tumor ≥2250 mm^3, ulceración del tumor, pérdida de peso corporal ≥20 % o aspecto moribundo

Anticuerpos:

[00547] Los anticuerpos quiméricos anti-PVRIg de ratón (mAb 406 y mAb 407) utilizados en este estudio, modificados por ingeniería genética como un anticuerpo monoclonal de isotipo de IgG2b de rata (mAb), demostraron fijarse a los transfectantes 293HEK que expresan mPVRIg y bloquear la fijación de mPVRL2 a estas células. El inhibidor de anti-PDL-1 de ratón mIgG1 usado en este estudio fue mAb YW243.55.S70. El anticuerpo YW243.55.S70 es un anti-PD-Ll descrito en WO 2010/077634 (secuencias de la región variable de cadena pesada y liviana mostradas en las SEQ ID N°s. 20 y 21, respectivamente, de WO 2010/077634), y que tiene un secuencia descrita en este.

[00548] Todos los mAb se formularon en PBS estéril y tuvieron un bajo nivel de

endotoxinas (<0,05 EU/mg).

[00549] **Tabla 8** mAb probados.

1	IgG1 de ratón, k isotipo control. (MOPC-21)	BP0083	BioXcell
2	IgG2b de rata, k isotipo control. (LTF-2,)	BP0090	BioXcell
3	Anti PDL-1 de referencia (mIgG1)	YW243.55.S70	Compugen inc.
4	mAb Anti CGEN PVRIG 406 (IgG2b de rata)	BOJ-5C7-B3	ALDEVERON
5	mAb Anti CGEN PVRIG 407 (IgG2b de rata)	BOJ-5G4-F4	ALDEVERON

Diseño del estudio

Monotratamiento

[00550] Se compraron ratones BALB/c hembra de ocho semanas de edad de Envigo y se mantuvieron en una instalación de animales SPF durante 1 semana antes de comenzar el experimento. Los ratones recibieron anestesia, se afeitaron y se inocularon por vía subcutánea con 50 µl de $5X10^5$ células tumorales CT26. En el día 4 después de la inoculación del tumor, los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento de n=10 (como se describe a continuación). Los ratones se trataron con mAb (como se detalla a continuación), los cuales se inyectaron los días 4, 7, 11, 14, 18 y 21 después de la inoculación. El crecimiento del tumor se midió con un calibre cada 2-3 días.

[00551] **Tabla 9**. Grupos de tratamiento.

N.° de grupo	**Tratamiento/mAb**	**Dosis (mg/kg)**	**N.° de dosis**	**Vol/dosis (ul)**
1	Vehículo		6	200
2	mIgG1 iso control	5	6	200
3	IgG2b de rata iso control	10	6	200
4	Anti-PDL-1 mIgG1	5	6	200

N.° de grupo	Tratamiento/mAb	Dosis (mg/kg)	N.° de dosis	Vol/dosis (ul)
5	mAb anti-mPVRIg 406 rIgG2b	10	6	200
6	mAb anti-mPVRIg 407 rIgG2b	10	6	200

Tratamiento combinado

[00552] Para combinación de tratamientos con mAB anti-mPVRIg y anti-mPDL-1. Los ratones fueron tratados como se describe en el monotratamiento. En el **día 7** después de la inoculación del tumor, los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento de n=10 como se describe a continuación. Los ratones se trataron con mAb (como se detalla a continuación), los cuales se inyectaron los días 7, 11, 14, 18, 21 y 25 después de la inoculación del tumor.

[00553] **Tabla 10.** Dosis de tratamiento.

N.° de grupo	Tratamiento/ mAb 1	Dosis (mg/kg)	Tratamiento/mAb 2	Dosis (mg/kg)	N.° de dosis	Vol/dosis (µl)
7	mIgG1 iso control	5	IgG2b de rata iso control	10	6	200
8	Anti-PDL-1 mIgG1	5	IgG2b de rata iso control	10	6	200
9	Anti-PDL-1 mIgG1	5	mAb anti-mPVRIg 406 rIgG2b	10	6	200
10	Anti-PDL-1 mIgG1	5	mAb anti-mPVRIg 407 rIgG2b	10	6	200

Análisis estadístico:

[00554] ANOVA de dos vías con medidas repetidas, seguido de ANOVA de dos vías con medidas repetidas para pares de grupos seleccionados mediante el software JUMP (Statistical Discoveries TM). Los análisis de las mediciones de crecimiento tumoral se realizaron al comparar los volúmenes de tumor medidos el último día en el que todos los animales del estudio estaban vivos. Las diferencias estadísticas en el porcentaje de ratones sin tumores se determinaron mediante una prueba de Mantel-Cox (*logrank*). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron de importancia.

[00555] * p<0,05; ** p<0,01; *** p <0,001. Para cada experimento, el número de réplicas realizadas y el número de animales por grupo se describen en los epígrafes de las figuras correspondientes (Figuras 47-48).

Resultados

Actividad de monoterapia de anti-mPVRIg y anti-mPDL-1 en el modelo de tumor CT26 singénico

[00556] Comenzamos la evaluación preclínica de monoterapia anti-mPVRIg y anti-mPDL-1 en el modelo de tumor CT26 singénico de ratón. Tratamos ratones con un anticuerpo anti-PDL-1 de isotipo mIgG1 (YW243.55.S70) o con anti-mPVRIg de isotipo rIgG2b (mAb 406 y 407).

[00557] En un modelo de tratamiento semiterapéutico de carcinoma de colon CT26, la monoterapia con anti-PDL-1 fue significativamente eficaz (P<0,0001), lo que provoca un 70% de TGI comparación con el isotipo de mIgG1 de control, mayores tasas de rechazo del tumor con rechazo de tumor rápido e inmunidad antitumoral duradera observados en la mayoría de los ratones (Figuras 48A+B).

[00558] Los grupos tratados ya sea con mAb anti-mPVRIg 406 o mAb anti-mPVRIg 407 mostraron tasas de crecimiento tumoral similares sin TGI sobre el isotipo de rIgG2b (Figuras 48A+B). De acuerdo con ello, el tratamiento con anti-PDL-1 mIgG1 prolongó la supervivencia de ratones (P<0,01, Figura 48C), y 5 de 10 individuos mostraron una eliminación completa del tumor (Figura 48B). No se observó ningún efecto de los mAb anti-mPVRIg en las tasas de supervivencia.

Actividad de la combinación de anti-PVRIg y anti-PDL-1 en un modelo de tumor singénico de ratón

[00559] A continuación, evaluamos la actividad de la terapia de combinación de anti-PVRIg y anti-PDL-1 en un modelo de tumor singénico de ratón.

[00560] En un modelo de tratamiento terapéutico de carcinoma de colon CT26, la administración de anti-PDL-1 con tratamiento de isotipo de rIgG2b de control, iniciado el día 7 después de la inoculación, no fue eficaz, mientras que la combinación de mAb anti-PVRIg 407 con anti-PDL-1 provocó una TGI significativa (56 %, P=0,0005), mayores índices de rechazo de tumor , en donde 4 de 10 individuos mostraron una eliminación completa del tumor (Figuras 64A + B) y promovió una mejor actividad antitumoral, y se detectó una inmunidad antitumoral duradera (P<0,01, Figura 64C). La combinación de

mAb 406 anti-PVRIg con anti-PDL-1 fue parcialmente eficaz, y dio como resultado un 33% de TGI; sin embargo, la respuesta antitumoral registrada fue transitoria y no se observó efecto alguno sobre la tasa de supervivencia.

Conclusiones

[00561] Se predijo que mPVRIg desempeñaría un papel como una molécula tipo B7 novedosa y, por lo tanto, como una diana potencial para la inmunoterapia contra el cáncer a base de anticuerpos. Varios sistemas experimentales *in vitro* humanos han demostrado un efecto inmunomodulador para mPVRIg. En los estudios presentados en este informe, hemos evaluado el efecto anticanceroso in vivo de los mAb dirigidos contra mPVRIg. En nuestro estudio, el tratamiento con 10 mg/kg (200 ug/ratón) de anticuerpos anti-mPVRIg como monoterapia en una configuración de enfermedad mínima, es decir, se dio inicio al tratamiento el día 4 (media de tumor de 40 mm^3), no dio como resultado una ventaja de TGI o supervivencia mientras que mAb anti-PDL-1 de control positivo exhibió TGI significativa y resultó en una supervivencia prolongada.

[00562] Se analizaron mAb anti-mPVRIg también en combinación con el tratamiento con anti-PDL-1. El tratamiento con 10 mg/kg (200 ug/ratón) se inició el día 7, cuando los tumores alcanzan un tamaño medio de 75 mm^3. La terapia de combinación con mAb 407 anti-mPVRIg y anti-PDL-1 en el modelo terapéutico CT26 mostró inhibición del crecimiento tumoral y supervivencia prolongada de ratones tratados. El efecto sobre el crecimiento tumoral varió entre los ratones individuales; algunos individuos mostraron una eliminación completa del tumor, mientras que otros individuos mostraron una respuesta parcial (TGI transitorio) y algunos individuos no mostraron respuesta alguna. También se mostró un efecto in vivo del tratamiento combinado con anti-mPVRIg y anti-mPDL-1 en los modelos de tumor MC38 y B16-D^b/gp100 (datos no mostrados).

[00563] Se planean estudios in vivo adicionales para evaluar las dependencias y eficacia de dosis en modelos singénicos adicionales o en combinación con compuestos o regímenes de tratamiento adicionales.

J. EJEMPLO 10: DESCUBRIMIENTO DE ANTICUERPO TERAPÉUTICO TIGIT MEDIANTE LA EXPRESIÓN EN FAGO

1. Introducción

[00564] Se realizó una campaña de descubrimiento de anticuerpo de expresión en fago para aislar los aglutinantes de TIGIT humano de una colección de fab humanas sin tratamiento previo al tener el dominio extracelular de TIGIT humano recombinante

como antígeno diana. Se aislaron cuarenta y cinco anticuerpos novedosos específicos de TIGIT humano y se generaron como IgG4 humana, que incluye una S241P opcional en la región bisagra como se describe en la presente. Se analizaron los anticuerpos resultantes para determinar su capacidad para bloquear la interacción TIGIT-PVR y para determinar su reactividad cruzada con TIGIT de *Macaca fascicularis* expresado en células mediante citometría de flujo. Dos de estos anticuerpos se optimizaron además para una afinidad mayor de fijación a TIGIT humano y de *Macaca fascicularis*.

2. Protocolos

[00565] Antígenos para el descubrimiento de anticuerpos mediante la expresión en fago: se utilizaron dos formatos de proteína TIGIT humana como antígenos en la expresión en fago. El primero comprendía el ECD de TIGIT humano (Met22 - Pro141) fusionado con una etiqueta de polihistidina de terminal C (hTIGIT-HIS) y o bien se generó internamente o bien se obtuvo comercialmente de Sino Biological Inc. El segundo formato de antígeno comprendía el ECD de TIGIT humano fusionado con un dominio de Fc de IgG1 humana en el terminal C (hTIGIT-hFc) y o bien se generó internamente o bien se obtuvo comercialmente de R&D Systems.

[00566] Control de calidad funcional de los antígenos: los antígenos TIGIT recombinantes utilizados para ciclos de selección por afinidad se validaron funcionalmente por su capacidad para fijarse a la PVR humana, el ligando del TIGIT humano. Se analizaron los antígenos biotinilados para determinar la fijación a PVR, ya sea mediante ELISA o citometría de flujo. El hTIGIT-HIS biotinilado se validó por su capacidad para fijar hPVR-hFc (Sino Biological Inc.) mediante ELISA. El hTIGIT-hFc biotinilado se validó mediante citometría de flujo por su capacidad para fijar la PVR expresada endógenamente en la superficie en células Expi293.

[00567] Cribado de fagos de la colección de anticuerpos humanos: se ejecutaron dos campañas de fagos, mediante el uso de TIGIT-HIS humano (campaña 1) o TIGIT-hFc humano (campaña 2) como antígenos. Las reacciones de cribado se llevaron a cabo en solución, mediante el uso de microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina para mostrar los antígenos TIGIT biotinilados. Ambas campañas utilizaron una colección de expresión en fago de anticuerpos fab humanos para el descubrimiento inicial. Se llevaron a cabo tres rondas de cribado mediante el uso de los antígenos TIGIT humanos respectivos, con mayor rigurosidad de lavado y menores concentraciones de antígeno en cada ronda sucesiva de cribado. El anticuerpo CPA.9.002, generado en la campaña 1, se optimizó para mejorar la fijación a TIGIT humano al generar una colección de fagos

mediante mutagénesis de saturación de L-CDR3 y al cribar la colección resultante en comparación con TIGIT-HIS humano (campaña 3). Dos anticuerpos, CPA.9.059 y CPA.9.027, generados en las campañas 2 y 3, respectivamente, también se optimizaron para mejorar la afinidad TIGIT humana y la reactividad cruzada de TIGIT de *Macaca fascicularis* (campaña 4). Para cada anticuerpo, se generó una colección de fagos mediante mutagénesis de saturación de dos CDR (cualquier combinación de H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1 o L-CDR3). Las colecciones de fagos resultantes se cribaron durante cuatro rondas en comparación con TIGIT-HIS humano y la proteína recombinante de ECD de TIGIT de *Macaca fascicularis* etiquetada con HIS de terminal C en rondas alternas de cribado. Los antígenos de cribado utilizados fueron los siguientes: 1 nM de TIGIT-HIS humano en la ronda 1, 1 nM de TIGIT-HIS de *Macaca fascicularis* en la ronda 2, 0,1 nM de TIGIT-HIS humano en la ronda 3 y 0,1 nM de TIGIT-HIS en la ronda 4.

[00568] Cribados de fijación con anticuerpos expresados como fragmentos fab: el constructo fagémido contiene un codón de detención ámbar que le permite funcionar como un vector de expresión fab. La transformación de estos vectores en E. coli y la inducción con isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) dan como resultado la expresión periplásmica de moléculas fab solubles. Las proteínas Fab secretadas en el periplasma de E. coli se extrajeron mediante choque osmótico para los cribados de fijación.

[00569] Cribado primario mediante ELISA: los extractos de PPE fab se analizaron para determinar su fijación al antígeno de cribado hTIGIT-HIS o hTIGIT-hFc mediante ELISA. Las coincidencias positivas de la pantalla ELISA se secuenciaron con cebadores específicos de cadena pesada y cadena liviana. Se ensamblaron y analizaron las secuencias. Los clones se consideraron de secuencia única si había más de una diferencia no conservadora en CDR3 de cadena pesada.

[00570] Cribado secundario mediante citometría de flujo: los clones fab positivos según ELISA de secuencia única se seleccionaron y analizaron para determinar su capacidad para fijar TIGIT humano que sobreexpresa células Expi293 mediante citometría de flujo. Se usaron células de origen Expi293 como control negativo para cada muestra fab.

[00571] Cambio de formato de las coincidencias y producción de fab como moléculas de IgG4 humana: los potenciales fab de fijación a TIGIT humano se convirtieron en IgG4 humana de longitud completa (lo que incluye un mutante de bisagra

S241P, véase Aalberse et al., Immunology 202 105: 9-19, incorporado en la presente por referencia en su totalidad, y en particular al respecto del análisis de S241P y las referencias 1, 2 y 3 citadas allí) para una caracterización adicional. Los constructos de expresión de proteínas se derivaron mediante amplificación por PCR de secuencias de cadena pesada y liviana variables, que se subclonaron en el vector pUNO3 (Invivogen).

3. Resultados

[00572] Control de calidad funcional de las proteínas recombinantes de TIGIT humano: las proteínas recombinantes de hTIGIT-HIS y hTIGIT-hFc, generadas internamente o de origen comercial, se validaron funcionalmente por su capacidad para unirse a la PVR humana. La PVR humana (conjugada con Fc) mostró una fijación dependiente de la dosis a hTIGIT-HIS biotinilado en ELISA (datos no mostrados). Se observó una fijación similar en la orientación inversa en donde se inmovilizó PVR en la placa ELISA y hTIGIT-HIS estaba en solución (datos no mostrados).

[00573] La proteína de hTIGIT-hFc se validó funcionalmente mediante la fijación a PVR en un ensayo de citometría de flujo. En este ensayo, la proteína de hTIGIT-hFc se tituló frente a células Expi293 que expresan de manera endógena PVR humana. La interacción se detectó mediante un anticuerpo secundario anti-hFc conjugado con la etiqueta de fluorescencia AF647. Se usó una proteína Fc irrelevante como control (datos no mostrados).

[00574] Los ensayos funcionales se realizaron en varios de los candidatos como se describe en los ejemplos a continuación.

[00575] Cribados de fijación de maduración de afinidad con anticuerpos expresados como fragmentos fab: se analizaron ocho placas de 96 cavidades de clones fab de extracción periplásmica para las campañas de novo (1 y 2). Setenta y tres clones únicos fueron identificados en la campaña 1 mediante el uso de la proteína de hTIGIT-HIS como antígeno diana. El cribado secundario de los 73 clones positivos según ELISA mediante citometría de flujo identificó 21 positivos para la fijación a las células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano. Un cribado similar para la campaña 2 (hTIGIT-hFc como antígeno diana) produjo 37 clones positivos según ELISA, 24 de los cuales también fueron positivos para la fijación a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano, mediante citometría de flujo (Figura 52).

[00576] Se cribaron dos placas de 96 cavidades de clones fab (como PPE) para las campañas de optimización/maduración de afinidad (3 y 4). Las variantes únicas

positivas según ELISA se cribaron para determinar la fijación a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano y/o de *Macaca fascicularis* en citometría de flujo. Las afinidades de fijación de los clones superiores a la proteína de hTIGIT-HIS también se evaluaron mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR). El primer ciclo de maduración por afinidad del anticuerpo CPA.9.002 produjo 5 nuevos anticuerpos, CPA.9.021, CPA.9.027, CPA.9.044, CPA.9.048 y CPA.9.049, con mutaciones en la L-CDR3 y una mejora de al menos 3 veces en la afinidad de fijación para TIGIT humano recombinante. Un segundo ciclo de optimización del anticuerpo CPA.9.027 produjo 4 nuevos anticuerpos con una mejora de al menos 25 veces de la fijación a TIGIT humano recombinante. Las nuevas variantes mostraron mutaciones en el H-CDR2 y L-CDR3 (CPA.9.083 y CPA.9.086) y adicionalmente en el L-FR4 para CPA.9.089 y CPA.9.093. La optimización de CPA.9.059 dio como resultado dos nuevos anticuerpos, CPA.9.101 y CPA.9.103, con una fijación significativamente mejorada al TIGIT de *Macaca fascicularis*, así como una mejora significativa en la fijación a TIGIT humano para CPA.9.103. Las mutaciones se observaron en H-CDR3 y L-CDR1 para las dos nuevas variantes. Además, se observaron cambios menores en L-FR1 para CPA.9.101.

[00577] Cambio de formato de los fab positivos según ELISA y FACS a hIgG4: cuarenta y cinco fab únicos positivos según ELISA y fijación a TIGIT humano mediante citometría de flujo recibieron un cambio de formato para la expresión como moléculas de IgG4 humana, lo que incluye una variante opcional de bisagra S241P como se analiza en la presente. Además, 11 variantes optimizadas de afinidad también recibieron este nuevo formato de IgG4. Las secuencias de anticuerpos derivados de fago seleccionados se muestran en la Figura 53. Las secuencias de dos anticuerpos de referencia, BM26 (WO2016/028656, clon 31C6) y BM29 (US2016/0176963, clon 22G2), se muestran también en la Figura 53 para comparar. Los anticuerpos con nuevo formato se evaluaron para determinar la fijación a las células Expi293 que expresan en exceso TIGIT humano y se generó una curva de fijación para calcular la constante de fijación de equilibrio (KD). Estos anticuerpos también se evaluaron para determinar su fijación a las células Expi293 que sobreexpresan TIGIT de *Macaca fascicularis*, así como su capacidad para bloquear la interacción entre TIGIT humano y PVR humana en ensayos a base de células. En virtud de esta caracterización, se seleccionó un subconjunto de estos anticuerpos para los ensayos funcionales in vitro, tal como se describe más detalladamente a continuación.

K. EJEMPLO 11: DESCUBRIMIENTO DE ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS TIGIT

MEDIANTE HIBRIDOMA

1. Fundamentos y objetivos

[00578] La tecnología de hibridoma que utiliza métodos conocidos y estándar en el campo se usó para generar anticuerpos murinos que se fijan a TIGIT humano con alta afinidad, que reaccionan de manera cruzada con primates no humanos (*Macaca fascicularis*), TIGIT y que bloquean la interacción de TIGIT con su ligando, PVR (CD155).

2. Síntesis

[00579] Los ratones Balb/c se inmunizaron con formas recombinantes de proteínas de dominio extracelular de TIGIT humano y de *Macaca fascicularis*. Las células aisladas del bazo y los ganglios linfáticos de ratones inmunizados se fusionaron con la línea celular de mieloma Sp2/0 para generar hibridomas que secretan anticuerpos murinos. Se cribaron los sobrenadantes de hibridomas policlonales y monoclonales subclonados para determinar la fijación a células Expi293 que sobreexpresan TIGIT humano y *Macaca fascicularis* y la afinidad de fijación a proteínas recombinantes de TIGIT humano y de *Macaca fascicularis* mediante métodos estándar SPR. Los anticuerpos murinos de hibridomas seleccionados se purificaron y caracterizaron ampliamente en ensayos de fijación y funcionales. Se humanizaron cinco anticuerpos murinos funcionales y con reacción cruzada con *Macaca fascicularis* para contener un marco de hIgG4 (que incluye una variante de bisagra opcional como se describe en la presente) e isotipo. Las secuencias se muestran en la Figura 53.

L. EJEMPLO 12: MEDICIONES DE KD DE FACS DE LA FIJACIÓN DE ANTICUERPOS DERIVADOS DE FAGO E HIBRIDOMA A CÉLULAS QUE SOBREEXPRESAN TIGIT HUMANO Y DE *MACACA FASCICULARIS*

1. Protocolos

[00580] Las siguientes líneas celulares se prepararon para estimar las afinidades de fijación de anticuerpos anti-TIGIT de fago humano y de ratón: Expi293 de origen, Expi293 con sobreexpresión de TIGIT humano, y Expi293 con sobreexpresión de TIGIT de *Macaca fascicularis*. Los siguientes anticuerpos de hibridoma y fago se prepararon, cada uno, en una serie de dilución en serie de 11 puntos y 2 veces a razón de un rango de concentración de sitio de fijación de 195 pM-200 nM:

[00581] Anticuerpos generados por fago: CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059.

[00582] Anticuerpos generados por hibridoma (antes de la humanización): CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.543, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560. Se

incluyeron dos anticuerpos de referencia diferentes, BM26 (WO2016/028656A1, clon 31C6 como IgG1 de ratón) y BM29 (US2016/0176963A1, clon 22G2 como IgG1 de ratón).

[00583] La cavidad N.° 12 de cada titulación contenía amortiguador solo para servir como fondo. Cada tipo de célula se incubó con un mAb anti-TIGIT humano durante 60 minutos a 4 °C. Después del lavado, se agregaron anti-F(ab') humano en cabra etiquetado con AF647 (Jackson Immunoresearch) y anti-IgG-Fc de ratón en cabra etiquetado con AF647 (Southern Biotech N.° 1030-30) a células incubadas con mAb humano y de ratón, respectivamente. Un instrumento FACS Canto II HTS registró la media geométrica de intensidad de fluorescencia (gMFI) de 5000-10.000 eventos para cada cavidad. Se ajustó una gráfica de la gMFI como una función de la concentración molecular de PVR humana mediante el modelo de "fijación específica de un sitio" de Graphpad Prism para estimar la KD y los intervalos de confianza de 95 % de cada ajuste no lineal.

2. Resultados

[00584] Los dos KD independientes de FACS medidas para cada mAb diferían en un promedio de no más de 2 veces. En la Figura 54 y la Figura 55, se enumera una única medición representativa de KD junto con el intervalo de confianza de 95 % del ajuste de la isoterma de fijación para cada mAb para células con sobreexpresión de humano y *Macaca fascicularis*, respectivamente. CPA.9.059 no mostró fijación a las células con sobreexpresión de *Macaca fascicularis*. Se debe tener en cuenta que las concentraciones de sitio de fijación (2 veces la concentración molecular) para todos los mAb se utilizan para el ajuste de curvas no lineales, lo que significa que se supone que este método de KD de FACS mide la constante del sitio de fijación (kD) en lugar de la constante de fijación molecular o estequiométrica.

M. EJEMPLO 13: ENSAYO DE BLOQUEO DE FACS DE MAB ANTI-TIGIT DERIVADOS DE FAGO E HIBRIDOMA QUE INHIBEN LA FIJACIÓN DE PVR-FC A TIGIT

1. Introducción

[00585] El propósito de este ensayo es caracterizar la capacidad de los anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de fago e hibridoma para inhibir la fijación de PVR humana a TIGIT humano sobreexpresado en una superficie celular. En primer lugar, la afinidad de fijación de PVR humana-TIGIT humano se determinará mediante FACS. Las isotermas de fijación mostraron la concentración de saturación de PVR

humana que se usó para los ensayos de bloqueo. A continuación, las células que sobreexpresan las células TIGIT humanas se titularon con mAb anti-TIGIT producidos por fago e hibridoma, seguido de la adición de una concentración de saturación de PVR humana. La fijación del anticuerpo anti-TIGIT humano en las células de sobreexpresión se midió luego mediante FACS.

2. Protocolos

[00586] Ensayo de KD de FACS: se analizaron varios isotipos de PVR humana-Fc mediante FACS para determinar la fijación óptima y se determinó que PVR humana-h1Fc (Sino Biological # 10109-H20H) y PVR humana-m2aFc (Compugen) mostraron los niveles más altos de fijación a células que sobreexpresan TIGIT humano. Los dos isotipos de PVR se diluyeron en serie 2 veces en una serie de titulación de 11 puntos a razón de un rango de concentración molecular final de 98 pM-100 nM. La cavidad N.° 12 de cada titulación contenía amortiguador solo para servir como fondo. Cada tipo de célula se incubó con mAb durante 60 minutos a 4 °C. Después del lavado, se agregaron el fragmento de F(ab')2 etiquetado con AF647 anti-Fc humano en cabra (Jackson Immunoresearch N.° 109-606-098) y anti-IgG de ratón en cabra etiquetada con AF647 (Southern Biotech N.° 1033-31) a cavidades tituladas con mAb anti-TIGIT humano y de ratón, respectivamente. Un instrumento FACS Canto II HTS registró la media geométrica de intensidad de fluorescencia (gMFI) de 5000-10.000 eventos para cada cavidad. Se ajustó una gráfica de la gMFI como una función de la concentración molecular de PVR humana mediante el modelo de "fijación específica de un sitio" de Graphpad Prism para estimar la KD y los intervalos de confianza de 95 % de cada ajuste no lineal. Los resultados de PVR humana-m2aFc y PVR humana-h1Fc se muestran en la Figura 57A y B, respectivamente.

[00587] Ensayo de bloqueo de MAb de fago: los siguientes anticuerpos hIgG4 derivados de fago y mAb de referencia se prepararon en una serie de dilución en serie de tres puntos y 5 veces a razón de un rango de concentración de 267 pM - 6,7 nM: CPA.9.027, CPA.9.049 y CPA.9.059, así como BM26 (WO2016/028656A1, clon 31C6 como hIgG4) y Synagis hIgG4 (control de isotipo negativo).

[00588] La cavidad N.° 4 de cada titulación contenía amortiguador solo para servir como fondo. Las células se incubaron con mAb durante 15 minutos a 4 °C. Entonces se incubó PVR-m2aFc humana (Compugen) durante 1 hora a 4 °C. Después del lavado, se agregó anti-IgG de ratón en cabra etiquetada con AF647 (SouthernBiotech N.° 1033-31). Un instrumento FACS Canto II HTS registró la media geométrica de intensidad de

fluorescencia (gMFI) de 5000-10.000 eventos para cada cavidad. Los valores de gMFI de la PVR humana fijada para las células preincubadas con los mAb se compararon con los valores de gMFI de las células incubadas previamente con el mAb de referencia de bloqueo y el mAb de control de no bloqueo. Si un anticuerpo de fago redujo la señal de fijación de PVR humana-m2aFc en comparación con la señal de la titulación con el mAb de no bloqueo conocido, el anticuerpo se caracterizó por bloquear la fijación de PVR a esa concentración de mAb de fago. Las tendencias de bloqueo de los mAb de fago fueron similares al bloqueo de PVR con el punto de referencia BM26 (Figura 58).

[00589] Ensayo de bloqueo de MAb de hibridoma: cada uno de los siguientes anticuerpos de hibridoma se preparó en una serie de dilución de 11 puntos y 2,5 veces a razón de un rango de concentración de sitio de fijación de 14pM-133nM: CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, CHA.9.560, BM26 (WO2016/028656A1, clon 31C6 como IgG1 de ratón) y BM29 (US2016/0176963A1, clon 22G2 como IgG1 de ratón).

[00590] La cavidad N.° 12 de cada titulación contenía amortiguador solo para servir como fondo. Las células se incubaron con mAb durante 15 minutos a 4 °C. Luego se agregó PVR humana-h1Fc (Sino Biological N.° 10109-H20H), y luego las células se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Después del lavado, se agregó el fragmento de F(ab')2 etiquetado con AF647 anti-Fc humano en cabra (Jackson Immunoresearch). Un instrumento FACS Canto II HTS registró la media geométrica de intensidad de fluorescencia (gMFI) de 5000-10.000 eventos para cada cavidad. Se ajustó una gráfica de la gMFI como una función de la concentración del sitio de fijación del mAb de forma no lineal mediante el modelo de "log(inhibidor) en comparación con respuesta - pendiente variable (cuatro parámetros)" de Graphpad Prism para estimar el IC50 de cada ajuste no lineal. Este experimento se repitió dos veces a lo largo de dos días.

3. Resultados

[00591] Las Figuras 58 y 59 demuestran que tanto los anticuerpos de fago como de hibridoma bloquean de forma potente la fijación de PVR humana-Fc a TIGIT humano sobreexpresado en la superficie celular de las células Expi293. La actividad de bloqueo de los anticuerpos de fago e hibridoma es comparable con los dos anticuerpos de referencia analizados, BM26 y BM29.

N. EJEMPLO 14: ESTUDIOS CINÉTICOS DE RESONANCIA DE PLASMÓN DE SUPERFICIE (SPR) DE LA FIJACIÓN DE NUEVE MAB DERIVADOS DE FAGO E HIBRIDOMA A TIGIT HUMANO, DE *MACACA FASCICULARIS* Y DE RATÓN

1. Protocolos

[00592] Se realizaron todos los experimentos con un instrumento ProteOn XPR 36 a 22 °C. Primero, se prepararon superficies de captura de alta densidad con anticuerpo policlonal anti-Fc humano de cabra (Thermo N.° H10500) y anticuerpos anti-ratón de conejo (GE Healthcare N.° BR100838), respectivamente, inmovilizados sobre todas las líneas de captura verticales y puntos intermedios horizontales en chips GLC separados mediante acoplamiento estándar de aminas. Los niveles típicos de inmovilización para el pAb de anti-captura humana y el anticuerpo de anti-captura de ratón para cada chip GLC fueron de alrededor de 5000RU. El TIGIT humano se obtuvo de Sino Biologicals, mientras que el monómero TIGIT de ratón y el monómero TIGIT de *Macaca fascicularis* se prepararon internamente. Los mAb purificados estudiados para la fijación a TIGIT humano, de ratón y de *Macaca fascicularis* se enumeran a continuación:

[00593] Anticuerpos de fago: CPA.9.027, CPA.9.049 y CPA.9.059

[00594] Anticuerpos de hibridoma: CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.543, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560

[00595] Comparaciones de referencia: BM26 (WO2016/028656A1, clon 31C6 como hIgG4) y BM29 (US2016/0176963A1, clon 22G2 como hIgG4).

[00596] Cada mAb se diluyó a ~0,5 µg/ml en un amortiguador de corrida que fue de 1xPBST con BSA filtrada agregada a una concentración final de 100 µg/ml. Para cada ciclo de "cinética de disparo único" en el instrumento ProteOn, se capturó un mAb diferente en una de las seis líneas únicas de captura vertical por alrededor de 1,5-2,5 minutos. Después de cambiar el flujo de amortiguador de ProteOn a la dirección horizontal, las superficies de captura se estabilizaron por alrededor de 15-20 minutos. Se inyectaron seis concentraciones de una serie de dilución de 3 veces de TIGIT humano (346 pM - 84,1 nM), TIGIT de *Macaca fascicularis* (371 pM - 90,2 nM) o TIGIT de ratón (382 pM - 92,9 nM) por 2 minutos, seguido de 20 minutos de disociación a razón de una velocidad de flujo de 50µl/min. Una inyección idéntica de amortiguador precedió cada serie de antígeno inyectado para una referencia doble. Las superficies de anti-anticuerpos humanos se regeneraron con dos pulsos de 30 segundos de 146 mM de ácido fosfórico y las superficies de captura de anti-anticuerpos de ratón se regeneraron con dos pulsos de 30 segundos de 10 mM de glicina, pH de 1,7. Los sensogramas del antígeno TIGIT inyectado sobre los mAb capturados se procesaron con una versión ProteOn de Scrubber y se ajustaron a un modelo de fijación cinética de 1:1 que incluye un término para el transporte masivo.

[00597] La Figura 56 muestra las constantes de velocidad cinética resultantes y las constantes de disociación de equilibrio donde los datos fueron lo suficientemente confiables para estimar las constantes de fijación (no se muestran los datos de sensograma). Los asteriscos indican los valores de kd que debían mantenerse constantes a 1,00x10-5/s. En casos como el de la fijación del clon CHA.9.560 al TIGIT humano, el modelo cinético pudo estimar una Kd, pero es prácticamente imposible estimar con precisión una Kd en el orden $1x10^{-6}$/s después de solo 20 minutos de datos de disociación a causa de la sensibilidad de la instrumentación.

O. EJEMPLO 15: ANÁLISIS FUNCIONALES DE ANTICUERPOS ANTI-TIGIT

1. Fundamentos y objetivos

[00598] Para caracterizar funcionalmente la capacidad de los anticuerpos anti-TIGIT humano para inhibir la interacción de TIGIT y su ligando PVR y, por consiguiente, mejorar la activación de los linfocitos T humanos como monoterapia o en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG humana, CHA.7.518. 1.H4 (S241P).

2. Protocolos

[00599] Ensayo de indicador de luciferasa de Jurkat IL-2 de TIGIT humano/CD155: se utilizó el kit de bioensayo indicador de luciferasa de Jurkat IL-2 de TIGIT humano/PVR (Promega) para evaluar el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-TIGIT humano sobre la activación de linfocitos T. Los linfocitos Jurkat T se transfectaron de forma estable con TIGIT humano recombinante y un gen indicador de luciferasa dirigido por el elemento de respuesta IL-2 (IL-2-RE). Las células estimuladoras fueron células APC (aAPC) CHO-K1 artificiales que expresan PVR humana recombinante, y una proteína de superficie celular modificada por ingeniería genética para activar la señalización mediada por TCR de una manera independiente del antígeno. Después del cocultivo de estas células, la interacción TIGIT humano/PVR humana inhibe la señalización de TCR y la luminiscencia mediada por IL-2-RE. La adición de un anticuerpo anti-TIGIT humano que bloquea la interacción TIGIT humano/PVR humana libera la señal inhibidora, lo que resulta en la activación de los linfocitos T y la luminiscencia mediada por IL-2-RE. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células PVR humanas aAPC CHO-K1 se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se diluyeron en medio F-12 complementado con FBS al 10 % (Promega). Se colocaron 25.000 células/cavidad en placas blancas de 96 cavidades tratadas con cultivo de tejido de fondo plano (Costar). Las placas se incubaron luego durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se agregaron

anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y fagos, anticuerpos de control de isotipos IgG1 de ratón (mIgG1) y hIgG4, o anticuerpos anti-TIGIT humano de referencia (BM), ya sea como dosis única de 10 µg/ml o en una serie de dilución de 10 puntos y 2 veces a partir de 20 µg/ml. Las células TIGIT humanas de luciferasa de Jurkat IL-2-RE se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se diluyeron en medio RPMI complementado con FBS al 10 % (Promega). Se agregaron 125.000 células Jurkat a cada cavidad. Las placas se incubaron entonces a 37 °C con 5 % de CO2 durante 6 horas. Después de la incubación, las placas se retiraron de la incubadora y se las dejó para que se equilibren a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregaron 80 µl de sustrato de luciferasa Bio-Glo (Promega) a cada cavidad y se dejó que la mezcla se equilibre durante 10 minutos a temperatura ambiente a resguardo de la luz. Se cuantificó la luminiscencia en un lector de etiquetas múltiples EnVision (Perkin Elmer) con un detector de luminiscencia ultra sensible. La señal de luminiscencia se informó a razón de unidades relativas de luz (RLU).

[00600] Expansión de linfocitos T CD8+ específicos de CMV humano: se descongelaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que reaccionan ante el CMV humano, se resuspendieron a razón de $2x10^6$ 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. Después de 9 días, las células se dividieron a razón de 1:2 y descansaron con una dosis baja de IL-2 humana (100 UI/ml). La frecuencia de los linfocitos T CD8+ específicos de CMV se determinó con el tetrámero pp65/HLA-A2 de CMV (MBL). Los linfocitos T CD8+ específicos de CMV que fueron 65-98 % positivos en cuanto tetrámeros se utilizaron en ensayos entre los días 12 y 16 después de la estimulación del péptido de CMV.

[00601] Ensayo de cocultivo de linfocitos T $CD8^+$ específicos de CMV humano con líneas celulares de melanoma que expresan PVR humana: se utilizó un ensayo de cocultivo in vitro con linfocitos T CD8+ específicos de CMV humano para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-TIGIT humano en la secreción de citocinas específicas de antígenos. La línea celular diana utilizada en el ensayo fue la línea celular de melanoma HLA-$A2^+$, Mel624, transducida de forma estable con un lentivirus que contiene ADN de PVR humana (System Biosciences). Un grupo estable de células que sobreexpresan PVR humana Mel624 se pulsaron con el péptido pp65 de CMV a 0,0033 µg/ml o 0,001 µg/ml a 37 °C durante 1 hora. Se lavaron entonces las células y se colocaron en placas

a razón de 50.000 células/cavidad. Se agregaron anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y fago, anticuerpos de isotipo mIgG1 o hIgG4 de control, o anticuerpos anti-TIGIT humano de BM a razón de una concentración de 10 µg/ml. Se expandieron los linfocitos T CD8+ humanos específicos de CMV de tres donantes diferentes, especificados como donante 2, donante 4 y donante 210 según el protocolo anterior. Se agregaron 50.000 linfocitos T CD8+ humanos a cada cavidad. Los cocultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO2 durante 24 horas. Después de la incubación, las placas se centrifugaron a 1200 rpm durante 1 minuto y se recogió el sobrenadante. La cantidad de interferón gamma humano (IFNγ) en el sobrenadante de cocultivo se midió mediante citometría de flujo utilizando un ensayo de microesferas citométricas (BD).

[00602] Ensayo de cocultivo de linfocitos T CD8+ humanos específicos de CMV con líneas celulares de melanoma que expresan PVR humana y PVRL2 humana (CD112): se evaluó el efecto combinado de anticuerpos anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P), un anticuerpo anti-PVRIG humano, en la secreción de citocinas específicas de antígeno mediante un ensayo de cocultivo in vitro con linfocitos T CD8+ humanos específicos de CMV similar al ensayo descrito anteriormente. La línea celular diana usada en el ensayo fue la línea celular de melanoma HLA-$A2^+$, Mel624, que expresaba de forma estable PVR humana y PVRL2 humana, los ligandos para TIGIT y PVRIG, respectivamente, mediante transducción lentiviral (System Biosciences). Las células Mel624 que sobreexpresan la PVR humana y la PVRL2 humana se pulsaron con el péptido pp65 de CMV a razón de 0,0033 µg/ml o 0,001 µg/ml a 37 °C durante 1 hora. Se lavaron entonces las células y se colocaron en placas a razón de 50.000 células/cavidad. Se agregaron anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridomas o fagos, o un anticuerpo anti-TIGIT humano de BM, al cultivo en combinación con CHA.7.518.1.H4(S241P) o un anticuerpo de isotipo de hIgG4 de control a razón de 10 µg/ml. Se expandieron los linfocitos T CD8+ humanos específicos de CMV de tres donantes diferentes, especificados como donante 4, donante 25 y donante 210, de acuerdo con el protocolo mencionado anteriormente. Se agregaron 50.000 linfocitos T CD8+ humanos a cada cavidad. Los cocultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, las placas se centrifugaron a 1200 rpm durante 1 minuto y se recogió el sobrenadante. La cantidad de interferón gamma humano (IFNγ) en el sobrenadante de cocultivo se midió mediante citometría de flujo utilizando un ensayo de microesferas citométricas (BD).

3. Resultados

[00603] Los anticuerpos anti-TIGIT humano mejoran la señalización de IL-2: la capacidad de los anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y fago para mejorar la señalización de IL-2 se evaluó con el ensayo indicador de luciferasa de Jurkat de TIGIT humano/PVR humana. La Figura 60 y la Figura 62 demuestran el efecto de 10 µg/ml de anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma o fago en la señalización de IL-2, respectivamente. Tres anticuerpos derivados de fagos, CPA.9.027, CPA.9.049 y CPA.9.059, reforzaron de forma intensa la señalización de IL-2 en comparación con el control de isotipo hIgG4. Además, los tres anticuerpos de fago inducían más señalización de IL-2 en comparación con los anticuerpos anti-TIGIT humano BM26 y BM29. Los cinco anticuerpos derivados de hibridoma, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560, también indujeron la señalización de IL-2 en comparación con el control de isotipo mIgG1. Es de destacar que los cinco anticuerpos de hibridoma indujeron una señalización de IL-2 similar en comparación con BM26 y BM29. El anticuerpo de no bloqueo anti-TIGIT humano, CHA.9.543, no aumentó significativamente la señalización de IL-2. Para determinar si el efecto de los anticuerpos anti-TIGIT era dependiente de la dosis, el ensayo se realizó con una serie de dilución de 10 puntos y 2 veces para cada anticuerpo, a partir de 20 µg/ml (Figuras 61 y 63). La señalización de IL-2 disminuyó de manera dependiente de la dosis con los ocho anticuerpos anti-TIGIT humano, así como con BM26 y BM29.

[00604] Los anticuerpos anti-TIGIT humano aumentan la secreción de IFNγ de los linfocitos T CD8+ específicos de CMV humano: se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-TIGIT humano derivados de hibridoma y fago para modular la secreción de IFNγ con el ensayo de cocultivo de linfocitos T/Mel624 específicos de CMV. La Figura 64 muestra el efecto de los anticuerpos anti-TIGIT humano en la secreción de IFNγ. Tres anticuerpos derivados de fago, CPA.9.027, CPA.9.049 y CPA.9.059, aumentaron la secreción de IFNγ en comparación con el medio solo y el anticuerpo de control de isotipo hIgG4. Además, cinco anticuerpos derivados de hibridomas, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560, también aumentaron la producción de IFNγ en comparación con el anticuerpo de control de isotipo mIgG1. Los anticuerpos TIGIT derivados de hibridoma y fago indujeron IFNγ de manera similar a BM26 y BM29. Como se esperaba, el anticuerpo de no bloqueo anti-TIGIT humano, CHA.9.543, no afectó significativamente la secreción de IFNγ.

[00605] La Figura 65 muestra el efecto combinado de los anticuerpos anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P) sobre la secreción de IFNγ. Tres anticuerpos

derivados de fago, CPA.9.027, CPA.9.049 y CPA.9.059, y cinco anticuerpos derivados de hibridoma, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 y CHA.9.560, que incluyen BM26, mejoraron la secreción de IFN en comparación con sus anticuerpos de control de isotipo respectivos, ya sea con tratamiento en soledad o en combinación con CHA.7.518.1.H4(S241P). El anticuerpo de no bloqueo anti-TIGIT humano, CHA.9.543, dio como resultado una menor secreción de IFNγ en comparación con otros anticuerpos anti-TIGIT humano. El aumento porcentual de la secreción de IFNγ en cada anticuerpo sobre los anticuerpos de control de isotipo respectivos se sintetiza en la Figura 66. Un efecto sinérgico se observa en el tratamiento combinado de anticuerpos anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P).

4. Síntesis y conclusiones

[00606] La adición de anticuerpos anti-TIGIT humano al ensayo indicador de TIGIT humano/PVR Jurkat humano indujo un aumento robusto y dependiente de la dosis de la señalización de IL-2. Además, los anticuerpos anti-TIGIT humano aumentaron la secreción de IFNγ a partir de linfocitos T CD8+ humanos específicos de CMV al cocultivarse con células PVR humanas Mel624. La secreción de IFNγ aumentó adicionalmente a causa de los anticuerpos anti-TIGIT humano en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG humana. En conjunto, estos datos demuestran que los anticuerpos anti-TIGIT humano pueden bloquear la supresión mediada por TIGIT de la activación de linfocitos T humanos, y la activación de linfocitos T se ve reforzada por el bloqueo conjunto de tanto TIGIT como PVRIG.

P. EJEMPLO 16: ANÁLISIS DE CLASIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TIGIT

1. Protocolos

[00607] Los experimentos fueron realizados por Wasatch Microfluidics Inc. (Salt Lake City, UT) mediante un microposicionador de flujo continuo (CFM) y un formador de imágenes IBIS MX96 SPR (MX96 SPRi). Los siguientes mAb anti-TIGIT humano y las variantes de PVR-Fc humano se diluyeron a ~10 µg/ml en 10 mM de acetato sódico, pH de 5,0, y se inmovilizaron covalentemente mediante un acoplamiento de amina estándar en puntos independientes de un chip de prisma biosensor Xantec 200M durante ciclos de 7 minutos mediante el CFM:

1 CPA.9.009-H4	17 CPA.9.081-H4	32 CHA.9.555
2 CPA.9.011-H4	18 CHA.9.519	33 CHA.9.560
3 CPA.9.012-H4	19 CHA.9.521	34 CHA.9.525

4 CPA.9.013-H4	20 CHA.9.522	35 CHA.9.538
5 CPA.9.014-H4	21 CHA.9.527	36 CHA.9.543
6 CPA.9.015-H4	22 CHA.9.528	37 CHA.9.553
7 CPA.9.018-H4	23 CHA.9.529	38 CHA.9.556
8 CPA.9.027-H4	24 CHA.9.535	39 CHA.9.561
9 CPA.9.049-H4	25 CHA.9.536	40 BM8-H4
10 CPA.9.053-H4	26 CHA.9.541	41 BM9-H4
11 CPA.9.057-H4	27 CHA.9.546	42 BM26-H4
12 CPA.9.059-H4	28 CHA.9.547	43 BM29-H4
13 CPA.9.064-H4	29 CHA.9.549	44 MBSA43-M1
14 CPA.9.069-H4	30 CHA.9.552	45 PVR-Fc M2A
15 CPA.9.071-H4	31 CHA.9.554	46 Sino PVR-Fc
16 CPA.9.077-H4		

[00608] BM8-H4 y BM9-H4 se refieren a (US2015/0216970A1, clones 10A7 y 1F4 que se volvieron a formatear como hIgG4), respectivamente. MBSA43-M1 es una IgG1 anti-TIGIT humano de ratón de eBioscience. El chip de prisma se enjuagó luego con 1X PBST durante 3 minutos y luego se cargó directamente en el formador de imágenes MX96 SPRi, donde se inactivaron los ésteres de NHS en exceso con una inyección de 5 minutos de 1M de etanolamina. Los experimentos preliminares incluyeron varios ciclos de inyección de 100 nM de TIGIT humano monomérico (Sino Biologicals, N.° de cat. 10917-H08H) sobre todos los mAb inmovilizados durante cuatro minutos seguidos de regeneración para analizar la actividad de fijación de los anticuerpos y determinar mejor las condiciones de regeneración al evaluar la reproducibilidad de la fijación a TIGIT. Estos experimentos preliminares mostraron que el mejor reactivo para regenerar de forma reproducible la mayoría de los mAb inmovilizados fue un pulso de 30 segundos de ácido fosfórico a 1/500. Sin embargo, el PVR inmovilizado no retuvo la actividad y, por lo tanto, sus patrones de bloqueo se generaron y se "agruparon" como analitos en solución solamente. En estos experimentos preliminares y los experimentos de clasificación descritos a continuación, todas las muestras de proteínas se prepararon en el amortiguador de corrida que fue HBST desgasificado. Se realizó un protocolo de

clasificación de epítopos "en sándwich" en donde cada mAb y PVR se inyectaron sobre TIGIT que formó previamente un complejo con respecto a cada mAb inmovilizado para determinar si el mAb inmovilizado bloquea o no el mAb en solución de fijarse a TIGIT. Para cada ciclo, se inyectaron primero 100 nM de TIGIT sobre todos los mAb inmovilizados durante 4 minutos, seguido inmediatamente por una inyección de 4 minutos de un mAb o ligando competidor a razón de 274 nM (concentración de sitio de fijación). Esto se repitió con cada mAb y PVR que actúa como el analito competidor. Se realizaron ciclos de control con amortiguador de corrida en lugar de proteína competidora después de cada 12 ciclos para una doble referencia. Todas las superficies se regeneraron después de cada ciclo con un pulso de 30 segundos de 1/500 de ácido fosfórico. Se procesaron los datos de Sensorgram y se los usó como referencia mediante el software patentado de Wasatch. Se clasificó un par de anticuerpos como que tienen un epítopo de fijación a TIGIT compartido si no se observó fijación a partir de la inyección del competidor al TIGIT formado previamente como complejo hasta la inmovilización de mAb. Se clasificó un par de anticuerpos como que se fijan a diferentes epítopos en TIGIT, o que se "intercalan", si la inyección del mAb competidor se fijó al TIGIT formado previamente como complejo. La fijación baja o mínima del competidor se clasificó como un bloqueador "intermedio". El agrupamiento jerárquico de los patrones de bloqueo de TIGIT por pares para cada mAb y ligando se realizó mediante el software patentado por Wasatch.

2. Resultados

[00609] Tanto las proteínas PVR-Fc como 13 de los mAb perdieron actividad o no pudieron regenerarse como ligandos, por lo que sus patrones de bloqueo se determinaron como analitos solamente en solución. El MAb CPA.9.014-H4 no se agrupó porque no mostró fijación a TIGIT. La Figura 67 muestra el agrupamiento en dendrograma en función de los patrones de bloqueo por pares para cada mAb y dos proteínas PVR. El eje vertical representa el factor de similitud estadística en los patrones de bloqueo. Wasatch Microfluidics aplicó un factor de corte de 5 para agruparse los mAb, lo que se indica mediante la línea de la Figura 67. Para la definición más estricta de una "categoría" de epítopos donde solo se agrupan los mAb (y PVR) que muestran patrones idénticos de bloqueo, hay un total de 12 categorías separadas. Si se agrupan los patrones de bloqueo que muestran solo diferencias mínimas, hay cuatro "comunidades" estrechamente relacionadas de mAb y PVR. Estas “comunidades” están indicadas con diferentes bloques sombreados en la parte inferior de la Figura 67. La Figura 68 agrupa los mAb y los PVR que habitan cada categoría separada y única, en donde cada

categoría está indicada por un recuadro negro. Los recuadros grises rodean todas las categorías únicas que conforman cada "comunidad" de patrones relacionados de bloqueo. Los mAb y PVR en la Figura 68 se enumeran con la tecla numérica que representa cada proteína en el dendrograma de la Figura 67.

Q. EJEMPLO 17: ADMINISTRACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PVRIG A RATONES KNOCKOUT DE TIGIT

Fundamentos y objetivos

[00610] Para examinar si la eliminación de TIGIT en combinación con el bloqueo de PVRIG de ratón puede mejorar la inhibición del crecimiento tumoral y la supervivencia en un modelo singénico de tumor de ratón.

Protocolos

Animales

[00611] Se generaron ratones knockout (KO) de TIGIT en Ozgene Pty LTD (Australia). Ratones de tipo silvestre (WT) C57BL/6 (Ozgene) sirvieron como controles. Se utilizaron ratones C57BL/6 de ocho a once semanas de edad con KO de TIGIT. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de Tel-Aviv (Tel-Aviv, Israel).

Modelos de tumor in vivo

[00612] 1 x 105 células de melanoma B16/Db-hmgp100 se inocularon por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho de ratones C57BL/6 WT o KO con inactivación de TIGIT. El tratamiento con anticuerpos se inició el mismo día que la inoculación del tumor (día 0), con 7-10 ratones por grupo de tratamiento. Los anticuerpos utilizados fueron el control de isotipo de IgG1 de ratón (clon MOPC-21 BioXcell) y anti-PVRIG de ratón de IgG1 de ratón (clon 407, Compugen LTD). Los anticuerpos se administraron a razón de 10 mg/kg por inyección intraperitoneal, dos veces por semana durante 3 semanas. El crecimiento del tumor se midió con un calibre electrónico cada 2-3 días y se informó como 0,5 X W2 X L mm3 (L es la longitud y W es el ancho del tumor). Los animales que alcanzaron un tamaño de tumor de 2250 mm3 recibieron anestesia.

Análisis estadístico

[00613] Se realizó un ANOVA bidireccional con medidas repetidas, seguido de un ANOVA bidireccional con medidas repetidas para pares seleccionados de grupos, con

el software JUMP (Statistical Discoveries TM). Los análisis de las mediciones de crecimiento tumoral se realizaron al comparar los volúmenes de tumor medidos el último día en el que todos los animales del estudio estaban vivos. Las diferencias estadísticas en el porcentaje de ratones sin tumores se determinaron mediante una prueba de Mantel-Cox (*logrank*). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron de importancia. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p <0,001$.

Resultados

Inhibición del crecimiento tumoral in vivo después del tratamiento con anticuerpo de bloqueo de anti-PVRIG de ratón en ratones KO con inactivación de TIGIT

Probamos la eficacia in vivo de la eliminación de TIGIT en combinación con el bloqueo de PVRIG de ratón en un modelo de tumor de melanoma subcutáneo B16/Db-hmgp100 singénico de ratón. El tratamiento de ratones C57BL/6 WT que tienen tumor con un anticuerpo de bloqueo de anti-PVRIG de ratón tuvo un efecto menor en la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) en comparación con el tratamiento de isotipo (17 % de TGI en el día 11 y 8 % de TGI al final del estudio, día 18). El efecto de la eliminación de TIGIT sobre el crecimiento del tumor fue menor en comparación con el grupo de control C57BL/6 WT (17 % de TGI en el día 11 y 13 % de TGI al final del estudio). Sin embargo, cuando la eliminación de TIGIT se combinó con el tratamiento con el anticuerpo anti-PVRIG de ratón (clon 407), fue evidente una TGI significativa (63 % en el día 11 y 49 % de TGI al final del estudio) (Figuras 80A y 80B). De acuerdo con la TGI, los ratones KO con inactivación de TIGIT tratados con el anticuerpo anti-PVRIG de ratón (clon 407) mostraron una mayor supervivencia en comparación con el grupo de control C57BL/6 WT; sin embargo, no se alcanzó una importancia estadística (Figura 80C).

Síntesis y conclusiones

[00614] La combinación de la eliminación de TIGIT y el bloqueo de PVRIG redujo significativamente el crecimiento tumoral in vivo, lo que indica que tanto TIGIT como PVRIG desempeñan un papel inhibidor en este modelo de tumor de melanoma. Estos datos sugieren que el direccionamiento conjunto a TIGIT y PVRIG podría ser otra terapia de combinación que mejore significativamente las respuestas antitumorales.

R. EJEMPLO 18: EL ANTAGONISMO DE PVRIG MEJORA LA FUNCIÓN EFECTORA DE LOS LINFOCITOS T Y REDUCE EL CRECIMIENTO TUMORAL

Resumen

[00615] A pesar de los avances recientes, la mayoría de los pacientes no obtienen beneficios a largo plazo de los inhibidores de punto de control. PVRIG es un novedoso receptor inmunosupresor de la familia DNAM/TIGIT y aquí demostramos un papel de PVRIG en la regulación de las respuestas antitumorales. PVRIG se fija a PVRL2 y muestra una expresión significativamente mejorada en los linfocitos que infiltran tumores en comparación con los linfocitos de los tejidos normales. El antagonismo de PVRIG potenció la activación de linfocitos T humanos y la combinación de PVRIG ya sea con los inhibidores de PD-1 o con los de TIGIT aumentó sinérgicamente la función de los linfocitos. A continuación, abordamos el papel de PVRIG en los modelos preclínicos de tumores. Los ratones con $PVRIG^{-/-}$ mostraron un aumento significativo de la activación de linfocitos T in vitro y una reducción del crecimiento tumoral de MC38, lo cual estuvo mediado por un aumento de la función efectora de CD8. El anticuerpo anti-PVRIG antagonista redujo significativamente el crecimiento tumoral en combinación con anti-PD-L1 o cuando se puso a prueba en ratones $TIGIT^{-/-}$. En resumen, demostramos que la vía PVRIG-PVRL2 fue inducida en tipos de cáncer humanos y que las interacciones PVRIG-PVRL2 antagonistas dieron como resultado un aumento de la función de los linfocitos T y un menor crecimiento tumoral.

Importancia

[00616] Estos datos demuestran que PVRIG es una diana prometedora para el tratamiento contra el cáncer y proporcionan una base para probar un inhibidor de PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P), como un agente novedoso de inmunoterapia contra el cáncer, ya sea como monoterapia o en combinación con bloqueo de TIGIT o PD1.

Introducción

[00617] Cada vez más evidencia demuestra que las respuestas inmunitarias endógenas son críticas para demarcar el inicio, la progresión y la supresión del cáncer (1) (2). El estado inmunitario de los pacientes, así como el contenido de los leucocitos que se infiltran al tumor (TIL) dentro del microentorno del tumor (TME), son indicadores de pronóstico clave no solo de las tasas de supervivencia de cáncer, sino también de cómo los pacientes responden al tratamiento (3) (4). Los linfocitos T son un componente clave de los TIL que pueden invocar una respuesta antitumoral, y la mayoría de las respuestas inmunitarias antitumorales dependen en última instancia de la funcionalidad de los linfocitos efectores. Un enriquecimiento de los linfocitos T CD8 en el TME del tumor de un paciente, así como otros factores que sesgan una respuesta inmunitaria hacia una respuesta efectiva de los linfocitos T CD8, tal como la carga mutacional y un

TME polarizado por Th1, son todos indicadores clave de pronóstico para una respuesta inmunitaria antitumoral favorable (5) (6).

[00618] Una observación clave en muchos tumores sólidos es que los linfocitos T efectores tienen un fenotipo activado o "agotado" dentro del TME (7). Esto indica que, aunque los linfocitos T dentro del TME han visto inicialmente un antígeno cognado, se han activado y traficado al tumor, posteriormente no son capaces de invocar una respuesta antitumoral efectiva. Los linfocitos T activados previamente o agotados se definen por un aumento de la expresión en superficie de los receptores coinhibidores, tales como PD-1 y CTLA-4 (8). El direccionamiento terapéutico a estos receptores coinhibidores con anticuerpos que inhiben las interacciones con sus ligandos cognados ha demostrado una notable eficacia clínica en pacientes con múltiples tipos de cáncer avanzados (9). Mecánicamente, se ha demostrado que el direccionamiento de estos receptores coinhibidores conduce a la expansión de linfocitos T que ya reaccionan ante el tumor y que existen de antemano en el TME y a la producción de agrupaciones de linfocitos T con una diversidad ampliada de receptor de linfocitos T (10) (11) (12). Aunque los inhibidores de puntos de control a día de hoy en la clínica han revolucionado el tratamiento contra el cáncer y han demostrado el poder del sistema inmunitario para combatir el cáncer, muchos pacientes aún experimentan recaídas o no responden al tratamiento. En consecuencia, una mayor comprensión de la respuesta inmunitaria en el cáncer y el direccionamiento a vías que se basan en el sistema inmunitario adicionales llevarán a tratamientos terapéuticos adicionales.

[00619] Entre estas vías novedosas, un grupo de receptores y ligandos dentro de la nectina y la familia de similares a la nectina se encuentra actualmente bajo investigación como posibles nuevos tratamientos contra el cáncer. Los receptores de esta familia incluyen DNAM-1 (CD226), CD96 (TACTILE), TIGIT, y, más recientemente, PVRIG (CD112R) (13) (14) (15). De estas moléculas, DNAM es un receptor de activación dentro de esta subfamilia, el cual se fija a 2 ligandos, PVR (CD155) y PVRL2 (CD112), para enviar una señal de activación a los linfocitos (16). Se ha demostrado que dos receptores de esta familia inhiben la función de los linfocitos humanos, TIGIT, y, más recientemente, PVRIG (17) (18). Se informa que TIGIT tiene una interacción de alta afinidad con PVR, una afinidad mucho más débil con PVRL2, y se ha demostrado que inhibe las respuestas tanto de linfocitos T como de linfocitos NK al enviar una señal inhibidora a los linfocitos a través de su motivo ITSM (19) (20). Más recientemente, se demostró que PVRIG se fija con alta afinidad a PVRL2 y envía una señal inhibidora a

través de su motivo ITIM (15). En ambos casos, la afinidad de TIGIT con PVR y de PVRIG con PVRL2 es mayor que la afinidad de DNAM con ya sea PVR o PVRL2, lo que sugiere que TIGIT y PVRIG pueden superar a PVR y PVRL2 de DNAM, lo que proporciona un mecanismo indirecto mediante el cual TIGIT y PVRIG pueden reducir la función de los linfocitos T. Dentro de esta familia, PVR es también un ligando para CD96. Se ha informado que la función de CD96 inhibe los linfocitos de ratón (21) pero activa los linfocitos humanos (22). En función de estos datos, postulamos que, en los linfocitos humanos, 2 receptores, TIGIT y PVRIG, se fijan con alta afinidad a PVR y PVRL2, respectivamente, para enviar señales inhibidoras para reducir la función de los linfocitos T.

[00620] Aunque se ha demostrado que el PVRIG humano inhibe la respuesta de los linfocitos T en un informe reciente, no se entiende bien el papel de PVRIG y PVRL2 en lo que respecta a la vigilancia inmunitaria del cáncer. En particular, no se han informado el perfil de expresión de esta vía en los tipos de cáncer y el papel de PVRIG en la regulación de las respuestas antitumorales de los linfocitos T CD8. Además, no se han informado la caracterización funcional del gen PVRIG de ratón y el efecto de interrumpir la interacción PVRIG-PVRL2 in vivo en modelos preclínicos de tumores. En la presente, dilucidamos el papel de PVRIG en un entorno de cáncer al informar sobre el perfil de expresión de PVRIG y PVRL2 en cáncer y el efecto del antagonismo de PVRIG en ensayos de cocultivo de células tumorales y en modelos preclínicos de tumores. Demostramos que PVRIG tiene un perfil de expresión diferenciado en subconjuntos de linfocitos T en comparación con TIGIT o CD96 y que la expresión de PVRIG y PVRL2 se indujo en cáncer en comparación con los tejidos adyacentes normales. En múltiples sistemas de ensayo in vitro humanos, un anticuerpo monoclonal antagonista de PVRIG de alta afinidad (CHA.7.518.1.H4(S241P)) mejoró la función de los linfocitos T, en particular cuando se combina con anticuerpos anti-TIGIT o anti-PD1. Además, informamos la caracterización novedosa de PVRIG de ratón mediante el uso de anticuerpos antagonistas o ratones con deficiencia de PVRIG y demostramos que la inhibición de la interacción PVRIG-PVRL2 redujo el crecimiento tumoral, en donde los efectos más potentes se dieron en combinación con la inhibición de PD-1 o la deficiencia genética de TIGIT. En conjunto, estos datos muestran que PVRIG es un receptor inhibidor crítico en la regulación de las respuestas antitumorales de los linfocitos T y dan apoyo al desarrollo de CHA.7.518.1.H4(S241P) para pruebas clínicas en pacientes con cáncer.

Materiales y métodos

Estudios de expresión de sangre periférica y tumores humanos.

[00621] Las PBMC humanas de donantes sanos se obtuvieron de la Universidad de Stanford de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Los tejidos humanos fueron proporcionados por la Red cooperativa de tejido humano, un recurso sustentado por el Instituto nacional del cáncer. El tejido de cáncer humano y los tejidos adyacentes normales emparejados se disociaron en células individuales según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec). Las células disociadas se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de diversas dianas en diferentes subconjuntos de células. Para cada expresión de diana en un subconjunto de células individuales, se calculó un valor de relación de expresión al tomar el valor de MFI de la diana dividido por el valor de MFI del control de isotipo. Otros investigadores pueden haber recibido muestras de estas mismas muestras de tejido. El tipo de tumor se determinó en función de la revisión del informe de patología para cada muestra. Para los estudios de IHC, se utilizaron los anticuerpos anti-PVRL2 (HPA-012759, Sigma) y PD-L1 (Sp142, SpringBio) para teñir micromatrices tumorales (Biochain Institute) mediante el uso de las condiciones descritas en los métodos complementarios. 2 revisores independientes realizaron la puntuación en núcleos duplicados del mismo tumor.

Generación y caracterización de anticuerpos PVRIG.

[00622] Se generaron anticuerpos anti-PVRIG humana y anti-PVRIG de ratón como se detalla en los métodos complementarios. En resumen, la especificidad y afinidad de fijación al anticuerpo se evaluaron mediante la fijación selectiva a células modificadas por ingeniería genética con PVRIG sin una fijación detectable a células que no expresan el gen. La actividad antagonista de estos anticuerpos anti-PVRIG se determinó mediante ensayos que se basan en ELISA y FACS en los que se interrumpió la interacción de PVRIG con PVRL2. Para la caracterización en ensayos a base de células, se analizaron los anticuerpos en varios sistemas de ensayo de cocultivo de linfocitos T-células diana que consisten en células diana que expresan PVRL2 en cultivo con PBMC o linfocitos T derivados de tumores. Se expandieron las líneas de linfocitos T específicos de gp100 a partir de tumores de melanoma tal como se describió anteriormente (23). Los linfocitos T reactivos CMVpp65 se expandieron desde PBMC de donantes sanos (CTL Immunospot) con CMVpp65 (495-503), IL-2 e IL-7 durante 10 días. Para los estudios de combinación, se usaron anticuerpos de PD-1, TIGIT y PVRIG a 10 µg/ml. Se determinaron las concentraciones de citocinas en medios condicionados

mediante el uso de la matriz citométrica de microesferas (CBA) y la tinción con FACS se realizó como se describe en los métodos complementarios.

Caracterización de la expresión y función de PVRIG de ratón.

[00623] Las interacciones de fijación de PVRIG de ratón con mPVRL2 y mPVR se evaluaron con SPR y ELISA mediante proteínas PVRIG, PVRL2 y PVR recombinantes y con FACS mediante líneas celulares que sobreexpresan PVRIG y PVRL2 o líneas celulares transfectadas con PVR o PVRL2 siARN diseñadas ectópicamente. Se generaron ratones con deficiencia de PVRIG y TIGIT como se describe en los métodos complementarios. Se realizó un análisis de expresión para examinar la expresión de PVRIG en bazo, ganglio linfático y tumor en diversos subconjuntos de células. Los ensayos funcionales celulares que demuestran una actividad moduladora de linfocitos T para PVRIG de ratón se establecieron mediante el uso de linfocitos T WT y PVRIG$^{-/-}$ y células diana expresadas ectópicamente con PVRL2 Fc o PVRL2 como se detalla en los materiales y métodos complementarios. Los modelos de tumores CT26, MC38 y B16/Db-hmgp100 se realizaron como se describe en los métodos complementarios. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de Tel-Aviv (Tel-Aviv, Israel) o de la Johns Hopkins University (Baltimore, USA).

Resultados

La expresión de PVRIG es más alta en linfocitos T efectores de sangre periférica y tumores

[00624] La superfamilia de Ig (IgSF) consiste en cientos de proteínas, pero solo algunas de ellas son receptores inhibidores de linfocitos T. Las proteínas de la IgSF tienden a evolucionar rápidamente (24) y por lo tanto la similitud de secuencia entre estas proteínas es generalmente baja y no es óptima para la identificación de receptores inmunitarios novedosos. Para identificar novedosos puntos de control inmunitarios, desarrollamos algoritmos bioinformáticos que se basan en características genómicas y proteómicas compartidas entre los puntos de control inmunitarios conocidos, tales como la estructura génica, los dominios de proteínas, la localización celular prevista y el patrón de expresión. Mediante estos algoritmos, PVRIG fue identificada como un novedoso receptor inmune. Un informe ha también demostrado recientemente que la PVRIG humana (CD112R) se fija a PVRL2 e inhibe la función de los linfocitos T (15). Sin embargo, no se ha informado la relevancia de esta vía en la regulación de la vigilancia

inmunitaria del tumor. Aquí, hemos dilucidado la expresión y función de PVRIG y PVRL2 en tipos de cáncer humanos y modelos preclínicos de tumores. En sangre periférica de donantes sanos, PVRIG se expresó exclusivamente en linfocitos, y su expresión más alta fue en linfocitos T CD8 y linfocitos NK (Figura 83A). El análisis de subconjuntos adicionales de linfocitos T mostró la mayor expresión de PVRIG en los subconjuntos de linfocitos T de memoria/efectores CD8 o CD4 en comparación con el subconjunto Treg (Figura 83B, Figura 90A). El patrón de expresión de linfocitos T predominantemente de memoria diferencia PVRIG de otros receptores en la familia (TIGIT, CD96), que tienden a tener una expresión igual o mayor en Treg en comparación con los linfocitos T de memoria/efectores. También comparamos la cinética de expresión de PVRIG y TIGIT después de la activación de linfocitos T en 2 sistemas de ensayo (respuesta de reactivación de CMV Figura 83C, DC-MLR Figura 83D, Figura 90B) y mostramos que PVRIG ha retrasado la cinética de inducción y una expresión más sostenida en el punto tardío de tiempo en comparación con TIGIT. La expresión preferencial de PVRIG en células de memoria/efectoras en comparación con TIGIT sugiere un papel único para PVRIG en la regulación de las respuestas de linfocitos T.

[00625] La inducción retardada y sostenida de la expresión de PVRIG en los linfocitos T después de la activación sugirió que podría expresarse en el microentorno del tumor. A continuación, analizamos la expresión de PVRIG en leucocitos de tumores humanos disociados directamente ex vivo por FACS. Se detectó la expresión de PVRIG en linfocitos T CD8, linfocitos T CD4 y linfocitos NK de múltiples tipos de tumores (Figura 83E-G, Figura 90C). PVRIG se expresó conjuntamente con PD-1 y TIGIT en linfocitos T CD4 y CD8 (Figura 83F). En promedio, se detectó una mayor expresión en TIL CD4+ y CD8+ de tumores de mama, endometrio, cabeza y cuello, pulmón, riñón y ovario en comparación con de vejiga, colorrectal y de próstata. En muestras de tumores en las que la expresión de PVRIG fue baja o estuvo ausente ex vivo, la activación con anti-CD3 y anti-CD28 mejoró la expresión de PVRIG, lo que sugiere que la expresión de TIL de PVRIG se puede inducir aún más después de la reactivación (Figura 90D). Para los tumores de colon, pulmón, riñón, endometrio y ovario, pudimos obtener tejido adyacente normal del mismo paciente y realizar una comparación de la expresión de PVRIG en linfocitos aislados del tumor y en tejido normal. Los TIL mostraron una inducción significativa de PVRIG en linfocitos T CD4 y CD8 en comparación con células aisladas a partir de tejidos adyacentes normales coincidentes (NAT) (Figura 90E). Al igual que con las PBMC, comparamos aún más la expresión de PVRIG, TIGIT y PD1 en linfocitos Treg y linfocitos T CD8 de tumores de pulmón, endometrio y riñón. En los TIL, la

expresión de TIGIT fue mayor en Treg en comparación con los linfocitos T CD8, mientras que para PVRIG y PD1, se observó una expresión similar o superior en los linfocitos T CD8 en comparación con Treg (Figura 83H). A continuación, examinamos la corregulación de PVRIG, TIGIT y PD-1 en poblaciones de linfocitos T mediante análisis de correlación ya sea de la magnitud de expresión en los TIL ex vivo o de la magnitud de la relación de cambio en la expresión entre tumor y NAT. En ambos análisis, los linfocitos T CD4 y CD8 mostraron una correlación positiva y significativa entre PVRIG y PD1 o TIGIT (Figura 90F). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que el PVRIG se expresa en linfocitos T y NK de múltiples tipos de cáncer humanos, lo que posiciona el PVRIG como una novedosa diana receptora inhibidora que puede ser crítica al regular la función de los linfocitos T en el tumor.

La expresión de PVRL2 está mejorada en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente normal

[00626] Como se ha demostrado que la expresión de PD-L1 ayuda a predecir las respuestas a los inhibidores de PD-1, examinamos si la expresión de PVRL2 era concomitante con la expresión de su receptor cognado, PVRIG, en tejidos de cáncer humano. Mediante un anticuerpo anti-PVRL2 que validamos para teñir muestras de FFPE (Figura 91A), teñimos micromatrices de tumores (TMA) compuestas de tejidos de cáncer de pulmón, colon, piel, mama, ovario/endometrio y riñón y asignamos un puntaje a cada núcleo según la prevalencia e intensidad de la expresión de PVRL2. La expresión de PVRL2 no estaba presente o estaba mínimamente expresada en la mayoría de las muestras de tejido normal de estos órganos. En tejidos tumorales, se detectó la expresión de PVRL2 en células tumorales en alrededor de 50-70 % de los tipos de cáncer de pulmón, colon, mama y ovario/endometrio (Figura 84A, 84F). La expresión en muestras de cáncer de riñón varió de 20 a 40 %, mientras que la expresión en melanoma fue la más baja (~10 %) (Figura 84A, 84F). Se detectó la expresión de PVRL2 en células tumorales y células inmunes en el frente invasivo (Figura 84B). Para determinar los subconjuntos de células inmunitarias específicas que expresan PVRL2, realizamos una citometría de flujo en tumores recién disociados. Se detectó expresión de PVRL2 en células inmunitarias $CD45^+$, particularmente células mieloides (por ejemplo, macrófagos asociados a tumores $CD14^+$ (TAM) y DC mieloides) y en células no inmunitarias $CD45^-$ de múltiples tipos de tumores (Figura 84C, D). No se detectó expresión de PVRL2 en los linfocitos (datos no mostrados). La comparación de la expresión de PVRL2 en células $CD45^-$ y TAM aislados de tumores de colon, pulmón, riñón, endometrio y ovario mostró

una inducción significativa de PVRL2 en células aisladas del tumor en comparación con células aisladas de los NAT coincidentes del mismo donante (Figura 92). Para muestras en las que obtuvimos expresión de PVRIG y PVRL2, se analizó la expresión de PVRIG en linfocitos en comparación con PVRL2 en mieloides y en células $CD45^-$ de múltiples tipos de tumores. De los tipos examinados de cáncer, los tipos de cáncer de endometrio, pulmón y riñón tuvieron la mayor prevalencia de linfocitos $PVRIG^{hi}$ y células no inmunitarias $PVRL2^{hi}$ TAM o $CD45^-$ (Figura 842E, Figura 93). La integración de los datos de las TMA y los estudios disociados de tumores, demostramos que los tumores de mama, endometrio, pulmón, cabeza y cuello, riñón y ovario pueden representar un tipo de tumor que responde al antagonismo de PVRIG.

En comparación con PD-L1, la expresión PVRL2 se regula diferencialmente y está presente en tumores $PD\text{-}L1^-$

[00627] Como PVRIG y PD-1 se pueden expresar conjuntamente en linfocitos que se infiltran en tumores (TIL), también se examinó la expresión conjunta de PVRL2 y PD-L1 en el mismo tumor mediante la tinción de secciones en serie de la misma TMA. La expresión de PVRL2 en linfocitos tumorales se detectó claramente en muestras de tumor $PD\text{-}L1^-$ (tal como se define por la ausencia de tinción membranosa de PD-L1 en células tumorales o células inmunitarias) a razón de una frecuencia y puntuación promedio similares en comparación con las muestras de $PD\text{-}L1^+$. (Figura 85A, Figura 84F). En las células inmunitarias, 3 de 5 tumores en los que se detectó la expresión de PVRL2 en las células inmunitarias también expresaron PD-L1 (datos no mostrados), pero el pequeño número de muestras dificulta la conclusión de la expresión conjunta de células inmunitarias de PD-L1 y PVRL2. La expresión de PVRL2 en células tumorales en tumores negativos PD-L1 sugería que la expresión de PVRL2 era más frecuente que PD-L1 en algunos tipos de tumores y que el direccionamiento de esta vía puede ser particularmente eficaz en tumores $PD\text{-}L1^-$. Mientras que PD-L1 se ve inducida principalmente por IFN-γ como un mecanismo de resistencia adaptativa (28), PVRL2 se ve modulada por el estrés genómico, daño del ADN, y genes supresores de tumores (29,30). Para comprender mejor la distinta regulación de PD-L1 y PVR/PVRL2, a continuación evaluamos la regulación de la expresión de PVR, PVRL2 y PD-L1 en líneas celulares tumorales y en DC derivadas de monocitos mediante la exposición a diversos estímulos inflamatorios (Figura 85D). El tratamiento de las DC con señales proinflamatorias generalmente conduce a un aumento de la expresión de PVR, PVRL2 y PD-L1, lo que demuestra que la expresión de PVR, PVRL2 y PD-L1 aumenta con la

maduración de las DC. Por el contrario, el tratamiento de las células epiteliales con IFN-γ aumentó la expresión de PD-L1 pero no tuvo efecto alguno sobre la alta expresión inicial de PVRL2 (Figura 85E), lo que da apoyo a la regulación diferencial de la expresión de PVRL2 en comparación con PD-L1 por parte de IFN-γ. En resumen, estos hallazgos indican que PD-L1 y PVRL2 se pueden regular conjuntamente en las células presentadoras de antígeno (APC), como las DC, pero que se pueden regular de manera diferencial en las células epiteliales. La presencia de PVRL2 en los tumores PD-L1-negativos sugiere que el direccionamiento a esta vía puede ser potencialmente beneficioso en los casos de pacientes que no responden a inhibidores de PD-1 o que no progresan sobre la base de estos.

CHA.7.518.1.H4(S241P) es un anticuerpo monoclonal humanizado de alta afinidad con respecto a PVRIG que interrumpe la interacción de PVRIG y PVRL2

[00628] Para examinar las consecuencias funcionales de antagonizar las interacciones de PVRIG-PVRL2 humanas, generamos un anticuerpo anti-PVRIG antagonista de alta afinidad, CHA.7.518.1.H4(S241P), que bloquea la interacción de PVRIG y PVRL2. Este anticuerpo se fijó selectivamente a las células HEK293 que expresan ectópicamente PVRIG humana o PVRIG de *Macaca fascicularis* y también fijó células Jurkat que expresan endógenamente PVRIG con afinidad subnanomolar (Figura 86A). En ensayos bioquímicos, CHA.7.518.1.H4(S241P) bloqueó la interacción de PVRIG Fc con células PVRL2$^+$ HEK293 (Figura 86B) y también bloqueó la fijación de PVRL2 Fc a células PVRIG$^+$ HEK293 (Figura 86C). Mediante el uso de este anticuerpo, observamos un efecto funcional de un anti-PVRIG antagónico en varios ensayos de linfocitos T. Las células presentadoras de antígeno artificial (aAPC) y que expresan ectópicamente un anticuerpo anti-CD3 de superficie celular y PVRL2 humana se generaron y cocultivaron con linfocitos T CD4 humanos primarios, ya sea en presencia de anti-PVRIG (CHA.7.518.1.H4(S241P)) o control de isotipo. La expresión de PVRIG se indujo en linfocitos T CD4 en proliferación después del cocultivo con CHO anti-CD3 aAPC (Figura 94A). El antagonismo de PVRIG con CHA.7.518.1.H4(S241P) aumentó la proliferación de linfocitos T CD4 de múltiples donantes (Figura 86D). También analizamos el efecto de anti-PVRIG en 2 líneas humanas de linfocitos T CD8 que reaccionan ante gp100 que se derivaron de tumores de melanoma. Estas líneas de linfocitos T se cocultivaron individualmente con aAPC que expresan HLA-A2 y PVRL2 (Figura 94B) en presencia de anticuerpos IgG de control de isotipo o anticuerpos anti-PVRIG. Como se observó en ambas líneas, el anti-PVRIG aumentó la producción de

IFN-γ y TNF-α en un ~20-50 %. En una evaluación de respuesta a la dosis, CHA.7.518.1.H4(S241P) mostró valores nanomolares de un solo dígito de EC50 en múltiples ensayos (Figura 94C, D). Estos datos demuestran colectivamente que la antagonización de las interacciones de PVRIG-PVRL2 con CHA.7.518.1.H4(S241P) dio como resultado un aumento de la activación de los linfocitos T.

CHA.7.518.1.H4(S241P), en combinación con inhibidores de TIGIT o PD-1, dio como resultado una mejora sinérgica de la función de los linfocitos T.

[00629] La combinación del bloqueo de PVRIG y TIGIT aumentó de forma sinérgica la función de los linfocitos T CD4 en un ensayo de cocultivo de linfocitos T-células dendríticas (15), lo que sugiere un papel para esta vía en la regulación de las interacciones linfocitos T-APC. No se han informado los efectos del bloqueo de PVRIG y TIGIT en los linfocitos T CD8 en un entorno de cocultivo de células tumorales. Como nuestro perfil de expresión tumoral demostró la expresión de PVRL2 en células inmunitarias $CD45^-$, exploramos adicionalmente el efecto del direccionamiento a esta vía en los cocultivos de linfocitos T-células tumorales mediante 2 sistemas de ensayo de linfocitos T. Primero realizamos un cocultivo de 2 líneas de linfocitos T CD8 específicos de antígeno de tumor de gp100 y una línea celular de melanoma, MEL624, en presencia de anticuerpos anti-PVRIG, anti-TIGIT o de control de isotipo, ya sea individualmente o en combinación. Las células MEL624 expresan tanto PVR como PVLR2 y tanto TIL-209 como TIL-463 expresaron PVRIG, TIGIT y PD-1 (Figura 86F). En TIL-209, observamos que el anti-PVRIG o anti-TIGIT solo no aumentaron IFN-γ y que la combinación de anti-PVRIG y anti-TIGIT aumentó la producción de IFN-γ sinérgicamente (Figura 86G). En TIL-463, observamos que el anti-PVRIG o anti-TIGIT aumentaron modestamente la producción de IFN-γ, y que la combinación de anti-PVRIG y anti-TIGIT aumentó adicionalmente IFN-γ (Figura 86G). En un sistema de ensayo adicional, utilizamos linfocitos T CD8 que reaccionan ante CMVpp65 como un sistema modelo para estudiar las respuestas de linfocitos T humanos. Los linfocitos T CD8 HLA-$A2^+$ CMVpp65 se expandieron en presencia de CMVpp65 (495-503) y se observó la expresión de PVRIG, TIGIT y PD-1 el día 10 (Figura 86F). PVRIG se expresó en linfocitos T CD8 específicos de CMVpp65 en una magnitud similar a la observada en muestras de cáncer humano (Figura 83). Como células diana, identificamos las líneas celulares de cáncer PD-$L1^{hi}$ (Panc05.04) y PD-$L1^{lo}$ (Colo205) HLA-$A2^+$ que expresaban cantidades similares de PVR y PVRL2 (Figura 86F). A continuación, realizamos un cocultivo de los linfocitos T que reaccionan ante CMVpp65 con líneas celulares de tumor

HLA-A2^{+} pulsadas con péptido pp65 (495-503) en presencia de anticuerpos de bloqueo de PVRIG, TIGIT y/o PD-1. Observamos que el anticuerpo anti-PVRIG incrementó IFN-γ en ~50 % en el cocultivo con células Panc05.04 y mínimamente en el cocultivo con Colo205 (Figura 86I). La combinación de anti-TIGIT con anticuerpo anti-PVRIG incrementó de forma sinérgica la producción de IFN-γ en ambas líneas celulares diana, lo que resultó en un mayor aumento de IFN-γ en comparación con el anticuerpo PD-1 en soledad (Figura 86H). La combinación de anti-PVRIG y anti-PD-1 también condujo a aumentos sinérgicos en la producción de IFN-γ en comparación con el anticuerpo individual (Figura 86I). En conjunto, estos datos sugieren una potente sinergia que surge de combinar PVRIG y TIGIT o el bloqueo de PD1 y PVRIG para aumentar la activación de linfocitos T CD8 humanos tras la interacción con linfocitos tumorales.

La deficiencia de PVRIG dio como resultado un aumento de la proliferación de linfocitos T y un menor crecimiento tumoral

[00630] Aunque se han informado la secuencia para PVRIG de ratón y su interacción con PVRL2 de ratón, no se conocen bien el perfil de expresión y la actividad moduladora inmunitaria de PVRIG de ratón. Primero analizamos la expresión de ARN de mPVRIG y la transcripción en linfocitos NK, NKT y T (Figura 87A). Los linfocitos T CD8 de ratón activados tenían transcritos elevados de PVRIG con cinética retardada de inducción en comparación con TIGIT (Figura 87B). Confirmamos que esa mPVRIG recombinante se fijó a la proteína mPVRL2 por resonancia de plasmón de superficie (SPR) y ELISA realizados en varias orientaciones de ensayo (Figura 95A-D). También observamos una interacción entre mPVRIG y mPVR, aunque la afinidad fue alrededor de 10 veces inferior a la interacción con mPVRL2 (Figura 95E). Para determinar si PVR o PVRL2 es el ligando dominante para mPVRIG, analizamos la fijación de PVRIG Fc de ratón a células B16F10 que expresan PVR y PVRL2 (datos no mostrados). PVRIG Fc mostró una fijación dependiente de la dosis a las células B16F10 que se eliminó por completo con la inactivación de siARN de PVRL2 en las células B16F10 (Figura 95F). En comparación, la fijación de la proteína de fusión PVRIG Fc se redujo ligera pero consistentemente después de la inactivación de PVR (Figura 95F), lo que sugiere que se produce una interacción muy débil entre mPVRIG y mPVR. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que, en los ratones, PVRL2 es el ligando principal para PVRIG, como es el caso en el humano.

Para delinear el papel de PVRIG en las respuestas inmunitarias, generamos ratones con deficiencia de PVRIG ($^{-/-}$) (Figura 96). Los ratones con PVRIG$^{-/-}$ nacieron con las

proporciones mendelianas esperadas, no mostraron fenotipo manifiesto hasta los 10 meses de edad, y a las 8 semanas de edad tenían una celularidad leucocitaria similar (tejido periférico y linfoide) en comparación con los ratones de tipo silvestre (Figura 97). Los linfocitos T CD8 de tipo silvestre (WT) y los linfocitos NK expresan PVRIG y no se detectó expresión de PVRIG en células PVRIG$^{-/-}$ (Figura 87C). Para examinar el papel de PVRIG en la regulación de las respuestas de linfocitos T de ratón, examinamos la proliferación de linfocitos T WT y PVRIG$^{-/-}$ en 2 sistemas de ensayo. Los linfocitos T WT o PVRIG$^{-/-}$ se activaron con anti-CD3 inmovilizado en presencia de PVRL2 Fc soluble o proteína Fc de control. PVRL2 Fc soluble inhibió significativamente la proliferación de linfocitos T CD4^{+} WT pero no la proliferación de linfocitos T CD4^{+} PVRIG$^{-/-}$ (Figura 87D), lo que sugiere que las células PVRIG$^{-/-}$ carecen de una señal inhibidora. Para evaluar el papel de PVRIG de ratón en la interacción de linfocitos T CD8^{+} con linfocitos tumorales, los ratones con PVRIG$^{-/-}$ fueron criados para ratones transgénicos pmel TCR, que expresan un TCR transgénico específico de gp100$_{25-33}$ (28). Los linfocitos T CD8+ PVRIG$^{-/-}$ o WT Pmel activados se cocultivaron con células tumorales de melanoma B16-Db/gp100 que expresan endógenamente PVRL2 (datos no mostrados) y se evaluó la activación y función efectora. Los linfocitos T CD8^{+} PVRIG$^{-/-}$ pmel mostraron una desgranulación y producción mejoradas de citocinas efectoras (IFN-γ y TNF-α) en comparación con células WT (Figura 87E). Estos datos indican que la PVRIG de ratón inhibe la activación y la función efectora de los linfocitos T específicos de tumor en el cocultivo con células diana de tumor PVRL2^{+}.

[00631] A continuación, estudiamos los efectos de la deficiencia de PVRIG en el crecimiento tumoral en el modelo singénico MC38. Los ratones con PVRIG$^{-/-}$ mostraron un crecimiento tumoral significativamente reducido en comparación con los ratones WT ($p < 0,05$; Figura 88A-B). Además, el bloqueo de PD-L1, iniciado el día 14, amplificó aún más las respuestas antitumorales y redujo el crecimiento tumoral en ratones con PVRIG$^{-/-}$ en comparación con ratones WT tratados con anti-PD-L1 ($p = 0,052$) (Figura 88C-D). Para evaluar los efectos funcionales del bloqueo de PD-L1 en microambientes tumorales de PVRIG$^{-/-}$ y WT, recolectamos tumores y ganglios linfáticos de drenaje de tumores de cada una de las cuatro cohortes experimentales en el día 18, cuando los grupos habían recibido 2 dosis de isotipo o de anti-PD-L1, pero no se observaron diferencias en el volumen del tumor, y se realizó citometría de flujo para determinar la composición del subconjunto inmunitario y las citocinas intracelulares. El tráfico de células inmunitarias (CD45^{+}) hacia los tumores PVRIG$^{-/-}$ se mejoró moderadamente (88 % en relación con los tumores WT) al igual que los linfocitos T CD8^{+} (92 % en comparación con los tumores

WT) y los linfocitos T $CD8^+$ que producen IFN-γ (110 % de aumento sobre los tumores WT; Figura 88E). En combinación con el bloqueo de PD-L1, la infiltración de células $CD45^+$ aumentó significativamente en los tumores $PVRIG^{-/-}$ (160 % en relación con los tumores de ratones WT tratados con anti-PD-L1; p = 0,032; Figura 88F). Los tumores $PVRIG^{-/-}$ tratados con anti-PD-L1 también tuvieron un mayor número de linfocitos T $CD8^+$ totales por peso tumoral (aumento del 252 %) y linfocitos T CD8+ que producen IFN-γ (297 % de aumento), en comparación con los tumores WT tratados con anti-PD-L1 (Figura 88F). También observamos que los ratones $PVRIG^{-/-}$ tenían linfocitos T CD4+ que infiltran tumores efectores no alterados y números de Treg $Foxp3^+$ Treg independientemente del bloqueo de PD-L1 (datos no mostrados). El rescate de la disfunción inmunitaria en los tumores $PVRIG^{-/-}$, particularmente después del bloqueo de PD-L1, se reflejó en los ganglios linfáticos que drenan el tumor, los cuales tenían frecuencias aumentadas de linfocitos T $CD8^+$ efectores de IFN-γ^+TNF-□$^+$ en comparación con los ratones WT tratados con anti-PD-L1 (Figura 88G-H). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la ablación de PVRIG da como resultado una reducción del crecimiento tumoral asociada con un aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral, en particular al combinarse con el tratamiento con anticuerpo anti-PD-L1.

El anticuerpo anti-mPVRIG inhibió el crecimiento tumoral en combinación con el anticuerpo PD-1 o la deficiencia de TIGIT

[00632] Luego de demostrar que la deficiencia genética de PVRIG redujo el crecimiento del tumor, nuestro siguiente objetivo fue demostrar que la inhibición de la interacción PVRIG-PVRL2 mediada por anticuerpos podría mejorar la inmunidad antitumoral, particularmente en combinación con inhibidores de PD1 o TIGIT, como han demostrado nuestros datos in vitro en humanos. Para evaluar esto, generamos un anticuerpo anti-mPVRIG antagonista de alta afinidad. Las evaluaciones de afinidad de mAb anti-mPVRIG determinadas mediante FACS mostraron una Kd subnanomolar (0,33 nM en HEK293 mPVRIG, 0,39 nM en células D10.G4.1), similar a CHA.7.518.1.H4(S241P) (Figura 95G-H). La especificidad de este anticuerpo se confirmó adicionalmente, ya que la mayor parte de la fijación a las células D10.G4.1 se anuló con la inactivación de mPVRIG (Figura 95I). Se analizó anti-mPVRIG para interrumpir la interacción mPVRIG-mPVRL2 mediante la inhibición de la fijación de mPVRIG Fc a B16F10 y la fijación de mPVRL2 Fc a células HEK293 que sobreexpresan mPVRIG (Figura 89A). El bloqueo completo de la interacción PVRIG-PVRL2 por parte del anticuerpo anti-mPVRIG se observó en ambos formatos de ensayo (Figura 89A,

Figura 95J), y mostró un anticuerpo anti-mPVRIG antagonista. A continuación, analizamos la eficacia in vivo del bloqueo de mPVRIG en un modelo de tumor de colon subcutáneo CT26 singénico. La expresión de PVRIG se elevó en los linfocitos NK y T en el microentorno del tumor, en comparación con los correspondientes subconjuntos de ganglios linfáticos esplénicos o drenantes (Figura 89B). El tratamiento de ratones portadores de tumores con mAb de bloqueo de anti-mPVRIG como monoterapia no logró reducir el crecimiento tumoral (datos no mostrados). Sin embargo, la combinación de mAb anti-PVRIG y anti-PD-L1 retrasó efectivamente el crecimiento del tumor CT26 (Figura 89C) y aumentó significativamente la supervivencia de los ratones tratados con una tasa de respondedores completos del 40 % (Figura 89D). De acuerdo con nuestros datos de ensayo de linfocitos T humanos, estos datos demuestran que la combinación de inhibidores de PD-1 y PVRIG puede reducir el crecimiento tumoral.

[00633] También analizamos el efecto de la ablación de la señalización de tanto PVRIG como TIGIT en la regulación de las respuestas antitumorales. Para estos estudios, analizamos la eficacia del anticuerpo anti-mPVRIG en ratones WT o TIGIT$^{-/-}$ inoculados con células de melanoma B16F10/Db-hmgp100. El tratamiento de ratones WT portadores de tumores con mAb de bloqueo de anti-mPVRIG tuvo un efecto menor en comparación con el tratamiento con isotipo (17 % de TGI en el día 11 y 8 % de TGI al final del estudio, día 18). El efecto de la eliminación de TIGIT sobre el crecimiento del tumor fue menor también, en comparación con el grupo de control WT (17 % de TGI en el día 11 y 13 % de TGI al final del estudio). Sin embargo, cuando la eliminación de TIGIT se combinó con tratamiento con mAb anti-PVRIG, se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral (63 % en el día 11 y 49 % de TGI al final del estudio (Figura 89E, F). De acuerdo con la inhibición del crecimiento tumoral, los ratones TIGIT$^{-/-}$ tratados con mAb anti-PVRIG 407 mostraron una mayor supervivencia en comparación con el grupo de control WT; sin embargo, no se alcanzó una importancia estadística en este agresivo modelo de tumor de rápido crecimiento (datos no mostrados). En conjunto, estos datos demuestran la actividad sinérgica de los inhibidores de PVRIG con los inhibidores de PD1 o TIGIT y están de acuerdo con nuestros datos funcionales humanos que proporcionan la base para las pruebas clínicas de CHA.7.518.1.H4(S241P) con inhibidores de PD1 o TIGIT.

Análisis

[00634] Aunque los anticuerpos dirigidos a los puntos de control de los linfocitos T inmunes, tales como CTLA4 y PD-1, han aumentado la supervivencia de los pacientes

con cáncer, la mayoría de los pacientes con cáncer todavía no muestran un beneficio clínico. Una posible razón para esto es la presencia de reguladores adicionales de linfocitos T que inhiben la inmunidad antitumoral de los linfocitos T. Aquí, dilucidamos el papel de PVRIG en la regulación de la función de los linfocitos T efectores y demostramos que el antagonismo de PVRIG aumenta las respuestas antitumorales de los linfocitos T y reduce el crecimiento tumoral.

[00635] PVRIG es un miembro novedoso de la familia de la nectina y de similares a la nectina, y se ubica entre varios receptores inmunorreguladores conocidos en la familia. Comprender la interacción de los receptores dentro de esta familia es crucial para comprender la relevancia y el mecanismo de acción de PVRIG. De estos receptores, DNAM, TIGIT y CD96 están más estrechamente relacionados con PVRIG en términos de compartir los mismos ligandos, PVR y PVRL2. DNAM se une tanto a PVR como a PVRL2 y envía una señal coestimuladora a los linfocitos. Se informa que TIGIT se fija a PVR y débilmente a PVRL2. No pudimos detectar una interacción entre TIGIT y PVRL2 mediante ELISA o SPR (datos no mostrados), lo que sugiere que PVR es el ligando dominante para TIGIT. Mediante métodos similares, detectamos, junto con un informe reciente, una interacción de alta afinidad entre PVRL2 y PVRIG, lo que sugiere que PVRIG es el receptor inhibidor dominante de PVRL2. Estos datos sugieren que TIGIT y PVRIG comprenden nodos de señalización dual en este eje y que el bloqueo de ambos es necesario para el aumento máximo de la activación de linfocitos T dentro de esta familia. Además de interactuar con diferentes ligandos, observamos que PVRIG tiene la mayor expresión en linfocitos T efectores o de memoria, similar a PD-1, mientras que TIGIT tiene la mayor expresión en linfocitos T reguladores. Además, observamos que PVRIG mostraba una inducción tardía después de la activación de los linfocitos T en comparación con TIGIT. Estos datos sugieren que PVRIG tiene un rol único dentro de esta familia, al interactuar con alta afinidad con PVRL2 y al tener una expresión diferenciada en células de memoria y un perfil de inducción tardía con respecto a TIGIT.

[00636] Aquí se informó sobre el papel novedoso de PVRIG en la regulación de las respuestas de los linfocitos T antitumorales mediante ratones con deficiencia de PVRIG y anticuerpos anti-PVRIG antagonistas. Aquí se demostró que la PVRIG de ratón se expresó en linfocitos T y NK, inducida por activación de linfocitos, y es más alta en el TME en comparación con la periferia. Además, mostramos que la deficiencia de PVRIG condujo a un aumento de la función de los linfocitos T in vitro y a una reducción del crecimiento tumoral in vivo. Un anticuerpo antagonista con respecto a PVRIG redujo el

crecimiento tumoral al combinarse con anti-PD-L1 o la deficiencia genética de TIGIT, lo que demuestra el papel necesario de PVRIG en la regulación de las respuestas de los linfocitos T. Estos nuevos datos proporcionan una prueba de concepto in vivo mediante modelos preclínicos de tumores de que el direccionamiento a PVRIG en combinación con el antagonismo de PD1 o TIGIT es un tratamiento novedoso potencial para el tratamiento de tipos de cáncer.

[00637] Aquí se informó sobre un anticuerpo anti-PVRIG humano de alta afinidad que interrumpe la interacción de PVRIG y PVRL2, el cual estamos buscando poner a prueba en ensayos clínicos. Para determinar las posibles indicaciones de cáncer que podrían informar sobre la selección de pacientes en ensayos clínicos, examinamos el perfil de expresión de este eje en tipos de cáncer humanos mediante FACS e IHC. Para PVRIG, observamos que la expresión media de PVRIG en linfocitos T CD4 y CD8 por FACS es más alta en los tipos de cáncer de endometrio, pulmón, riñón y ovario, aunque esta diferencia no logró una diferencia estadística con respecto a otros tipos de cáncer, según lo determinado por ANOVA mediante una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con el número actual de muestras. Como el PVRIG se induce con la activación de los linfocitos T y dado que la mayoría de los linfocitos T que infiltran tumores tienen experiencia con antígenos, tal vez no sorprenda que la mediana de la expresión de PVRIG haya sido similar en todas las muestras de tumores y tipos de cáncer. Observamos que la expresión de PVRIG estaba correlacionada con la expresión de PD-1 y TIGIT, lo que sugiere que la interacción de estos 3 receptores inhibidores será importante para regular la respuesta antitumoral. En este informe, observamos un aumento sinérgico de la función de los linfocitos T cuando los anticuerpos PVRIG se combinaron con los anticuerpos TIGIT en un cocultivo de linfocitos tumorales de linfocitos T CD8, mejor que PD-1 en combinación con inhibidores de PVRIG o TIGIT. Estos datos, junto con un estudio anterior que demuestra el papel de PVRIG y TIGIT en la regulación de las interacciones de DC-linfocitos T, muestran que esta vía podría estar involucrada en la regulación de las interacciones de los linfocitos T-APC y de los linfocitos T-linfocitos tumorales, y proporcionan múltiples mecanismos mediante los cuales el direccionamiento a PVRIG podría aumentar la respuesta inmunitaria antitumoral.

[00638] Como la expresión de PD-L1 se ha correlacionado con la respuesta clínica a los inhibidores de PD-1, también analizamos la expresión de PVRL2 en tumores mediante FACS e IHC para evaluar si ciertos tipos de cáncer tienen una expresión

mayor. Al evaluar los linfocitos tumorales disociadas, observamos que la expresión media de PVRL2 en macrófagos de muestras de endometrio, cabeza y cuello, riñón, pulmón y ovario fue mayor en comparación con otros tipos de tumor. La expresión media de PVRL2 en células no inmunes $CD45^-$ fue mayor en cáncer de mama, colorrectal, de endometrio, de pulmón, de ovario y de próstata en comparación con otros cánceres. En virtud de la expresión de PVRIG y PVRL2, determinamos que los tipos de cáncer de endometrio, cabeza y cuello, pulmón, riñón y ovario tienen una mayor incidencia de tumores con alta expresión de PVRIG y PVRL2 y que estos son potenciales tipos de cáncer que podrían responder a los inhibidores de esta vía.

[00639] Aquí se observó que la expresión de PVRL2 se puede modular en células productoras de antígeno in vitro mediante mediadores inflamatorios, mientras que la expresión de PVRL2 en células cancerosas no se alteró. Estos datos sugieren que la expresión de PVRL2 en células presentadoras de antígeno puede estar regulada por inflamación y podría ser un indicador de un tumor inflamado. De hecho, sí observamos que todos los tumores PD-L1+ también expresan PVRL2, tanto en los linfocitos tumorales como en el compartimento inmunitario. La expresión de PVRL2 en células mieloides podría ayudar a predecir las respuestas a los inhibidores de PVRIG en un contexto de combinación con PD-1 o TIGIT para mejorar aún más el efecto antitumoral. Curiosamente, una parte de los tumores negativos de PD-L1 también expresaron PVRL2, principalmente en los linfocitos tumorales y no en las células inmunes. Se informa que la expresión de PVR y PVRL2 en células epiteliales se induce en la tumorigénesis, así como en respuesta al estrés y al daño del ADN. Estos datos son consistentes con los hallazgos *in vitro de* que la regulación de la expresión de PVRL2 en linfocitos tumorales no depende de IFN-g. Como PD-L1 se induce en un contexto de resistencia adaptativa en respuesta a IFN-g y se asocia con una respuesta inflamatoria, la expresión de PVRL2 en ausencia de PD-L1 sugiere que la expresión de PVRL2 es más prevalente que PD-L1 y que PVRL2 se expresa en tumores no inflamados. Sobre la base de lo anterior, es posible que la presencia de PVR y PVRL2 contribuya a suprimir las respuestas inmunitarias independientemente de PD-L1 y que los inhibidores de PVRIG y TIGIT puedan ser de particular importancia en pacientes que son PD-L1 negativos o no respondedores/progresores con respecto a los inhibidores de PD-1.

[00640] En resumen, este informe proporciona varias ideas novedosas sobre la biología de PVRIG, las cuales incluyen caracterizar la expresión de este eje en los tipos humanos de cáncer, demostrar un papel destacado de PVRIG/TIGIT en la regulación

de la interacción de las células CD8-tumorales, y mostrar que el antagonismo de PVRIG, en combinación con la inhibición de PD-1 o la deficiencia de TIGIT, conduce a una reducción sinérgica del crecimiento tumoral. Estos datos amplían nuestra comprensión actual de la biología de PVRIG y proporcionan una base para las pruebas clínicas de CHA.7.518.1.H4(S241P), un anticuerpo anti-PVRIG de alta afinidad, en pacientes con cáncer.

Referencias

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell **2000**; 100 (1): 57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell **2011**; 144 (5): 646-74 doi 10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C*, et al.* Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. J Pathol **2014**; 232 (2): 199-209 doi 10.1002/path.4287.
4. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. Immunity **2013**; 39 (1): 74-88 doi 10.1016/j.immuni.2013.06.014.
5. Danilova L, Wang H, Sunshine J, Kaunitz GJ, Cottrell TR, Xu H*, et al.* Association of PD-1/PD-L axis expression with cytolytic activity, mutational load, and prognosis in melanoma and other solid tumors. Proc Natl Acad Sci USA **2016**; 113 (48): E7769-E77 número 10.1073/pnas.1607836113.
6. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. Nat Rev Cancer **2016**; 16 (5): 275-87 doi 10.1038/nrc.2016.36.
7. Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. Clin Cancer Res **2016**; 22 (8): 1856-64 doi 10.1158/1078-0432.CCR-15-1849.
8. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer **2012**; 12 (4): 252-64 doi 10.1038/nrc3239.
9. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. Cell **2015**; 161 (2): 205-14 doi 10.1016/j.cell.2015.03.030.
10. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M*, et al.* Mejora de la supervivencia con la estabilidad del clonotipo de linfocitos T después del tratamiento con anti-CTLA-4 en pacientes con cáncer. Sci Transl Med **2014**; 6 (238): 238ra70 doi 10.1126/scitranslmed.3008211.

11. Robert L, Tsoi J, Wang X, Emerson R, Homet B, Chodon T*, et al.* CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. Clin Cancer Res **2014**; 20 (9): 2424-32 doi 10.1158/1078-0432.CCR-13-2648.
12. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L*, et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature **2014**; 515 (7528): 568-71 doi 10.1038/nature13954.
13. Chan CJ, Andrews DM, Smyth MJ. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. Curr Opin Immunol **2012**; 24 (2): 246-51 doi 10.1016/j.coi.2012.01.009.
14. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. Nat Rev Immunol **2015**; 15 (4): 243-54 doi 10.1038/nri3799.
15. Zhu Y, Paniccia A, Schulick AC, Chen W, Koenig MR, Byers JT*, et al.* Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. J Exp Med **2016**; 213 (2): 167-76 doi 10.1084/jem.20150785.
16. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B*, et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. J Exp Med **2003**; 198 (4): 557-67 doi 10.1084/jem.20030788.
17. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B*, et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. Nat Immunol **2009**; 10 (1): 48-57 doi 10.1038/ni.1674.
18. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A*, et al.* The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA **2009**; 106 (42): 17858-63 doi 10.1073/pnas.0903474106.
19. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y*, et al.* The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. Cancer Cell **2014**; 26 (6): 923-37 doi 10.1016/j.ccell.2014.10.018.
20. Zhang B, Zhao W, Li H, Chen Y, Tian H, Li L*, et al.* Immunoreceptor TIGIT inhibits the cytotoxicity of human cytokine-induced killer cells by interacting with CD155. Cancer Immunol Immunother **2016**; 65 (3): 305-14 doi 10.1007/s00262-016-1799-4.
21. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L*, et al.* The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of

natural killer cell functions. Nat Immunol **2014**; 15 (5): 431-8 doi 10.1038/ni.2850.

22. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). J Immunol **2004**; 172 (7): 3994-8.
23. Machlenkin A, Uzana R, Frankenburg S, Eisenberg G, Eisenbach L, Pitcovski J*, et al.* Capture of tumor cell membranes by trogocytosis facilitates detection and isolation of tumor-specific functional CTLs. Cancer Res **2008**; 68 (6): 2006-13 doi 10.1158/0008-5472.CAN-07-3119.
24. Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. Immunogenetics **2011**; 63 (7): 417-28 doi 10.1007/s00251-011-0519-7.
25. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL*, et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. Sci Transl Med **2012**; 4 (127): 127ra37 doi 10.1126/scitranslmed.3003689.
26. Cerboni C, Fionda C, Soriani A, Zingoni A, Doria M, Cippitelli M*, et al.* The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D and DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. Front Immunol **2014**; 4: 508 doi 10.3389/fimmu.2013.00508.
27. de Andrade LF, Smyth MJ, Martinet L. DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. Immunol Cell Biol **2014**; 92 (3): 237-44 doi 10.1038/icb.2013.95.
28. Overwijk WW, Tsung A, Irvine KR, Parkhurst MR, Goletz TJ, Tsung K*, et al.* gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self"-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. J Exp Med **1998**; 188 (2): 277-86.

S. EJEMPLO 19: ENSAYO DE INACTIVACIÓN DE LINFOCITOS TUMORALES

[00641] Se evaluó el efecto de un anticuerpo anti-TIGIT humano y CHA.7.518.1.H4(S241P), ya sea en soledad o en combinación, sobre la inactivación de células tumorales mediante un ensayo de cocultivo in vitro con linfocitos T CD8+ humanos específicos de CMV. Las líneas celulares diana HLA-$A2^+$ utilizadas en el ensayo fueron la línea celular de melanoma, Mel624, que expresa de forma estable PVR y PVRL2 humanas, y la línea celular de adenocarcinoma pancreático, Panc05.04, que expresa niveles endógenos de PVR y PVRL2 humanas. Ambas líneas de células

tumorales se transdujeron de forma estable con un gen indicador de luciferasa mediante transducción lentiviral (System Biosciences). Las células Mel624 y Panc05.04 se pulsaron con el péptido pp65 de CMV a razón de 0,0033 µg/ml o 0,01 µg/ml a 37 °C durante 1 hora, respectivamente. Se lavaron entonces las células y se colocaron en placas a razón de 20.000 células/cavidad. Un anticuerpo anti-TIGIT humano de referencia y CHA.7.518.1.H4(S241P) se agregaron al cultivo en combinación, o con un anticuerpo de isotipo hIgG4 de control a razón de 10 µg/ml. Se agregaron linfocitos T CD8+ humanos específicos de CMV de tres donantes diferentes, especificados como donante 4, donante 72 y donante 234 a razón de 100.000 células/cavidad. Los cocultivos se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Después de la incubación, las placas se retiraron de la incubadora y se las dejó para que se equilibren a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó sustrato de luciferasa Bio-Glo (Promega) a cada cavidad y la mezcla se equilibró durante 10 minutos a temperatura ambiente a resguardo de la luz. Se cuantificó la luminiscencia o las unidades relativas de luz (RLU) en un lector de etiquetas múltiples EnVision (Perkin Elmer) con un detector de luminiscencia ultra sensible. Se calculó el porcentaje específico de inactivación mediante [(RLU para el tratamiento del anticuerpo - RLU para el medio solo)/RLU para el medio solo] x 100.

Resultados

[00642] Las Figuras 99A y B muestran el efecto del anticuerpo anti-TIGIT y el tratamiento con CHA.7.518.1.H4(S241P) sobre la inactivación de las células Mel624 y Panc05.04, respectivamente. Cuando se agregan al cocultivo en soledad, tanto el anticuerpo anti-TIGIT como CHA.7.518.1.H4(S241P) indujeron una inactivación significativa de linfocitos T de las líneas de células tumorales en comparación con el anticuerpo de control de isotipo. Para el anticuerpo anti-TIGIT, el porcentaje específico de inactivación fue de 19-41 % para las células Mel624 y de 3-44 % para las células Panc05.04 en los 3 diferentes donantes reactivos a CMV analizados. Para CHA.7.518.1.H4(S241P), el porcentaje específico de inactivación fue de 16-20 % para las células Mel624 y de 0,21-29 % para las células Panc05.04. En algunos casos, se observó un efecto aditivo sobre la inactivación de células tumorales en el tratamiento combinado de anticuerpo anti-TIGIT y CHA.7.518.1.H4(S241P).

[00643] Para determinar si el efecto de un anticuerpo anti-TIGIT y CHA.7.518.1.H4(S241P) en la inactivación de células tumorales fue dependiente de la dosis, el ensayo se realizó con una serie de dilución de 10 puntos y 2 veces para cada anticuerpo a partir de 0,5 µg/ml para los anticuerpos anti-TIGIT, y de 10 µg/ml para

CHA.7.518.1.H4(S241P) (Figura 100). La inactivación de Mel624 disminuyó de una manera dependiente de la dosis al combinarse ya sea el anticuerpo anti-TIGIT, BM26 o CPA.9.086 con CHA.7.518.1.H4(S241P). Se observó una inactivación más potente en la combinación de CPA.9.086 y CHA.7.518.1.H4(S241P), que tiene una EC_{50} de 0,40 ± 0,49 nM, en comparación con la combinación de BM26 y CHA.7.518.1.H4(S241P), que tiene una EC_{50} de 2,6 ± 1,7 nM.

T. EJEMPLO 20: MEDICIÓN BIOFÍSICA DE K_D

[00644] Los experimentos de equilibrio de KinExA se realizaron mediante un instrumento KinExA 3200 (Sapidyne Instruments, Boise, ID, EE.UU.) A 22 °C. El TIGIT humano recombinante etiquetado con His se obtuvo de Sino Biologicals (Beijing, China) y se reconstituyó en 1XPBS. Todas las muestras de antígeno y anticuerpo para los análisis de KinExA se prepararon en amortiguador PBST desgasificado (PBS con tween 20 al 0,05 %) con 100 µg/ml de BSA filtrada y azida de sodio al 0,02 %. El anticuerpo de detección secundario utilizado fue anti-IgG humana de cabra etiquetado con Alexa Flour 647 (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y diluido de 400 a 700 veces en el amortiguador PBST (con BSA y azida) descrito anteriormente a partir de una reserva de 0,5 mg/ml en 1X PBS, pH de 7,4. Para cada experimento de KinExA, se diluyeron ~20 µg de TIGIT humano en 1 ml de 50 mM de carbonato de sodio, pH de 9,2, que se agregó directamente a 50 mg de microesferas de azlactona (Ultralink Support, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) y se agitó durante la noche a 4 °C. Después de la agitación, las microesferas se enjuagaron una vez con amortiguador de 1 M de Tris, pH de 8,5, que contenía 10 mg/ml de BSA y se agitaron durante una hora a temperatura ambiente en el mismo amortiguador. Las microesferas acopladas se agregaron al depósito de microesferas en el instrumento KinExA y se diluyeron hasta ~30 ml con 1X HBS-N (0,01 M de Hepes, 0,15 M de NaCl, GE Healthcare) que contenía azida sódica al 0,02 %, que también era el amortiguador de corrida para el instrumento KinExA. Todas las microesferas acopladas al antígeno se usaron inmediatamente después de la preparación.

[00645] Para dos mediciones repetidas de K_D para CPA.9.086 (Tabla 1), se equilibraron 14 concentraciones de TIGIT entre 957 aM - 212 pM a temperatura ambiente durante ~72 horas con sitios de fijación de CPA.9.086 de 2,5 pM y sitios de fijación de CPA.9.086 de 1,8 pM. Para CPA.9.083, se equilibraron 14 concentraciones de TIGIT de 478 aM - 196pM durante ~72 horas con sitios de fijación de CPA.9.083 de 1,8pM. Para las mediciones duplicadas del anticuerpo de referencia, BM26 hIgG4, se

equilibraron 14 concentraciones de TIGIT de 9,6 fM a 3,53 nM durante ~72 horas con sitios de fijación de BM26 de 20 pM y sitios de fijación de BM26 de 8,0 pM. Para CHA.9.547.13, se equilibraron 14 concentraciones de TIGIT de 10,5 fM - 2,2 nM durante ~72 horas con sitios de fijación de mAb CHA.9.547.13 de 8pM. El volumen que fluyó a través del paquete de microesferas para cada muestra equilibrada para todos los experimentos fue de 4 ml a 11 ml a una velocidad de flujo de 0,25 ml/min. Los datos se ajustaron con un modelo de fijación de "equilibrio estándar" de 1:1 mediante el software KinExA Pro (versión 4.2.10; Sapidyne Instruments) para estimar K_D y generar el intervalo de confianza (CI) de 95 % del ajuste de curva.

Resultados

[00646] Tanto CPA.9.083 como CPA.9.086 se fijaron a TIGIT humano con afinidad de fijación femtomolar, mientras que CHA.9.547.13 y BM26 se fijaron con afinidad picmolar. Por lo tanto, CPA.9.083 y CPA.9.086 se fijaron a TIGIT humano con la afinidad más alta de los cuatro anticuerpos diferentes probados.

[00647] Tabla 1: mediciones de K_D de anticuerpos anti-TIGIT humano hIgG4 determinados por KinExA

Anticuerpo	**K_D ± 95 % CI (n = 1)**	**K_D ± 95 % CI (n = 2)**
CHA.9.547.13	18,8 ± 5,8 pM	No determinado
CPA.9.083	694 ± 277 fM	No determinado
CPA.9.086	553 ± 230 fM	665 ± 378 fM
BM26	8,2 ± 2,8 pM	11,2 ± 3,6 pM

U. EJEMPLO 21: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CPA.9.086, UN ANTICUERPO TERAPÉUTICO NOVEDOSO QUE SE DIRIGE AL TIGIT DE PUNTO DE CONTROL INMUNITARIO

[00648] Antecedentes: TIGIT es un receptor coinhibidor que se expresa en gran medida en los linfocitos, que incluyen los linfocitos T CD4+ efectores y reguladores (Treg), los linfocitos T CD8+ efectores y los linfocitos NK, que infiltran diferentes tipos de tumores. El acoplamiento de TIGIT con sus ligandos, receptor de poliovirus (PVR) y proteínas similares a PVR (PVRL2 y PVRL3) indicados suprime directamente la activación de linfocitos. La 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 la presente se informa la caracterización biofísica y funcional de CPA.9.086, un anticuerpo terapéutico dirigido a TIGIT. También se demuestra que el bloqueo conjunto de TIGIT y un nuevo inhibidor de punto de control, PVRIG, aumenta las respuestas de los linfocitos T.

[00649] Materiales y métodos: se realizaron campañas de expresión en fago humano y de descubrimiento de anticuerpos de hibridoma de ratón para generar anticuerpos terapéuticos anti-TIGIT. Se evaluaron los anticuerpos resultantes para determinar su capacidad para fijarse con alta afinidad a TIGIT humano recombinante y expresado en la superficie celular. También se examinó la reactividad cruzada de los anticuerpos con respecto a TIGIT de *Macaca fascicularis* y de ratón. Un subconjunto de anticuerpos que se fijaron con alta afinidad a TIGIT humano y que tienen reactividad cruzada con respecto a TIGIT de *Macaca fascicularis,* se caracterizó además por su capacidad para bloquear la interacción entre TIGIT y PVR. Se analizaron los anticuerpos de bloqueo para determinar su capacidad para mejorar la activación de linfocitos T específicos del antígeno in vitro, ya sea en soledad o en combinación con un anticuerpo anti-PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P).

[00650] Resultados: se identificó un anticuerpo inicial, CPA.9.086, que se fija al TIGIT humano con alta afinidad femtomolar. Este anticuerpo se fijó a TIGIT expresado de forma endógena en linfocitos T CD8+ humanos con mayor afinidad que los anticuerpos de referencia probados, y también tuvo reactividad cruzada con respecto tanto a TIGIT de *Macaca fascicularis* como de ratón. Cuando se lo analizó para determinar la actividad in vitro, CPA.9.086 aumentó la secreción de citocinas y la inactivación de linfocitos tumorales mediante linfocitos T CD8+ específicos de CMV con una potencia superior o equivalente a la de los anticuerpos de referencia probados. La combinación de CPA.9.086 con un anticuerpo anti-PD1 o CHA.7.518.1.H4(S241P) dio como resultado una mayor actividad de los linfocitos T CD8+ específicos de CMV. Además, se demuestra que TIGIT se expresa predominantemente en Treg y linfocitos T CD8+ efectores de tumores sólidos en comparación con sangre periférica, lo que sugiere que estas poblaciones serán probablemente la diana preferente de CPA.9.086.

[00651] Conclusión: se describe el desarrollo de un anticuerpo TIGIT antagonista de afinidad muy alta, CPA.9.086, que actualmente se encuentra en desarrollo preclínico. Postulamos que la afinidad femtomolar de CPA.9.086 podría resultar en una dosis menor y menos frecuente en los pacientes. CPA.9.086 puede mejorar la activación de

linfocitos T humanos, ya sea solo o en combinación con otros anticuerpos de punto de control. Por lo tanto, estos datos demuestran la utilidad del direccionamiento a TIGIT, PD1 y PVRIG para el tratamiento del cáncer.

FIG. 1

PVRIG humana WT de longitud completa

Secuencia de PVRIG humana a partir de la posición 21 – metionina alternativa

MGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIR
QWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSAPPTPAPILRADLAGILGV
SGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQA

(SEQ ID NO: 1)

Secuencia de PVRIG humana a partir de la posición 1 – metionina

MRTEAQVPALQPPEPGLEGAMGHRTLVLPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWG
GPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPG
LSAPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQA

(SEQ ID NO:2)

Proteína transmembrana PVRIG [Homo sapiens]

Secuencia de referencia NCBI: NP_076975.2

1 mrteaqvpal qppepglega mghrtlvlpw vlltlcvtag tpevwvqvrm eatelssfti

61 rcgflgsgsi slvtvswggp ngaggttlav lhpergirqw aparqarwet qssislileg

121 sgasspcant tfcckfasfp egsweacgsl ppssdpglsa pptpapilra dlagilgvsg

181 vllfgcvyll hllrrhkhrp aprlqpsrts pqaprarawa psqasqaalh vpyatintsc

241 rpatldtahp hggpswwasl pthaahrpqg paawastpip argsfvsven glyaqagerp

301 phtgpgltlf pdprgprame gplgvr

(SEQ ID NO: 612)

FIG. 2

Isoforma alfa de PVLR2 humana

>gi|5360210|ref|NP_002847.1|Precursor alfa de isoforma de nectina-2 [Homo sapiens]

MARAAALLPSRSPPTPLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVTW

QRPDAPANHQNVAAFHPKMGPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTC

EFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSQDPTTVALCISKEGRPPARISWLSSLDWEAKETQVS

GTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEEPALIPVTLSVRYPPEVSISGYDDNWYLGRTDAT

LSCDVRSNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQLVIHAVDSLFNTTFVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETP

RASPRDVGPLVWGAVGGTLLVLLLLAGGSLAFILLRVRRRRKSPGGAGGGASGDGGFYDPKAQVLGNGDP

VFWTPVVPGPMEPDGKDEEEEEEEEKAEKGLMLPPPPALEDDMESQLDGSLISRRAVYV

(SEQ ID NO:3)

Isoforma delta de PVLR2 humana

>gi | 112789532 |ref|NP_001036189.1|Precursor delta de isoforma de nectina-2 [Homo sapiens]

MARAAALLPSRSPPTPLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVTW
QRPDAPANHQNVAAFHPKMGPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTC
EFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSQDPTTVALCISKEGRPPARISWLSSLDWEAKETQVS
GTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEEPALIPVTLSVRYPPEVSISGYDDNWYLGRTDAT
LSCDVRSNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQLVIHAVDSLFNTTFVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETP
NTAGAGATGGIIGGIIAAIIATAVAATGILICRQQRKEQTLQGAEEDEDLEGPPSYKPPTPKAKLEAQEM
PSQLFTLGASEHSPLKTPYFDAGASCTEQEMPRYHELPTLEERSGPLHPGATSLGSPIPVPPGPPAVEDV
SLDLEDEEGEEEEEYLDKINPIYDALSY

(SEQ ID NO:4)

FIG. 3A

CHA.7.518.1.H4(S241P)

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS	**5**
vhCDR1	GYTFTDYN	**6**
vhCDR2	IYPYIGGS	**7**
vhCDR3	AREDKTARNAMDY	**8**
HC de longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	**9**
Dominio liviano variable (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHFWGTPYTFGQGTKLEIK	**10**
vlCDR1	ENIYSN	**11**
vlCDR2	EAT	**12**
vlCDR3	QHFWGTPYT	**13**
Cadena liviana de longitud completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHFWGTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	**14**

FIG. 3B

CHA.7.538.1.2.H4(S241P)

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS	**15**
vhCDR1	GYAFTNYL	**16**
vhCDR2	INPGSGGI	**17**
vhCDR3	ARSETHDTWFAY	**18**
HC de longitud completa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	**19**
Dominio liviano variable (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWFQQKPGKAPKALIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATY YCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK	**20**
vlCDR1	QSVRIA	**21**
vlCDR2	LAS	**22**
vlCDR3	LQHWNYPYT	**23**
Cadena liviana de longitud completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWFQQKPGKAPKALIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATY YCLQHWNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	**24**

FIG. 4A

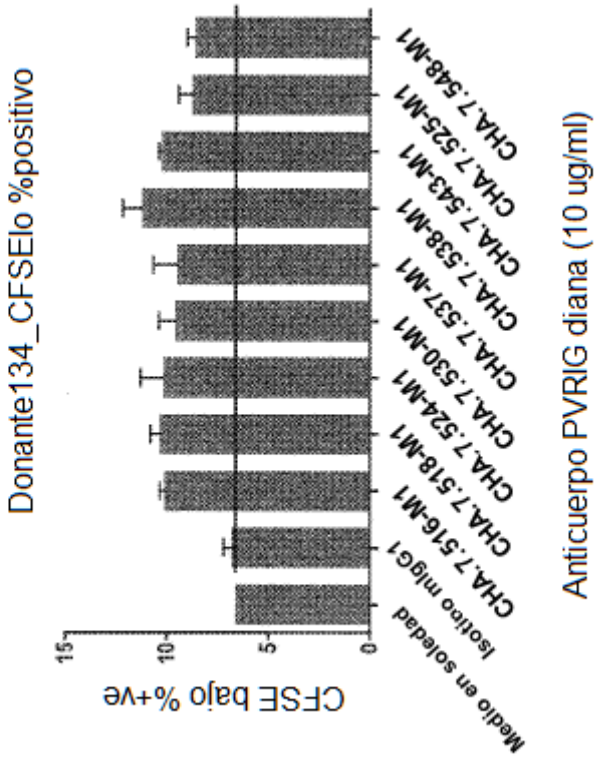

Donante134_CFSElo %positivo
CFSE bajo %+ve
15
10
5
0
Medio en soledad
Isotipo mIgG1
CHA.7.516-M1
CHA.7.518-M1
CHA.7.524-M1
CHA.7.530-M1
CHA.7.537-M1
CHA.7.538-M1
CHA.7.543-M1
CHA.7.525-M1
CHA.7.548-M1
Anticuerpo PVRIG diana (10 ug/ml)

FIG. 4B

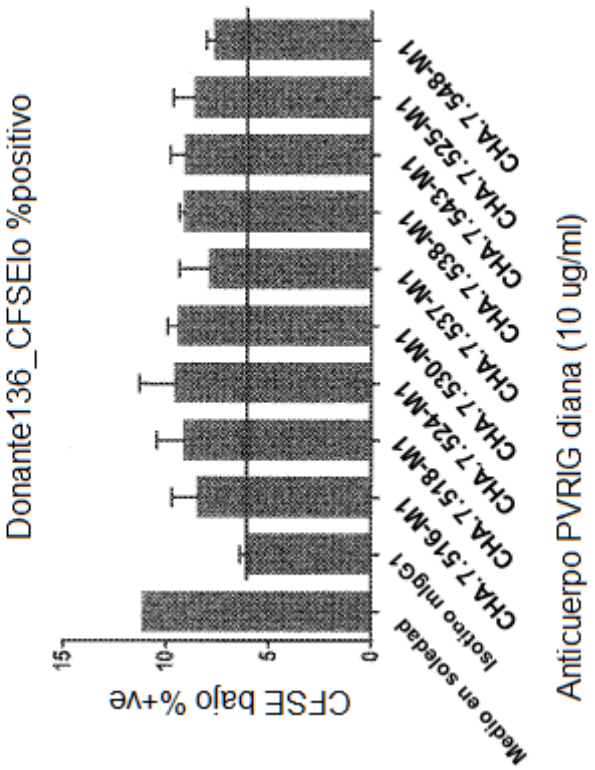

Donante136_CFSElo %positivo
CFSE bajo %+ve
15
10
5
0
Medio en soledad
Isotipo mIgG1
CHA.7.516-M1
CHA.7.518-M1
CHA.7.524-M1
CHA.7.530-M1
CHA.7.537-M1
CHA.7.538-M1
CHA.7.543-M1
CHA.7.525-M1
CHA.7.548-M1
Anticuerpo PVRIG diana (10 ug/ml)

FIG. 5A

Anticuerpo (mIgG)	EC_{50} (HEK OE, nM)	HEK OE/par **(3,3 ug/ml, gMFIr)**	Jurkat **(3,3 ug/ml, gMFIr)**
CHA.7.502	40,18	71,99	6,21
CHA.7.503	1,05	260,98	23,59
CHA.7.506	Sin fijación	0,76	Sin fijación
CHA.7.508	3,30	45,86	6,50
CHA.7.510	92,81	16,32	4,19
CHA.7.512	52,99	5,12	1,47
CHA.7.514	5,31	49,82	7,67
CHA.7.516	0,79	37,90	5,73
CHA.7.518	0,36	42,24	6,58
CHA.7.520	Sin fijación	1,01	Sin fijación
CHA.7.522	91,44	10,12	2,99
CHA.7.524	0,46	48,33	7,87
CHA.7.525	3,05	41,86	4,30
CHA.7.526	2,99	47,28	3,98
CHA.7.527	Sin fijación	0,98	Sin fijación
CHA.7.528	7,31	44,88	6,17
CHA.7.530	0,33	51,14	8,04
CHA.7.534	1,87	43,72	5,05
CHA.7.535	3,67	40,44	2,79
CHA.7.537	2,47	36,61	5,53

FIG. 5B

CHA.7.538	0,52	35,80	7,37
CHA.7.543	0,52	49,81	6,73
CHA.7.544	0,76	42,60	5,68
CHA.7.545	0,76	44,31	6,53
CHA.7.546	0,61	43,14	6,42
CHA.7.547	14,37	10,94	1,02
CHA.7.548	0,27	45,26	7,37
CHA.7.549	2,60	29,71	2,23
CHA.7.550	1,34	27,72	2,10

FIG. 6A

Anticuerpo (mIgG)	CD56 int. NK humana (gMFIr, 10ug/ml)	Linfocitos T CD8+ humanos (gMFIr, 10ug/ml)	Expi de *Macaca fascicularis* OE/par (gMFIr, 3,3 ug/ml)	Linfocitos NK de *Macaca fascicularis* (gMFIr, 10ug/ml)	Linfocitos T CD8+ de *Macaca fascicularis* (gMFIr, 10ug/ml)
CHA.7.502	1,97	1,41	60,49	No analizado	No analizado
CHA.7.503	3,15	1,96	106,3	No analizado	No analizado
CHA.7.506	No analizado	No analizado	0,77	No analizado	No analizado
CHA.7.508	3,6	4,09	41,49	No analizado	No analizado
CHA.7.510	3,13	2,73	38,21	No analizado	No analizado
CHA.7.512	1,30	1,15	8,96	No analizado	No analizado
CHA.7.514	4,16	5,15	65,20	No analizado	No analizado
CHA.7.516	4,22	4,09	60,05	1,76	2,09
CHA.7.518	5,08	6,69	83,51	1,92	2,09
CHA.7.520	1,13	1,04	No analizado	No analizado	No analizado
CHA.7.522	2,06	1,90	27,24	No analizado	No analizado

FIG. 6B

CHA.7.524	5,50	6,12	66,32	1,78	
CHA.7.525	1,98	1,76	0,85	No analizado	No analizado
CHA.7.526	2,08	1,71	0,79	No analizado	No analizado
CHA.7.527	1,16	0,99	No analizado	No analizado	No analizado
CHA.7.528	3,08	3,63	12,2	1,21	1,18
CHA.7.530	6,04	6,47	60,80	1,73	1,89
CHA.7.534	2,60	1,96	46,27	No analizado	No analizado
CHA.7.535	2,24	1,28	0,82	No analizado	No analizado
CHA.7.537	3,90	3,41	1,55	1,18	1,19
CHA.7.538	6,49	6,17	15,16	1,36	1,45
CHA.7.543	4,48	4,33	0,83	1,35	1,39
CHA.7.544	2,36	2,54	61,09	No analizado	No analizado
CHA.7.545	2,54	2,82	0,91	No analizado	No analizado
CHA.7.546	2,75	2,95	0,85	No analizado	No analizado
CHA.7.547	2,21	1,13	26,65	No analizado	No analizado
CHA.7.548	3,15	3,35	4,25	1,18	1,09
CHA.7.549	3,05	1,42	1,00	No analizado	No analizado
CHA.7.550	1,60	1,29	0,90	No analizado	No analizado

FIG. 7A

Anticuerpo (mIgG)	IC_{50} (nM)
CHA.7.502	39,90
CHA.7.503	Sin IC_{50}
CHA.7.506	31,65
CHA.7.508	37,88
CHA.7.510	55,00
CHA.7.512	839,6
CHA.7.514	38,88
CHA.7.516	33,11
CHA.7.518	23,15
CHA.7.520	619,3
CHA.7.522	50,48
CHA.7.524	30,20
CHA.7.525	85,52
CHA.7.526	58,88
CHA.7.527	Sin IC_{50}
CHA.7.528	28,88
CHA.7.530	34,56
CHA.7.534	181,4
CHA.7.535	821,1
CHA.7.537	38,95
CHA.7.538	51,87
CHA.7.543	Sin IC_{50}

FIG. 7B

CHA.7.544	Sin IC_{50}
CHA.7.545	96,06
CHA.7.546	92,05
CHA.7.547	27,94
CHA.7.548	18,98
CHA.7.549	36,12
CHA.7.550	58,34

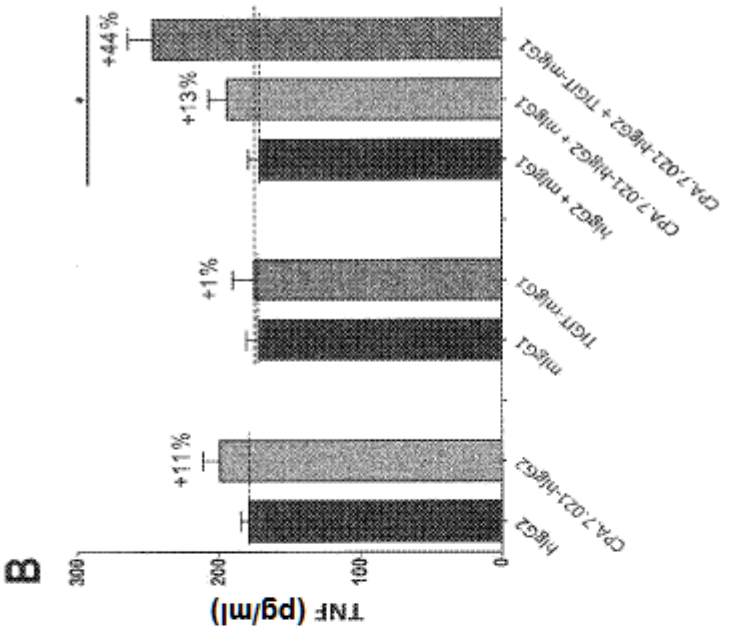
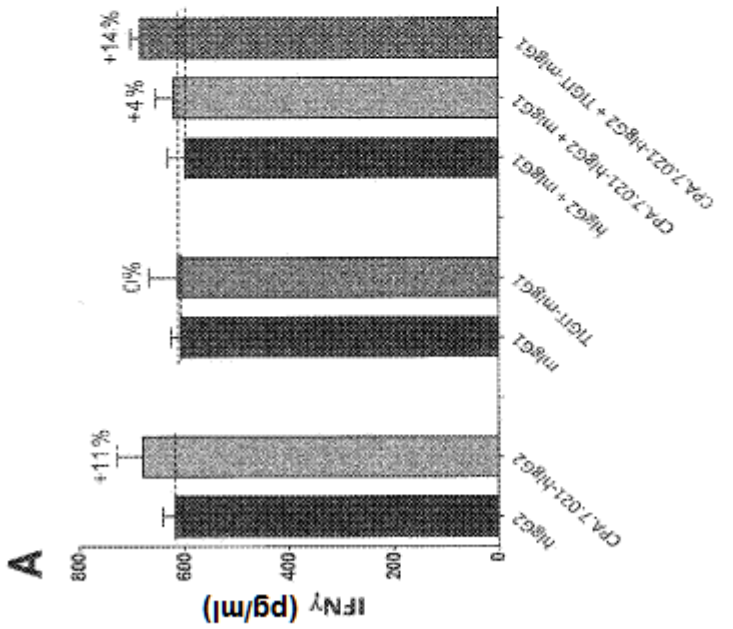


FIG. 8B



TIL 209

FIG. 8A

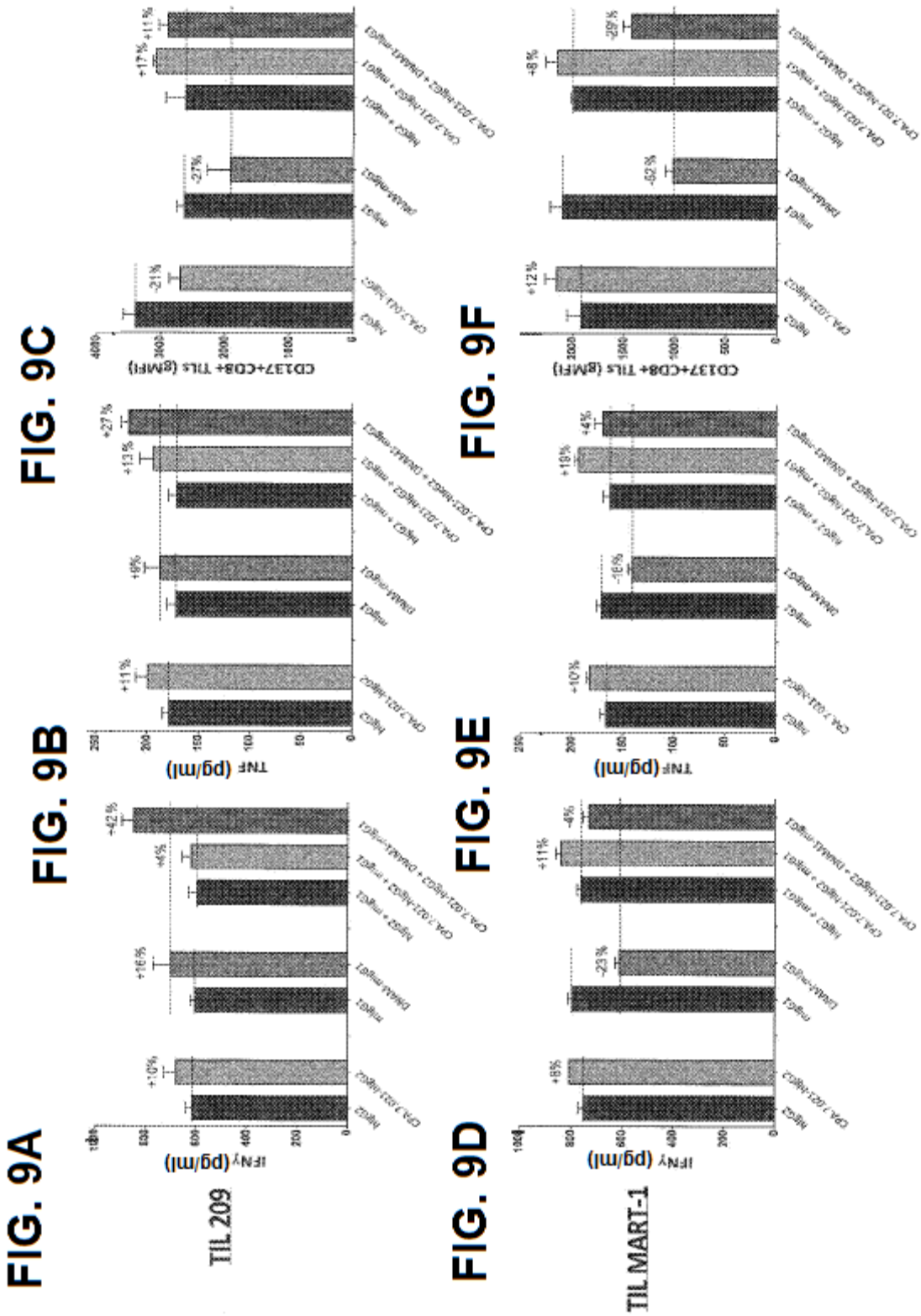

FIG. 9A
FIG. 9B
FIG. 9C
FIG. 9D
FIG. 9E
FIG. 9F
TIL 209
TIL MART-1
IFNγ (pg/ml)
TNF (pg/ml)
CD137+CD8+ TILs (gMFI)

FIG. 10A

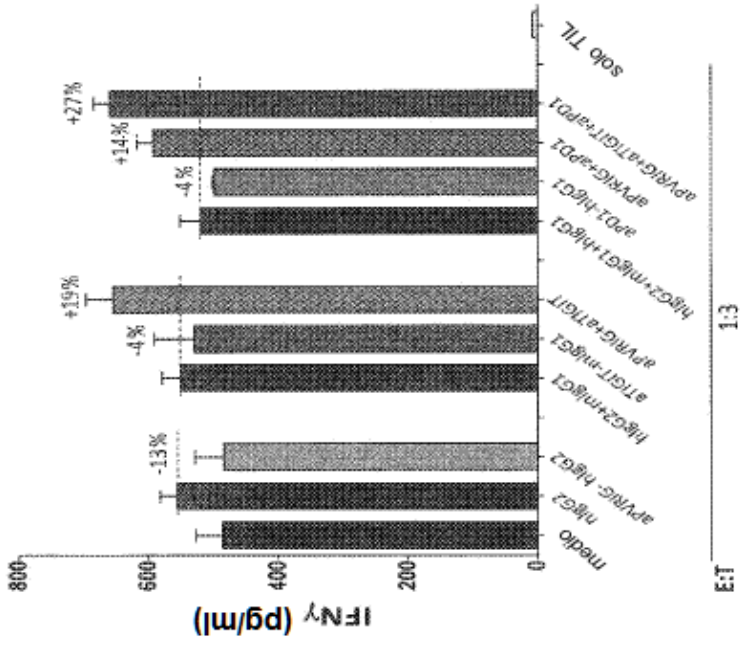


FIG. 10B

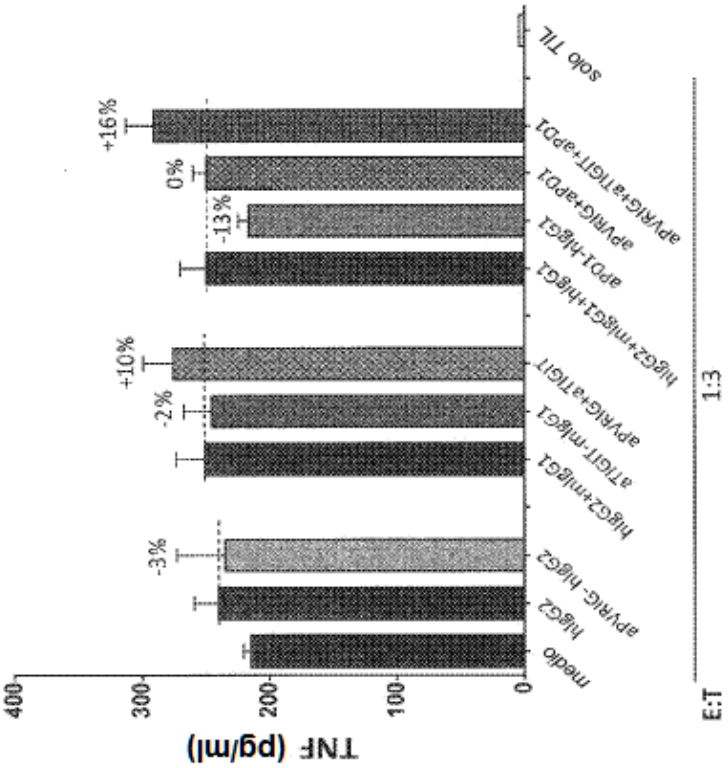


FIG. 11A

Secuencias humanizadas de VH de anticuerpo CHA.7.518

Secuencia humanizada potencial en función del marco aceptor IMGT IGHV1-46*01 (definición de AbM CDR)

IGHV1-46*01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
(SEQ ID NO: **25**)

Región de unión IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: **26**)

```
sec              10        20        30        40        50        60        70        80        90
AbM              10        20        30        40        50  a     60        70        80  abc   90
          b b b     p     p b b b   b b    b  bi i     i ibb  b          i  b   b b b x    b b b  b     bibibb
518       EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYTFTDYNIN WVKQSHGKSLEWIG YIYPYIGGSG YNQKFKSKATLSADNPSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR
          *   *   * **      *                   * ** **   *                *   **** *** ***  *     *  *  *   *
1-46*01   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h518H1    QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTDYNIN WVRQAPGQGLEWMG YIYPYIGGSG YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h518H2    QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTDYNIN WVRQAPGQGLEWIG YIYPYIGGSG YAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h518H3    QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS GYTFTDYNIN WVRQAPGQGLEWIG YIYPYIGGSG YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h518H4    QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS GYTFTDYNIN WVRQAPGQGLEWIG YIYPYIGGSG YAQKFQGRATLTADNSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
                    V                       #                             N
```

```
sec    100        110       120
AbM                110
                 i   b b b
518       EDKTARNAMDY WGQGTPVTVSS (SEQ ID NO: 27 )
                      *          ( 1-46*01 descrito como SEQ ID NO: 28)
h518H1    EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29 )
h518H2    EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 30 )
h518H3    EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 31 )
h518H4    EDKTARNAMDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 32 )
               #
```

N.° de sustituciones de desaminación : Q/S/A

FIG. 11B

Secuencias humanizadas de VL de anticuerpo CHA.7.518

Secuencia humanizada potencial en función del marco aceptor IMGT IGKV1-39*01

IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP (SEQ ID NO: **33**)

Región de unión IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:**34**)

```
sec              10        20        30        40        50        60        70        80
AbM              10        20        30        40        50        60        70        80
          b b b    p p     p b b  b   b   bi bi i    ii ibbi      i   b   b        b b b  b    ib bib
518       DIQMTQSPASLSVSVGETVTIIC RVSENIYSNLA WYQQKQGKSPQLLVY EATNLAE GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC
                  *   *   **   *                 *  * *  *                      *** * *   *   **
IGKV1-39  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h518L1    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RVSENIYSNLA WYQQKPGKAPKLLIY EATNLAE GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h518L2    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RVSENIYSNLA WYQQKPGKAPKLLIY EATNLAE GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC
h518L3    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RVSENIYSNLA WYQQKPGKAPKLLVY EATNLAE GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFGTYYC
                     V                 #   #           S          #
```

```
sec       90        100
AbM       90        100
          ibi  iib  i   b b b
518       QHFWGTPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:35   )
                    *
IGKV1-39  QQSYSTPP (SEQ ID NO:36   )
h518L1    QHFWGTPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:37   )
h518L2    QHFWGTPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:38   )
h518L3    QHFWGTPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:39   )
             @
```

N.° de sustituciones de desaminación: Q/S/A/D
@ En sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

FIG. 11C

Secuencias humanizadas de VH de anticuerpo CHA.7.518_1

Secuencia humanizada potencial en función del marco aceptor IMGT IGHV1-46*01
IGHV1-46*01
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: **40**)

Región de unión IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: **41**)

```
sec              10        20        30        40        50        60        70        80        90
AbM              10        20        30        40        50  a     60        70        80  abc   90
          b b b     p     p b b b   b b    b  bi i     i ibb  b          i  b   b b b x    b b b  b     bibibb
538_1   QVQLQQSGAELVRPGASVKVSCKTS GYAFTNYLIE WVKQRPGQGLEWIG VINPGSGGIY YNDKFKVKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR
            *     ***          *               * *      *                **  **** * * * *  *  *    * * *   *
1-46*01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5381H1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFTNYLIE WVRQAPGQGLEWMG VINPGSGGIY YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5381H2 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYAFTNYLIE WVRQAPGQGLEWIG VINPGSGGIY YAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5381H3 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTS GYAFTNYLIE WVRQAPGQGLEWIG VINPGSGGIY YAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5381H4 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTS GYAFTNYLIE WVRQAPGQGLEWIG VINPGSGGIY YAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
                  V                   #                   #         N      T                                F

sec     100       110
AbM               110
                  i   b b b
538_1   SETHDTWFAY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 42 )
                           * (1-46*01 descrito como SEQ ID NO: 43)
h5381H1 SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 44 )
h5381H2 SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 45 )
h5381H3 SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 46 )
h5381H4 SETHDTWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 47 )
          @
```

N.° de sustituciones de desaminación: Q/S/A
@ En sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

FIG. 11D

Secuencias humanizadas de VL de anticuerpo CHA.7.518_1

Secuencia humanizada potencial en función del marco aceptor IMGT IGKV1-39*01
IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP (SEQ ID NO:**48**)

Región de unión IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:**49**)

IGKV1-17*02
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCLQHNSYPP (SEQ ID NO: **50**)

```
sec              10        20        30        40        50        60        70        80
AbM              10        20        30        40        50        60        70        80
           b b b   p p     p b b  b   b   bi bi i    ii ibbi     i   b   b       b b b  b    ib bib
538        DIVMTQSQKFISTSVGDRVSITC KASQSVRIAVA WFQQKPGQSPKALIY LASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC
             *    **** *     *                  *     **  *                 *  *              ** *  * * *
IGKV1-39   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h538L1     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQSVRIAVA WYQQKPGKAPKLLIY LASTRHT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
h538L2     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQSVRIAVA WFQQKPGKAPKALIY LASTRHT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYC
                 I T                              S                                                L   F

sec        90        100
AbM        90        100
           ibi  iib  i   b b b
538        LQHWNYPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 51   )
                      *
IGKV1-39   QQSYSTPP (SEQ ID NO: 52   )
h538L1     LQHWNYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 53   )
h538L2     LQHWNYPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 54   )
              @#
```

N.° de sustituciones de desaminación: Q/S/A/D
@ En sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

FIG. 11E

Secuencias humanizadas de VH de anticuerpo CHA.7.518_2

Secuencia humanizada potencial en función del marco aceptor IMGT IGHV1-46*01
IGHV1-46*01
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:**55**)

Región de unión
IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: **56**)

```
sec              10        20        30        40        50        60        70        80        90
AbM              10        20        30        40        50  a     60        70        80  abc   90
          b b b     p     p b b b   b b    b  bi i     i ibb  b          i  b   b b b x    b b b  b     bibibb
538_2   QVQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAA GYTFTNYWIG WVKQRPGHGLEWIG DIYPGGGYTN YNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCAS
          *     ***  *   *    *              * *  *    *               **  * ** * *   *  *  *    *   * *    *
1-46*01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5382H1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTNYWIG WVRQAPGQGLEWMG DIYPGGGYTN YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
h5382H2 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTNYWIG WVRQAPGQGLEWIG DIYPGGGYTN YAQKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAS
h5382H3 QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKAS GYTFTNYWIG WVRQAPGQGLEWIG DIYPGGGYTN YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAS
                  V                   # @                             #  N                                  I

sec     100       110
AbM               110
                 i   b b b
538_2   PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:57   )
                            * (1-46*01 descrito como SEQ ID NO: 58)
h5382H1 PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:59   )
h5382H2 PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:60   )
h5382H3 PYYGSSYGFAF WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:61   )
```

N.° de sustituciones de desaminación: Q/S/A
@ En sustituciones de oxidación de triptófano: Y/F/H

FIG. 12A

Qué	Secuencias
VH de CHA.7518 h518HH1 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGSGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:62)**
VH de CHA.7518 h518HH2 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGSGYAQKFQG RVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:63)**
VH de CHA.7518 h518HH3 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGSGYAQKFQG RATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:64)**
VH de CHA.7518 h518HH4 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGSGYAQKFQGR ATLTADNSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDKTARNAMDYWGQGTLVTVSS **(SEQ ID NO:65)**
VL de CHA.7518 h518HL1 **humanizada**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:66)**
VL de CHA.7518 h518HL2 **humanizada**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:67)**
VL de CHA.7518 h518HL3 **humanizada**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLVYEATNLAEGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFGTYYCQHFWGTPYTFGQGTKLEIK **(SEQ ID NO:68)**

FIG. 12B

Qué	Secuencias
VH de CHA.7.538 h5381HH1 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVINPGSGGIYYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:69)
VH de CHA.7.538 h5381HH2 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQG RVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:70)
VH de CHA.7.538 h5381HH3 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQG RVTLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:71)
VH de CHA.7.538 h5381HH4 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQG RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSETHDTWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:72)
VL de CHA.7.538_1/538_2 h538HL1 **humanizada**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWYQQKPGKAPKLLIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:73)
VL de CHA.7.538_1/538_2 h538HL2 **humanizada**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWFQQKPGKAPKALIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSVQPEDFATYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:74)

FIG. 12C

Qué	Secuencias
VH de CHA.7.538_2 h5382HH1 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGGYTNYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:75)
VH de CHA.7.538_2 h5382HH2 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYAQKFQ GRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:76)
VH de CHA.7.538_2 h5382HH3 **humanizada**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYAQKFQ GRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:77)
VL de CHA.7.538_1/538_2 h538HL1 **humanizada**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWYQQKPGKAPKLLIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:78)
VL de CHA.7.538_1/538_2 h538HL1 **humanizada**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAVAWFQQKPGKAPKALIYLASTRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSVQPEDFATYYCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:79)

FIG. 13 pares de VH-VL de CHA.7 humanizados

Anticuerpo CHA.7.518

	VH	VL
ch518	chimVH	chimVL
h518-1	h518HH1	h518HL1 (opcional)
h518-2	h518HH2	h518HL2
h518-3	h518HH3	h518HL2
h518-4	h518HH3	h518HL3
h518-5	h518HH4	h518HL3

Anticuerpo CHA.7.538_1

	VH	VL
ch538.1	chimVH	chimVL
h538.1-1	h538.1HH1	h538.1HL1 (opcional)
h538.1-2	h538.1HH2	h538.1HL2
h538.1-3	h538.1HH3	h538.1HL2
h538.1-4	h538.1HH4	h538.1HL2

Anticuerpo CHA.7.538_2

	VH	VL
ch538.2	chimVH	chimVL
h538.2-1	h538.2HH1	h538.1HL1 (opcional)
h538.2-2	h538.2HH2	h538.1HL2
h538.2-3	h538.2HH3	h538.1HL2

FIG. 14

Anticuerpo (mIgG)	CD56 int. NK humana (gMFIr, 10ug/ml)	Linfocitos T CD8+humana (gMFIr, 10ug/ml)	Expi de *Macaca fascicularis* OE/par (gMFIr, 3,3ug/ml)	Linfocitos NK de *Macaca fascicularis* (gMFIr, 10 ug/ml)	Linfocitos T CD8+ de *Macaca Fascicularis* (gMFIr, 10 ug/ml)
CHA.7.502	1,97	1,41	60,49	No analizado	No analizado
CHA.7.503	3,15	1,96	106,3	No analizado	No analizado
CHA.7.506	No analizado	No analizado	0,77	No analizado	No analizado
CHA.7.508	3,6	4,09	41,49	No analizado	No analizado
CHA.7.510	3,13	2,73	38,21	No analizado	No analizado
CHA.7.512	1,30	1,15	8,96	No analizado	No analizado
CHA.7.514	4,16	5,15	65,20	No analizado	No analizado
CHA.7.516	4,22	4,09	60,05	1,76	2,09
CHA.7.518	5,08	6,69	83,51	1,92	2,09
CHA.7.520	1,13	1,04	No analizado	No analizado	No analizado
CHA.7.522	2,06	1,90	27,24	No analizado	No analizado
CHA.7.524	5,50	6,12	66,32	1,78	2,02
CHA.7.525	1,98	1,76	0,85	No analizado	No analizado
CHA.7.526	2,08	1,71	0,79	No analizado	No analizado
CHA.7.527	1,16	0,99	No analizado	No analizado	No analizado
CHA.7.528	3,08	3,63	12,2	1,21	1,18
CHA.7.530	6,04	6,47	60,80	1,73	1,89
CHA.7.534	2,60	1,96	46,27	No analizado	No analizado
CHA.7.535	2,24	1,28	0,82	No analizado	No analizado
CHA.7.537	3,90	3,41	1,55	1,18	1,19
CHA.7.538	6,49	6,17	15,16	1,36	1,45
CHA.7.543	4,48	4,33	0,83	1,35	1,39
CHA.7.544	2,36	2,54	61,09	No analizado	No analizado
CHA.7.545	2,54	2,82	0,91	No analizado	No analizado
CHA.7.546	2,75	2,95	0,85	No analizado	No analizado
CHA.7.547	2,21	1,13	26,65	No analizado	No analizado
CHA.7.548	3,15	3,35	4,25	1,18	1,09
CHA.7.549	3,05	1,42	1,00	No analizado	No analizado
CHA.7.550	1,60	1,29	0,90	No analizado	No analizado

FIG. 15

Anticuerpo (mIgG)	IC_{50} (nM)
CHA.7.502	39,90
CHA.7.503	Sin IC_{50}
CHA.7.506	31,65
CHA.7.508	37,88
CHA.7.510	55,00
CHA.7.512	839,6
CHA.7.514	38,88
CHA.7.516	33,11
CHA.7.518	23,15
CHA.7.520	619,3
CHA.7.522	50,48
CHA.7.524	30,20
CHA.7.525	85,52
CHA.7.526	58,88
CHA.7.527	Sin IC_{50}
CHA.7.528	28,88
CHA.7.530	34,56
CHA.7.534	181,4
CHA.7.535	821,1
CHA.7.537	38,95
CHA.7.538	51,87
CHA.7.543	Sin IC_{50}
CHA.7.544	Sin IC_{50}
CHA.7.545	96,06
CHA.7.546	92,05
CHA.7.547	27,94
CHA.7.548	18,98
CHA.7.549	36,12
CHA.7.550	58,34

FIG. 16

Anticuerpo (hIgG1)	Línea celular diana	Relaciém de cambio de citotoxicidad en comparación con el control
CPA.7.002	Reh	2,9
	MOLM-13	1,9
CPA.7.005	Reh	1,6
	MOLM-13	1,6
CPA.7.021	Reh	1,9
	MOLM-13	0,7
CPA.7.036	Reh	0,9
CPA.7.037	Reh	1,1
CPA.7.038	Reh	0,8
CPA.7.041	Reh	0,7
CPA.7.042	Reh	0,7
CPA.7.050	Reh	1,6
TIGIT	Reh	1,1
	MOLM-13	1,1
DNAM-1	Reh	1,2

FIG. 17

```
NP_076975.2-Homosapiens                TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQW
XP_005549281.1-Macacafascicularis      TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHPELGTRQW
XP_003732227.1-Callithrixjacchus       TPEVWVQVQMKATELSSFIVHCGFLGSGSISLVTVSWGGPDGAGGTRLAVLHPELGTRQW
XP_001103603.1-Macacamulatta           TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHPELGTRQW
                                       ********:*:******* ::***** ************:***** ******* * ***

NP_076975.2-Homosapiens                APARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTPCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA
XP_005549281.1-Macacafascicularis      APARQARWETQSSISLALEDSGASSPFANTTPCCKFASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLSA
XP_003732227.1-Callithrixjacchus       APAHQARWETQSSISLVLEEPGASSPSANTTPCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA
XP_001103603.1-Macacamulatta           APARQARWETQSSISLALEDSGASSPFANTTPCCKFASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLSA
                                       ***:************ **  ***** ******************:**************

NP_076975.2-Homosapiens                PPTPAPILRAD
XP_005549281.1-Macacafascicularis      PPTPVPILRAD
XP_003732227.1-Callithrixjacchus       PIL-----RAD
XP_001103603.1-Macacamulatta           PPTPVPILRAD
                                       *    ***
```

SEQ ID NOS: 80-63, respectivamente en orden de aparición

FIG. 18A

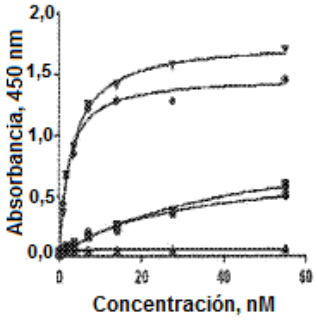


FIG. 18B

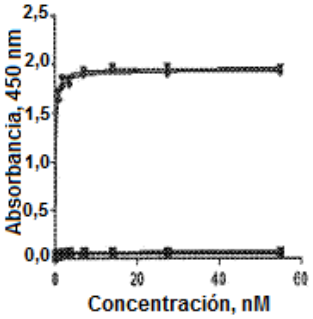
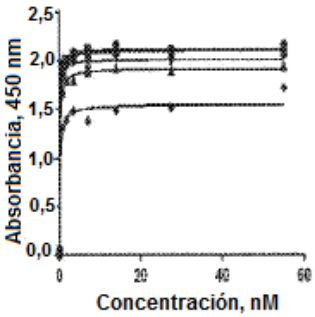


FIG. 18C



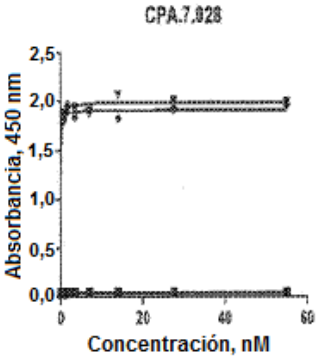


FIG. 18D

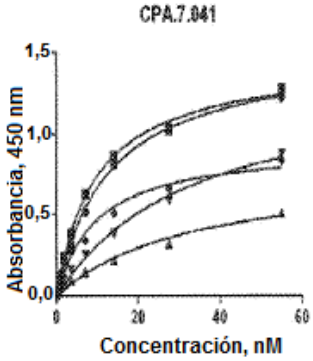


FIG. 18E

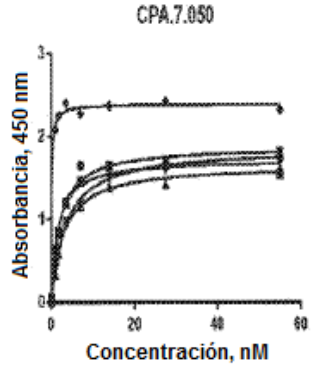


FIG. 18F

FIG. 19

mAb	Reactividad cruzada de *Macaca fascicularis*	Categoría de epítopos	Grupo de epítopos
CPA.7.002	+	1	2
CPA.7.021	-	1	1
CPA.7.024	+++	1	3
CPA.7.028	-	1	1
CPA.7.041	++	1	2
CPA.7.050	+++	4	3

FIG. 20A

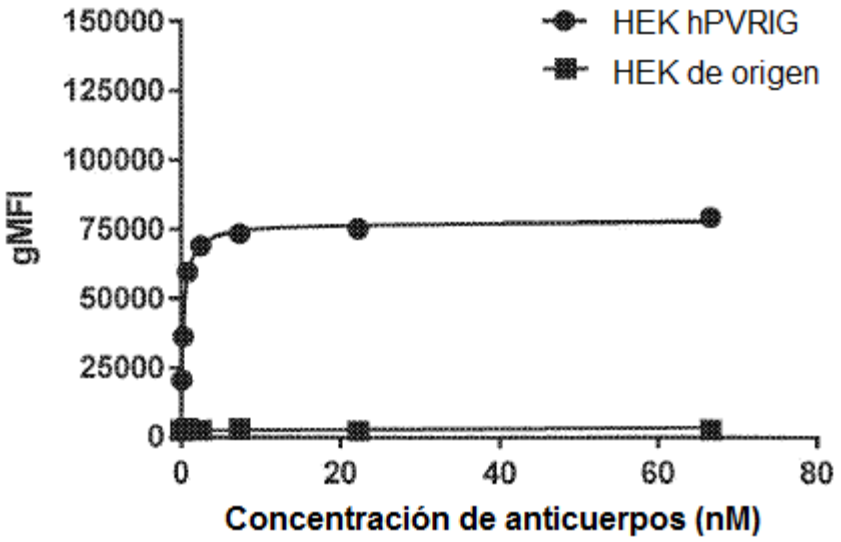


FIG. 20B

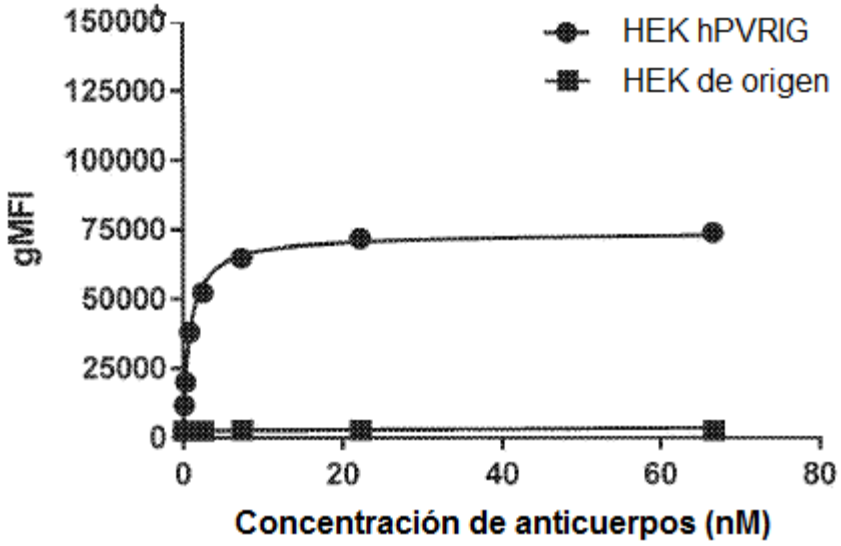


FIG. 21A

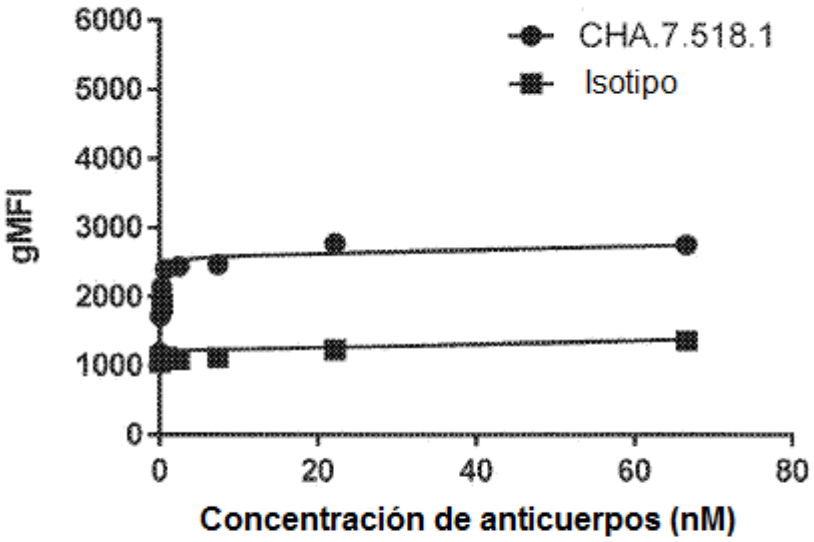


FIG. 21B

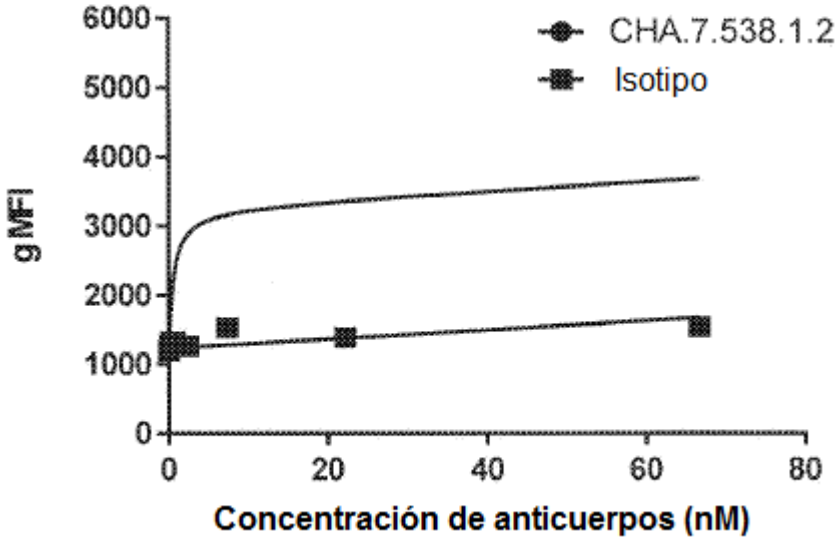


FIG. 22

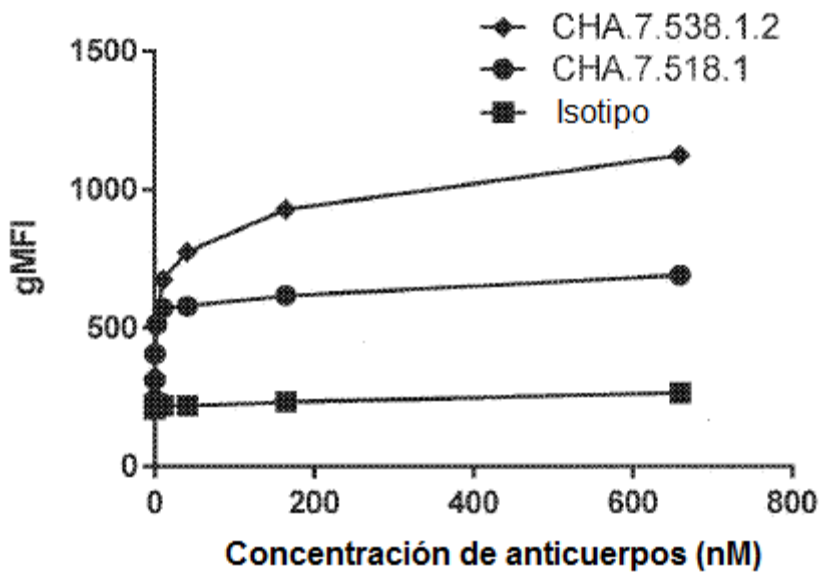

CHA.7.538.1.2
CHA.7.518.1
Isotipo
gMFI
1500
1000
500
0
0
200
400
600
800
Concentración de anticuerpos (nM)

FIG. 23A

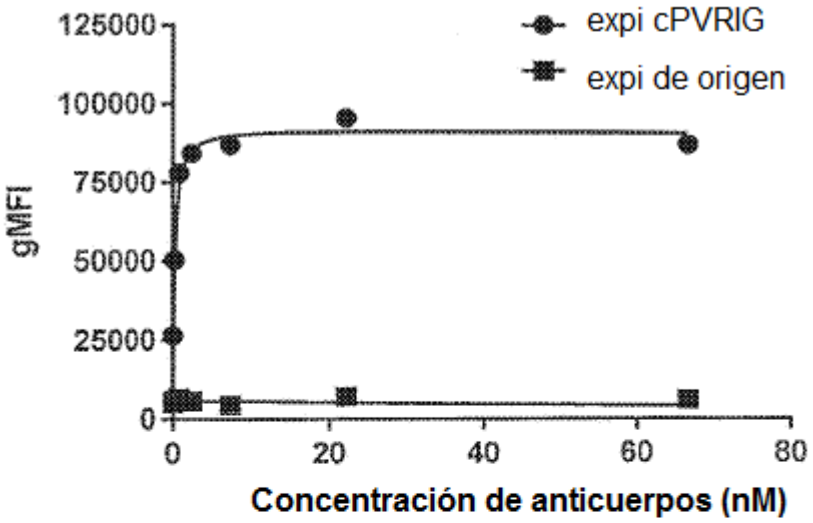


FIG. 23B

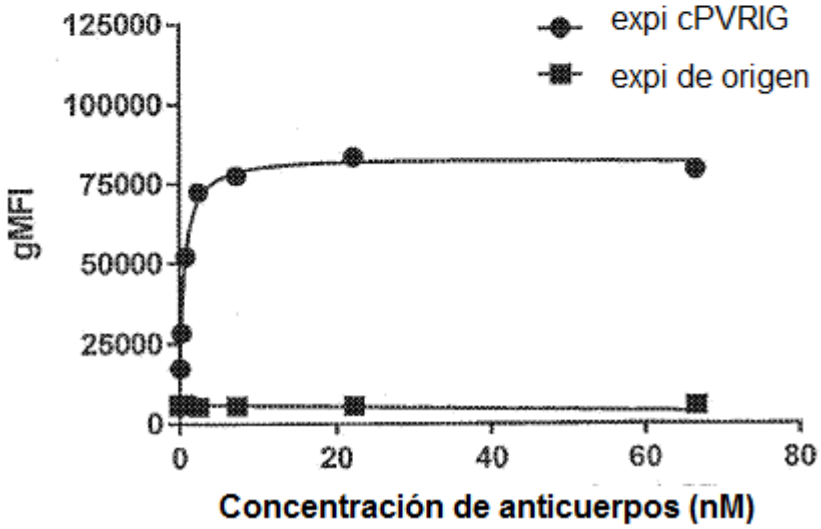


FIG. 24A

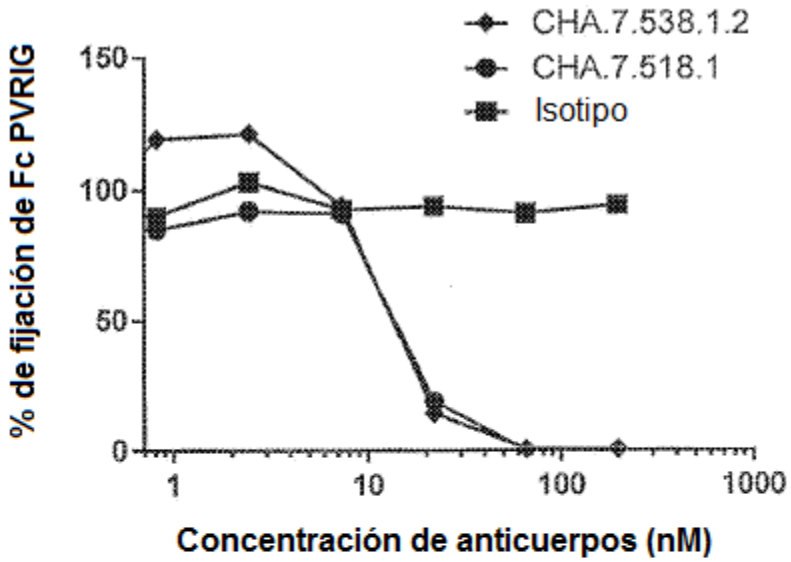


FIG. 24B

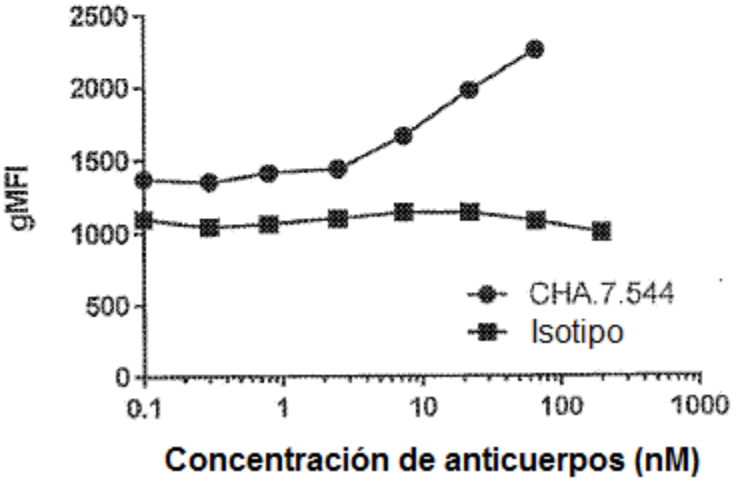


FIG. 25A

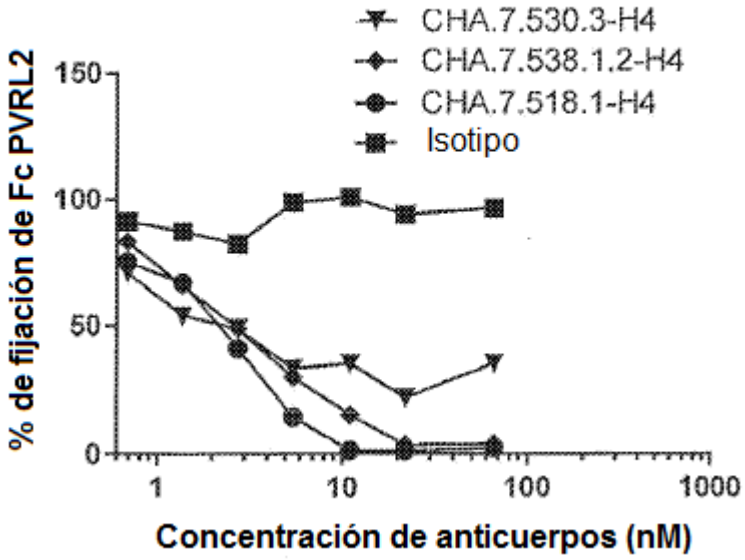


FIG. 25B

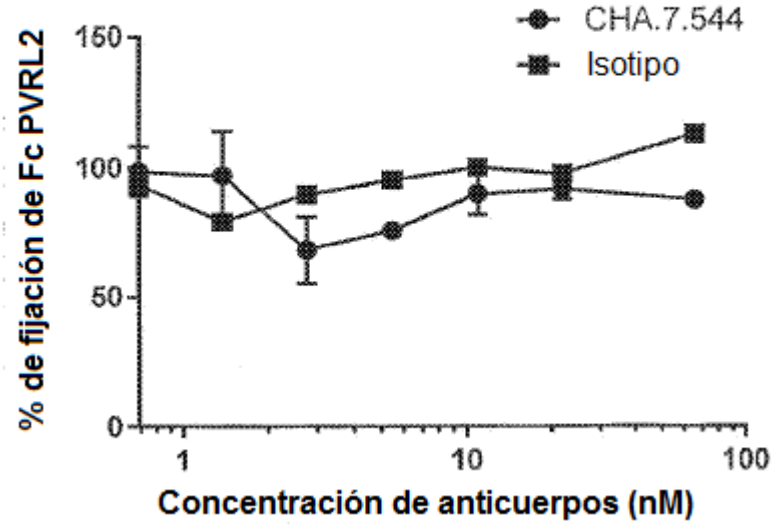


FIG. 26

	CHA.7.518.1 (Alexa 647)	CHA.7.538.1.2 (Alexa 647)
Isotipo (no conjugado)	100	100
CHA.7.518.1 (no conjugado)	14	32
CHA.7.538.1.2 (no conjugado)	7	7

FIG. 27A

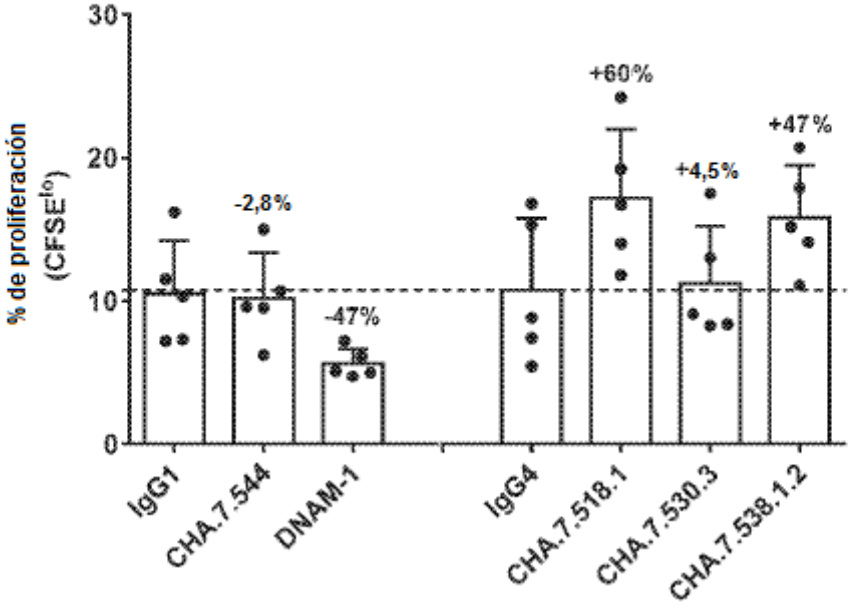


FIG. 27B

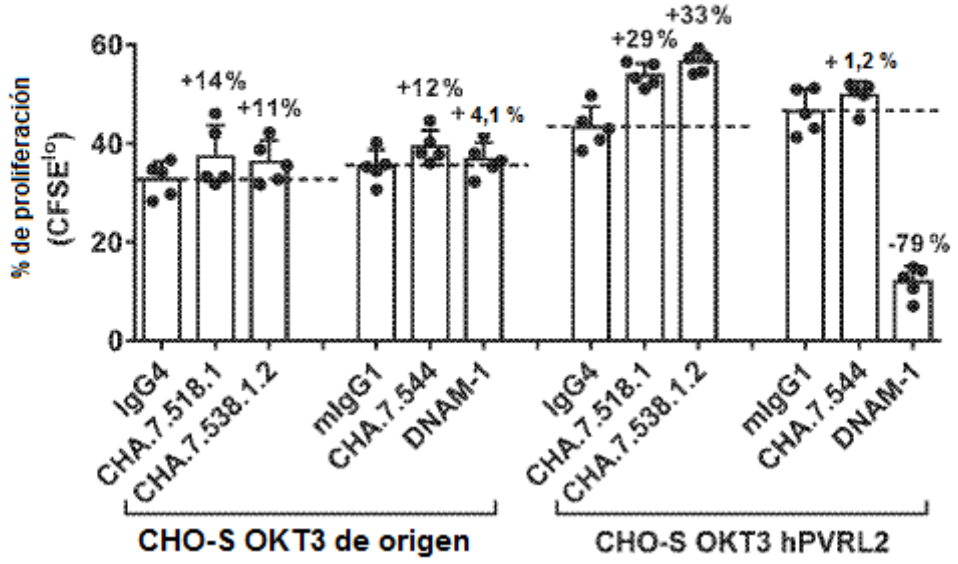


FIG. 28A

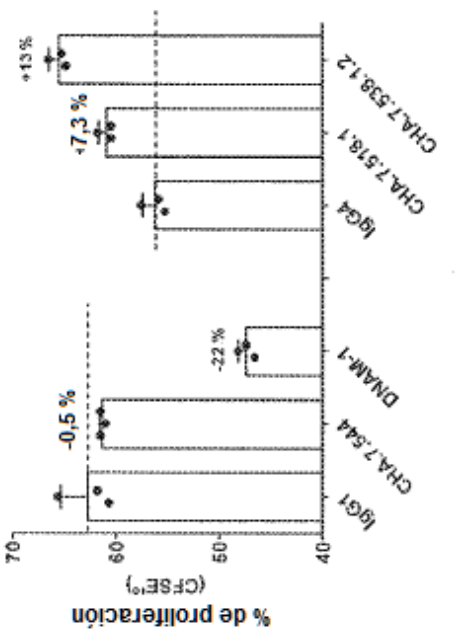


FIG. 28B

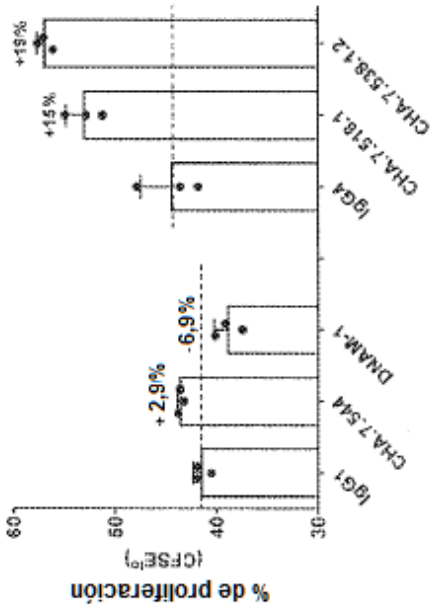


FIG. 28C

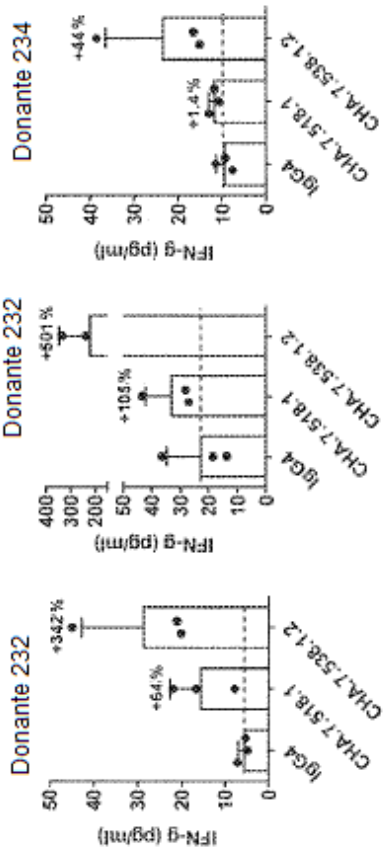


FIG. 29

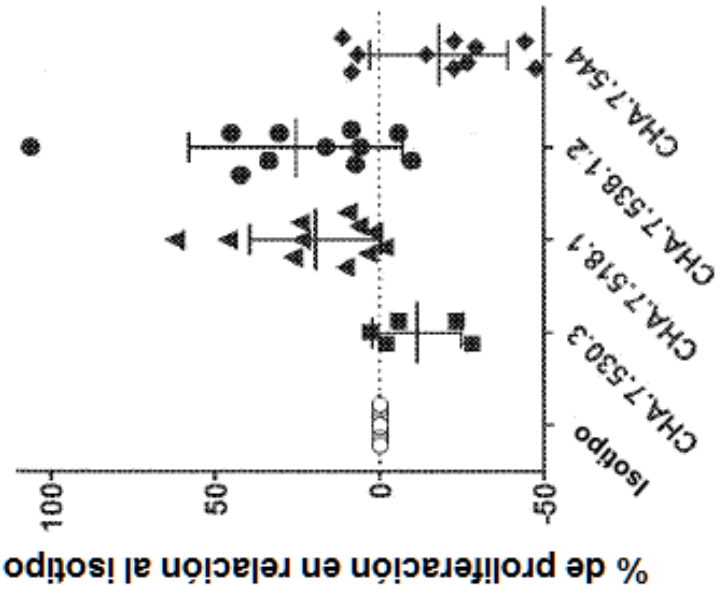

% de proliferación en relación al isotipo
100
50
0
-50
isotipo
CHA.7.530.3
CHA.7.518.1
CHA.7.538.1.2
CHA.7.544

FIG. 30A

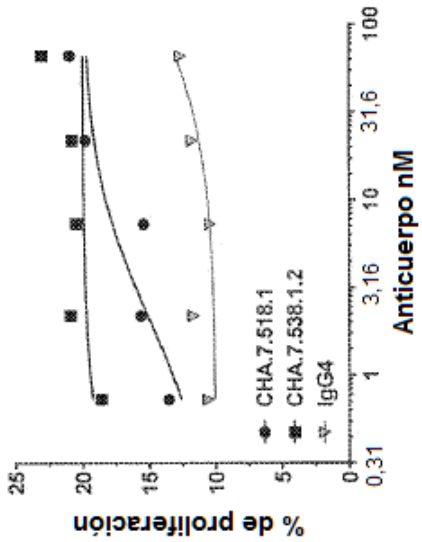


FIG. 30B

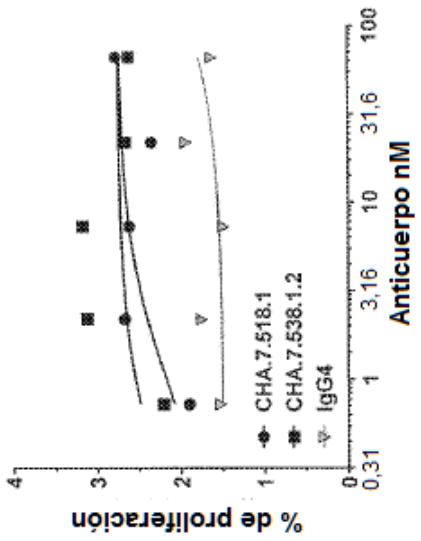


FIG. 30C

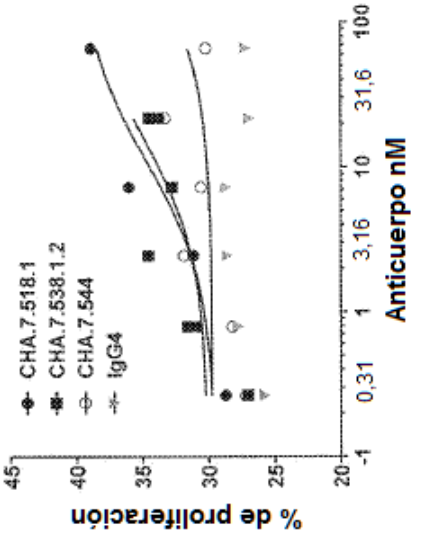


FIG. 30D

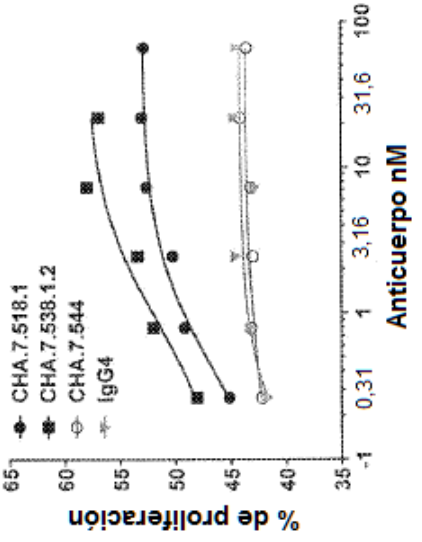


FIG. 31A

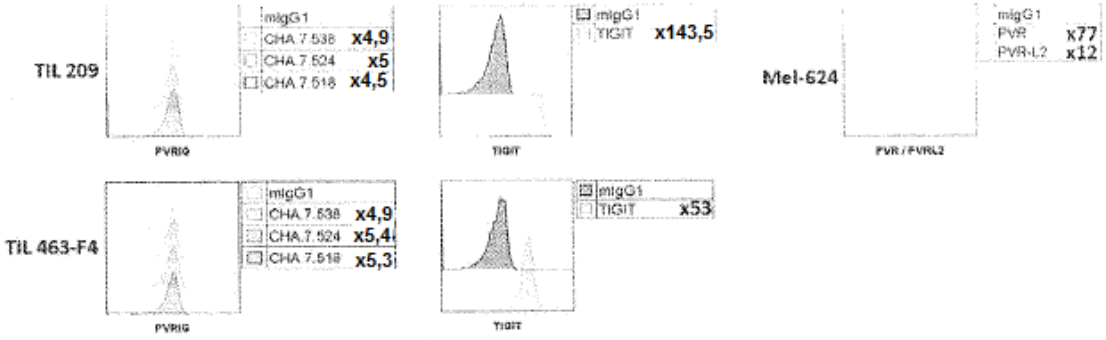


FIG. 31B

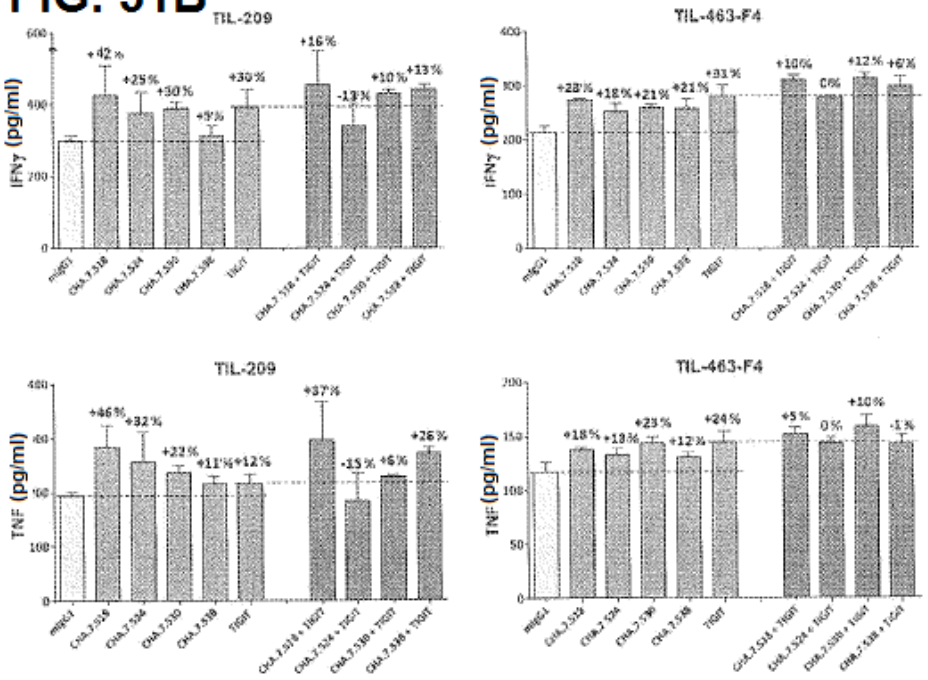


FIG. 31C

FIG. 32A

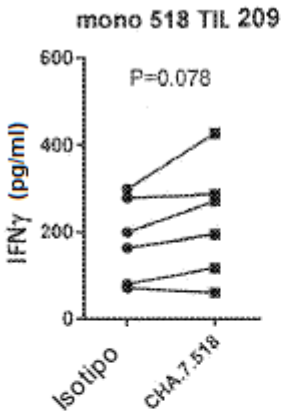


FIG. 32B

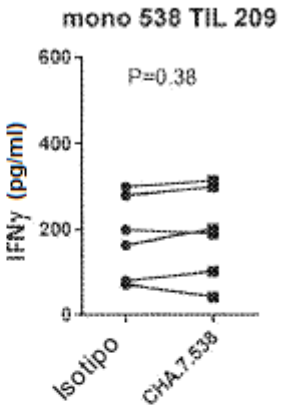


FIG. 32C

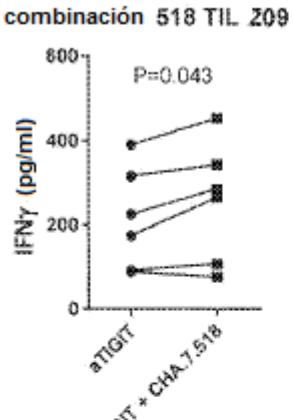


FIG. 32D

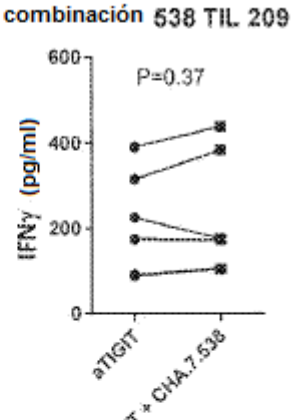


FIG. 32E

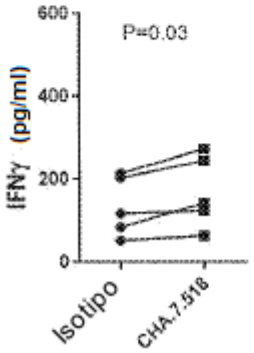


FIG. 32F

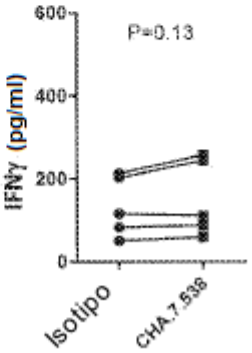


FIG. 32G

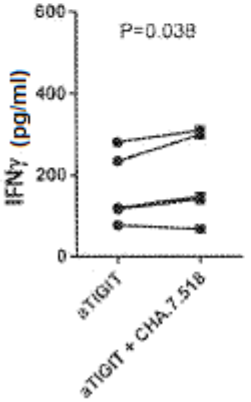


FIG. 32H

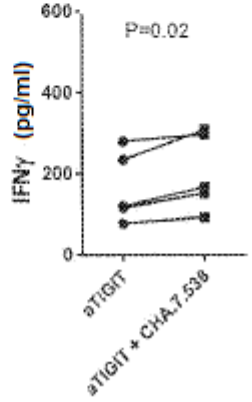


FIG. 33A

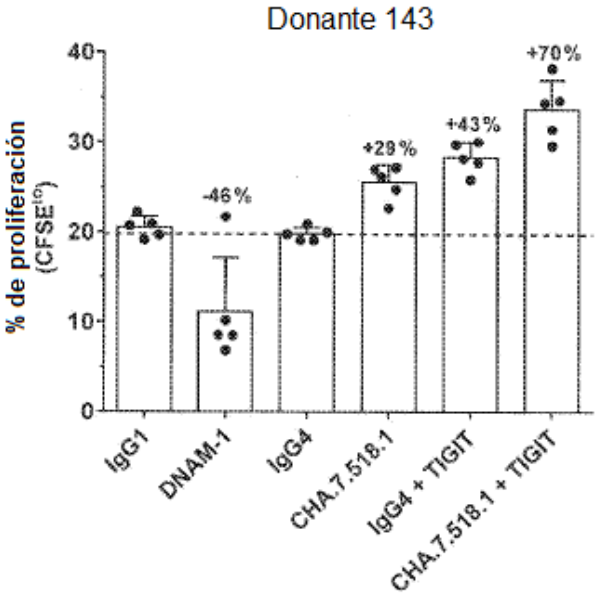


FIG. 33B

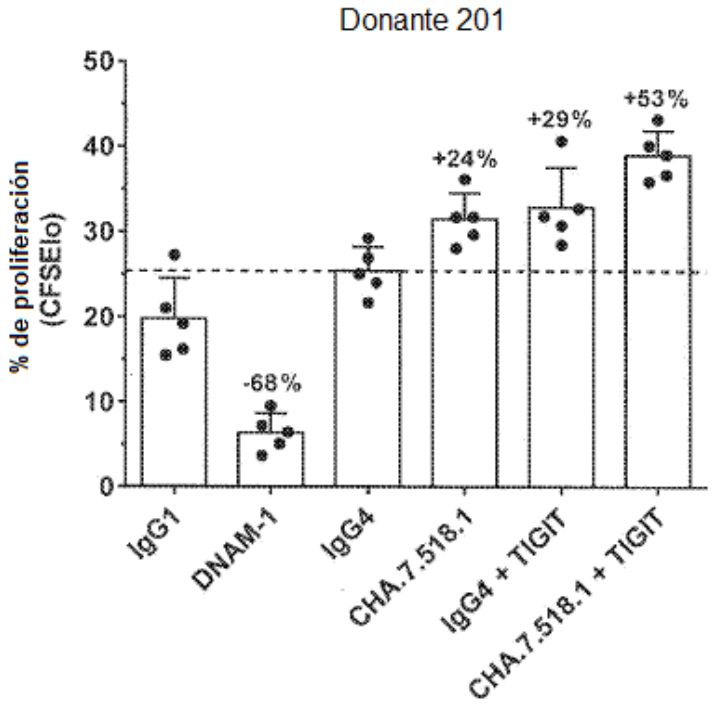


FIG. 34A

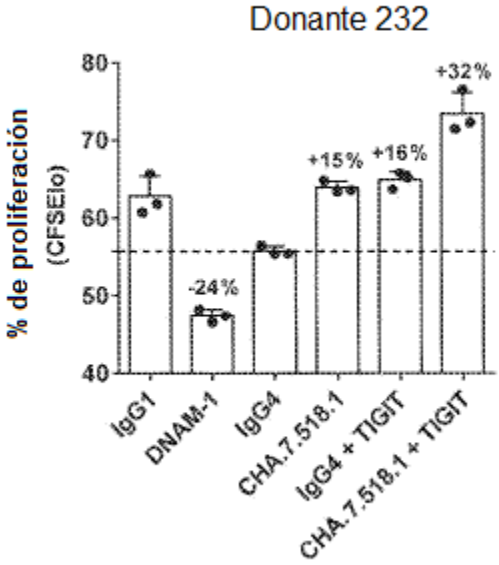


FIG. 34B

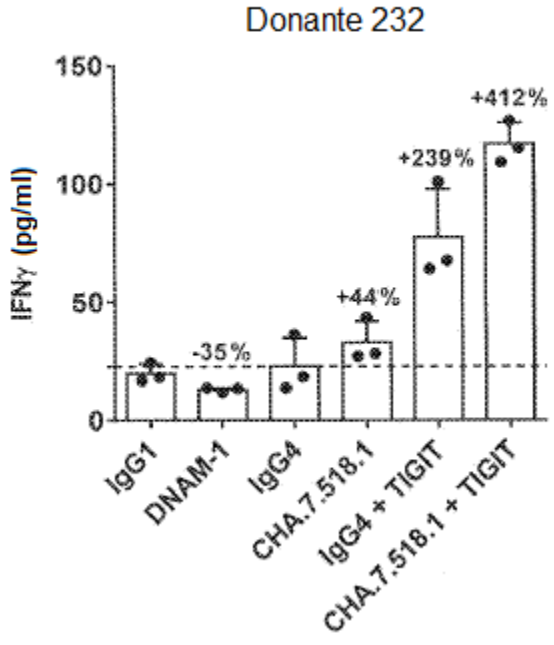


FIG. 35

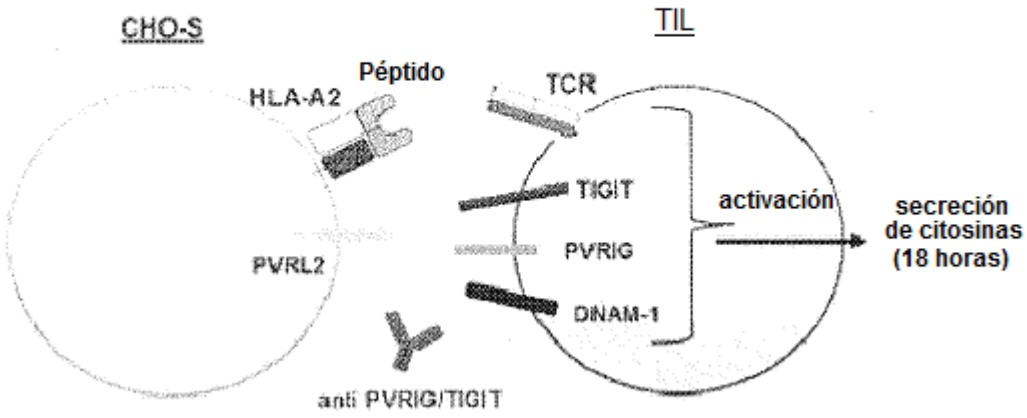

CHO-S
TIL
Péptido
HLA-A2
TCR
TIGIT
activación
secreción
de citosinas
(18 horas)
PVRL2
PVRIG
DNAM-1
anti PVRIG/TIGIT

FIG. 36A

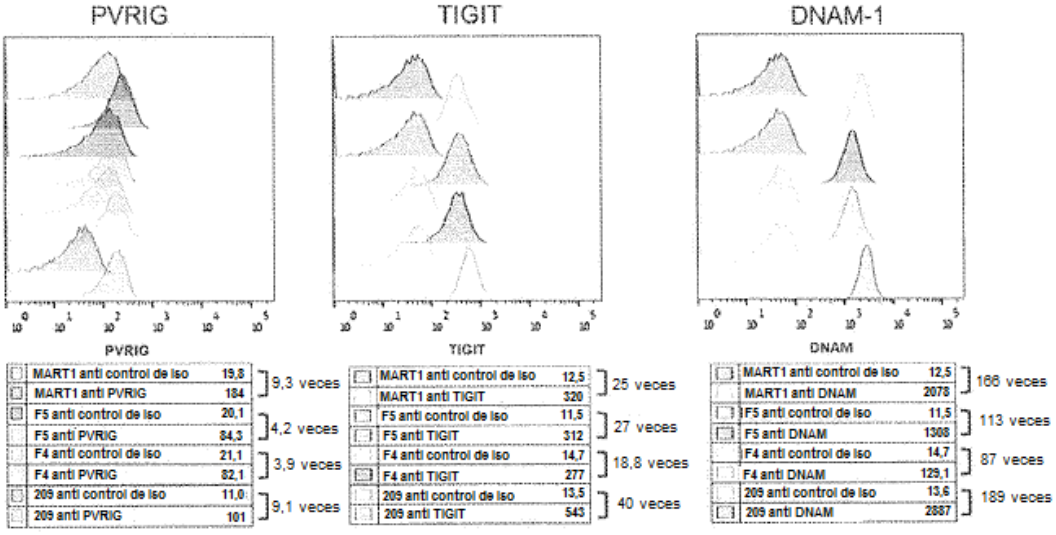


FIG. 36B

FIG. 36C

FIG. 37

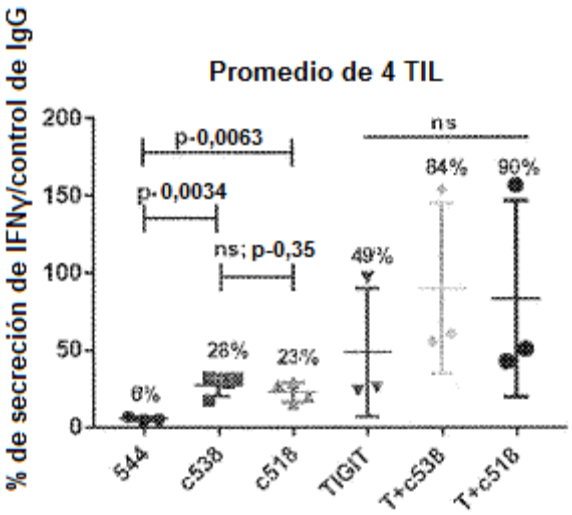

Promedio de 4 TIL
% de secreción de IFNγ/control de IgG
200
150
100
50
0
p-0,0063
p-0,0034
ns; p-0,35
ns
6%
26%
23%
49%
84%
90%
544
c538
c518
TIGIT
T+c538
T+c518

FIG. 38A

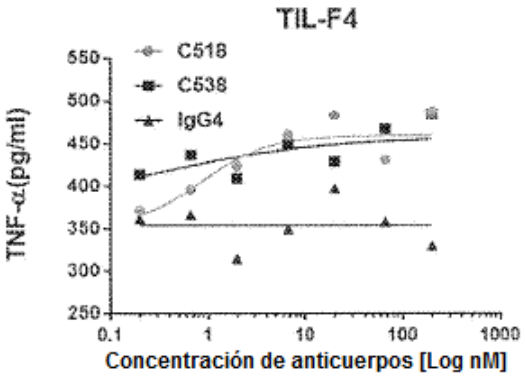


FIG. 38B

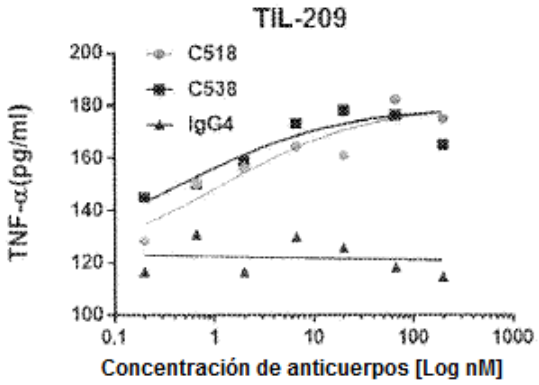


FIG. 39A

péptido 0,5 ug/ml		TIGIT	544	c538	c518	TIGIT+c518
TIL-209	IFNγ	111%	11%	29%	29%	171%
	TNFα	181%	17%	20%	23%	216%
TIL-F4	IFNγ	32%	<5%	<5%	11%	47%
	TNFα	63%	<5%	<5%	21%	83%
TIL-F5	IFNγ	37%	15%	39%	56%	86%
	TNFα	44%	5%	<5%	9%	54%

péptido 0,1 ug/ml		544	c538	c518
TIL-209	IFNγ	12%	48%	39%
	TNFα	20%	47%	38%
TIL-F4	IFNγ	8%	13%	9%
	TNFα	7%	31%	15%
TIL-F5	IFNγ	3%	31%	21%
	TNFα	0%	10%	14%

FIG. 39B

péptido 0,1 ug/ml		544	c538	c518	TIGIT	c538+ TIGIT	c518+ TIGIT
TIL-209	IFNγ	2%	16%	19%	97%	154%	157%
	TNFα	7%	28%	27%	150%	190%	180%
TIL-F4	IFNγ	2%	12%	7%	26%	56%	51%
	TNFα	15%	31%	18%	39%	55%	60%
TIL-F5	IFNγ	8%	4%	10%	24%	61%	43%
	TNFα	11%	16%	20%	35%	56%	59%
MART-1	IFNγ	50%	53%	81%	39%	87%	81%

FIG. 39C

FIG. 40A

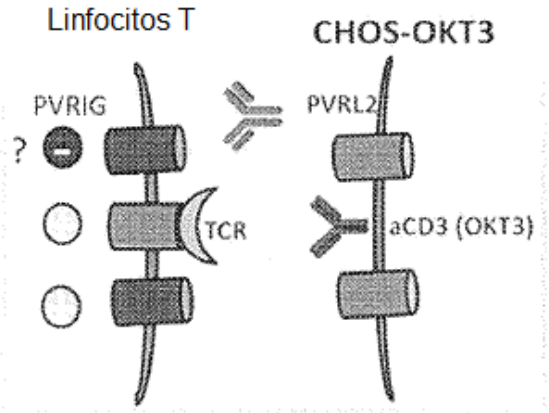


FIG. 40B

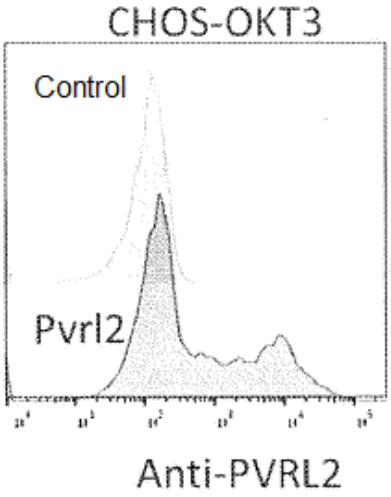


FIG. 41A

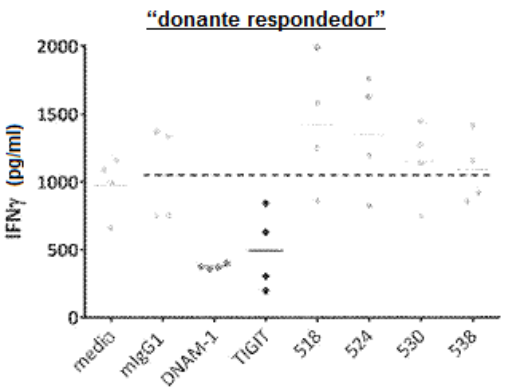


FIG. 41B

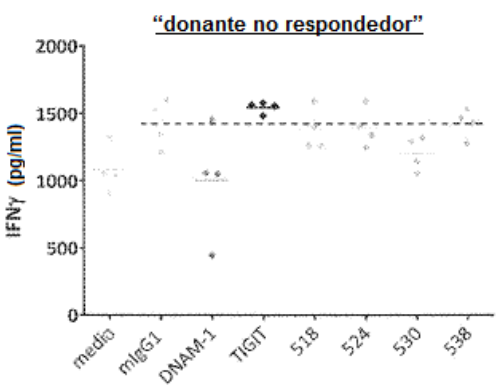


FIG. 42A

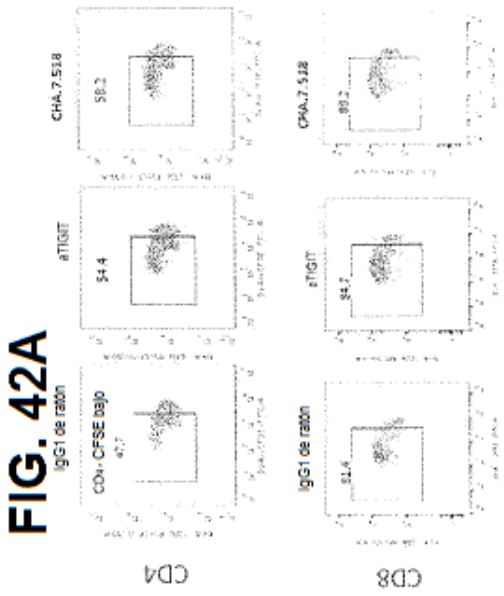


FIG. 42B

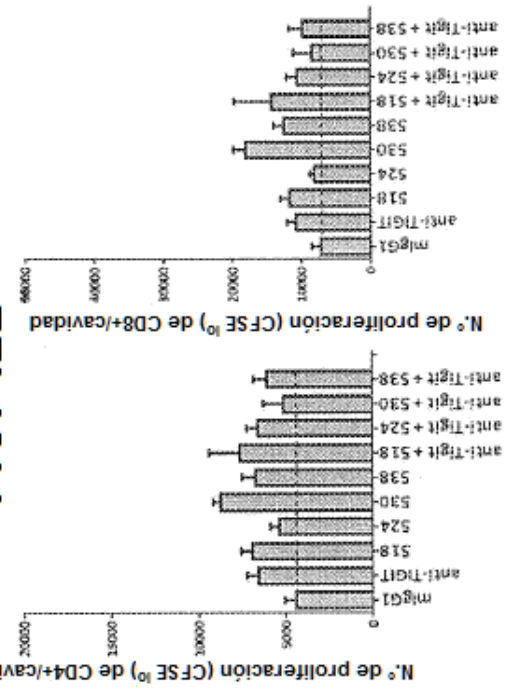


FIG. 43A

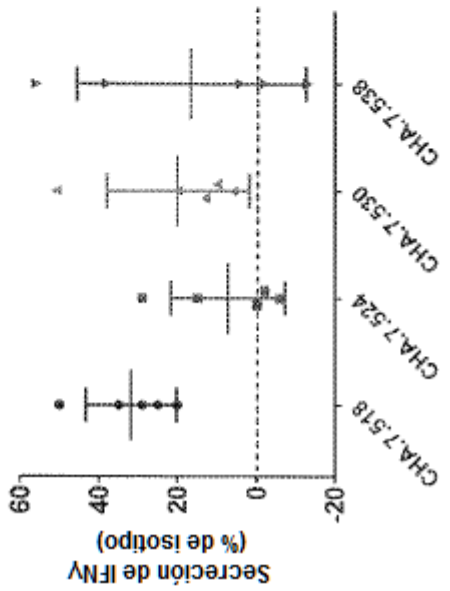


FIG. 43B

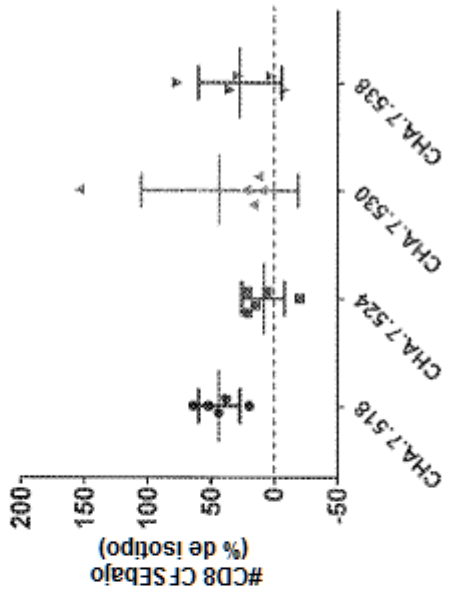


FIG. 43C

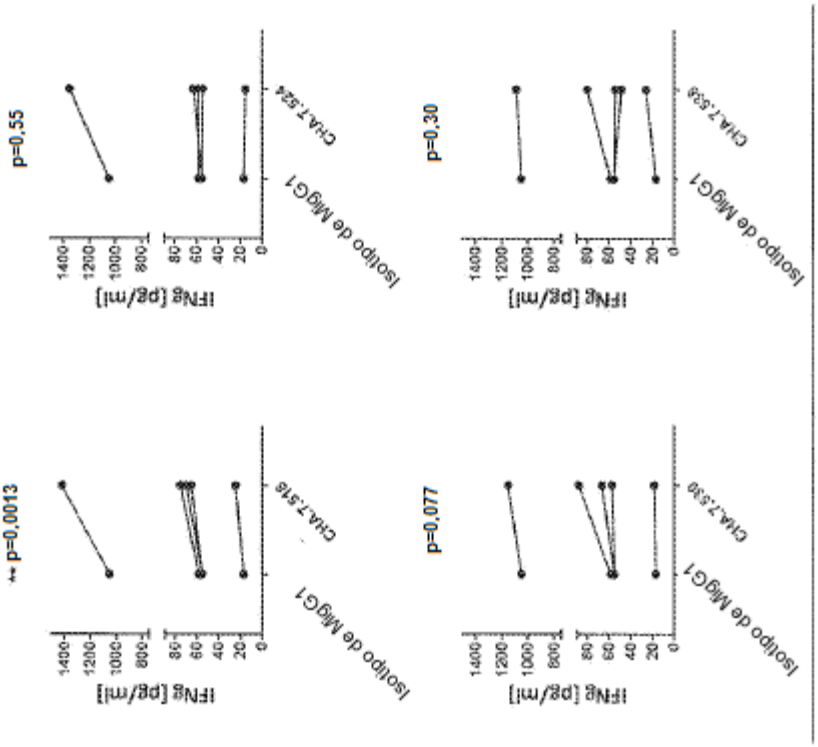

** p=0,0013
p=0,55
p=0,077
p=0,30
IFNg [pg/ml]
Isotipo de MigG1
CHA.7.518
CHA.7.524
CHA.7.530
CHA.7.538

FIG. 44

% de efecto (contra isotipo)	n.° de exp.	Donante	IFNg	n.° total de CD4+ CFSE bajo	n.° total de CD8+ CFSE bajo
CHA.7.518	410-IB-003	3	25%	24%	52%
	410-IB-003	72	29%	58%	64%
	400-ES-002	226	50%	16%	38%
	400-ES-002	345	20%	-26%	20%
	400-ES-002	ES_001	35%	39%	44%
	400-ES-003	ES_002	-3%	-22%	-17%
	400-ES-003	ES_004	-20%	-14%	-15%
	400-ES-003	ES_005	1%	5%	1%
	400-ES-003	ES_006	-11%	4%	12%
	400-ES-003	ES_007	4%	6%	15%
CHA.7.524	410-IB-003	3	-2%	-9%	-20%
	410-IB-003	72	0%	23%	15%
	400-ES-002	226	-6%	0%	6%
	400-ES-002	345	15%	-21%	21%
	400-ES-002	ES_001	29%	25%	21%
	400-ES-003	ES_002	-2%	-10%	-14%
	400-ES-003	ES_004	-18%	-8%	-7%
	400-ES-003	ES_005	12%	10%	12%
	400-ES-003	ES_006	2%	8%	-10%
	400-ES-003	ES_007	-4%	-4%	2%
CHA.7.530	410-IB-003	3	20%	16%	10%
	410-IB-003	72	51%	98%	154%
	400-ES-002	226	13%	3%	13%
	400-ES-002	345	6%	-25%	23%
	400-ES-002	ES_001	10%	20%	17%
	400-ES-003	ES_002	-15%	-23%	-29%
	400-ES-003	ES_004	-20%	-7%	-10%
	400-ES-003	ES_005	11%	5%	13%
	400-ES-003	ES_006	-20%	5%	17%
	400-ES-003	ES_007	0%	0%	11%
CHA.7.538	410-IB-003	3	-13%	1%	-8%
	410-IB-003	72	38%	53%	77%
	400-ES-002	226	56%	24%	29%
	400-ES-002	345	-2%	-22%	35%
	400-ES-002	ES_001	4%	0%	3%
	400-ES-003	ES_002	0%	1%	1%
	400-ES-003	ES_004	-21%	-9%	-5%
	400-ES-003	ES_005	18%	-1%	0%
	400-ES-003	ES_006	-21%	6%	13%
	400-ES-003	ES_007	-4%	11%	20%

FIG. 45A

Células	Anticuerpo	Kd	gMFI
HEK hPVRIG	CPA.7.021 IgG4	2,939	18,17
HEK hPVRIG	CHA7.518 M1	0,36	42,24
Jurkat	CPA.7.021 IgG4	3,18	10,08
Jurkat	CHA7.518 M1	0,24	6,58

FIG. 45B

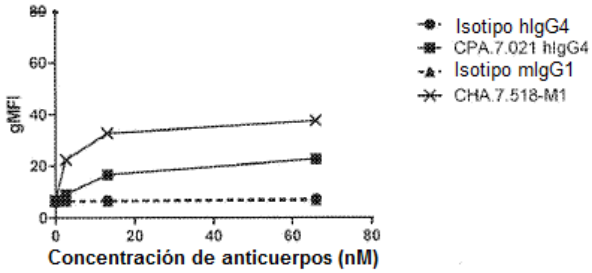


FIG. 45C

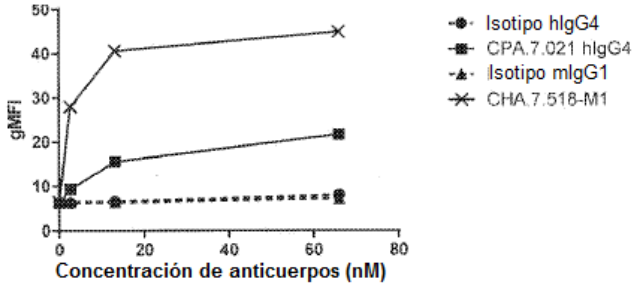


FIG. 46A

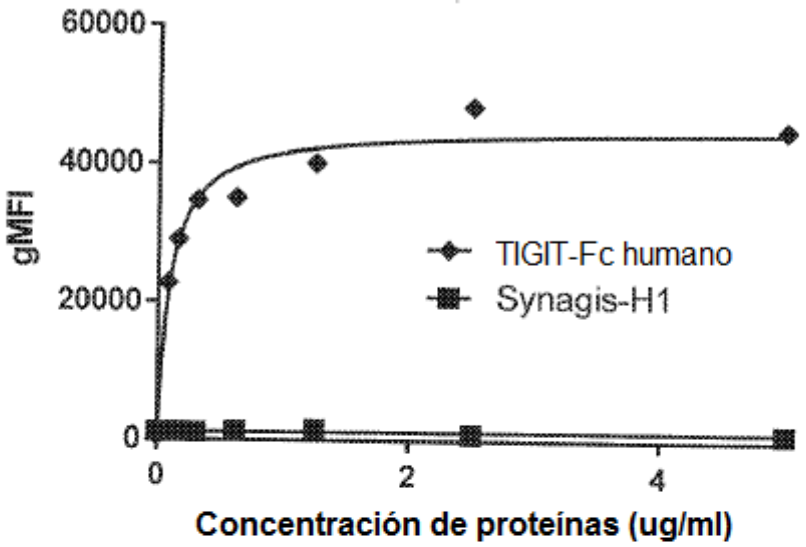


FIG. 46B

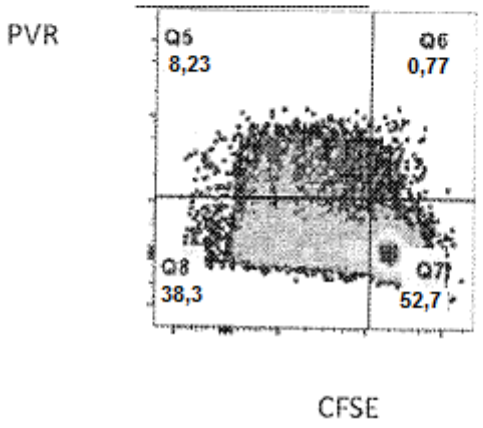


FIG. 47A y 47B

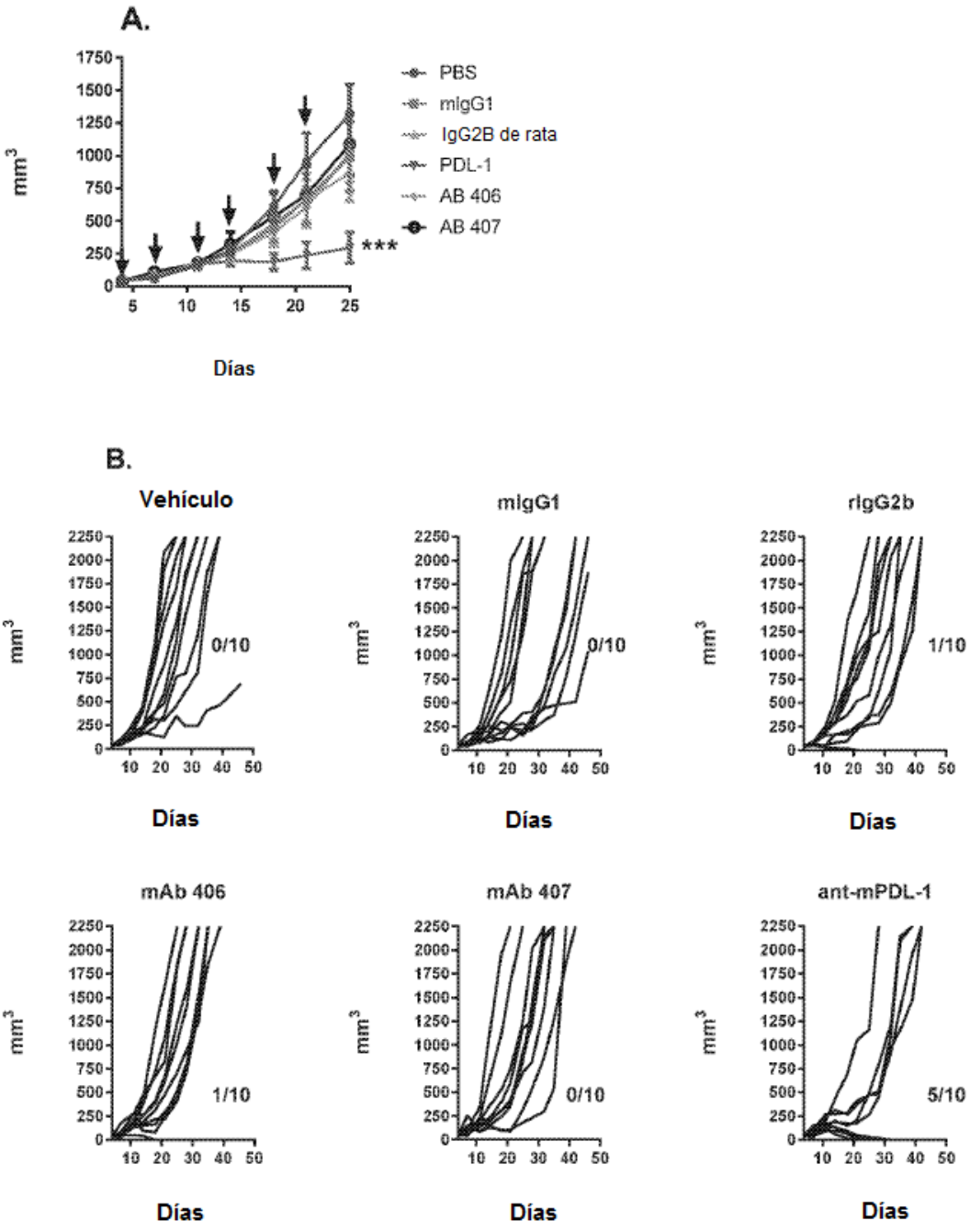

A.
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
mm3
5
10
15
20
25
Días
PBS
mIgG1
IgG2B de rata
PDL-1
AB 406
AB 407
***
B.
Vehículo
0/10
mIgG1
0/10
rIgG2b
1/10
mAb 406
1/10
mAb 407
0/10
ant-mPDL-1
5/10
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
10
20
30
40
50
Días

FIG. 47C

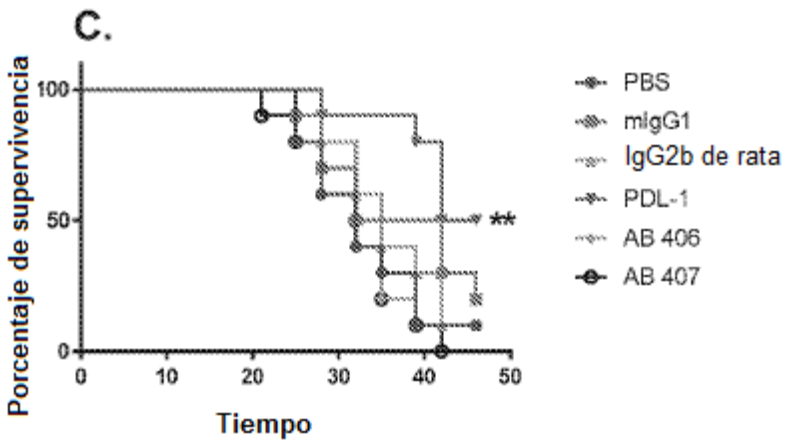

C.
Porcentaje de supervivencia
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Tiempo
**
PBS
mIgG1
IgG2b de rata
PDL-1
AB 406
AB 407

FIG. 48A y 48B

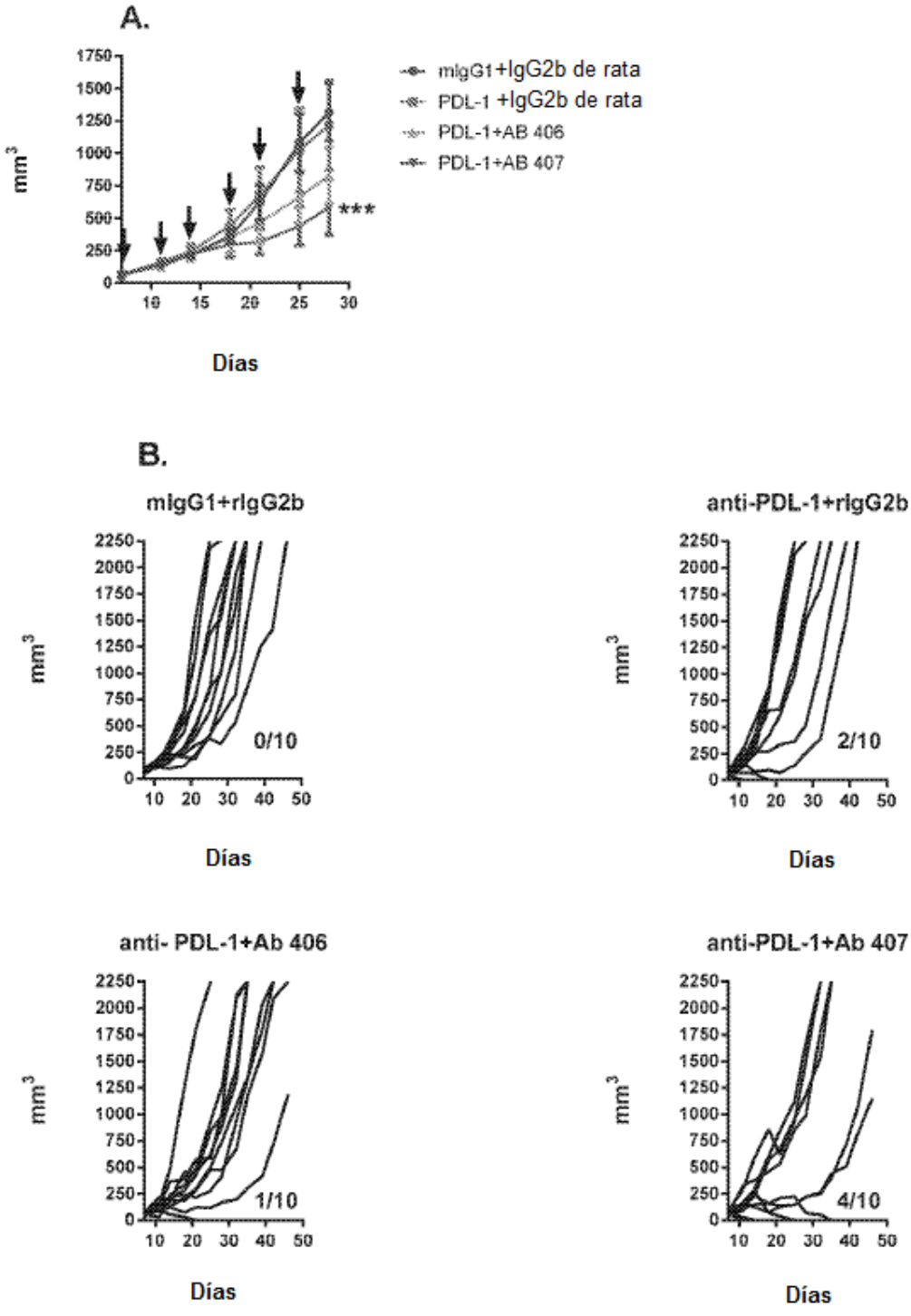

A.
mm3
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
10
15
20
25
30
***
Días
mIgG1+IgG2b de rata
PDL-1 +IgG2b de rata
PDL-1+AB 406
PDL-1+AB 407
B.
mIgG1+rIgG2b
0/10
anti-PDL-1+rIgG2b
2/10
anti- PDL-1+Ab 406
1/10
anti-PDL-1+Ab 407
4/10
2250
2000
40
50
Días

FIG. 48C

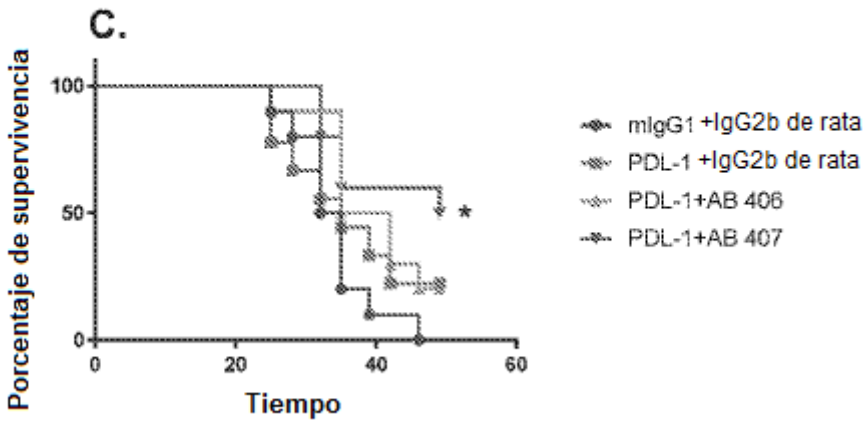

C.
Porcentaje de supervivencia
100
50
0
0
20
40
60
Tiempo
*
mIgG1 +IgG2b de rata
PDL-1 +IgG2b de rata
PDL-1+AB 406
PDL-1+AB 407

FIG. 49A, 49B, 49C y 49D

A)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Cadena pesada: secuencia de aminoácidos

MEWNWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELAKPGSSVMISCKASGYTFTN
YAVHWIKQTTGQALEWTGYIAPGSGVTKYNEKFKGKATLTVDKSSTTAYMQLSSLTPVDTAVYYCASGTTRFAYWGQ
GTLVTVSSAQTTAPSVYPLAPGCGDTTSSTVTLGCLVKG **(SEQ ID NO:84)**

B)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Cadena pesada: secuencia de ADN

ATGGAATGGAACTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGAGTCCACTCCCAGGTCCAGC
TGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCAAAGCCTGGCTCTTCAGTGATGATTTCCTGCAAGGCTTCTGG
TTACACCTTTACCAACTATGCTGTGCACTGGATAAAGCAGACGACTGGACAGGCCCTTGAGTGGACT
GGATATATTGCTCCTGGAAGTGGAGTTACTAAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGA
CTGTAGACAAATCCTCAACCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACACCTGTGGACACTGCGGT
CTATTACTGTGCAAGCGGAACTACGAGGTTTGCTTATTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCT
TCA GCCCAAACAACAGCCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCTGGATGTGGTGATACAACCAGC
TCCACGGTGACTCTGGGATGCCTGGTCAAGGGC **(SEQ ID NO:85)**

C)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Cadena liviana: secuencia de aminoácidos

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVSLSSYNLMQWYQQKPGQEP
KILIYDASNLPSGIPARFSGSGSGTDFTLTIDPVQADDIATYYCQQSKDDPLTFGSGTKLEIK **(SEQ ID NO:86)**

D)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Cadena liviana: secuencia de ADN

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTG
TGCTGACCCAGTCTCCTGCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACAATCTCCTGTAGAGCCAG
CCAAAGTGTCAGTTTATCCAGCTATAATCTCATGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGAACCC
AAAATCCTCATCTATGATGCATCCAACCTACCATCTGGGATCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGCAGGCTGATGATATTGCAACCTATTACTGTCA
GCAGAGTAAGGATGACCCGCTCACGTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAA **(SEQ ID NO:87)**

FIG. 50

Región constante de IgG1 humana **(SEQ ID NO:88)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de D265A de IgG1 humana **(SEQ ID NO:89)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVV[A]VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de N297A de IgG1 humana **(SEQ ID NO:90)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY[A]STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG2 humana **(SEQ ID NO:91)**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG3 humana **(SEQ ID NO:92)**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCD
TPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ
FKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

FIG. 50 continuación

Región constante de IgG4 humana (tipo silvestre) **(SEQ ID NO:93)**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de IgG4 humana (mutante de bisagra S241P) **(SEQ ID NO:94)**

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena liviana kappa humana **(SEQ ID NO:95)**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena liviana lambda humana **(SEQ ID NO:96)**

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAA
SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 51

ECD de TIGIT humano **(SEQ ID NO:97)**

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGP
GLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP

ECD de TIGIT de *Macaca Fascicularis* **(SEQ ID NO:98)**

MMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVTQVNWEQHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPG
PGLGLTLQSLTMNDTGEYFCTYHTYPDGTYRGRIFLEVLESSVAEHSARFQIP

ECD de PVR humana **(SEQ ID NO:99)**

DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMAVFHQTQGPSYSESKRLEFV
AARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDIWLRVLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPM
ARCVSTGGRPPAQITWHSDLGGMPNTSQVPGFLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKP
QLLTVNLTVYYPPEVSISGYDNNWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLI
RPVDKPINTTLICNVTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGMSRN

FIG. 52

Campaña	ID del anticuerpo	MFIr (OE/Par) hTIGIT	MFIr (OE/Par) cTIGIT
1	CPA.9.002	98	ND
1	CPA.9.009	8,7	ND
1	CPA.9.011	12	ND
1	CPA.9.012	12	ND
1	CPA.9.013	25	ND
1	CPA.9.014	110	ND
1	CPA.9.015	10	ND
1	CPA.9.018	16	ND
1	CPA.9.053	4,4	ND
2	CPA.9.057	30	ND
2	CPA.9.059	11	ND
2	CPA.9.064	5	ND
2	CPA.9.069	5	ND
2	CPA.9.071	5,7	ND
2	CPA.9.077	19	ND
2	CPA.9.081	7,6	ND
3	CPA.9.027	110	ND
3	CPA.9.049	94	ND
4	CPA.9.083	170	97
4	CPA.9.086	36	34
4	CPA.9.089	110	52
4	CPA.9.093	80	60
4	CPA.9.101	130	22
4	CPA.9.103	95	30

FIG. 53A: CPA.9.086

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS	160
vhCDR1	GFTFSSYA	161
vhCDR2	ISYAGEVK	162
vhCDR3	ARDPLPLHYYGMDV	163
HC de longitud completa (IgG4(S241P))	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	164
Dominio liviano variable (vl)	QSALTQPRSASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLG	165
vlCDR1	SSNMGRRP	166
vlCDR2	SQN	167
vlCDR3	AVWDDIGRVLQ	168
Cadena liviana de longitud completa	QSALTQPRSASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	169

FIG. 53B: CPA.9.083

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGTPVYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSS	150
vhCDR1	GFTFSSYA	151
vhCDR2	ISYDGTPV	152
vhCDR3	ARDPLPLHYYGMDV	153
HC de longitud completa (IgG4(S241P))	EVQLVETGGGLIQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGTPVYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	154
Dominio liviano variable (vl)	QSALTQPRSASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDGDRRSLQLGGGTQLAVLG	155
vlCDR1	SSNMGRRP	156
vlCDR2	SQN	157
vlCDR3	AVWDGDRRSLQ	158
Cadena liviana de longitud completa	QSALTQPRSASGNPGQRVTISCSGSSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDGDRRSLQLGGGTQLAVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	159

FIG. 53C: CHA.9.547.13

Qué	secuencia	SEQ ID NO:
Dominio pesado variable (vh)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGTNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGTLVTVSS	560
vhCDR1	GFTFSSYIMS	561
vhCDR2	TISGGGTNTY	562
vhCDR3	WLLSYYAMDY	563
HC de longitud completa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGTNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	564
Dominio liviano variable (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQNINVWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQGQSYPYTFGQGTKLEIK	565
vlCDR1	RASQNINVWLS	566
vlCDR2	KASKSHT	567
vlCDR3	QQGQSYPYT	568
Cadena liviana de longitud completa	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQNINVWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQGQSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	569

FIG. 54

Anticuerpo	Fecha	K_d ± 95 % de intervalo de confianza del ajuste
BM26	12/12/2016	490 pM ± 80 pM
BM29	12/12/2016	760 pM ± 180 pM
CPA.9.027	18/10/2016	170 pM ± 40 pM
CPA.9.049	21/7/2016	260 pM ± 170 pM
CPA.9.059	18/10/2016	290 pM ± 110 pM
CHA.9.536	12/12/2016	880 pM ± 260 pM
CHA.9.541	12/12/2016	1.24 nM ± 470 pM
CHA.9.543	12/12/2016	10.2 nM ± 3.27 nM
CHA.9.546	12/12/2016	1.22 nM ± 390 pM
CHA.9.547	12/12/2016	720 pM ± 200 pM
CHA.9.560	12/12/2016	1.02 nM ± 210 pM

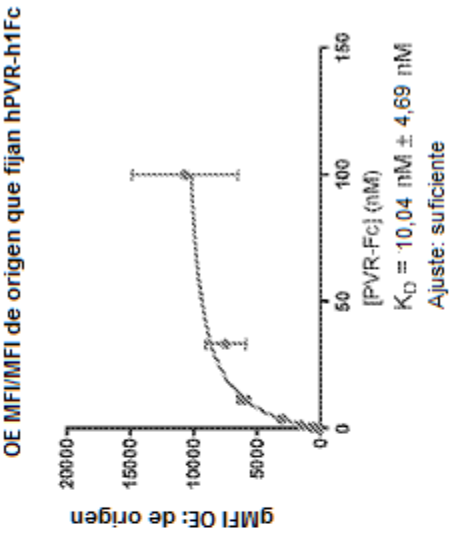
FIG. 55

Anticuerpo	Fecha	K_d ± 95 % de intervalo de confianza del ajuste
BM26	12/12/2016	670 pM ± 240 pM
BM29	12/12/2016	Not Reliable Fit
CPA.9.027	18/10/2016	2.25 nM ± 760 pM
CPA.9.049	21/7/2016	1.88 nM ± 1.09 nM
CPA.9.059	2/9/2016	Ajuste no confiable
CHA.9.536	12/12/2016	2.15 nM ± 590 pM
CHA.9.541	12/12/2016	2.09 nM ± 280 pM
CHA.9.543	12/12/2016	17.2 nM ± 3.82 nM
CHA.9.546	12/12/2016	1.36 nM ± 270 pM
CHA.9.547	12/12/2016	1.40 nM ± 390 pM
CHA.9.560	12/12/2016	1.84 nM ± 140 pM

FIG. 56

	TIGIT humano			TIGIT de *Macaca fascicularis*			TIGIT de ratón		
MAb	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
	(/s)	(/M-s)	(M)	(/s)	(/M-s)	(M)	(/s)	(/M-s)	(M)
CPA.9.027	1,94E+06	2,51E-04	1,30E-10	Cinética del complejo			4,50E+05	3,60E-02	8,00E-08
CPA.9.049	1,68E+06	1,58E-04	9,45E-11	Cinética del complejo			4,65E+05	3,85E-02	8,27E-08
CPA.9.059	1,88E+06	4,01E-05	2,13E-11	Cinética del complejo			N/A		
CHA.9.536	8,81E+05	*1,00E-05	1,13E-11	1,18E+06	2,90E-04	2,45E-10	Sin fijación		
CHA.9.541	4,41E+05	3,64E-05	8,08E-11	1,75+06	*1,00E-05	5,73E-12	Sin fijación		
CHA.9.543	1,97E+06	4,54E-05	2,31E-11	6,46+06	*1,00E-05	1,55E-12	Sin fijación		
CHA.9.546	1,19E+06	2,68E-04	2,26E-11	2,20+06	1,23E-03	5,56E-10	Sin fijación		
CHA.9.547	2,69E+06	1,03E-04	3,84E-11	3,34+06	5,15E-04	1,54E-10	Sin fijación		
CHA.9.560	1,04E+06	1,59E-06	*1,52E-12	3,05+06	1,90E-04	6,23E-11	Sin fijación		
BM26	2,05E+06	4,94E-05	2,41E-11	7,99+06	*1,00E-05	1,25E-12	Sin fijación		
BM29	1,63E+06	2,45E-05	1,5E-11	Complejo					

FIG. 57A y 57B


OE MFI/MFI de origen que fijan hPVR-h1Fc
gMFI OE: de origen
20000
15000
10000
5000
0
0
50
100
150
[PVR-Fc] (nM)
K_D = 10,04 nM ± 4,69 nM
Ajuste: suficiente

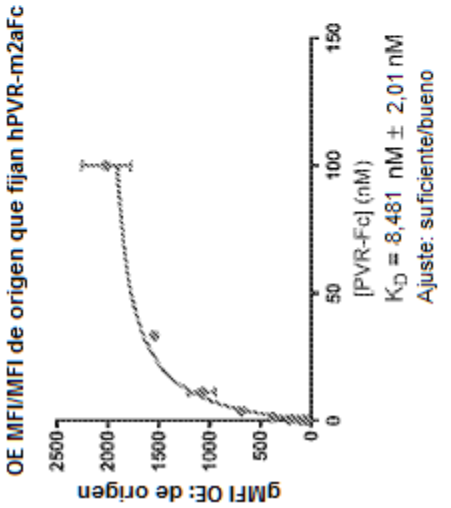

OE MFI/MFI de origen que fijan hPVR-m2aFc
gMFI OE: de origen
2500
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
[PVR-Fc] (nM)
K_D = 8,481 nM ± 2,01 nM
Ajuste: suficiente/bueno

FIG.58

Anticuerpo	6,7 nM mAb		1,3 nM mAb		266 pM mAb	
	Bloqueo (Si/no)	gMFI	Bloqueo (Si/no)	gMFI	Bloqueo (Si/no)	gMFI
BM26	Si	234	Si	401	Si	719
Synagis	No	828	No	964	No	959
CPA.9.027	Si	208	Si	253	Si	529
CPA.9.049	Si	215	Si	276	Si	511
CPA.9.059	Si	209	Si	262	Si	509

FIG. 59

Anticuerpo	Fecha de análisis	IC50 (nM)
BM26	12/10/2016	0,37
BM29	12/10/2016	0,60
CHA.9.536	12/10/2016	0,92
CHA.9.541	12/10/2016	1,24
CHA.9.546	12/10/2016	0,63
CHA.9.547	12/10/2016	0,49
CHA.9.560	12/10/2016	1,12

FIG. 60

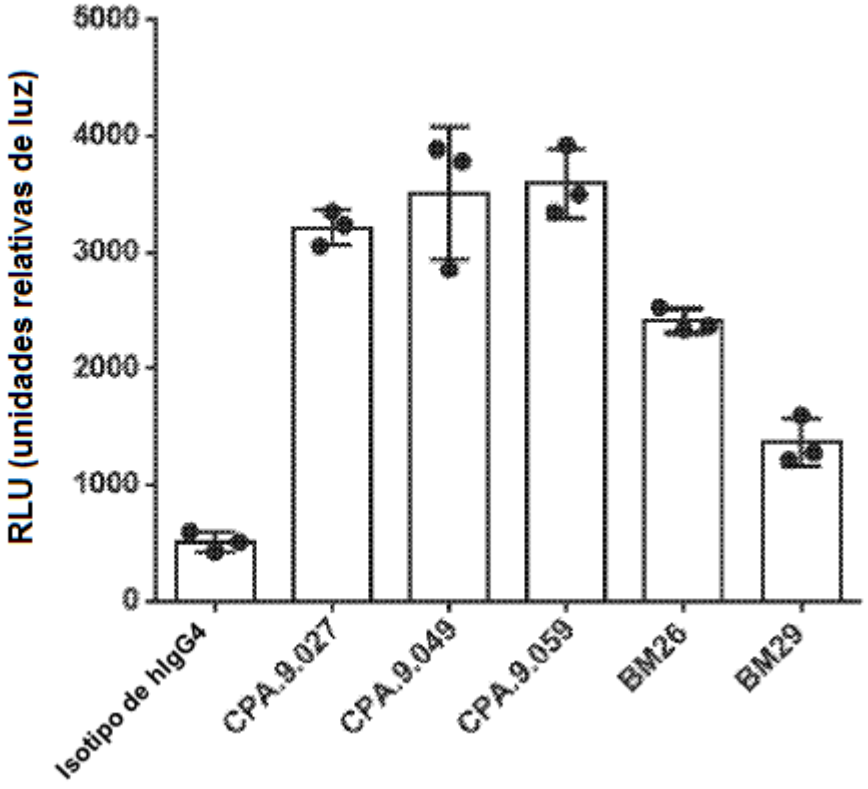
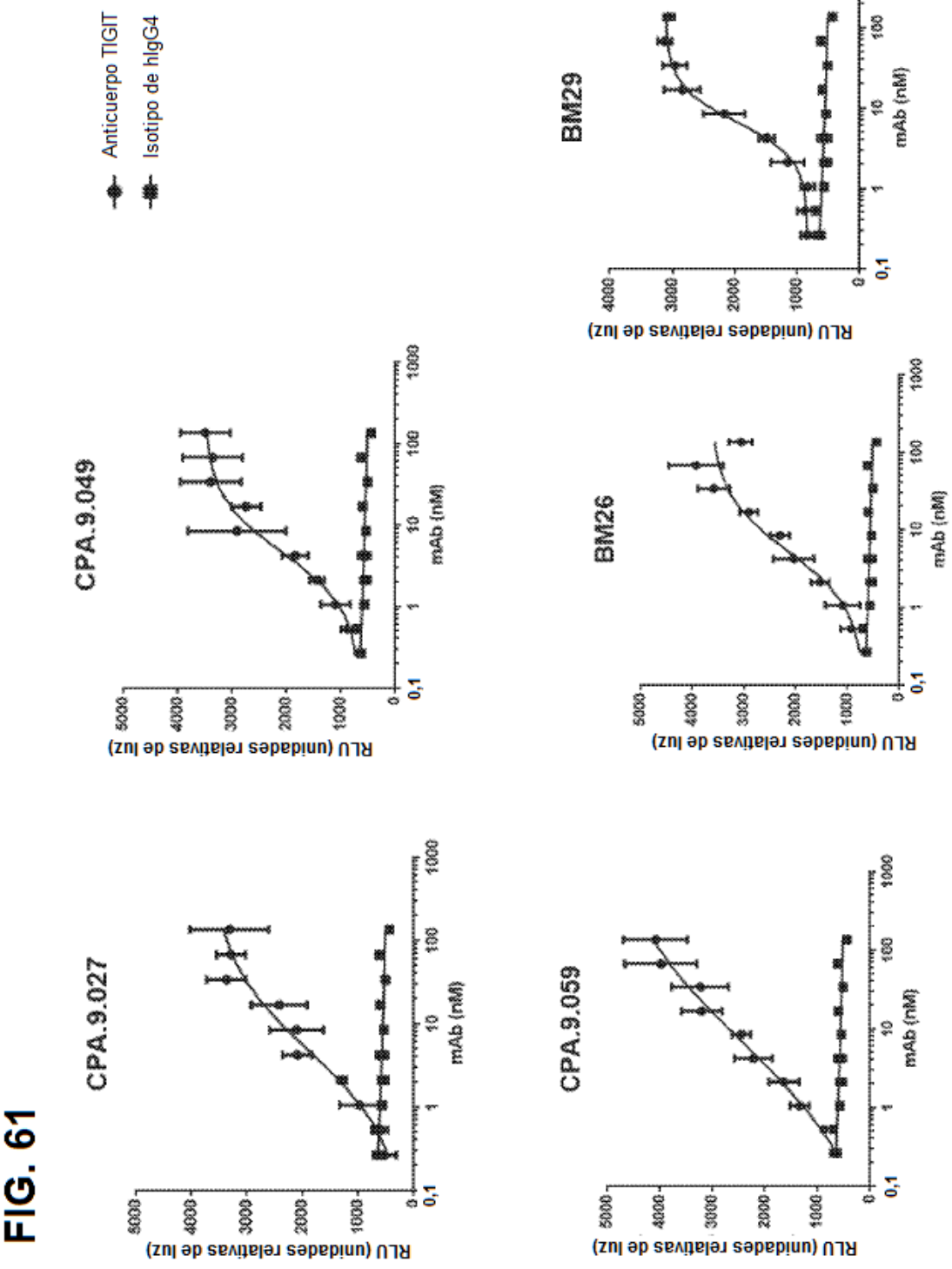

RLU (unidades relativas de luz)
5000
4000
3000
2000
1000
0
Isotipo de hIgG4
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
BM26
BM29

FIG. 61


Anticuerpo TIGIT
Isotipo de hIgG4
CPA.9.027
CPA.9.049
BM29
BM26
CPA.9.059
RLU (unidades relativas de luz)
mAb (nM)
0
1000
2000
3000
4000
5000
0,1
1
10
100
1000

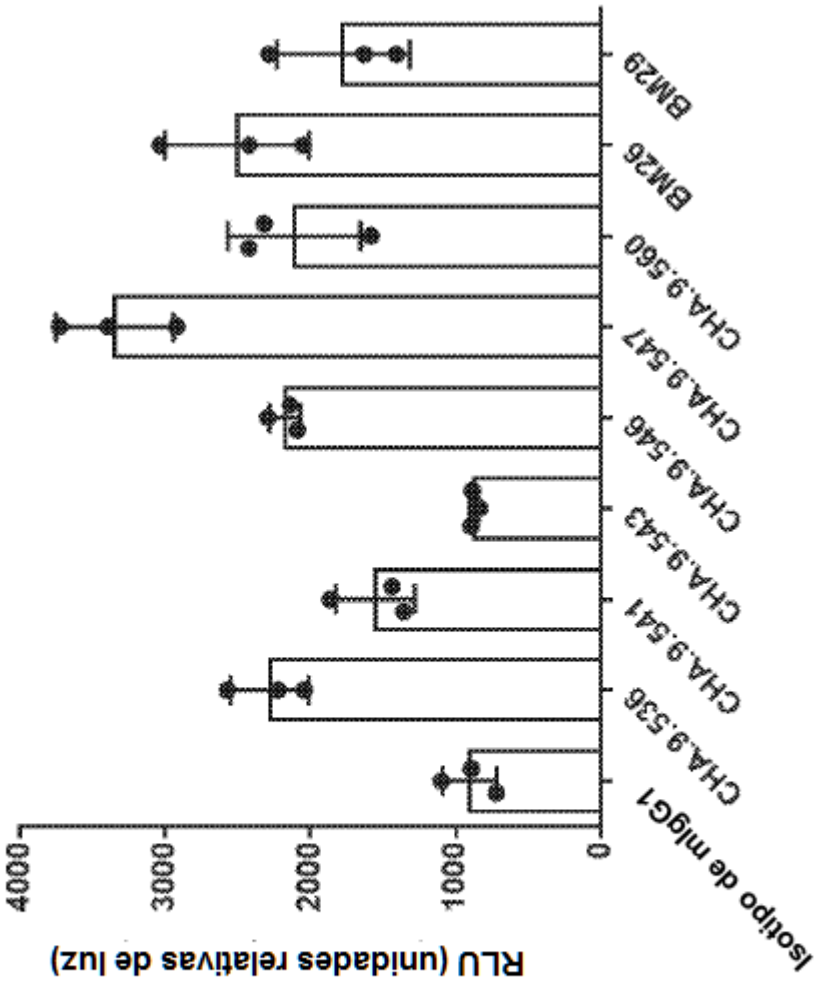

RLU (unidades relativas de luz)
4000
3000
2000
1000
0
Isotipo de mIgG1
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26
BM29

FIG. 62

FIG. 63

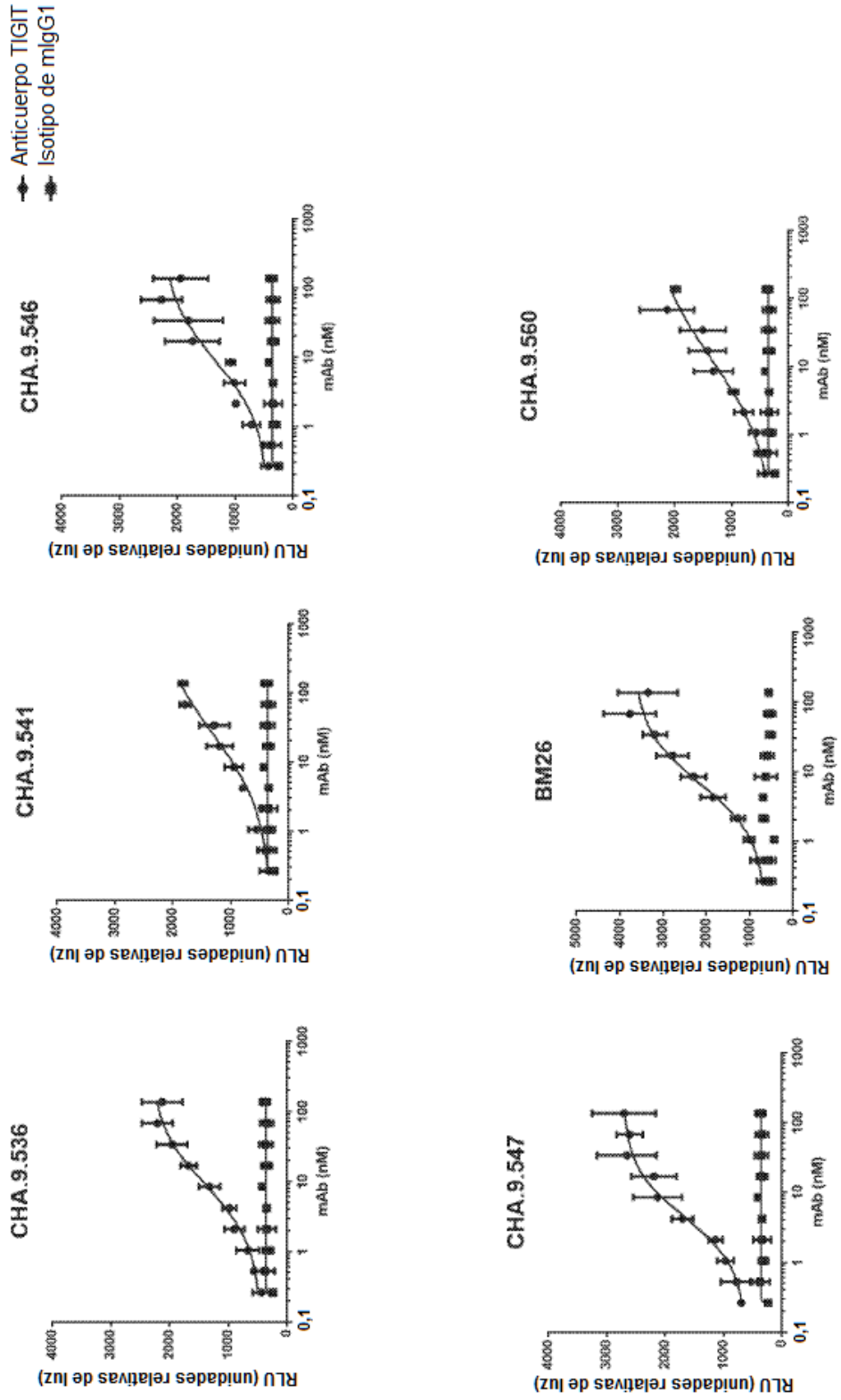

Anticuerpo TIGIT
Isotipo de mIgG1
CHA.9.546
CHA.9.560
CHA.9.541
BM26
CHA.9.536
CHA.9.547
RLU (unidades relativas de luz)
mAb (nM)
0,1
1
10
100
1000
0
1000
2000
3000
4000
5000

FIG. 64

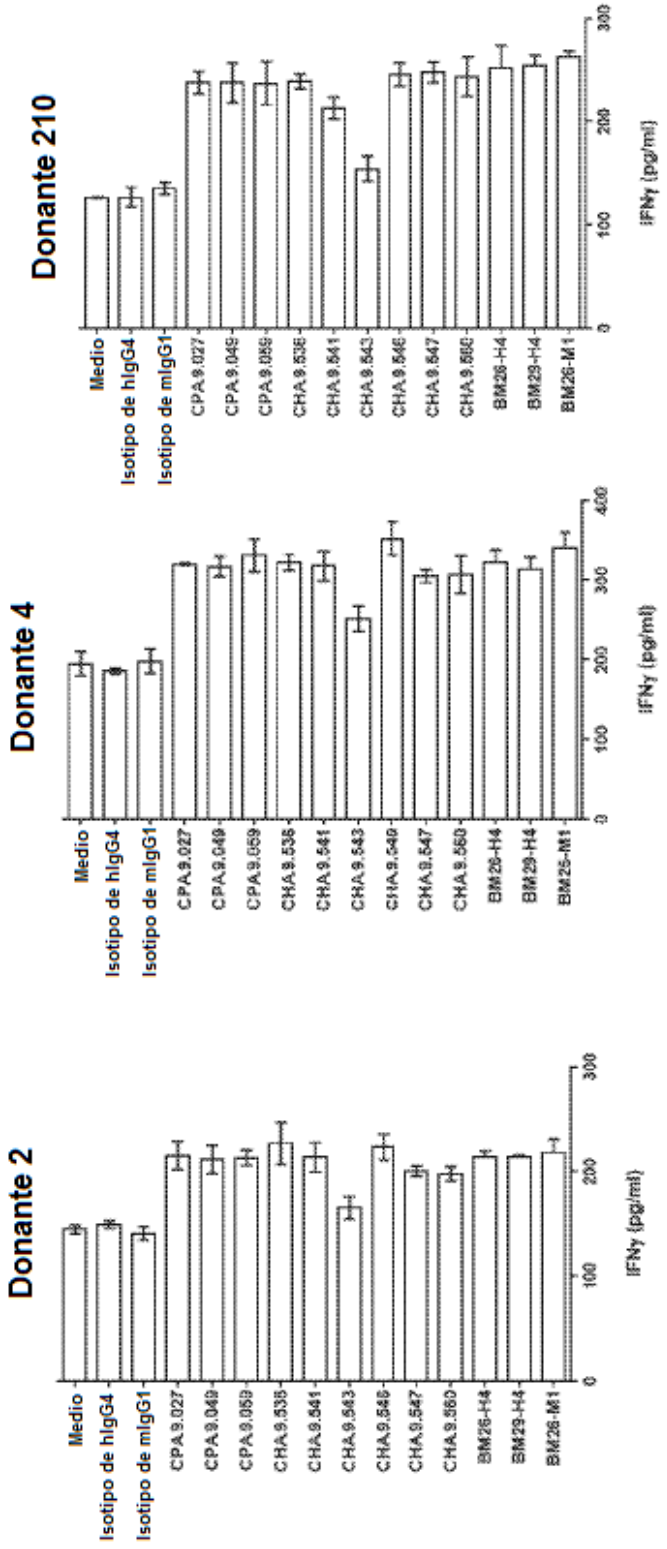

Donante 2
Donante 4
Donante 210
Medio
Isotipo de hIgG4
Isotipo de mIgG1
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26-H4
BM29-H4
BM26-M1
IFNγ (pg/ml)
0
100
200
300
400

FIG. 65

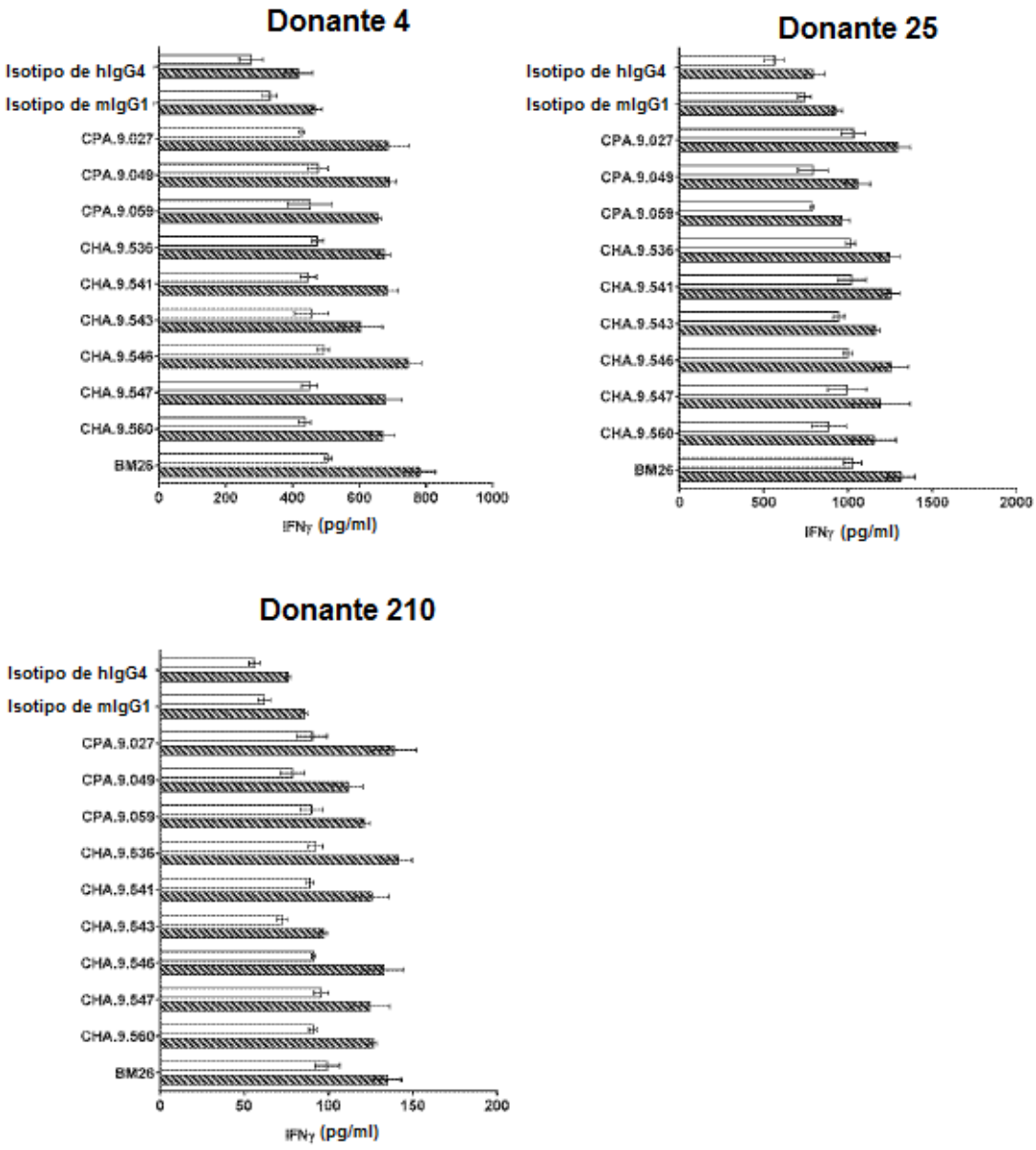

Donante 4
Isotipo de hIgG4
Isotipo de mIgG1
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26
0
200
400
600
800
1000
IFNγ (pg/ml)
Donante 25
Isotipo de hIgG4
Isotipo de mIgG1
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26
0
500
1000
1500
2000
IFNγ (pg/ml)
Donante 210
Isotipo de hIgG4
Isotipo de mIgG1
CPA.9.027
CPA.9.049
CPA.9.059
CHA.9.536
CHA.9.541
CHA.9.543
CHA.9.546
CHA.9.547
CHA.9.560
BM26
0
50
100
150
200
IFNγ (pg/ml)

FIG. 66

	Promedio de 3 donantes	
	Monoterapia	Combinación con CHA.7.518.1
CHA.7.518.1 + isotipo de hIgG4	43	
CPA.9.027-H4	66	142
CPA.9.049-H4	51	112
CPA.9.059-H4	55	108
CHA.7.518.1+ isotipo de mIgG1	39	
CHA.9.536-M1	43	100
CHA.9.541-M1	39	93
CHA.9.543-M1 (no bloqueador)	27	65
CHA.9.546-M1	43	103
CHA.9.547-M1	47	96
CHA.9.560-M1	38	94
BM26	49	107

FIG. 67

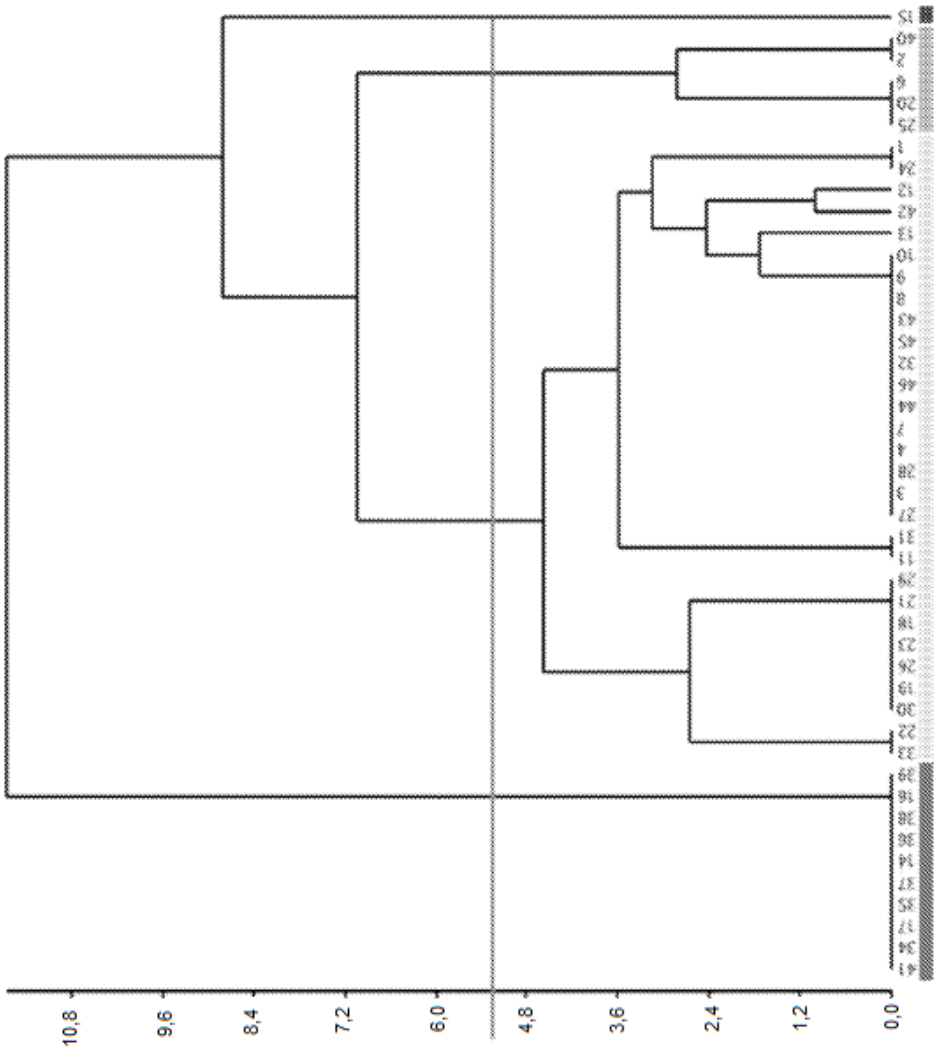


FIG. 68

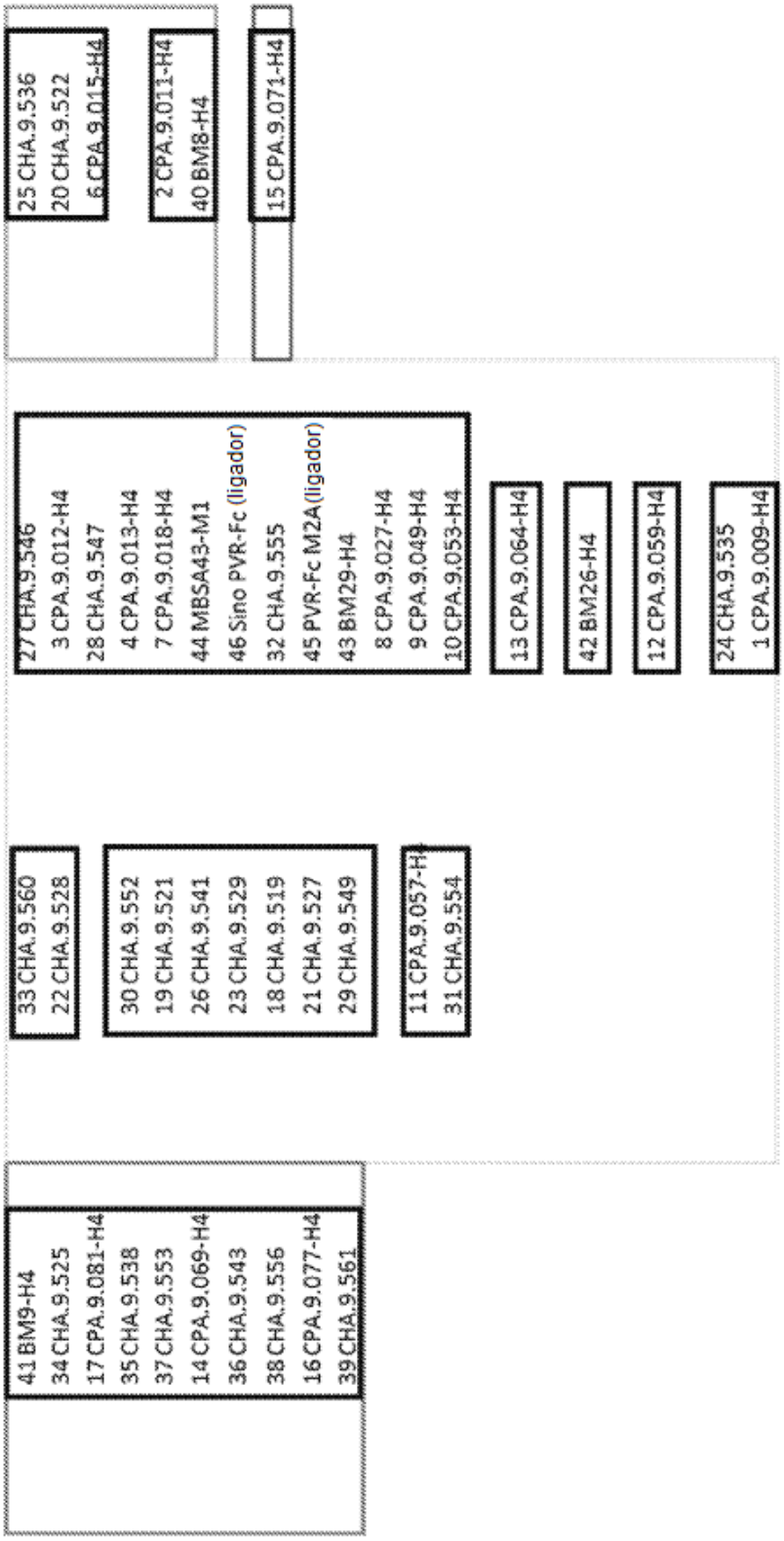

41 BM9-H4
34 CHA.9.525
17 CPA.9.081-H4
35 CHA.9.538
37 CHA.9.553
14 CPA.9.069-H4
36 CHA.9.543
38 CHA.9.556
16 CPA.9.077-H4
39 CHA.9.561
33 CHA.9.560
22 CHA.9.528
30 CHA.9.552
19 CHA.9.521
26 CHA.9.541
23 CHA.9.529
18 CHA.9.519
21 CHA.9.527
29 CHA.9.549
11 CPA.9.057-H
31 CHA.9.554
27 CHA.9.546
3 CPA.9.012-H4
28 CHA.9.547
4 CPA.9.013-H4
7 CPA.9.018-H4
44 MBSA43-M1
46 Sino PVR-Fc (ligador)
32 CHA.9.555
45 PVR-Fc M2A(ligador)
43 BM29-H4
8 CPA.9.027-H4
9 CPA.9.049-H4
10 CPA.9.053-H4
13 CPA.9.064-H4
42 BM26-H4
12 CPA.9.059-H4
24 CHA.9.535
1 CPA.9.009-H4
25 CHA.9.536
20 CHA.9.522
6 CPA.9.015-H4
2 CPA.9.011-H4
40 BM8-H4
15 CPA.9.071-H4

FIG. 69

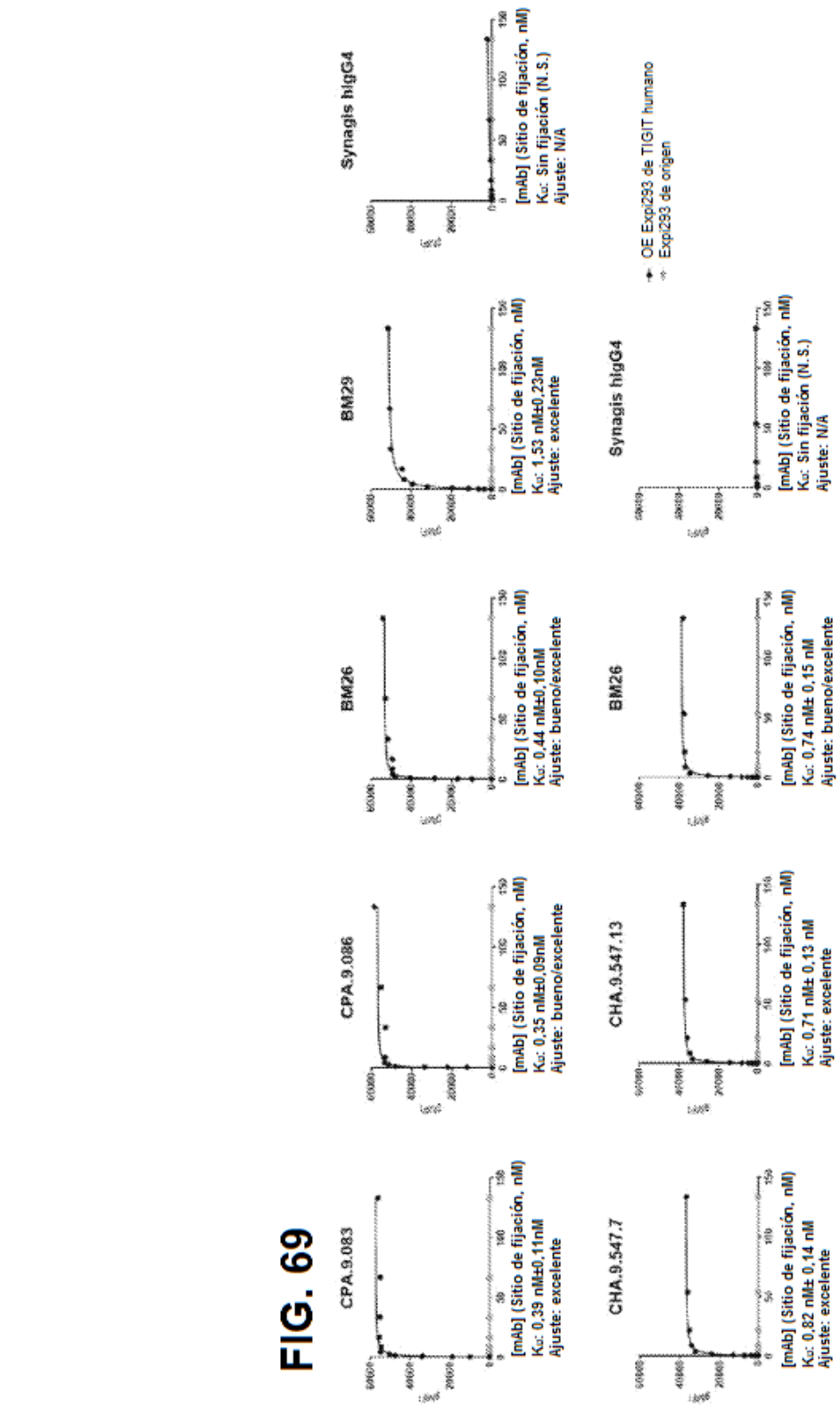

CPA.9.083
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
Kd: 0,82 nM± 0,14 nM
Ajuste: excelente
CPA.9.086
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
Kd: 0,35 nM±0,09nM
Ajuste: bueno/excelente
CHA.9.547.7
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
Kd: 0,71 nM± 0,13 nM
Ajuste: excelente
BM26
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
Kd: 0,44 nM±0,10nM
Ajuste: bueno/excelente
CHA.9.547.13
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
Kd: 0,74 nM± 0,15 nM
Ajuste: bueno/excelente
BM29
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
Kd: 1.53 nM±0,23nM
Ajuste: excelente
Synagis hIgG4
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
Kd: Sin fijación (N.S.)
Ajuste: N/A
OE Expi293 de TIGIT humano
Expi293 de origen
Synagis hIgG4
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
Kd: Sin fijación (N.S.)
Ajuste: N/A

FIG. 70

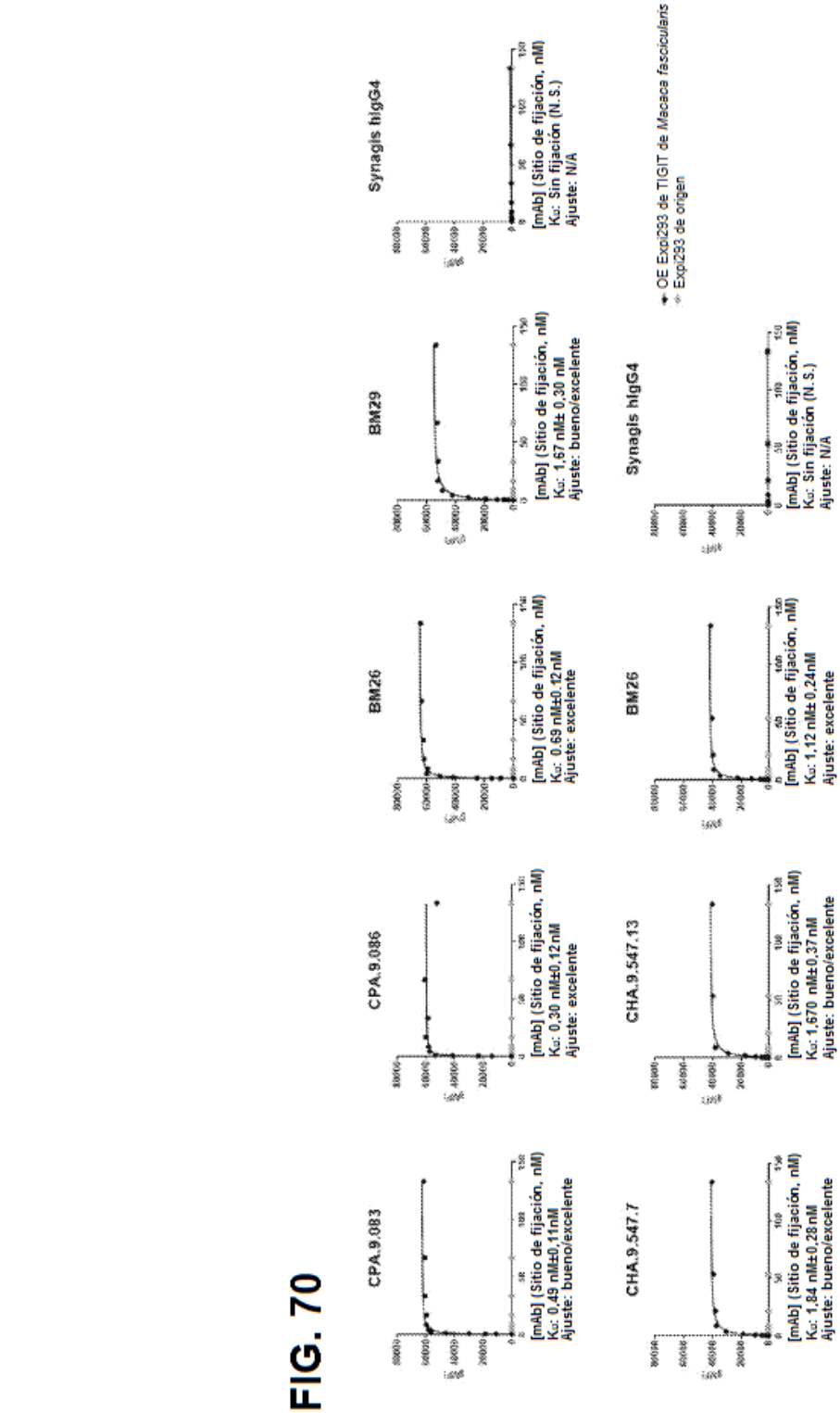

CPA.9.083
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
K_D: 0,49 nM±0,11nM
Ajuste: bueno/excelente
CPA.9.086
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
K_D: 0,30 nM±0,12 nM
Ajuste: excelente
BM26
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
K_D: 0,69 nM±0,12 nM
Ajuste: excelente
BM29
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
K_D: 1,67 nM± 0,30 nM
Ajuste: bueno/excelente
Synagis hIgG4
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
K_D: Sin fijación (N.S.)
Ajuste: N/A
CHA.9.547.7
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
K_D: 1,84 nM±0,28 nM
Ajuste: bueno/excelente
CHA.9.547.13
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
K_D: 1,670 nM±0,37 nM
Ajuste: bueno/excelente
BM26
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
K_D: 1,12 nM± 0,24nM
Ajuste: excelente
Synagis hIgG4
OE Expi293 de TIGIT de Macaca fascicularis
Expi293 de origen
[mAb] (Sitio de fijación, nM)
K_D: Sin fijación (N.S.)
Ajuste: N/A

FIG. 71

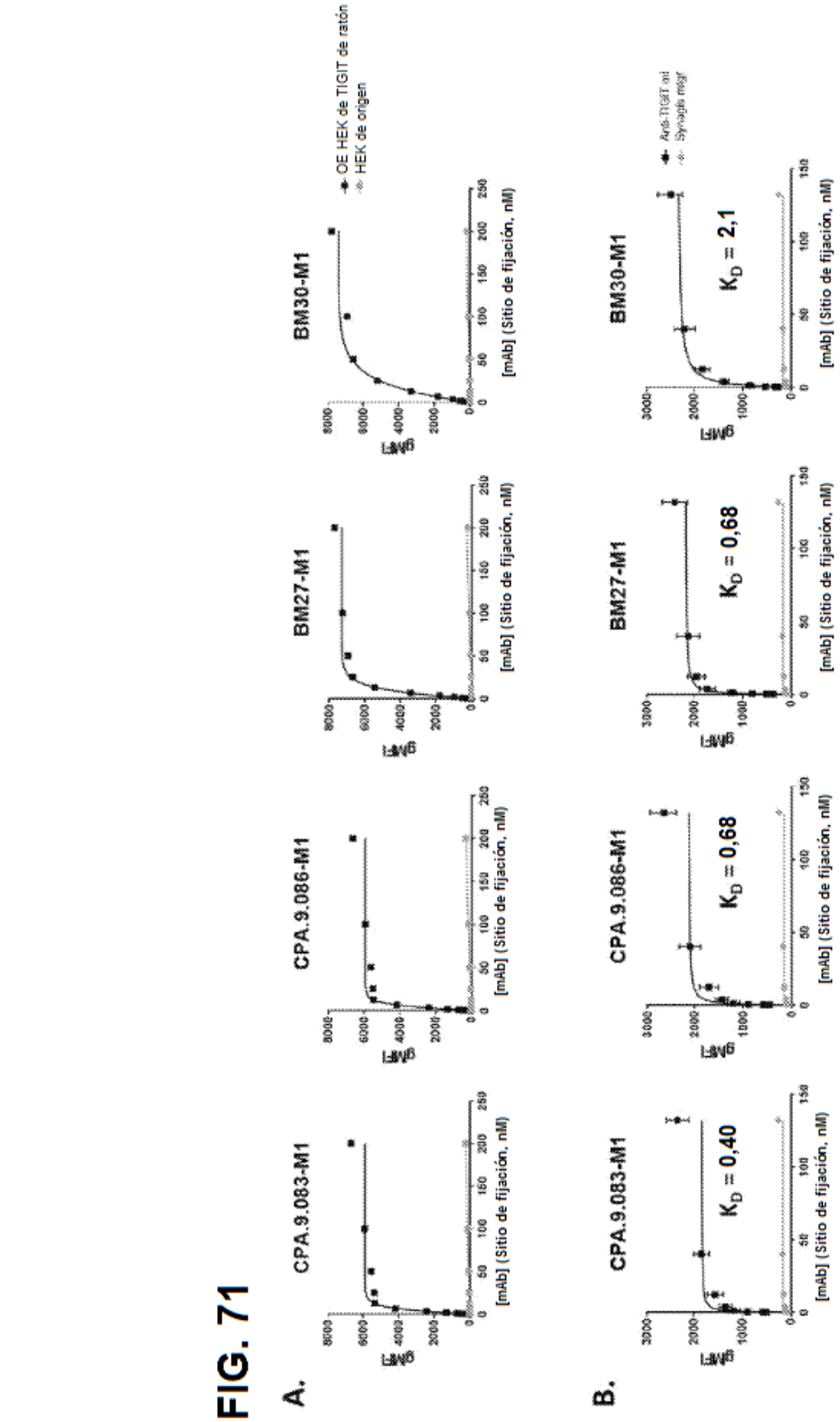
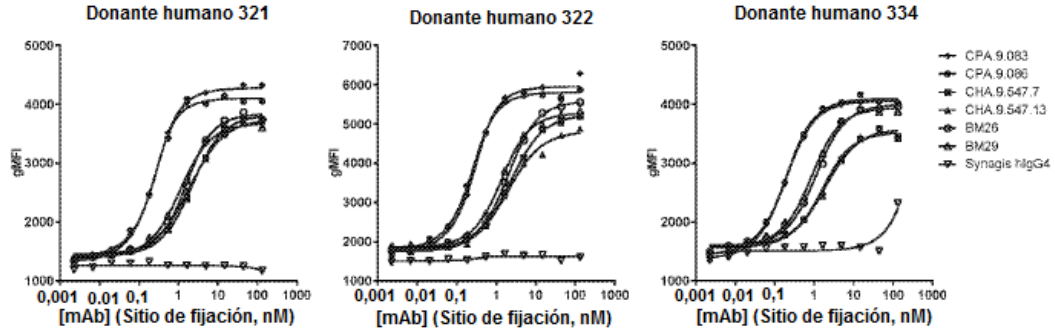
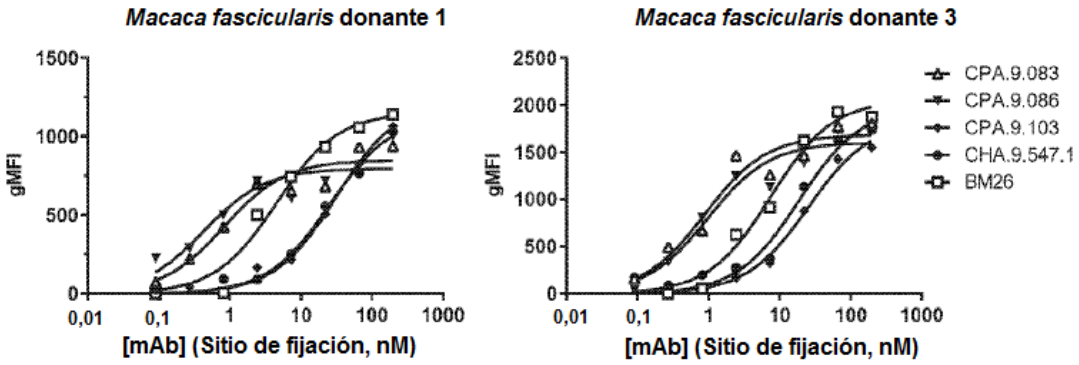

A.
B.
CPA.9.083-M1
CPA.9.086-M1
BM27-M1
BM30-M1
OE HEK de TIGIT de ratón
HEK de origen
K_D = 0,40
K_D = 0,68
K_D = 0,68
K_D = 2,1
[mAb] (Sitio de fijación, nM)

FIG. 72



Anticuerpo anti-TIGIT	K_D CD8⁺ Tem (nM)		
	Donante 321	Donante 322	Donante 334
CPA.9.083	0,13	0,12	0,13
CPA.9.086	0,09	0,11	0,13
CHA.9.547.7	1,8	2,1	1,8
CHA.9.547.13	2,0	1,9	1,2
BM26	0,93	1,4	0,81
BM29	0,88	0,91	0,59

FIG. 73

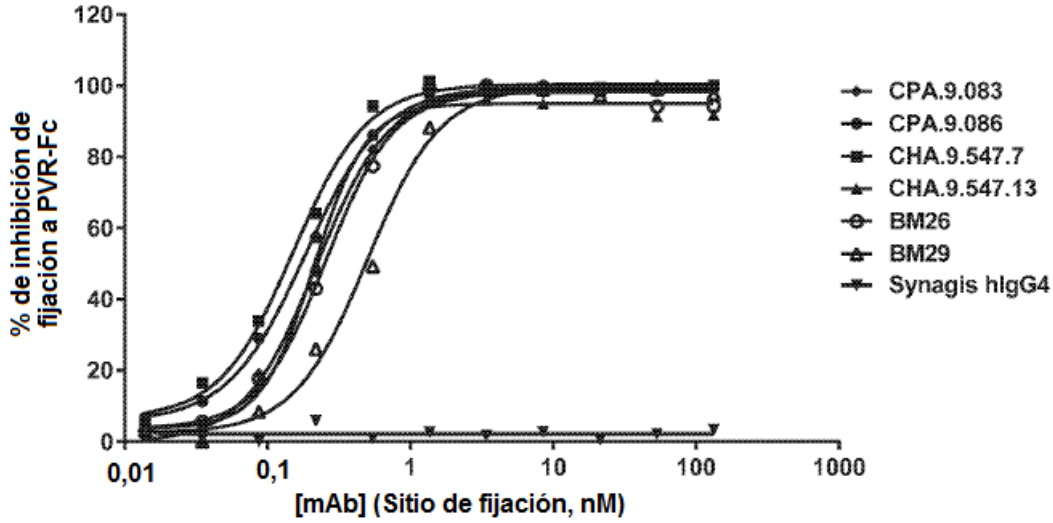


Anticuerpo anti-TIGIT	K_D Donante de CD8+ 1 (nM)	K_D Donante de CD8+ 3 (nM)
CPA.9.083	0,82	0,88
CPA.9.086	0,43	0,98
CPA.9.103	31	25
CHA.9.547.1	25	19
BM26	4,6	7,5

FIG. 74

Nombre	TIGIT humano-His			TIGIT de *Macaca fascicularis*-His			TIGIT de ratón-His		
	k_a (/s)	K_d (/M-s)	K_D (pM)	k_a (/s)	K_d (/M-s)	K_D (pM)	k_a (/s)	K_d (/M-s)	K_D (pM)
CPA.9.083	6.00E+06	1.00E-05	1,7	Cinética del complejo			2.73E+06	1.19E-03	434
CPA.9.086	4.40E+06	1.00E-05	2,3	Cinética del complejo			1.83E+06	1.21E-03	663
CPA.9.103	2.48E+06	1.60E-05	6,4	1.63E+06	5.50E-04	337	1.60E+07	0,4	25,000
CHA.9.547.1	2.47E+06	2.42E-04	98	1.03E+06	1.17E-03	1131	Sin fijación		
CHA.9.547.7	1.60E+06	5.51E-05	35	7.45E+05	3.40E-04	456	Sin fijación		
BM26	2.50E+06	1.00E-05	4.0	2.83E+06	1.00E-05	3,5	Sin fijación		
BM29	9.10E+05	1.00E-05	11	3.45E+06	5.30E-03	1537	Sin fijación		

FIG. 75



Anticuerpo anti-TIGIT	Sitio de fijación de IC_{50} (nM), n=1	Sitio de fijación de IC_{50} (nM), n=2
CPA.9.083	0,47	0,22
CPA.9.086	0,36	0,18
CHA.9.547.7	0,21	0,15
CHA.9.547.13	0,26	0,21
BM26	0,45	0,26
BM29	1,0	0,50

FIG. 76

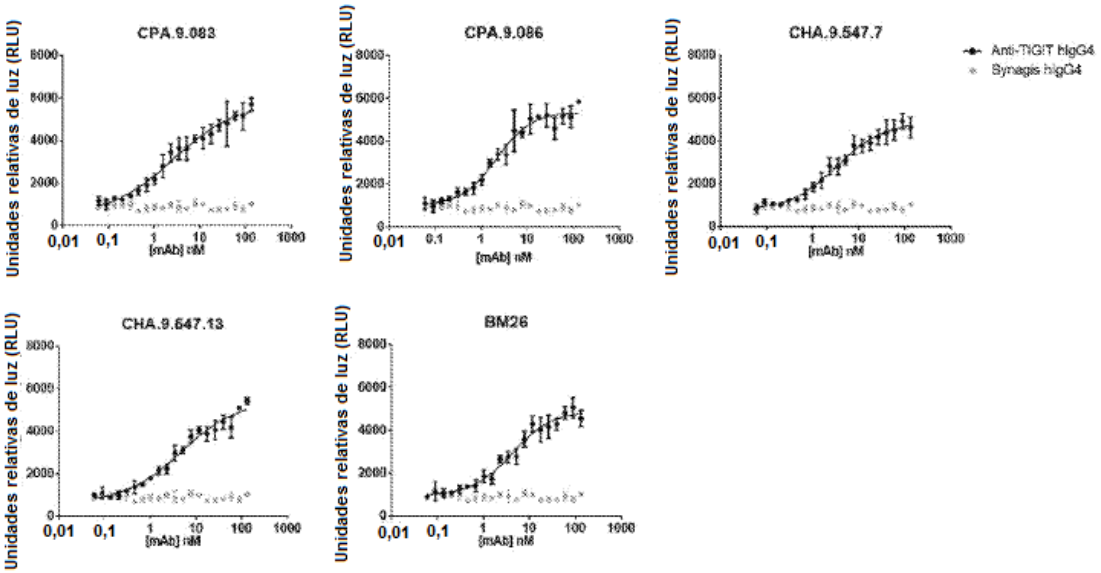
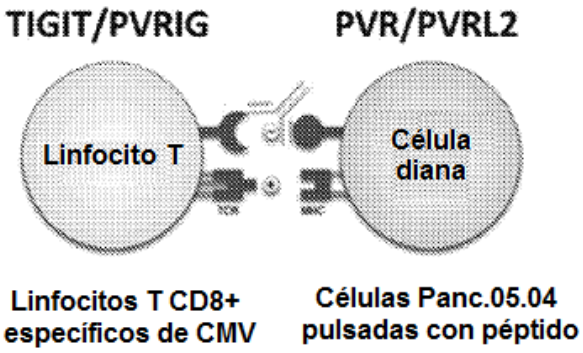
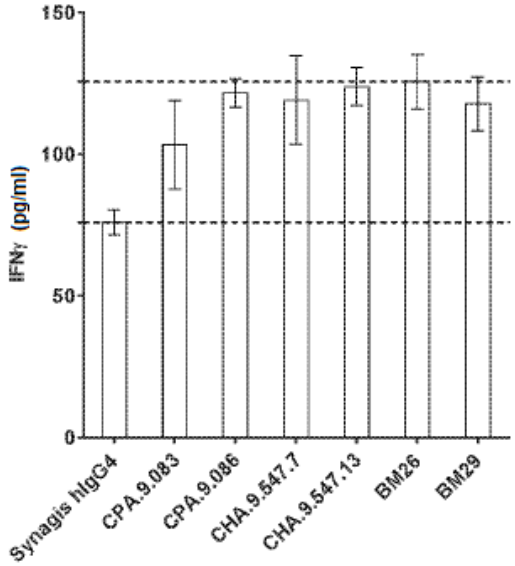

CPA.9.083
CPA.9.086
CHA.9.547.7
CHA.9.547.13
BM26
Unidades relativas de luz (RLU)
[mAb] nM
Anti-TIGIT hIgG4
Synagis hIgG4

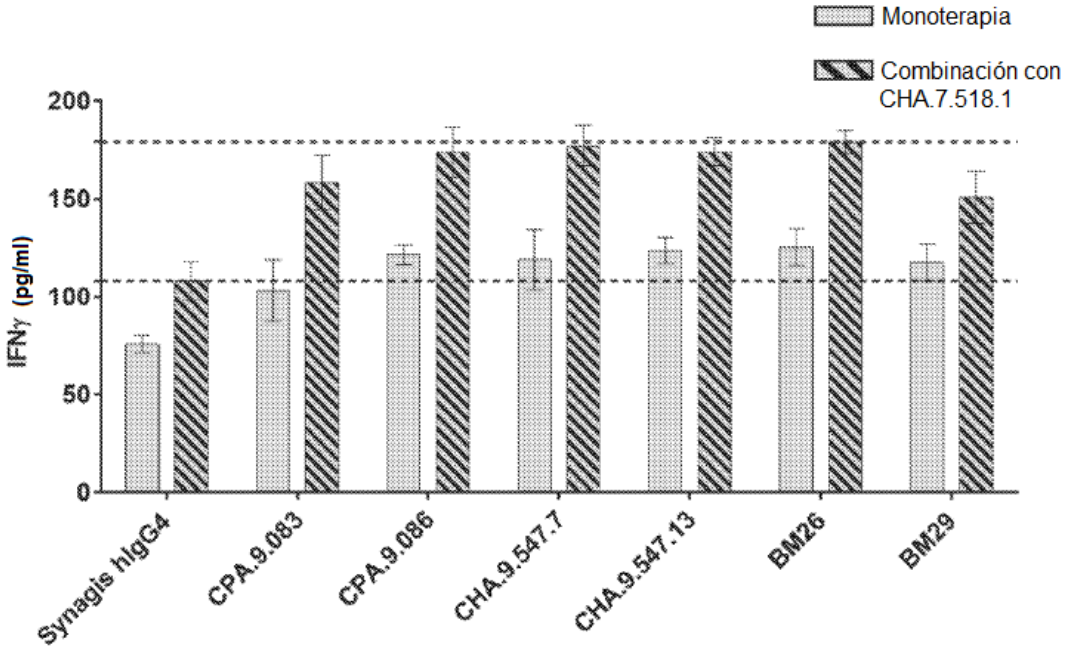
FIG. 77





	Donante 4 (n=1)	Donante 4 (n=2)
CPA.9.083	36	111
CPA.9.086	60	100
CHA.9.547.7	57	125
CHA.9.547.13	63	108
BM26	65	84
BM29	55	103

FIG. 78



	Donante 4(n=1)	Donante (n=2)
CPA.9.083	46	149
CPA.9.086	61	115
CHA.9.547.7	64	114
CHA.9.547.13	61	107
BM26	66	88
BM29	39	67

FIG. 79

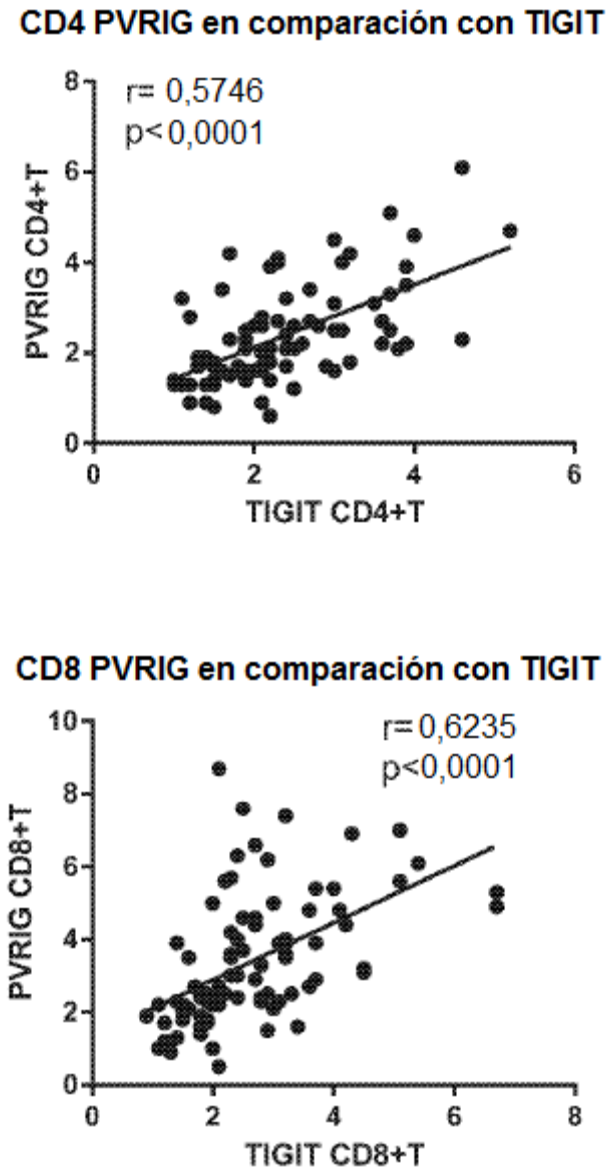
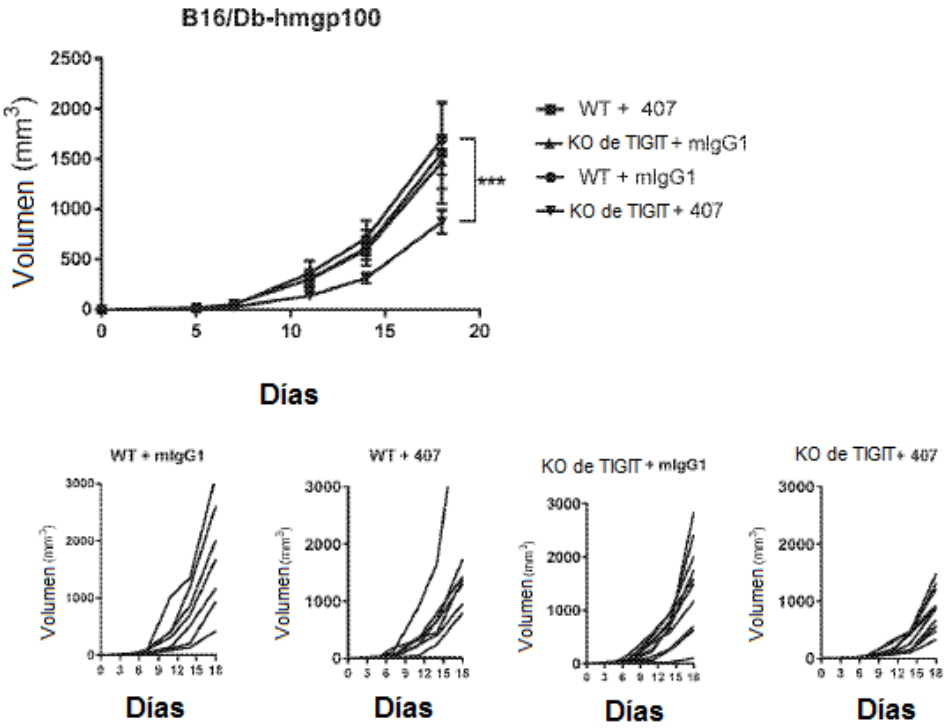

CD4 PVRIG en comparación con TIGIT
r= 0,5746
p<0,0001
PVRIG CD4+T
TIGIT CD4+T
0
2
4
6
8
CD8 PVRIG en comparación con TIGIT
r=0,6235
p<0,0001
PVRIG CD8+T
TIGIT CD8+T
0
2
4
6
8
10

FIG. 80

A.



B.

TGI en comparación con WT + mIgG1	Día 11	Día 14	Día 18
WT + 407	17%	13%	8%
KO de TIGIT + mIgG1	17%	17%	13%
KO de TIGIT + 407	63%	53%	49%

C.

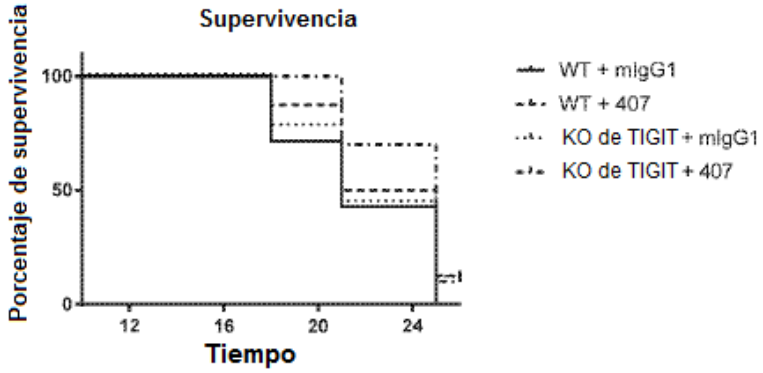
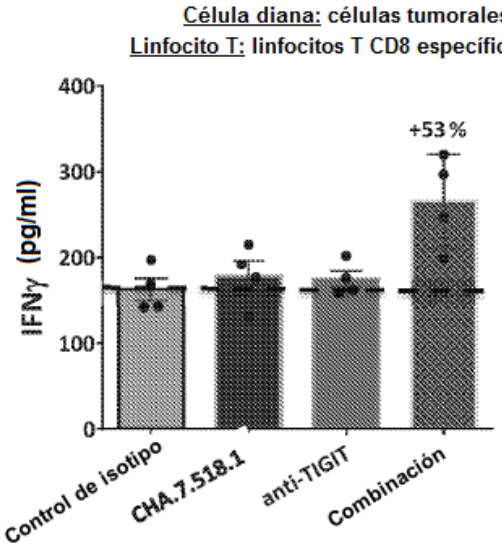
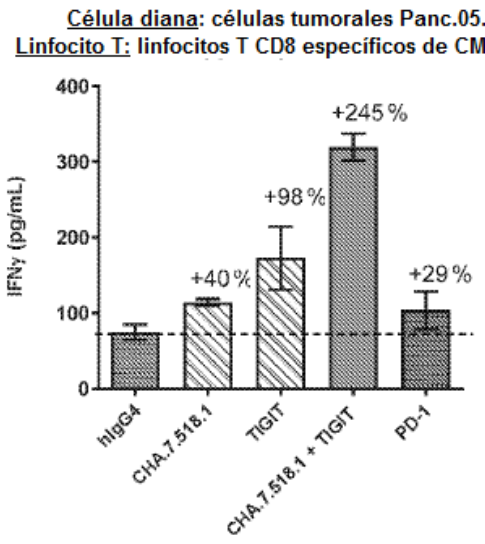


FIG. 81


Célula diana: células tumorales Mel-624
Linfocito T: linfocitos T CD8 específicos de gp100
IFNγ (pg/ml)
400
300
200
100
0
+53 %
Control de isotipo
CHA.7.518.1
anti-TIGIT
Combinación


Célula diana: células tumorales Panc.05.04
Linfocito T: linfocitos T CD8 específicos de CMVpp65
IFNγ (pg/mL)
400
300
200
100
0
+40 %
+98 %
+245 %
+29 %
hIgG4
CHA.7.518.1
TIGIT
CHA.7.518.1 + TIGIT
PD-1

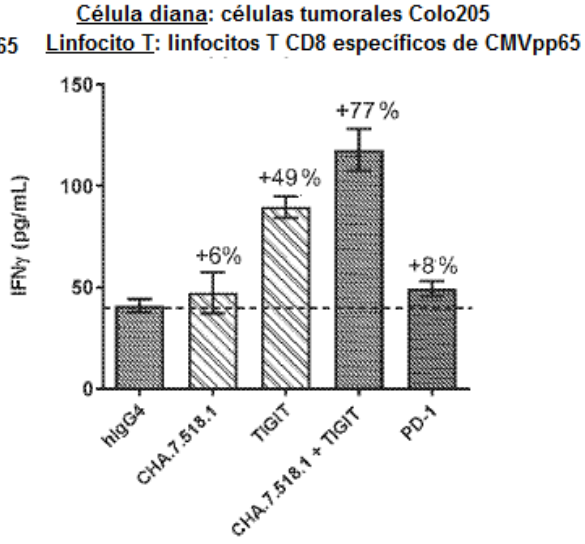

Célula diana: células tumorales Colo205
Linfocito T: linfocitos T CD8 específicos de CMVpp65
IFNγ (pg/mL)
150
100
50
0
+6%
+49 %
+77 %
+8 %
hIgG4
CHA.7.518.1
TIGIT
CHA.7.518.1 + TIGIT
PD-1

FIG. 82A y 82B

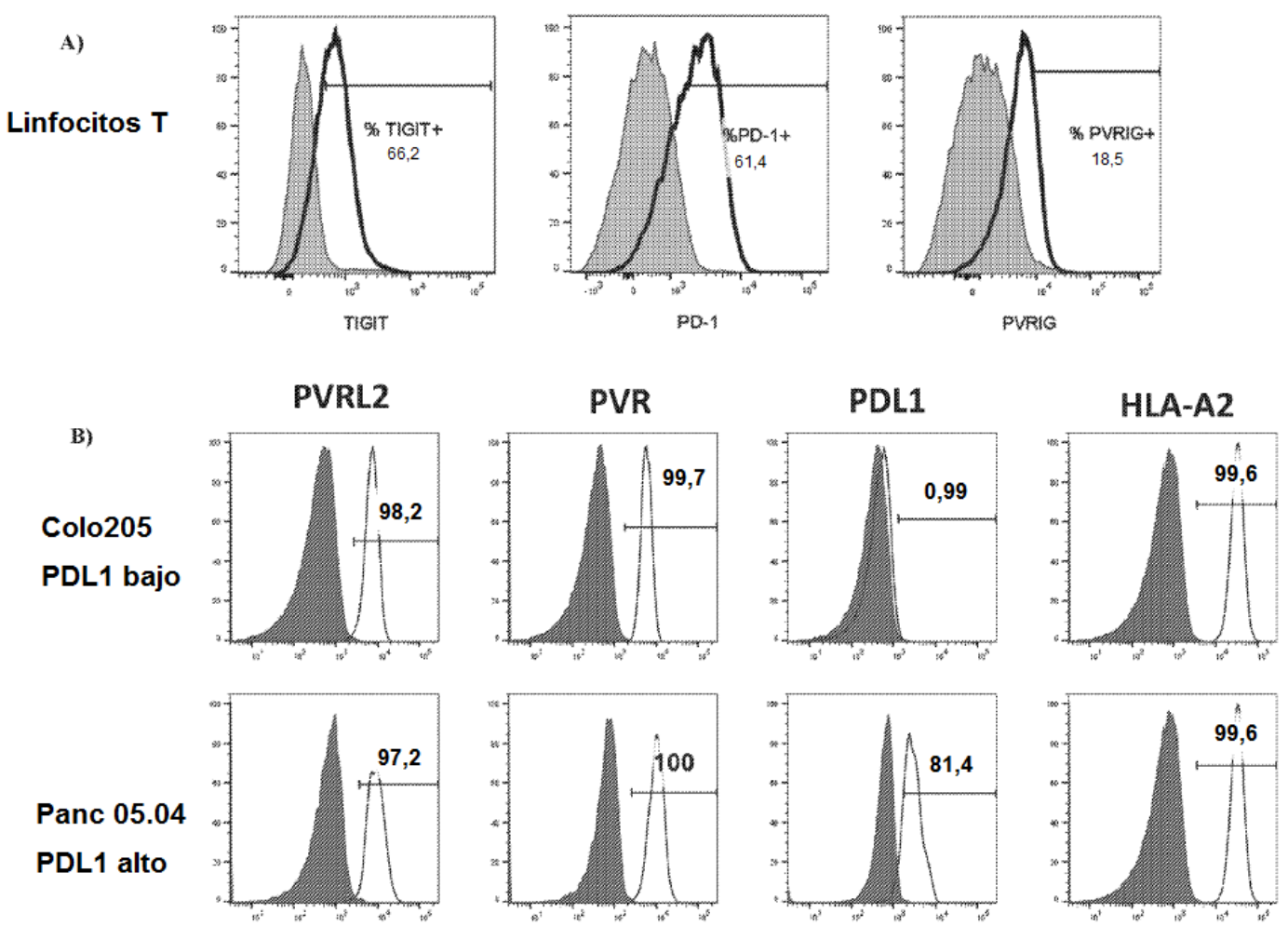

A)
Linfocitos T
% TIGIT+
66,2
TIGIT
%PD-1+
61,4
PD-1
% PVRIG+
18,5
PVRIG
B)
PVRL2
PVR
PDL1
HLA-A2
Colo205
PDL1 bajo
98,2
99,7
0,99
99,6
Panc 05.04
PDL1 alto
97,2
100
81,4
99,6

FIG. 82C

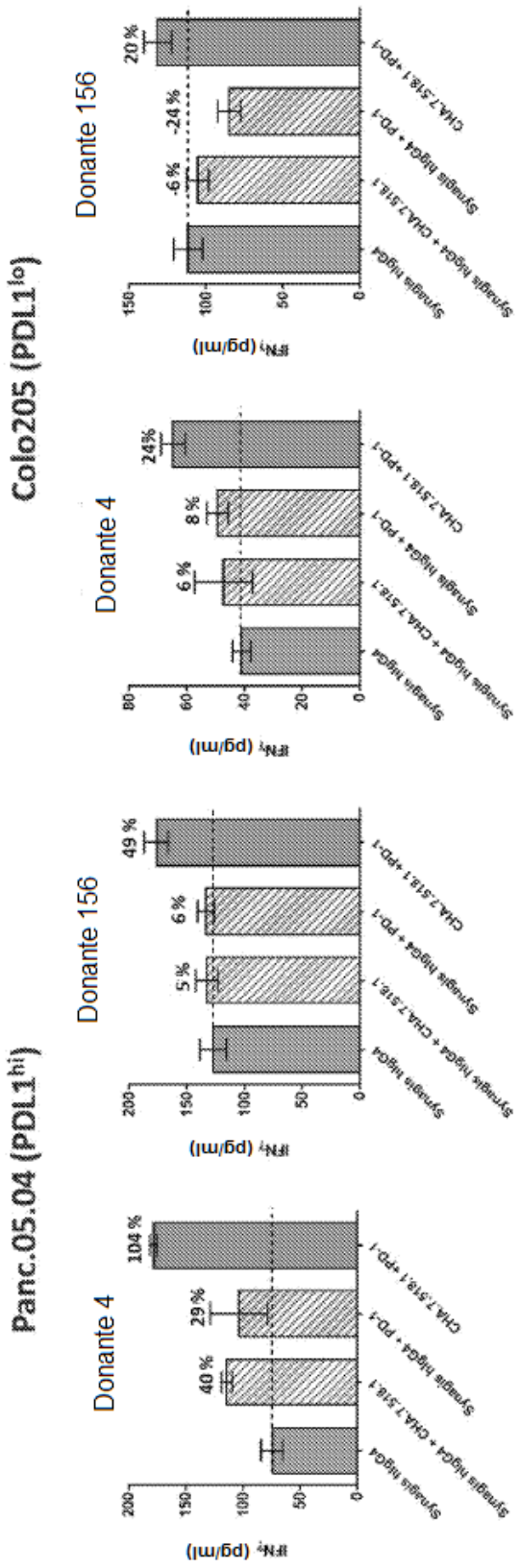

Panc.05.04 (PDL1hi)
Colo205 (PDL1lo)
Donante 4
Donante 156
Donante 4
Donante 156
IFNγ (pg/ml)
Synagis hIgG4
Synagis hIgG4 + CHA.7.518.1
Synagis hIgG4 + PD-1
CHA.7.518.1 +PD-1
104 %
29 %
40 %
49 %
6 %
5 %
24%
8 %
6 %
20 %
-24 %
-6 %

FIG. 83

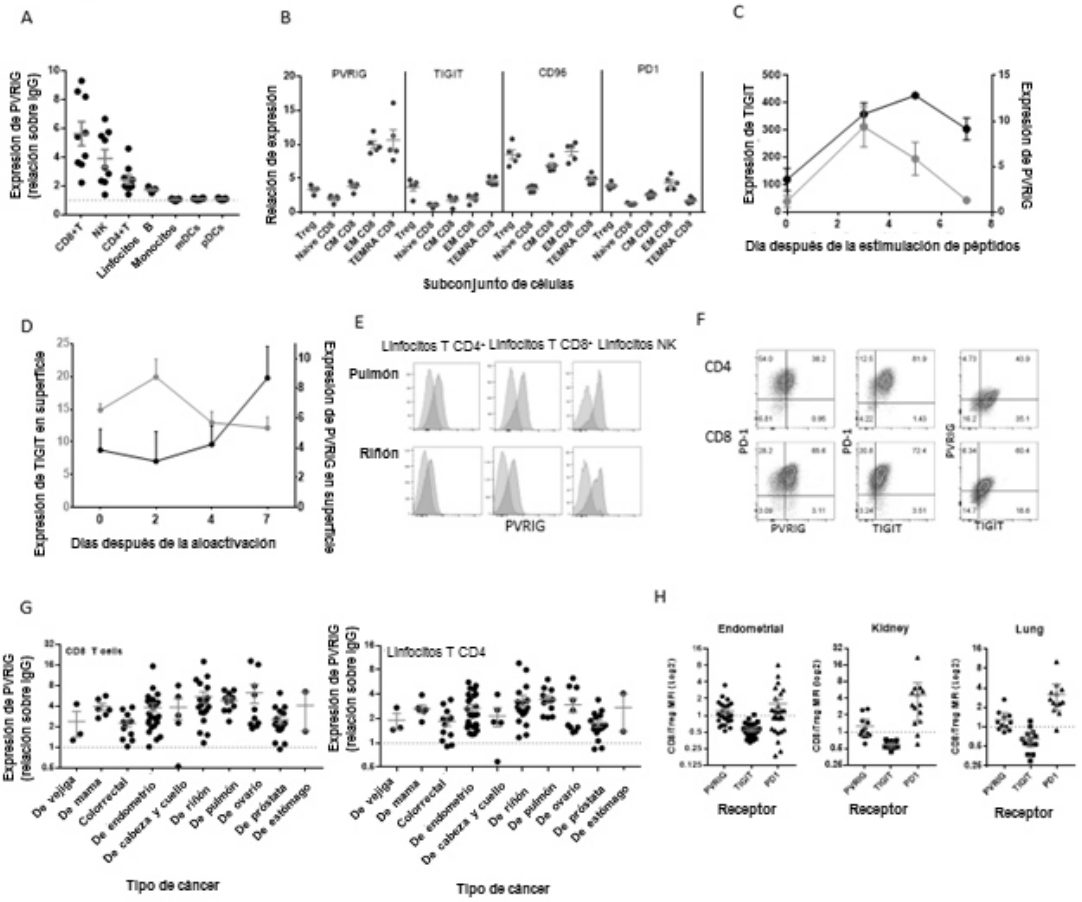

A
Expresión de PVRIG (relación sobre IgG)
CD8+T
NK
CD4+T
Linfocitos B
Monocitos
mDCs
pDCs
B
Relación de expresión
PVRIG
TIGIT
CD96
PD1
Treg
Naive CD8
CM CD8
EM CD8
TEMRA CD8
Subconjunto de células
C
Expresión de TIGIT
Expresión de PVRIG
Día después de la estimulación de péptidos
D
Expresión de TIGIT en superficie
Expresión de PVRIG en superficie
Días después de la aloactivación
E
Linfocitos T CD4+
Linfocitos T CD8+
Linfocitos NK
Pulmón
Riñón
PVRIG
F
CD4
CD8
PD-1
PVRIG
TIGIT
G
CD8 T cells
Linfocitos T CD4
Expresión de PVRIG (relación sobre IgG)
De vejiga
De mama
Colorrectal
De endometrio
De cabeza y cuello
De riñón
De pulmón
De ovario
De próstata
De estómago
Tipo de cáncer
H
Endometrial
Kidney
Lung
Receptor

FIG. 84

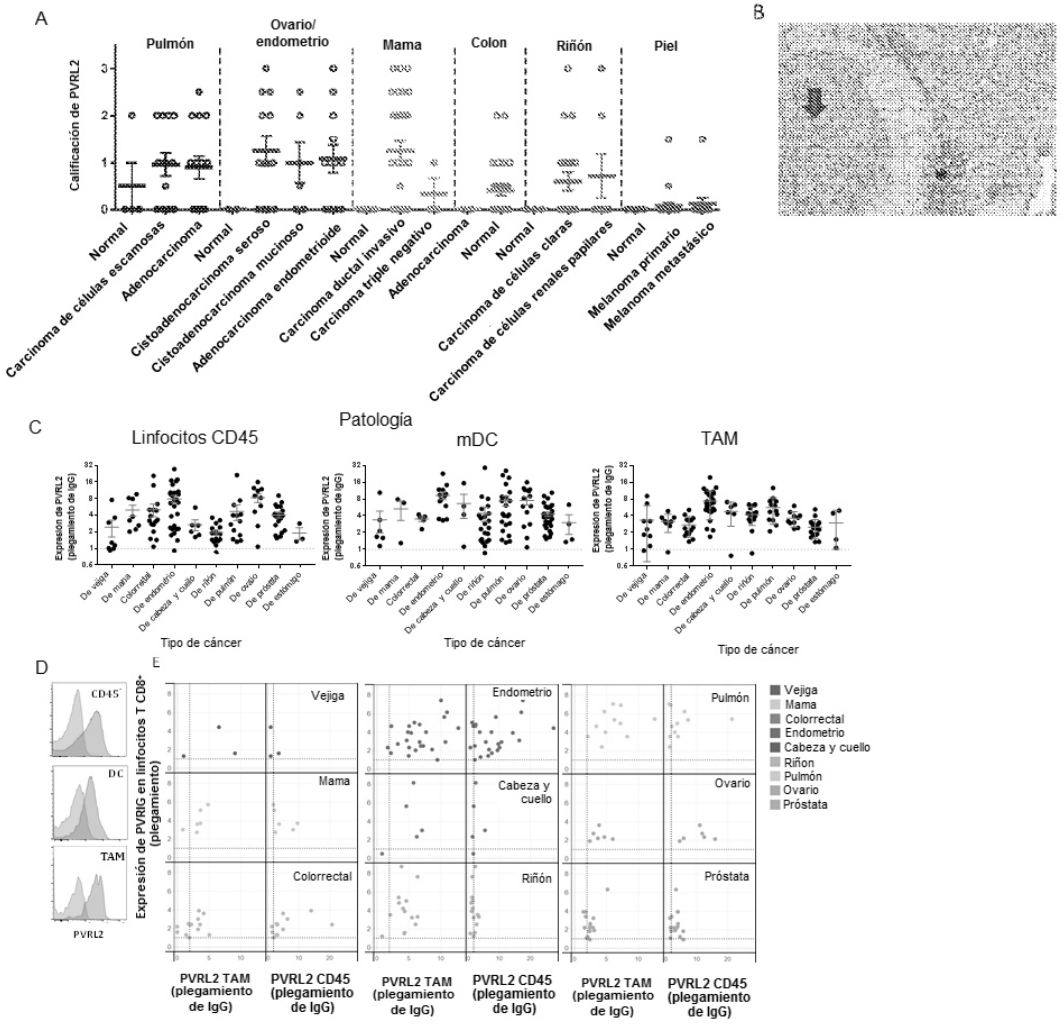

A
Pulmón
Ovario/ endometrio
Mama
Colon
Riñón
Piel
Calificación de PVRL2
Normal
Carcinoma de células escamosas
Adenocarcinoma
Normal
Cistoadenocarcinoma seroso
Cistoadenocarcinoma mucinoso
Adenocarcinoma endometrioide
Normal
Carcinoma ductal invasivo
Carcinoma triple negativo
Adenocarcinoma
Normal
Normal
Carcinoma de células claras
Carcinoma de células renales papilares
Normal
Melanoma primario
Melanoma metastásico
B
C
Patología
Linfocitos CD45
mDC
TAM
Expresión de PVRL2 (plegamiento de IgG)
De vejiga
De mama
Colorrectal
De endometrio
De cabeza y cuello
De riñón
De pulmón
De ovario
De próstata
De estómago
Tipo de cáncer
D
E
CD45
DC
TAM
PVRL2
Expresión de PVRIG en linfocitos T CD8+ (plegamiento)
Vejiga
Mama
Colorrectal
Endometrio
Cabeza y cuello
Riñón
Pulmón
Ovario
Próstata
PVRL2 TAM (plegamiento de IgG)
PVRL2 CD45 (plegamiento de IgG)

FIG. 84F

	Todos los tumores			PD-L1+			PD-L1-		
Tipo de tejido	PVRL2+	Total	% positivo	PVRL2+	Total	% positivo	PVRL2+	Total	% positivo
Pulmón									
Normal	1	4	25	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Adenocarcinoma	8	14	57	3	5	60	5	9	56
Carcinoma de células escamosas	8	13	62	5	7	71	3	6	50
Ovario									
Normal	0	2	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Cistoadenocarcinoma seroso	8	12	67	2	3	67	6	9	67
Cistoadenocarcinoma mucinoso	4	6	67	1	1	100	3	5	60
Adenocarcinoma endometrioide	8	12	67	3	4	75	5	8	63
Colon									
Normal	0	2	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Adenocarcinoma	16	30	53	8	14	57	7	16	44
Piel									
Normal	0	4	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Melanoma primario	3	24	13	1	4	25	2	20	10
Melanoma metastásico	1	12	8	1	4	25	0	8	0
Riñón									
Normal	0	3	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Carcinoma de células claras	8	20	40	0	0	N/A	8	20	40
Carcinoma de células renales papilares	2	7	29	1	1	100	1	6	17
Mama									
TNBC	1	3	33	0	0	N/A	1	3	33
Carcinoma ductal invasivo	19	30	63	6	10	60	13	20	65

FIG. 85

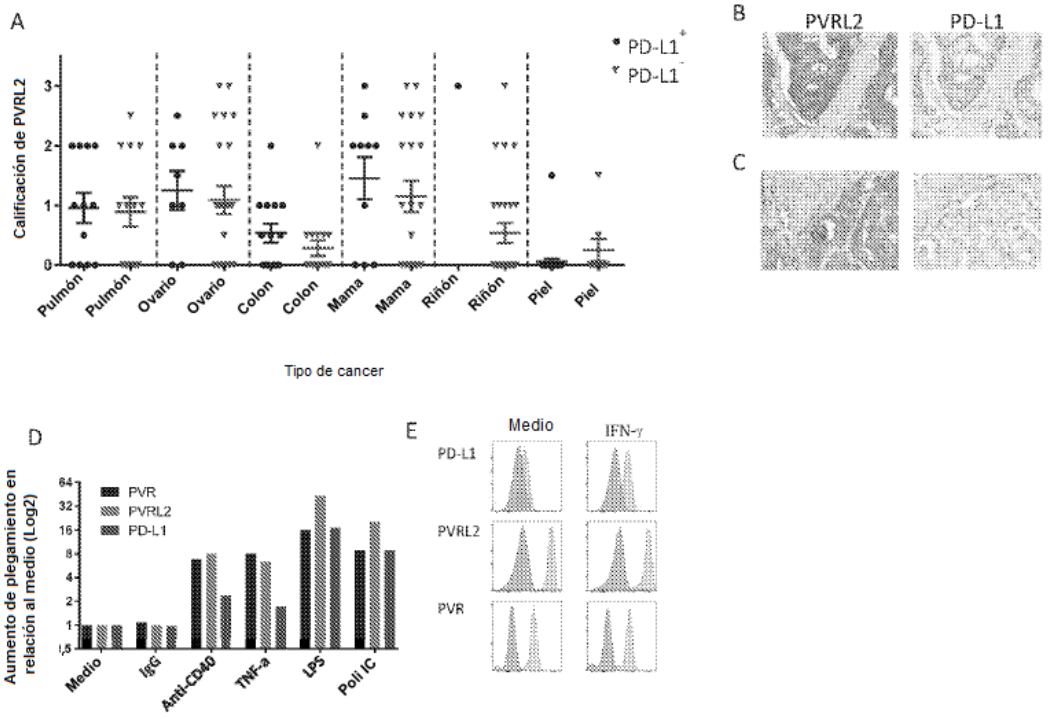

A
PD-L1+
PD-L1-
Calificación de PVRL2
Pulmón
Ovario
Colon
Mama
Riñón
Piel
Tipo de cancer
B
PVRL2
PD-L1
C
D
PVR
PVRL2
PD-L1
Aumento de plegamiento en relación al medio (Log2)
Medio
IgG
Anti-CD40
TNF-a
LPS
Poli IC
E
Medio
IFN-γ
PD-L1
PVRL2
PVR

FIG. 86

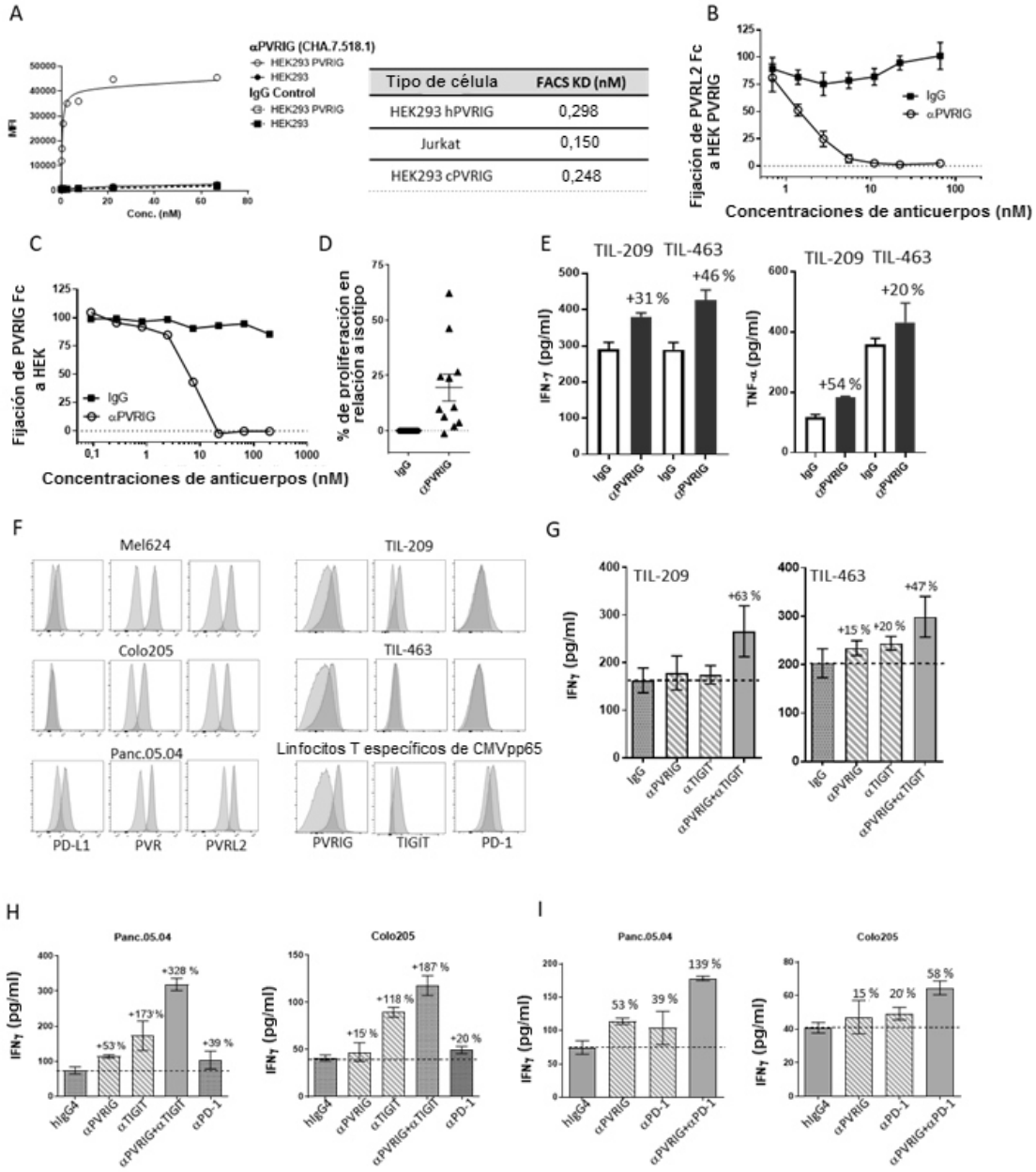

A
αPVRIG (CHA.7.518.1)
HEK293 PVRIG
HEK293
IgG Control
HEK293 PVRIG
HEK293
MFI
Conc. (nM)
Tipo de célula
FACS KD (nM)
HEK293 hPVRIG
0,298
Jurkat
0,150
HEK293 cPVRIG
0,248
B
Fijación de PVRL2 Fc a HEK PVRIG
IgG
αPVRIG
Concentraciones de anticuerpos (nM)
C
Fijación de PVRIG Fc a HEK
IgG
αPVRIG
Concentraciones de anticuerpos (nM)
D
% de proliferación en relación a isotipo
IgG
αPVRIG
E
TIL-209 TIL-463
IFN-γ (pg/ml)
+31 %
+46 %
TIL-209 TIL-463
TNF-α (pg/ml)
+54 %
+20 %
IgG
αPVRIG
F
Mel624
Colo205
Panc.05.04
TIL-209
TIL-463
Linfocitos T específicos de CMVpp65
PD-L1
PVR
PVRL2
PVRIG
TIGIT
PD-1
G
TIL-209
IFNγ (pg/ml)
+63 %
TIL-463
+15 %
+20 %
+47 %
IgG
αPVRIG
αTIGIT
αPVRIG+αTIGIT
H
Panc.05.04
IFNγ (pg/ml)
+53 %
+173 %
+328 %
+39 %
Colo205
+15 %
+118 %
+187 %
+20 %
hIgG4
αPVRIG
αTIGIT
αPVRIG+αTIGIT
αPD-1
I
Panc.05.04
IFNγ (pg/ml)
53 %
39 %
139 %
Colo205
15 %
20 %
58 %
hIgG4
αPVRIG
αPD-1
αPVRIG+αPD-1

FIG. 87

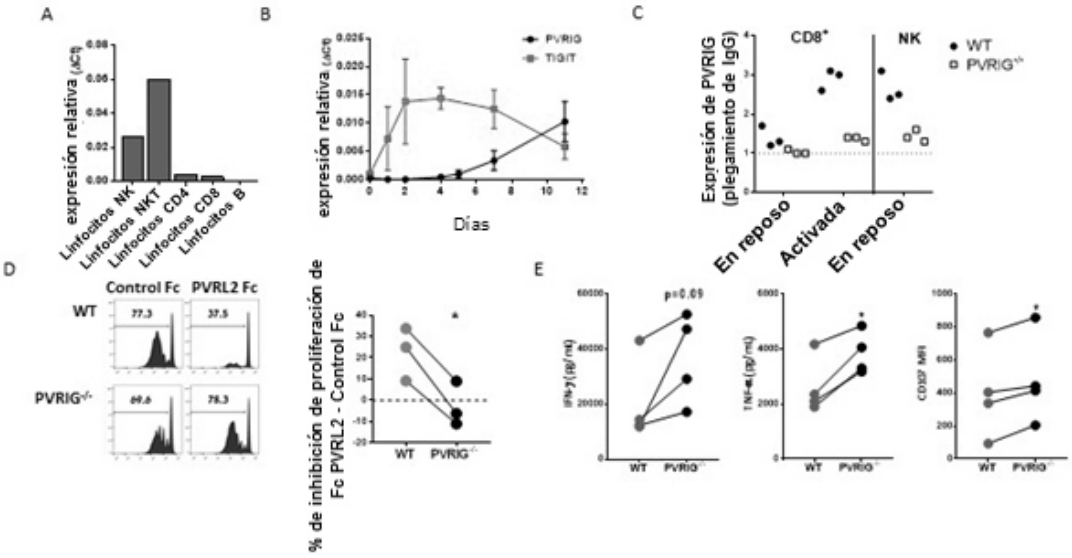

A
B
C
D
E
expresión relativa (ΔCt)
Linfocitos NK
Linfocitos NKT
Linfocitos CD4
Linfocitos CD8
Linfocitos B
PVRIG
TIGIT
Días
CD8+
NK
WT
PVRIG-/-
Expresión de PVRIG (plegamiento de IgG)
En reposo
Activada
En reposo
Control Fc
PVRL2 Fc
77.3
37.5
69.6
78.3
% de inhibición de proliferación de Fc PVRL2 - Control Fc
p=0.09

FIG. 88

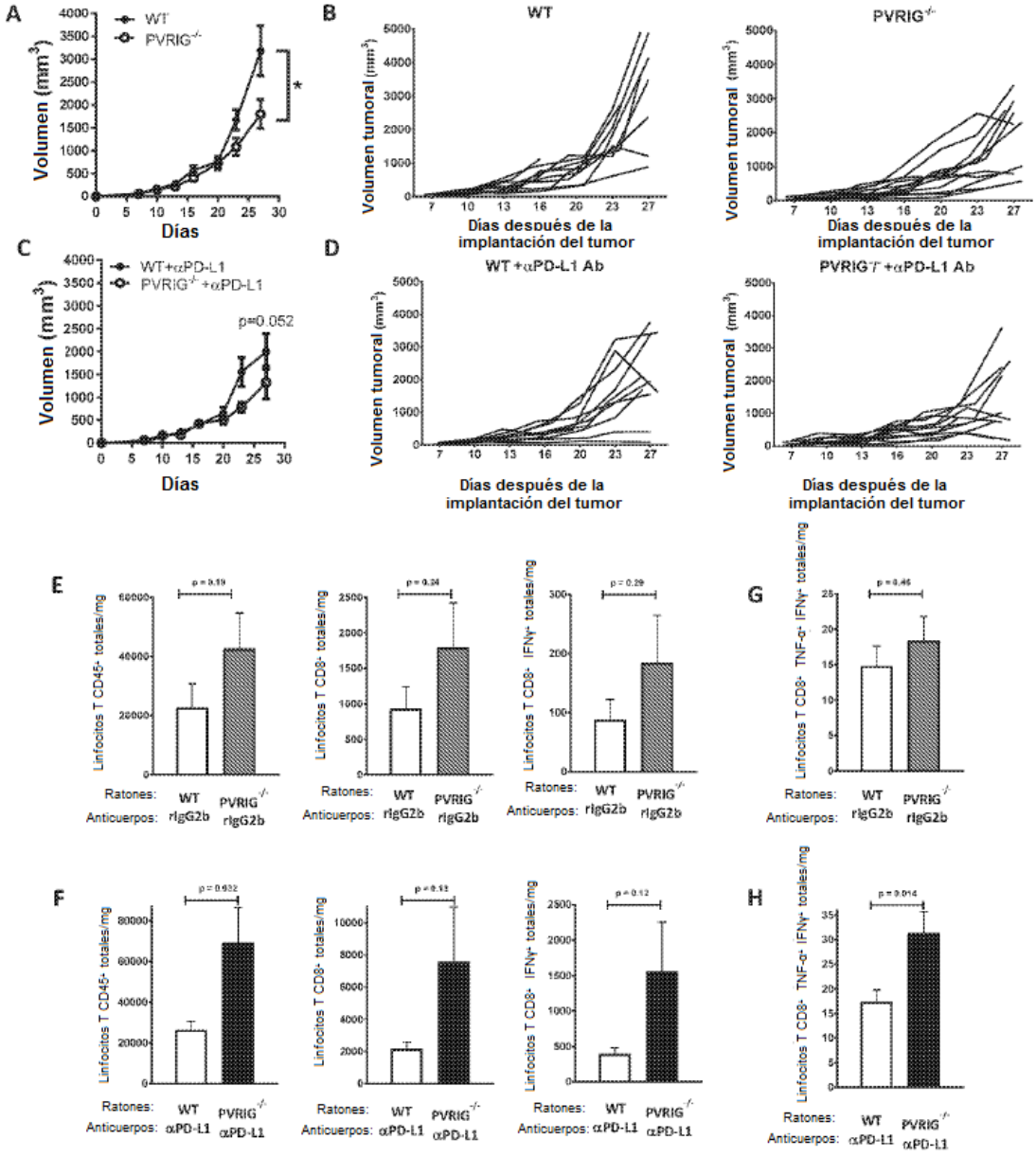

A
WT
PVRIG-/-
Volumen (mm3)
Días
*
B
WT
PVRIG-/-
Volumen tumoral (mm3)
Días después de la implantación del tumor
C
WT+αPD-L1
PVRIG-/- +αPD-L1
p=0.052
Volumen (mm3)
Días
D
WT +αPD-L1 Ab
PVRIG-/- +αPD-L1 Ab
Volumen tumoral (mm3)
Días después de la implantación del tumor
E
Linfocitos T CD45+ totales/mg
Linfocitos T CD8+ totales/mg
Linfocitos T CD8+ IFNγ+ totales/mg
Ratones: WT PVRIG-/-
Anticuerpos: rIgG2b rIgG2b
G
Linfocitos T CD8+ TNF-α+ IFNγ+ totales/mg
Ratones: WT PVRIG-/-
Anticuerpos: rIgG2b rIgG2b
F
Linfocitos T CD45+ totales/mg
Linfocitos T CD8+ totales/mg
Linfocitos T CD8+ IFNγ+ totales/mg
Ratones: WT PVRIG-/-
Anticuerpos: αPD-L1 αPD-L1
H
Linfocitos T CD8+ TNF-α+ IFNγ+ totales/mg
Ratones: WT PVRIG-/-
Anticuerpos: αPD-L1 αPD-L1

FIG. 89

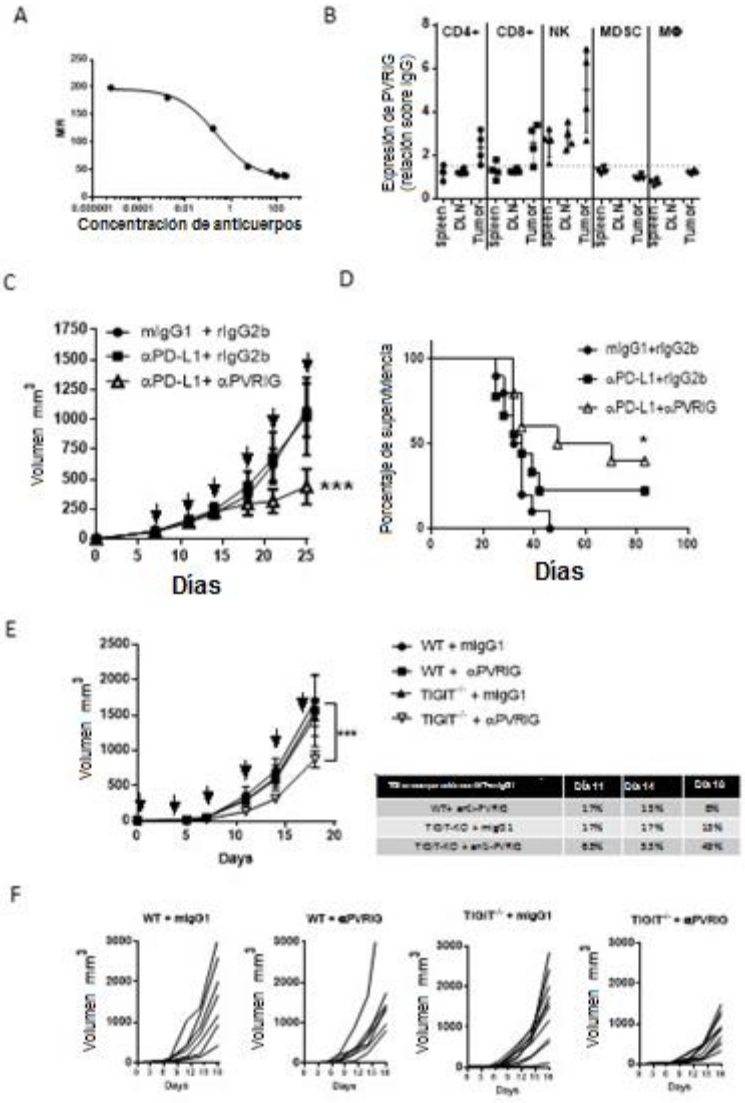

A
MFI
Concentración de anticuerpos
B
CD4+
CD8+
NK
MDSC
MΦ
Expresión de PVRIG (relación sobre IgG)
Spleen
DLN
Tumor
C
mIgG1 + rIgG2b
αPD-L1+ rIgG2b
αPD-L1+ αPVRIG
Volumen mm3
Días
***
D
mIgG1+rIgG2b
αPD-L1+rIgG2b
αPD-L1+αPVRIG
Porcentaje de supervivencia
Días
*
E
WT + mIgG1
WT + αPVRIG
TIGIT-/- + mIgG1
TIGIT-/- + αPVRIG
Volumen mm3
Days
***
Día 11
Día 14
Día 18
WT+ αPVRIG 17% 13% 8%
TIGIT-KO + mIgG1 17% 17% 18%
TIGIT-KO + αPVRIG 8.5% 3.5% 4%
F
WT + mIgG1
WT + αPVRIG
TIGIT-/- + mIgG1
TIGIT-/- + αPVRIG
Volumen mm3
Days

FIG. 90

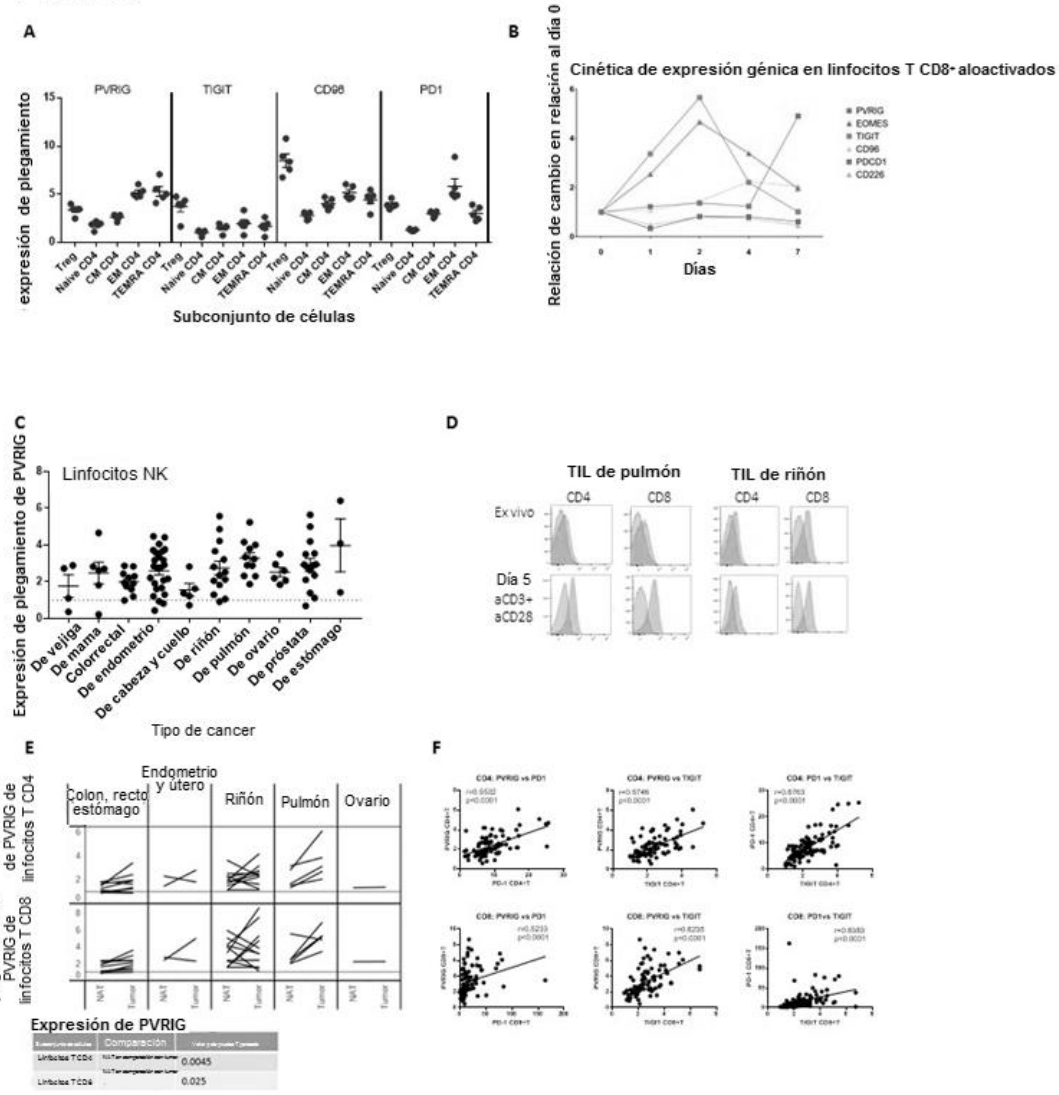
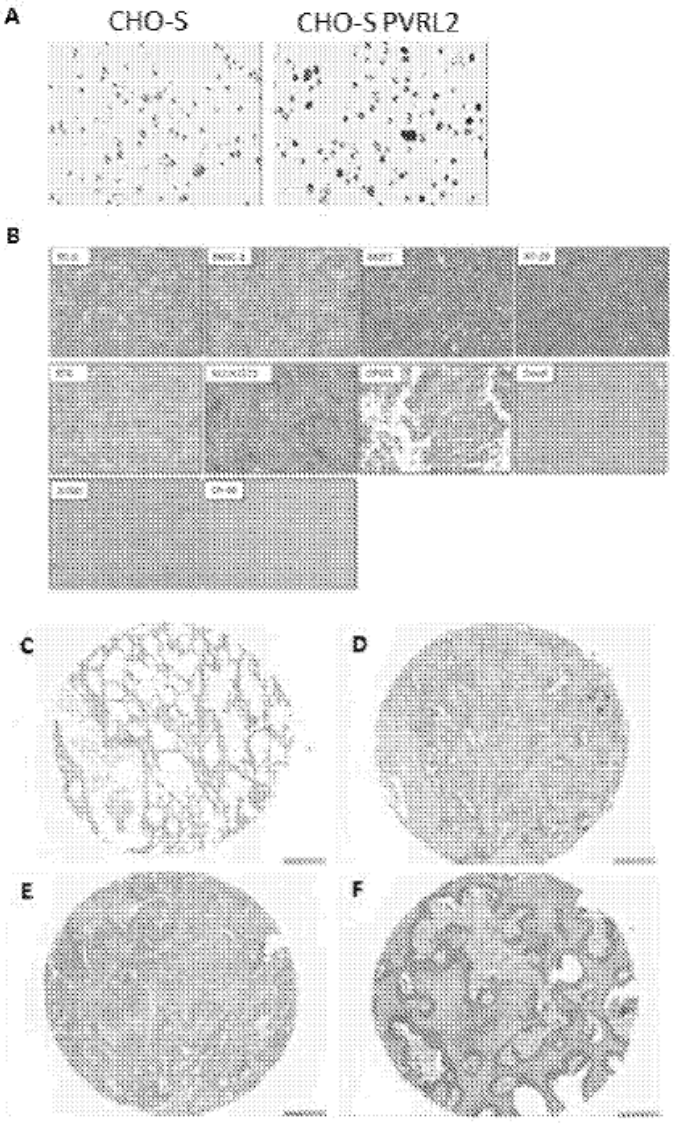
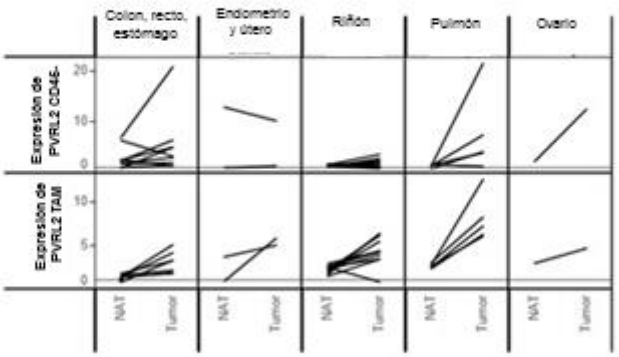

A
PVRIG
TIGIT
CD96
PD1
expresión de plegamiento
Treg
Naive CD4
CM CD4
EM CD4
TEMRA CD4
Subconjunto de células
B
Cinética de expresión génica en linfocitos T CD8+ aloactivados
Relación de cambio en relación al día 0
Días
PVRIG
EOMES
TIGIT
CD96
PDCD1
CD226
C
Linfocitos NK
Expresión de plegamiento de PVRIG
De vejiga
De mama
Colorrectal
De endometrio
De cabeza y cuello
De riñón
De pulmón
De ovario
De próstata
De estómago
Tipo de cancer
D
TIL de pulmón
TIL de riñón
CD4
CD8
Ex vivo
Día 5
aCD3+
aCD28
E
Endometrio y útero
Colon, recto estómago
Riñón
Pulmón
Ovario
Expresión de plegamiento de PVRIG de linfocitos T CD4
Expresión de plegamiento de PVRIG de linfocitos T CD8
NAT
Tumor
Expresión de PVRIG
Comparación
Linfocitos T CD4
0.0045
Linfocitos T CD8
0.025
F

FIG. 91



Línea celular	Expresión de PVRL2 por FACS
PC-3	+
PANC-1	+
MCF7	+
HT-29	+
RT-4	+
NCI-H1573	+
OPM2	-
Daudi	-
Jurkat	-
CA-46	-

FIG. 92



Expresión de PVRL2

Subconjunto de células	Comparación	Valor p de prueba T pareada
CD45-	NAT en comparación con tumor	0.02
Monocitos	NAT en comparación con tumor	<0.0001

FIG. 93

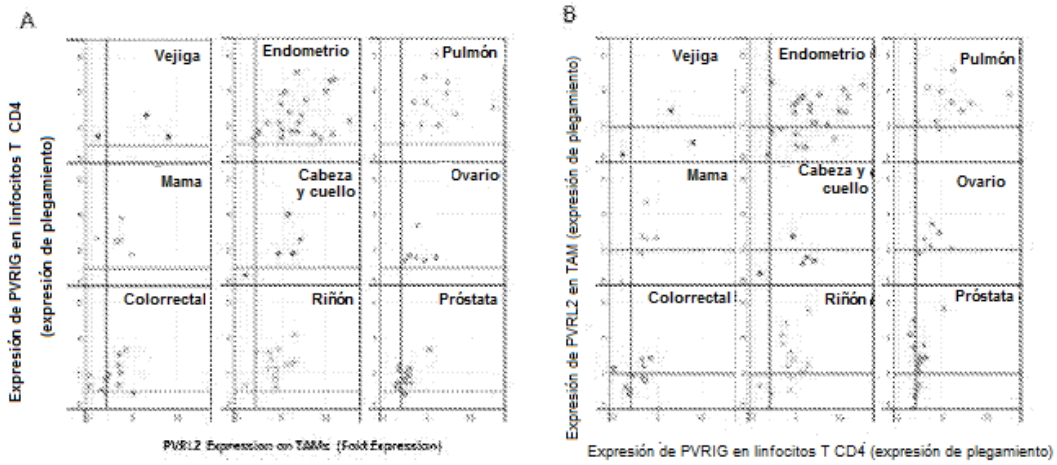

A
Vejiga
Endometrio
Pulmón
Mama
Cabeza y cuello
Ovario
Colorrectal
Riñón
Próstata
Expresión de PVRIG en linfocitos T CD4 (expresión de plegamiento)
PVRL2 Expression on TAMs (Fold Expression)
B
Vejiga
Endometrio
Pulmón
Mama
Cabeza y cuello
Ovario
Colorrectal
Riñón
Próstata
Expresión de PVRL2 en TAM (expresión de plegamiento)
Expresión de PVRIG en linfocitos T CD4 (expresión de plegamiento)

FIG. 94

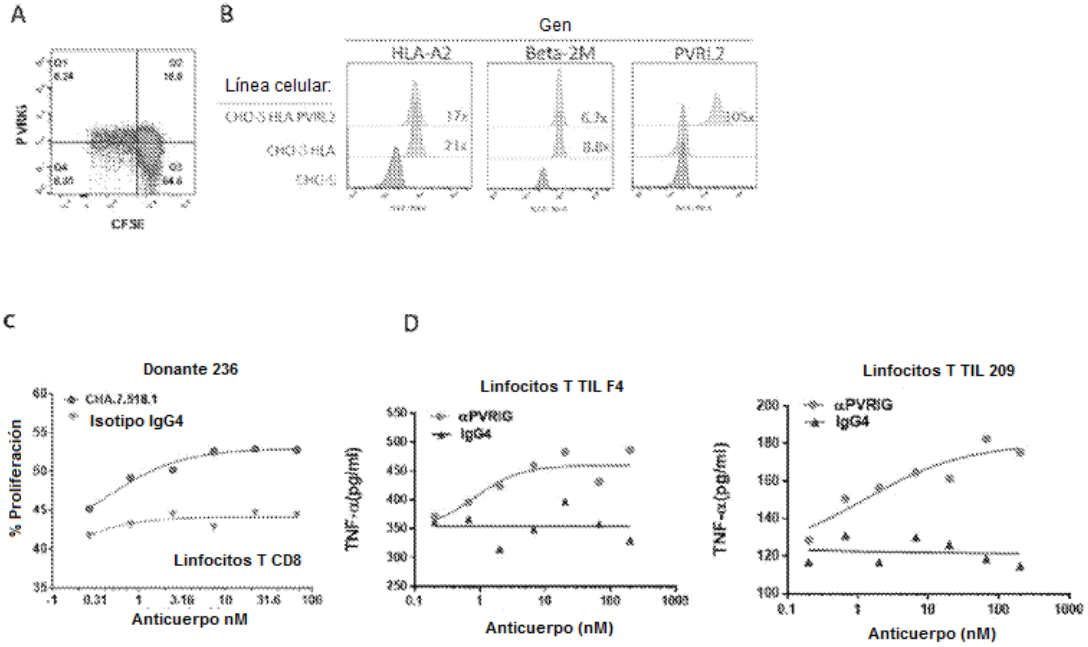

A
B
Gen
HLA-A2
Beta-2M
PVRL2
Línea celular:
CHO-S HLA PVRL2
CHO-S HLA
CHO-S
17x
21x
6.3x
8.8x
10Sx
PVRIG
CFSE
C
Donante 236
CNA.7.518.1
Isotipo IgG4
% Proliferación
Linfocitos T CD8
Anticuerpo nM
D
Linfocitos T TIL F4
αPVRIG
IgG4
TNF-α(pg/ml)
Anticuerpo (nM)
Linfocitos T TIL 209
αPVRIG
IgG4
TNF-α(pg/ml)
Anticuerpo (nM)

FIG. 95

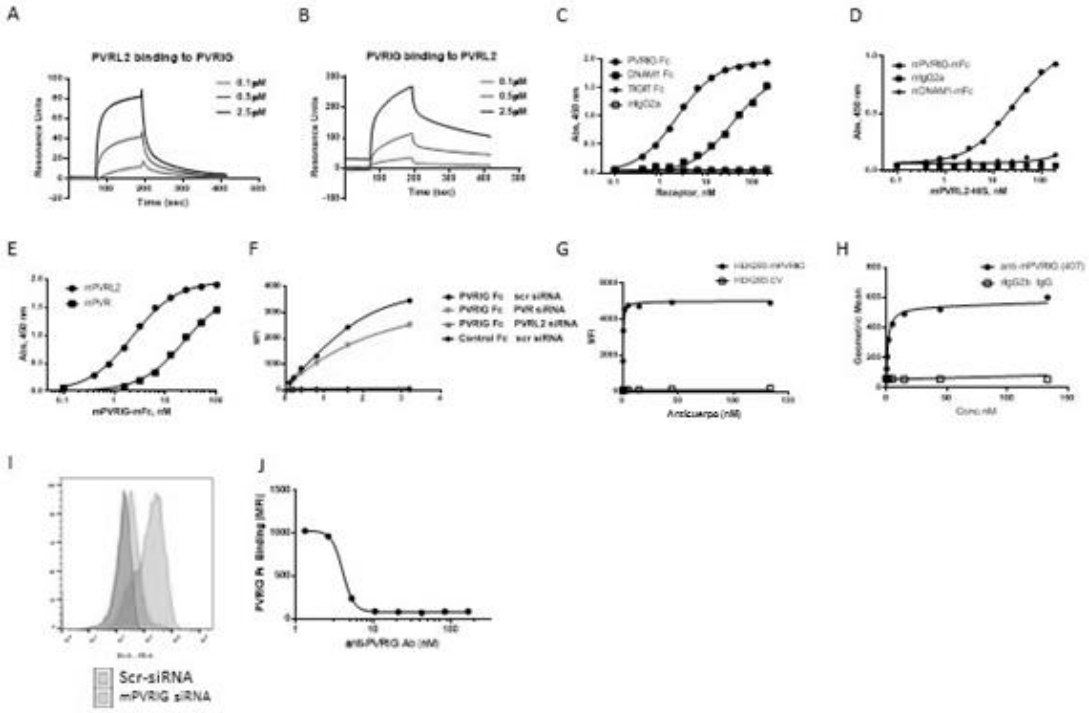

A
PVRL2 binding to PVRIG
B
PVRIG binding to PVRL2
C
D
E
F
G
H
I
J
Scr-siRNA
mPVRIG siRNA

FIG. 96

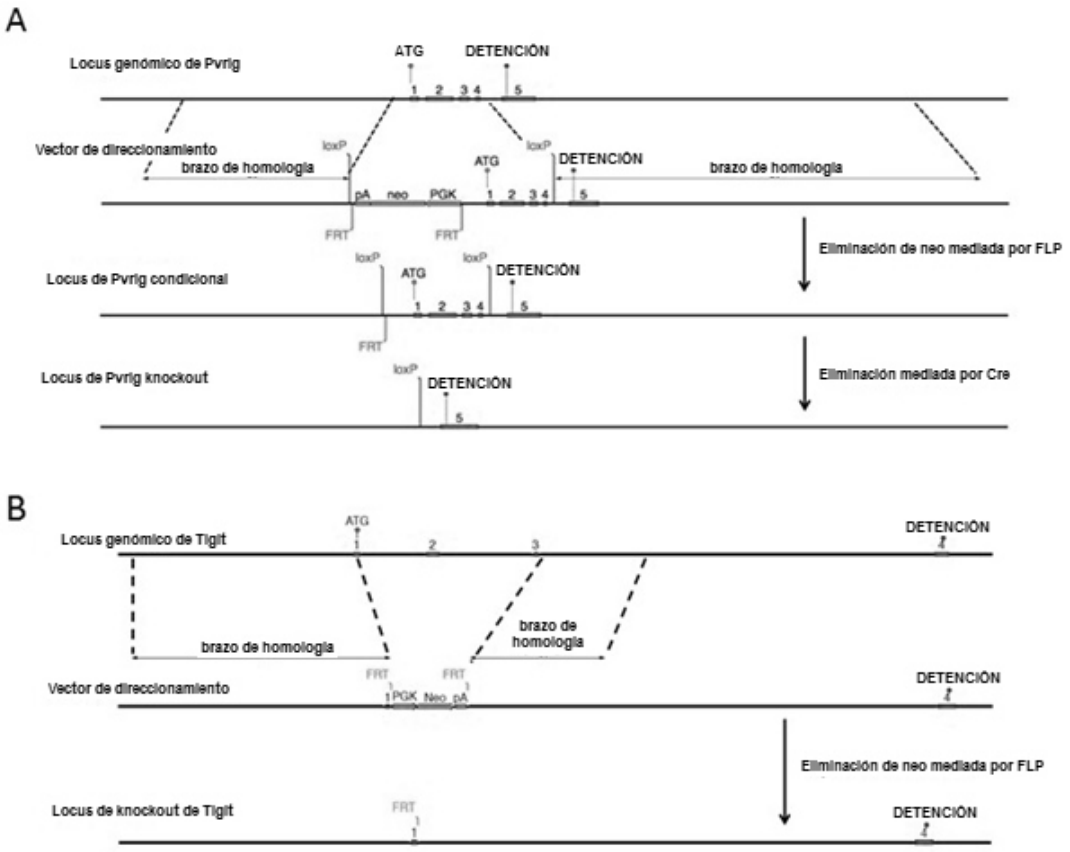

A
Locus genómico de Pvrig
ATG
DETENCIÓN
1 2 3 4 5
Vector de direccionamiento
brazo de homología
loxP
loxP
ATG
DETENCIÓN
brazo de homología
pA neo PGK
1 2 3 4 5
FRT
FRT
Eliminación de neo mediada por FLP
Locus de Pvrig condicional
loxP
loxP
ATG
DETENCIÓN
1 2 3 4 5
FRT
Locus de Pvrig knockout
loxP
DETENCIÓN
5
Eliminación mediada por Cre
B
Locus genómico de Tigit
ATG
1 2 3
DETENCIÓN
brazo de homología
brazo de homología
FRT
FRT
Vector de direccionamiento
1 PGK Neo pA
DETENCIÓN
Eliminación de neo mediada por FLP
Locus de knockout de Tigit
FRT
1
DETENCIÓN

FIG. 97

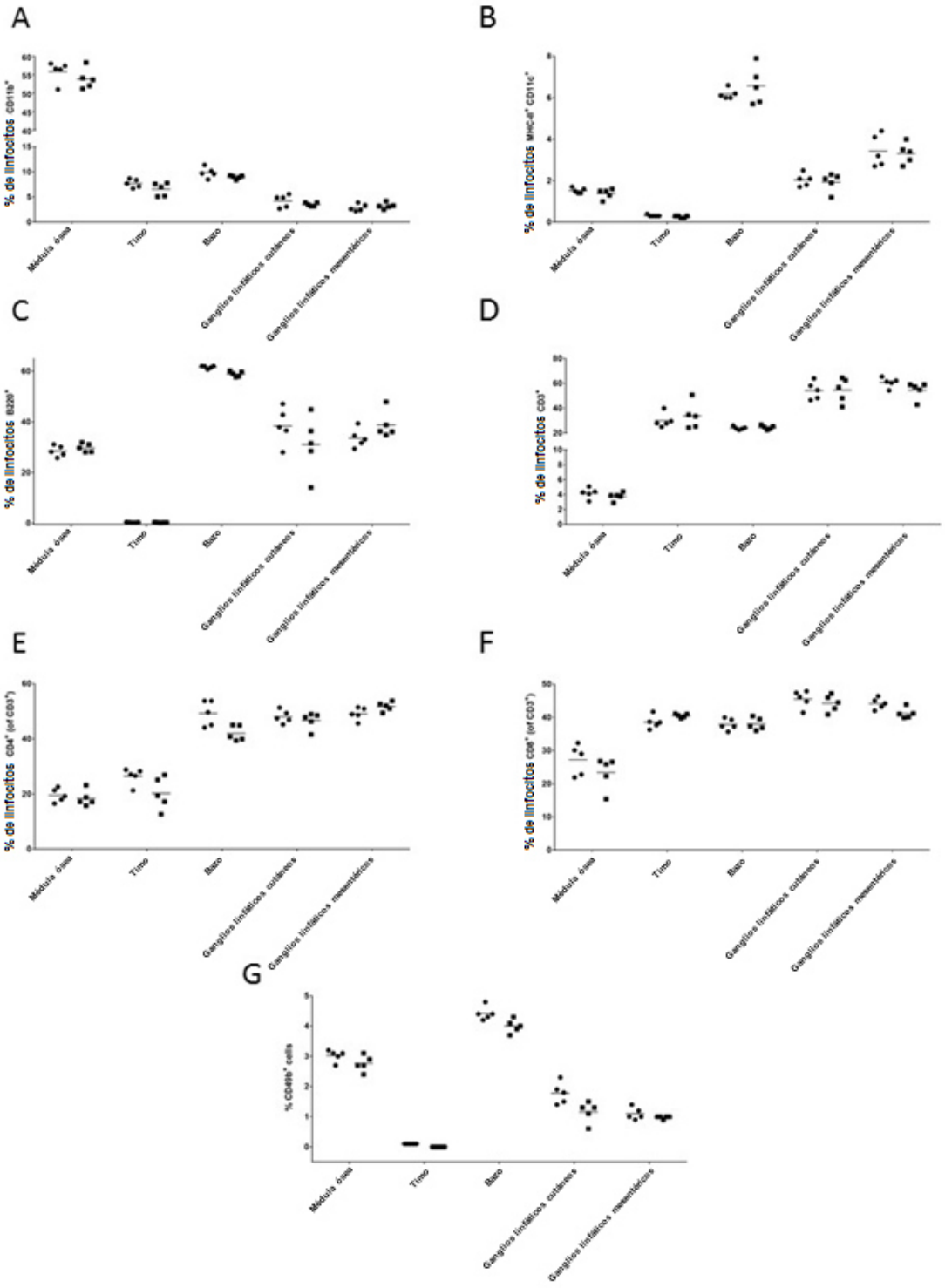

A
% de linfocitos CD11b+
Médula ósea
Timo
Baço
Gánglios linfáticos cutáneos
Gánglios linfáticos mesentéricos
B
% de linfocitos MHCII+ CD11c+
C
% de linfocitos B220+
D
% de linfocitos CD3+
E
% de linfocitos CD4+ (of CD3+)
F
% de linfocitos CD8+ (of CD3+)
G
% CD49b+ cells

FIG. 97 (Continuación)

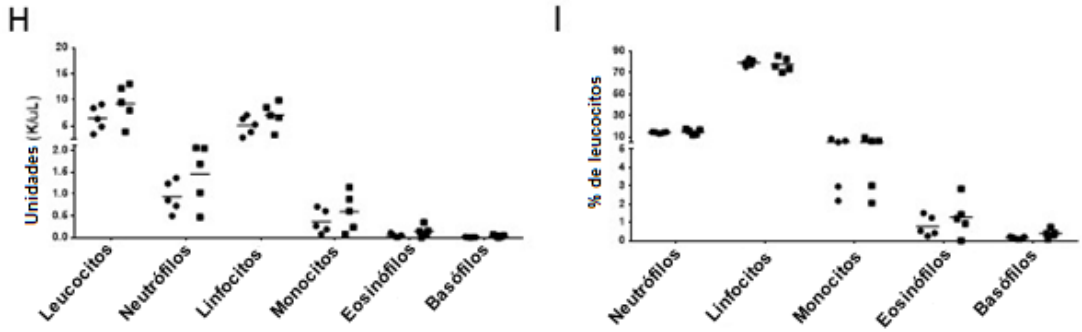


FIG. 98

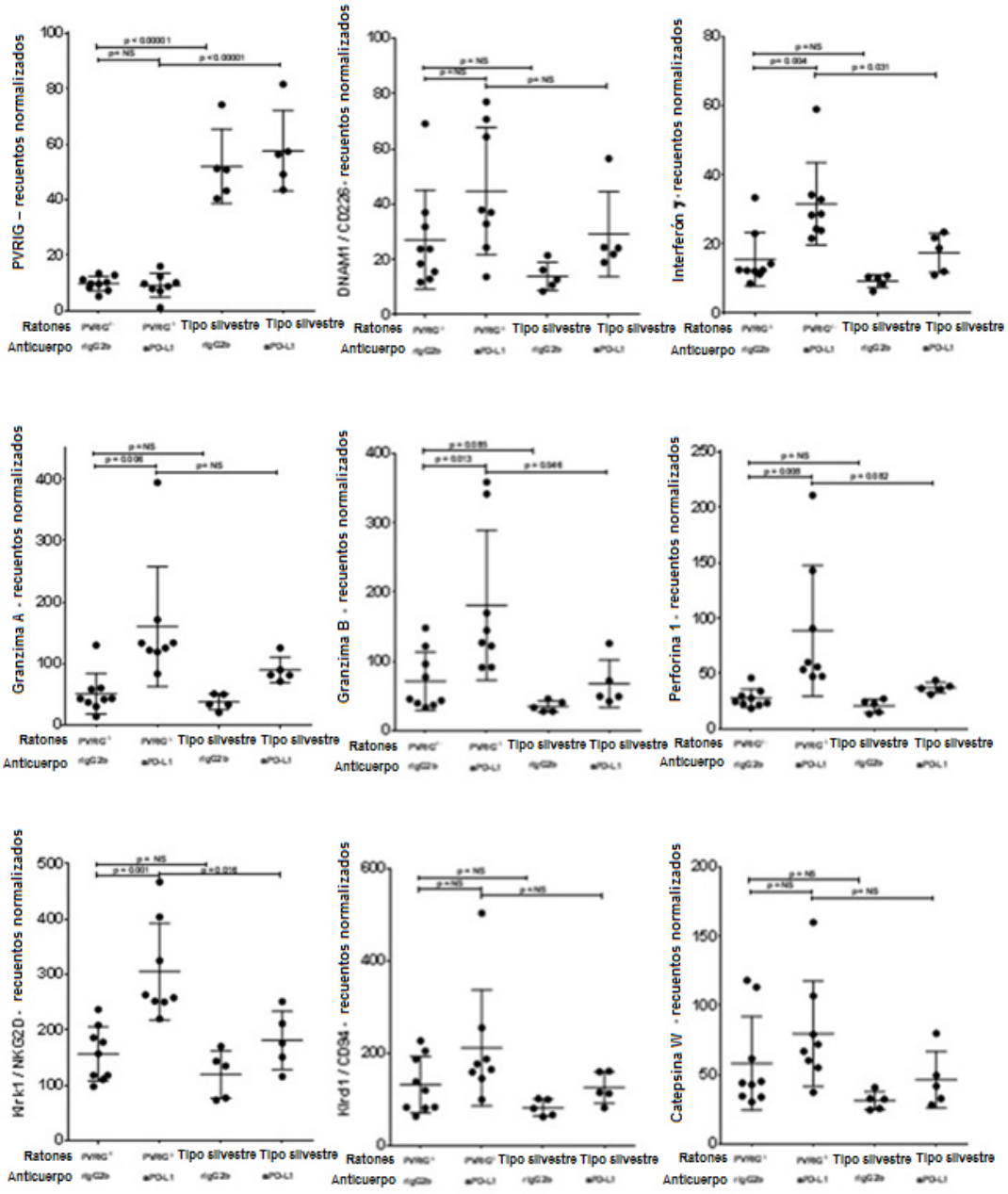

PVRIG – recuentos normalizados
DNAM1 / CD226 - recuentos normalizados
Interferón γ - recuentos normalizados
Granzima A - recuentos normalizados
Granzima B - recuentos normalizados
Perforina 1 - recuentos normalizados
Klrk1 / NKG2D - recuentos normalizados
Klrd1 / CD94 - recuentos normalizados
Catepsina W - recuentos normalizados
Ratones
Anticuerpo
Tipo silvestre
Tipo silvestre
rIgG2b
aPD-L1
p = NS

FIG. 99

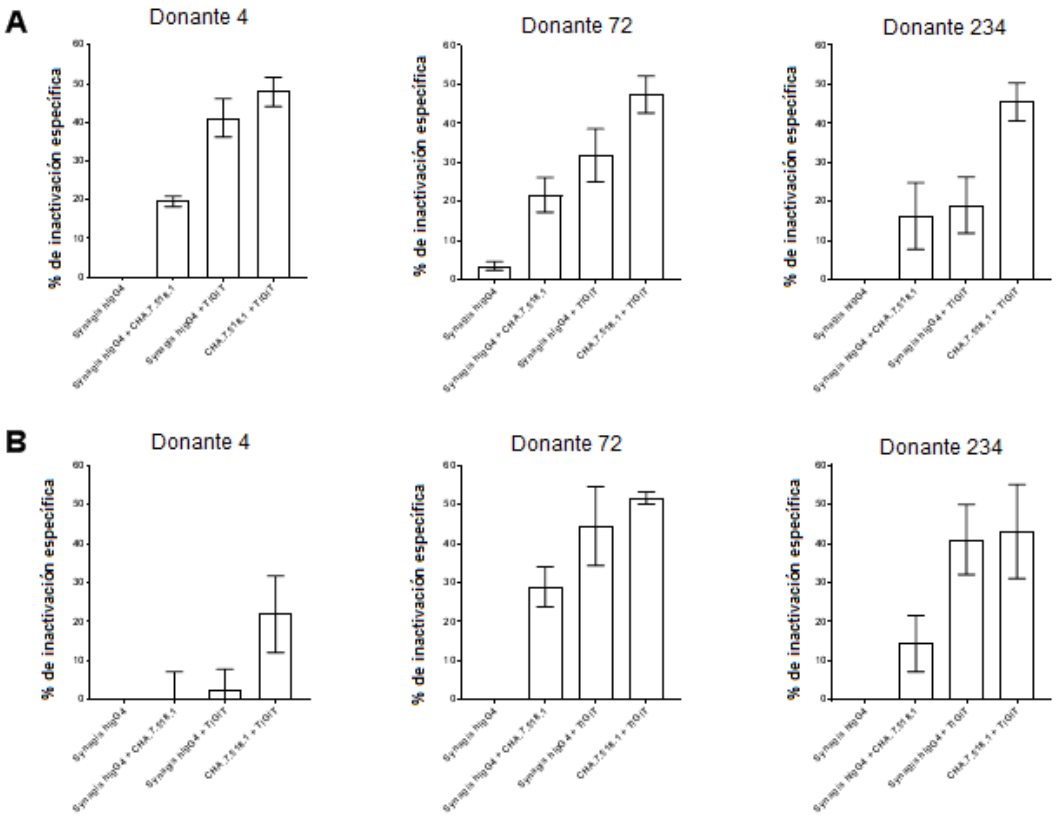

A
Donante 4
Donante 72
Donante 234
B
Donante 4
Donante 72
Donante 234
% de inactivación específica

FIG. 100

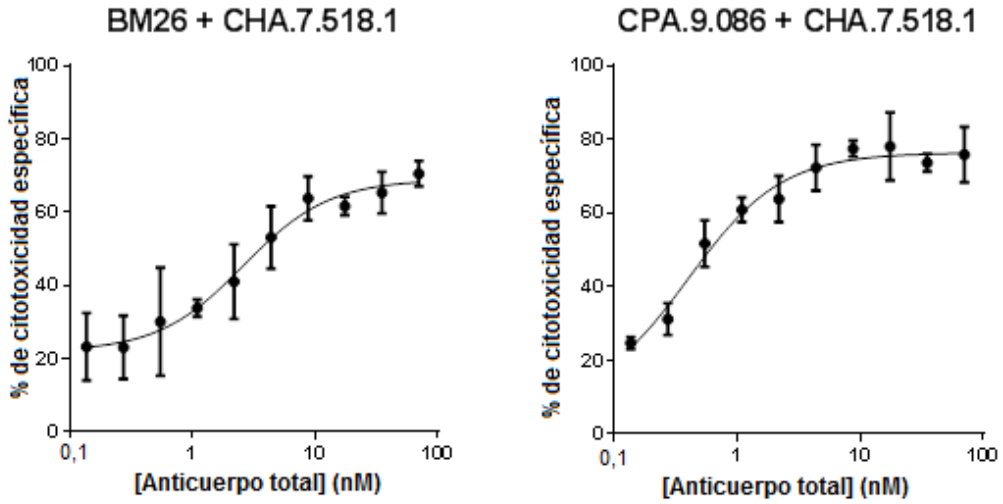
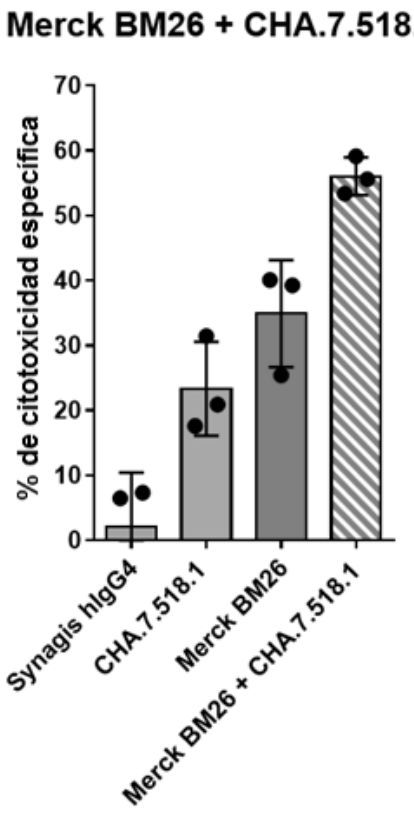

BM26 + CHA.7.518.1
% de citotoxicidad específica
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
[Anticuerpo total] (nM)
CPA.9.086 + CHA.7.518.1
% de citotoxicidad específica
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
[Anticuerpo total] (nM)

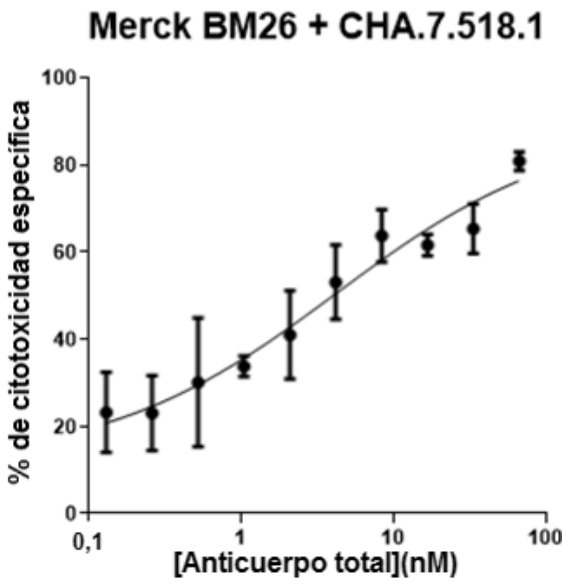
FIG. 101

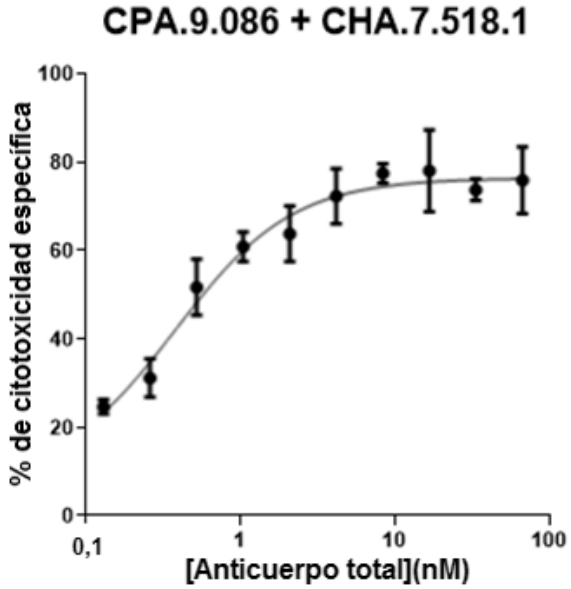
Secuencias de CPA 9.086 CDR

Definición	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
IMGT	GFTFSSYA (SEQ ID NO:600)	ISYAGEVK (SEQ ID NO:601)	ARDPLPLHYYGMDV (SEQ ID NO:602)	SSNMGRRP (SEQ ID NO:603)	SQN (SEQ ID NO:604)	AVWDDIGRVLQ (SEQ ID NO:605)
Kabat	SYAMH (SEQ ID NO:606)	VISYAGEVKYYADSVKG (SEQ ID NO:607)	DPLPLHYYGMDV (SEQ ID NO:608)	SGSSSNMGRRPVN (SEQ ID NO:609)	SQNQRPS (SEQ ID NO:610)	AVWDDIGRVLQ (SEQ ID NO:611)

FIG. 102


Merck BM26 + CHA.7.518.1
% de citotoxicidad especifica
70
60
50
40
30
20
10
0
Synagis hIgG4
CHA.7.518.1
Merck BM26
Merck BM26 + CHA.7.518.1


Merck BM26 + CHA.7.518.1
% de citotoxicidad especifica
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
[Anticuerpo total](nM)


CPA.9.086 + CHA.7.518.1
% de citotoxicidad especifica
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
[Anticuerpo total](nM)

P-2021-7446
Listado de secuencias modificado para respuesta a Oficio No. 17447
7 de febrero de 2022

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Compugen Ltd.

<120> ANTICUERPOS ANTI-TIGIT Y MÉTODOS DE USO

<130> 114386-5008-WO

<140> Presentado Adjunto

<141> 2017-08-17

<150> US 62/477,974

<151> 2017-03-28

<150> US 62/513,775

<151> 2017-06-01

<150> US 62/417,217

<151> 2016-11-03

<150> US 62/376,335

<151> 2016-08-17

<150> US 62/513,771

<151> 2017-06-01

<150> US 62/376,334

<151> 2016-08-17

<150> US 62/376,334

<151> 2016-08-17

<150> US 62/376,334

<151> 2016-08-17

<150> US 62/513,916

<151> 2017-06-01

<150> US 62/538,561

<151> 2017-07-28

<160> 611

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 204

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de PVRIG Humana a partir de la posición 21

<400> 1

Met Gly His Arg Thr Leu Val Leu Pro Trp Val Leu Leu Thr Leu Cys
1 5 10 15

Val Thr Ala Gly Thr Pro Glu Val Trp Val Gln Val Arg Met Glu Ala
20 25 30

Thr Glu Leu Ser Ser Phe Thr Ile Arg Cys Gly Phe Leu Gly Ser Gly

35 40 45

Ser Ile Ser Leu Val Thr Val Ser Trp Gly Gly Pro Asn Gly Ala Gly

50 55 60

Gly Thr Thr Leu Ala Val Leu His Pro Glu Arg Gly Ile Arg Gln Trp

65 70 75 80

Ala Pro Ala Arg Gln Ala Arg Trp Glu Thr Gln Ser Ser Ile Ser Leu

85 90 95

Ile Leu Glu Gly Ser Gly Ala Ser Ser Pro Cys Ala Asn Thr Thr Phe

100 105 110

Cys Cys Lys Phe Ala Ser Phe Pro Glu Gly Ser Trp Glu Ala Cys Gly

115 120 125

Ser Leu Pro Pro Ser Ser Asp Pro Gly Leu Ser Ala Pro Pro Thr Pro

130 135 140

Ala Pro Ile Leu Arg Ala Asp Leu Ala Gly Ile Leu Gly Val Ser Gly

145 150 155 160

Val Leu Leu Phe Gly Cys Val Tyr Leu Leu His Leu Leu Arg Arg His
165 170 175

Lys His Arg Pro Ala Pro Arg Leu Gln Pro Ser Arg Thr Ser Pro Gln
180 185 190

Ala Pro Arg Ala Arg Ala Trp Ala Pro Ser Gln Ala
195 200

<210> 2

<211> 224

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia PVRIG Humana a partir de la posición 1

<400> 2

Met Arg Thr Glu Ala Gln Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Glu Pro Gly
1 5 10 15

Leu Glu Gly Ala Met Gly His Arg Thr Leu Val Leu Pro Trp Val Leu
20 25 30

Leu Thr Leu Cys Val Thr Ala Gly Thr Pro Glu Val Trp Val Gln Val

35 40 45

Arg Met Glu Ala Thr Glu Leu Ser Ser Phe Thr Ile Arg Cys Gly Phe

50 55 60

Leu Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Val Thr Val Ser Trp Gly Gly Pro

65 70 75 80

Asn Gly Ala Gly Gly Thr Thr Leu Ala Val Leu His Pro Glu Arg Gly

85 90 95

Ile Arg Gln Trp Ala Pro Ala Arg Gln Ala Arg Trp Glu Thr Gln Ser

100 105 110

Ser Ile Ser Leu Ile Leu Glu Gly Ser Gly Ala Ser Ser Pro Cys Ala

115 120 125

Asn Thr Thr Phe Cys Cys Lys Phe Ala Ser Phe Pro Glu Gly Ser Trp

130 135 140

Glu Ala Cys Gly Ser Leu Pro Pro Ser Ser Asp Pro Gly Leu Ser Ala

145 150 155 160

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Ile Leu Arg Ala Asp Leu Ala Gly Ile Leu
165 170 175

Gly Val Ser Gly Val Leu Leu Phe Gly Cys Val Tyr Leu Leu His Leu
180 185 190

Leu Arg Arg His Lys His Arg Pro Ala Pro Arg Leu Gln Pro Ser Arg
195 200 205

Thr Ser Pro Gln Ala Pro Arg Ala Arg Ala Trp Ala Pro Ser Gln Ala
210 215 220

<210> 3

<211> 479

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PVLR2 Humana isoformaa alfa

<400> 3

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln

20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly

35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr

50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln

65 70 75 80

Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro

85 90 95

Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr

100 105 110

Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His

115 120 125

Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr

130 135 140

Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala
145 150 155 160

Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp
165 170 175

Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala
180 185 190

Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln
195 200 205

Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr
210 215 220

Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val
225 230 235 240

Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser
245 250 255

Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp

260 265 270

Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn

275 280 285

Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro

290 295 300

Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp

305 310 315 320

Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly

325 330 335

Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Arg Ala

340 345 350

Ser Pro Arg Asp Val Gly Pro Leu Val Trp Gly Ala Val Gly Gly Thr

355 360 365

Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Ile Leu

370 375 380

Leu Arg Val Arg Arg Arg Arg Lys Ser Pro Gly Gly Ala Gly Gly Gly

385 390 395 400

Ala Ser Gly Asp Gly Gly Phe Tyr Asp Pro Lys Ala Gln Val Leu Gly

405 410 415

Asn Gly Asp Pro Val Phe Trp Thr Pro Val Val Pro Gly Pro Met Glu

420 425 430

Pro Asp Gly Lys Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Ala Glu

435 440 445

Lys Gly Leu Met Leu Pro Pro Pro Pro Ala Leu Glu Asp Asp Met Glu

450 455 460

Ser Gln Leu Asp Gly Ser Leu Ile Ser Arg Arg Ala Val Tyr Val

465 470 475

<210> 4

<211> 518

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PVLR2 Humana isoforma delta

<400> 4

Met Ala Arg Ala Ala Ala Leu Leu Pro Ser Arg Ser Pro Pro Thr Pro
1 5 10 15

Leu Leu Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Gly Ala Gln
20 25 30

Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly Gly
35 40 45

Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu Tyr
50 55 60

Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His Gln
65 70 75 80

Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser Pro
85 90 95

Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser Thr
100 105 110

Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu His

115 120 125

Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala Thr

130 135 140

Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile Ala

145 150 155 160

Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln Asp

165 170 175

Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro Ala

180 185 190

Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr Gln

195 200 205

Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe Thr

210 215 220

Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys Val

225 230 235 240

Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu Ser

245 250 255

Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn Trp

260 265 270

Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser Asn

275 280 285

Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe Pro

290 295 300

Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val Asp

305 310 315 320

Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val Gly

325 330 335

Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn Thr

340 345 350

Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala Ala

355 360 365

Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg Gln
370 375 380

Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp Leu
385 390 395 400

Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu Glu
405 410 415

Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu His
420 425 430

Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr Glu
435 440 445

Gln Glu Met Pro Arg Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg Ser
450 455 460

Gly Pro Leu His Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro Val
465 470 475 480

Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu Asp

485 490 495

Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro Ile

500 505 510

Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr

515

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio pesado variable (vh)

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR1

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 7

Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser
1 5

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 8

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Asn Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Glu Ala Thr Asn Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 11

Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

1 5

<210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 12

Glu Ala Thr

1

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 13

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 14

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Glu Ala Thr Asn Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio pesado variable (vh)

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 16

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 17

Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ile

1 5

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 18

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 19

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Ile Ala

20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile

35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 21

Gln Ser Val Arg Ile Ala

1 5

<210> 22

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 22

Leu Ala Ser

1

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 23

Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 24

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Ile Ala
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 25

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VH

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VH

<400> 26

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 27

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Xaa Ile Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Ser Ala Asp Asn Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Xaa Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 28

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Tyr, Gln, Ser or Ala

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Xaa Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Xaa Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Xaa Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VH

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>
<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Xaa Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Xaa Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 31

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Xaa Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Xaa Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Xaa Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Asn Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Xaa Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 96
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VL

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro

85 90 95

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VL

<400> 34

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (53)..(53)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Ile Cys Arg Val Ser Glu Xaa Ile Tyr Ser Xaa
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Glu Ala Thr Xaa Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Xaa Gly Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> Tyr, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (53)..(53)

<223> Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Tyr, Phe or His

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Xaa Ile Ser Ser Xaa
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Xaa Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Xaa Ser Thr Pro Pro
85 90 95

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (53)..(53)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Xaa Ile Tyr Ser Xaa

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Glu Ala Thr Xaa Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Xaa Gly Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (53)..(53)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Xaa Ile Tyr Ser Xaa

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Glu Ala Thr Xaa Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Xaa Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.518 antibody VL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (53)..(53)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Xaa Ile Tyr Ser Xaa

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Glu Ala Thr Xaa Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Xaa Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 40

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VH

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VH

<400> 41

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (52)..(52)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<400> 42

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Xaa Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Xaa Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Asn Asp Lys Phe
50 55 60

Lys Val Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Xaa Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 43

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (52)..(52)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 43

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Xaa Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (52)..(52)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Xaa Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Xaa Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Xaa Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (52)..(52)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<400> 45

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Xaa Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Xaa Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Xaa Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (52)..(52)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<400> 46

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Xaa Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Xaa Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Xaa Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (52)..(52)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Xaa Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Xaa Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Xaa Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 48

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VL

<400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro

85 90 95

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VL

<400> 49

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 50

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VL

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp

20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro

85 90 95

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (93)..(93)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Ile Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Ile Ala
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Xaa Xaa Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 52

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Tyr, Phe or His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (93)..(93)

<223> Gln, Ser, Ala or Asp

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Xaa Xaa Thr Pro Pro
85 90 95

<210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (93)..(93)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<400> 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Ile Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Xaa Xaa Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_1 antibody VL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (93)..(93)

<223> Asn, Gln, Ser, Ala or Asp

<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Ile Ala
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Xaa Xaa Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 55

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_2 antibody VH

<400> 55

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_2 antibody VH

<400> 56

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 57

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_2 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (59)..(59)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 57

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr
20 25 30

Xaa Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Xaa Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 58

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_2 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Tyr, Phe or His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (59)..(59)

<223> Gln, Ser or Ala

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr

20 25 30

Xaa Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg

<210> 59

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_2 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (59)..(59)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 59

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr
20 25 30

Xaa Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 60

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_2 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (59)..(59)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 60

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr

20 25 30

Xaa Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 61

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized secuencias of CHA.7.538_2 antibody VH

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Trp, Tyr, Phe or His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (59)..(59)

<223> Asn, Gln, Ser or Ala

<400> 61

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr

20 25 30

Xaa Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.518 VH h518HH1

<400> 62

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 63

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.518 VH h518HH2

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Humanaized CHA.7.518 VH h518HH3

<400> 64

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 65

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.518 VH h518HH4

<400> 65

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Asn Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Lys Thr Ala Arg Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 66

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.518 VL h518HL1

<400> 66

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Glu Ala Thr Asn Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.518 VL h518HL2

<400> 67

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Glu Ala Thr Asn Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 68

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.518 VL h518HL3

<400> 68

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Glu Ala Thr Asn Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 69

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_1 VH h5381HH1

<400> 69

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Humanaized CHA.7.538_1 VH h5381HH2

<400> 70

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 71

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_1 VH h5381HH3

<400> 71

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_1 VH h5381HH4

<400> 72

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Thr His Asp Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_1/538_2 VL h538HL1

<400> 73

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Ile Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_1/538_2 VL h538HL2

<400> 74

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Ile Ala
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_2 VH h5382HH1

<400> 75

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 76

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_2 VH h5382HH2

<400> 76

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 77

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_2 VH h5382HH3

<400> 77

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_1/538_2 VL h538HL1

<400> 78

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Ile Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humanaized CHA.7.538_1/538_2 VL h538HL2

<400> 79

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Arg Ile Ala

20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile

35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 80

<211> 131

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia alignment of PVRIG orthologs

<400> 80

Thr Pro Glu Val Trp Val Gln Val Arg Met Glu Ala Thr Glu Leu Ser

1 5 10 15

Ser Phe Thr Ile Arg Cys Gly Phe Leu Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu

20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Gly Gly Pro Asn Gly Ala Gly Gly Thr Thr Leu

35 40 45

Ala Val Leu His Pro Glu Arg Gly Ile Arg Gln Trp Ala Pro Ala Arg
50 55 60

Gln Ala Arg Trp Glu Thr Gln Ser Ser Ile Ser Leu Ile Leu Glu Gly
65 70 75 80

Ser Gly Ala Ser Ser Pro Cys Ala Asn Thr Thr Phe Cys Cys Lys Phe
85 90 95

Ala Ser Phe Pro Glu Gly Ser Trp Glu Ala Cys Gly Ser Leu Pro Pro
100 105 110

Ser Ser Asp Pro Gly Leu Ser Ala Pro Pro Thr Pro Ala Pro Ile Leu
115 120 125

Arg Ala Asp
130

<210> 81

<211> 131

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia alignment of PVRIG orthologs

<400> 81

Thr Pro Glu Val Trp Val Gln Val Gln Met Glu Ala Thr Glu Leu Ser
1 5 10 15

Ser Phe Thr Val His Cys Gly Phe Leu Gly Pro Gly Ser Ile Ser Leu
20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Gly Gly Pro Asp Gly Ala Gly Gly Thr Lys Leu
35 40 45

Ala Val Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Arg Gln Trp Ala Pro Ala Arg
50 55 60

Gln Ala Arg Trp Glu Thr Gln Ser Ser Ile Ser Leu Ala Leu Glu Asp
65 70 75 80

Ser Gly Ala Ser Ser Pro Phe Ala Asn Thr Thr Phe Cys Cys Lys Phe
85 90 95

Ala Ser Phe Pro Glu Gly Ser Trp Glu Ser Cys Gly Ser Leu Pro Pro

100 105 110

Ser Ser Asp Pro Gly Leu Ser Ala Pro Pro Thr Pro Val Pro Ile Leu

115 120 125

Arg Ala Asp

130

<210> 82

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia alignment of PVRIG orthologs

<400> 82

Thr Pro Glu Val Trp Val Gln Val Gln Met Lys Ala Thr Glu Leu Ser

1 5 10 15

Ser Phe Ile Val His Cys Gly Phe Leu Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu

20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Gly Gly Pro Asp Gly Ala Gly Gly Thr Arg Leu

35 40 45

Ala Val Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Arg Gln Trp Ala Pro Ala His

50 55 60

Gln Ala Arg Trp Glu Thr Gln Ser Ser Ile Ser Leu Val Leu Glu Glu

65 70 75 80

Pro Gly Ala Ser Ser Pro Ser Ala Asn Thr Thr Phe Cys Cys Lys Phe

85 90 95

Ala Ser Phe Pro Glu Gly Ser Trp Glu Ala Cys Gly Ser Leu Pro Pro

100 105 110

Ser Ser Asp Pro Gly Leu Ser Ala Pro Ile Leu Arg Ala Asp

115 120 125

<210> 83

<211> 131

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia alignment of PVRIG orthologs

<400> 83

Thr Pro Glu Val Trp Val Gln Val Gln Met Glu Ala Thr Glu Leu Ser

1 5 10 15

Ser Phe Thr Val His Cys Gly Phe Leu Gly Pro Gly Ser Ile Ser Leu

20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Gly Gly Pro Asp Gly Ala Gly Gly Thr Lys Leu

35 40 45

Ala Val Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Arg Gln Trp Ala Pro Ala Arg

50 55 60

Gln Ala Arg Trp Glu Thr Gln Ser Ser Ile Ser Leu Ala Leu Glu Asp

65 70 75 80

Ser Gly Ala Ser Ser Pro Phe Ala Asn Thr Thr Phe Cys Cys Lys Phe

85 90 95

Ala Ser Phe Pro Glu Gly Ser Trp Glu Ser Cys Gly Ser Leu Pro Pro

100 105 110

Ser Ser Asp Pro Gly Leu Ser Ala Pro Pro Thr Pro Val Pro Ile Leu

115 120 125

Arg Ala Asp

130

<210> 84

<211> 166

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Heavy chain: Amino acid secuencia

<400> 84

Met Glu Trp Asn Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys

20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asn Tyr Ala Val His Trp Ile Lys Gln Thr Thr Gly Gln Ala Leu

50 55 60

Glu Trp Thr Gly Tyr Ile Ala Pro Gly Ser Gly Val Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Val Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Thr Thr Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr

130 135 140

Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Ser Ser Thr Val Thr Leu

145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Gly

165

<210> 85

<211> 498

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Heavy chain: DNA secuencia

<400> 85

atggaatgga actgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggagt ccactcccag 60

gtccagctgc agcagtctgg agctgagctg gcaaagcctg gctcttcagt gatgatttcc 120

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tatgctgtgc actggataaa gcagacgact 180

ggacaggccc ttgagtggac tggatatatt gctcctggaa gtggagttac taaatacaat 240

gagaagttca agggcaaggc cacattgact gtagacaaat cctcaaccac agcctacatg 300

caactcagca gcctgacacc tgtggacact gcggtctatt actgtgcaag cggaactacg 360

aggtttgctt attggggcca aggcactctg gtcactgtct cttcagccca aacaacagcc 420

ccatctgtct atccactggc tcctggatgt ggtgatacaa ccagctccac ggtgactctg 480

ggatgcctgg tcaagggc 498

<210> 86

<211> 130

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Light chain: Amino acid secuencia

<400> 86

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
20 25 30

Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Ser Leu Ser Ser Tyr Asn Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Glu Pro Lys Ile Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Pro Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Gln Ser Lys Asp Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu

115 120 125

Ile Lys

130

<210> 87

<211> 390

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Light chain: DNA secuencia

<400> 87

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60

gacattgtgc tgacccagtc tcctgctttg gctgtgtctc tagggcagag ggccacaatc 120

tcctgtagag ccagccaaag tgtcagttta tccagctata atctcatgca gtggtaccaa 180

cagaaaccag gacaggaacc caaaatcctc atctatgatg catccaacct accatctggg 240

atccctgcca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcaccctcac cattgatcct 300

gtgcaggctg atgatattgc aacctattac tgtcagcaga gtaaggatga cccgctcacg 360

ttcggttctg ggaccaagct ggagatcaaa 390

<210> 88

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana IgG1 constant region

<400> 88

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 89

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana IgG1 D265A constant region

<400> 89

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 90

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana IgG1 N297A constant region

<400> 90

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 91

<211> 326

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana IgG2 constant region

<400> 91

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 92
<211> 377
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Humana IgG3 constant region

<400> 92

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro

100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys

130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr

195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln

260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn

305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile

340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln

355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

370 375

<210> 93

<211> 327

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana IgG4 constant region (Wild Type)

<400> 93

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 94

<211> 327

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana IgG4 constant region (S241P hinge mutant)

<400> 94

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 95

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana kappa light chain

<400> 95

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 96

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana lambda light chain

<400> 96

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 97

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana TIGIT ECD

<400> 97

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln

20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys

35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val

50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn

65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr

85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu

100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro

115 120

<210> 98

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cyno macaque TIGIT ECD

<400> 98

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Lys Lys

1 5 10 15

Gly Gly Ser Val Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Met Ala Gln

20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln His Asp His Ser Leu Leu Ala Ile
35 40 45

Arg Asn Ala Glu Leu Gly Trp His Ile Tyr Pro Ala Phe Lys Asp Arg
50 55 60

Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Met
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly
85 90 95

Thr Tyr Arg Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala
100 105 110

Glu His Ser Ala Arg Phe Gln Ile Pro
115 120

<210> 99

<211> 316

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Humana PVR ECD

<400> 99

Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr
20 25 30

His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met
35 40 45

Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg
50 55 60

Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser
65 70 75 80

Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95

Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu

100 105 110

Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln

115 120 125

Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly

130 135 140

Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro

145 150 155 160

Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr

165 170 175

Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val

180 185 190

Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr

195 200 205

Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr

210 215 220

Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp

225 230 235 240

Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met

245 250 255

Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile

260 265 270

Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr

275 280 285

Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu

290 295 300

Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Met Ser Arg Asn

305 310 315

<210> 100

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.018 Dominio pesado variable (vh)

<400> 100

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Met Leu Val Gln Asp Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 101

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 101

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 102

Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 103

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 103

Ala Lys Glu Met Leu Val Gln Asp Tyr Tyr Tyr Met Asp Val

1 5 10

<210> 104

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 104

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Glu Met Leu Val Gln Asp Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 105

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 105

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Leu His Arg

20 25 30

Asn Gly Ile Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly

85 90 95

Leu Gln Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 106

Gln Asn Leu Leu His Arg Asn Gly Ile Asn Tyr
1 5 10

<210> 107
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR2

<400> 107

Trp Gly Ser
1

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR3

<400> 108

Met Gln Gly Leu Gln Ile Pro Pro Thr

1 5

<210> 109

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 109

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Leu His Arg

20 25 30

Asn Gly Ile Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Leu Gln Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 110

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.027 Dominio pesado variable (vh)

<400> 110

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 111

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 111

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 112

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 112

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 113

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 113

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 114

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 114

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 115

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 115

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Ser Leu Gln Leu Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ala Val Leu Gly

100 105 110

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 116

Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg Pro

1 5

<210> 117

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 117

Ser Gln Asn

1

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 118

Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ser Leu Gln

1 5 10

<210> 119

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 119

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Ser Ser Leu Gln Leu Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ala Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 120

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.049 Dominio pesado variable (vh)

<400> 120

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 121

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 122

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 122

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 123

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 123

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 124

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 124

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 125

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 125

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Phe Ser Leu Leu Leu Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ala Val Leu Gly
100 105 110

<210> 126
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR1

<400> 126

Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg Pro
1 5

<210> 127
<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 127

Ser Gln Asn

1

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 128

Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu Phe Ser Leu Leu

1 5 10

<210> 129

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 129

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Phe Ser Leu Leu Leu Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ala Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 130

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.057 Dominio pesado variable (vh)

<400> 130

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gln Gly Ala Ala Ala Gly Asn Pro Phe Asp Ile Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 131

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr

1 5 10

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 132

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 133

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 133

Ala Arg Gln Gly Ala Ala Ala Gly Asn Pro Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 134

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 134

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gln Gly Ala Ala Ala Gly Asn Pro Phe Asp Ile Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 135

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 135

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Phe Val Tyr Trp His Gln Gln Leu Thr Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Thr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Gly Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 136

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Phe

1 5

<210> 137

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 137

Arg Asn Thr

1

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 138

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ala Trp Val
1 5 10

<210> 139

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 139

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Phe Val Tyr Trp His Gln Gln Leu Thr Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Thr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Gly Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 140

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.059 Dominio pesado variable (vh)

<400> 140

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Ala Arg Tyr Ser Tyr Gly Gln Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 141

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 141

Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr

1 5

<210> 142

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 142

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 143

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 143

Ala Arg Gly Ala Arg Tyr Ser Tyr Gly Gln Tyr Pro Tyr

1 5 10

<210> 144

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 144

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Ala Arg Tyr Ser Tyr Gly Gln Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 145

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 145

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Ser Leu
20 25 30

Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Ala Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Asp Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 146

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 146

His Asp Ile Ser Ser Leu

1 5

<210> 147

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 147

Ala Ala Ser

1

<210> 148

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 148

Leu Gln Leu Asp Ser Phe Pro Thr Trp Thr

1 5 10

<210> 149

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 149

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Ser Leu

20 25 30

Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Ala Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Asp Ser Phe Pro Thr

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 150

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.083 Dominio pesado variable (vh)

<400> 150

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Pro Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 151

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 152

Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Pro Val
1 5

<210> 153

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 153

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 154

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 154

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Pro Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 155

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 155

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Trp Asp Gly Asp Arg

85 90 95

Arg Ser Leu Gln Leu Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ala Val Leu Gly

100 105 110

<210> 156

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 156

Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg Pro

1 5

<210> 157

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 157

Ser Gln Asn

1

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 158

Ala Val Trp Asp Gly Asp Arg Arg Ser Leu Gln

1 5 10

<210> 159

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 159

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Trp Asp Gly Asp Arg
85 90 95

Arg Ser Leu Gln Leu Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ala Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 160

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.086 Dominio pesado variable (vh)

<400> 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 161

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 161

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 162

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 162

Ile Ser Tyr Ala Gly Glu Val Lys

1 5

<210> 163

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 163

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 164

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 164

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 165

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 165

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Trp Asp Asp Ile Gly

85 90 95

Arg Val Leu Gln Leu Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ala Val Leu Gly

100 105 110

<210> 166

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 166

Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg Pro
1 5

<210> 167

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 167

Ser Gln Asn
1

<210> 168

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 168

Ala Val Trp Asp Asp Ile Gly Arg Val Leu Gln
1 5 10

<210> 169

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 169

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Trp Asp Asp Ile Gly
85 90 95

Arg Val Leu Gln Leu Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ala Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 170

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.089 Dominio pesado variable (vh)

<400> 170

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Arg Thr Pro Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 171
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR1

<400> 171

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 172
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR2

<400> 172

Ile Ser Tyr Asp Arg Thr Pro Val
1 5

<210> 173
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR3

<400> 173

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 174

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 174

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Arg Thr Pro Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 175

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 175

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Pro Arg Leu Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly

100 105 110

<210> 176

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 176

Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg Pro

1 5

<210> 177

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 177

Ser Gln Asn

1

<210> 178

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 178

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Pro Arg Leu Asn

1 5 10

<210> 179

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 179

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Pro Arg Leu Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 180

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.093 Dominio pesado variable (vh)

<400> 180

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Gly Asp Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 181

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 181

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 182

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 182

Ile Ser Tyr Glu Gly Asp Arg Lys

1 5

<210> 183

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 183

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 184

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 184

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Gly Asp Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 185

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 185

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Thr
85 90 95

Pro His Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly
100 105 110

<210> 186

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 186

Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg Pro
1 5

<210> 187

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 187

Ser Gln Asn

1

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 188

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Thr Pro His Gly Val

1 5 10

<210> 189

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 189

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Ala Ser Gly Asn Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gln Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Thr
85 90 95

Pro His Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 190

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.101 Dominio pesado variable (vh)

<400> 190

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Ala Pro Leu Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 191

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 191

Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr

1 5

<210> 192

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 192

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 193

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 193

Ala Arg Gly Ala Pro Leu Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr

1 5 10

<210> 194

<211> 445

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 194

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ala Pro Leu Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 195

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 195

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Ala Ile Ala Ser Leu
20 25 30

Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Ala Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Asp Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 196

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 196

His Ala Ile Ala Ser Leu

1 5

<210> 197

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 197

Ala Ala Ser

1

<210> 198

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 198

Leu Gln Leu Asp Ser Phe Pro Thr Trp Thr

1 5 10

<210> 199

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 199

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Ala Ile Ala Ser Leu

20 25 30

Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Ala Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Asp Ser Phe Pro Thr

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 200

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CPA.9.103 Dominio pesado variable (vh)

<400> 200

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Ala Arg Pro Asn Gly Gln Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 201

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 201

Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr
1 5

<210> 202
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR2

<400> 202

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 203
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR3

<400> 203

Ala Arg Gly Ala Arg Pro Asn Gly Gln Tyr Pro Tyr

1 5 10

<210> 204

<211> 445

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 204

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Ala Arg Pro Asn Gly Gln Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 205

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 205

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Gly Ile Lys Ser Leu

20 25 30

Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Ala Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Asp Ser Phe Pro Thr

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 206

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 206

His Gly Ile Lys Ser Leu

1 5

<210> 207

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 207

Ala Ala Ser
1

<210> 208
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR3

<400> 208

Leu Gln Leu Asp Ser Phe Pro Thr Trp Thr
1 5 10

<210> 209
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 209

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Gly Ile Lys Ser Leu

20 25 30

Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Ala Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Asp Ser Phe Pro Thr

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 210

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Clone 31C6 Dominio pesado variable (vh)

<400> 210

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 211

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 211

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Val

1 5

<210> 212

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 212

Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala

1 5

<210> 213

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 213

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 214

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 214

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 215

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 215

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 216

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 216

Glu His Ile Tyr Ser Tyr

1 5

<210> 217

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 217

Asn Ala Lys

1

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 218

Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 219

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 219

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 220

<211> 130

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Clone 22G2 Dominio pesado variable (vh)

<400> 220

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr

100 105 110

Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

115 120 125

Ser Ser

130

<210> 221

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 221

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Ile Tyr Tyr

1 5 10

<210> 222

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 222

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 223

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 223

Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr Tyr

1 5 10 15

Phe Phe Gly Val Asp Val

20

<210> 224

<211> 457

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 224

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr
100 105 110

Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys
130 135 140

Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

195 200 205

Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

210 215 220

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

225 230 235 240

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

260 265 270

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

290 295 300

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

325 330 335

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met

355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

405 410 415

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455

<210> 225

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 225

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 226

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 226

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 227

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 227

Asp Ala Ser

1

<210> 228

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 228

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 229

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 229

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 230

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.536.1 Dominio pesado variable (vh)

<400> 230

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 231

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 231

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Leu His

1 5 10

<210> 232

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 232

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser

1 5 10

<210> 233

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 233

Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 234

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 234

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 235

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 235

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala

20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 236

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 236

Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala Val Val
1 5 10

<210> 237

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 237

Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 238

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 238

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 239

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 239

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala

20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 240

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.536.3 Dominio pesado variable (vh)

<400> 240

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 241
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR1

<400> 241

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Leu His
1 5 10

<210> 242

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 242

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser

1 5 10

<210> 243

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 243

Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 244

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 244

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 245

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 245

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 246

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 246

Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala Val Val

1 5 10

<210> 247

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 247

Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 248

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 248

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 249

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 249

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 250

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.536.4 Dominio pesado variable (vh)

<400> 250

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 251

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 251

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Leu His

1 5 10

<210> 252

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 252

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser

1 5 10

<210> 253

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 253

Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 254

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 254

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 255

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 255

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala

20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 256
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR1

<400> 256

Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala Val Val
1 5 10

<210> 257
<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 257

Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 258

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 258

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 259

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 259

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 260

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.536.5 Dominio pesado variable (vh)

<400> 260

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 261

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 261

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Leu His

1 5 10

<210> 262

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 262

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser

1 5 10

<210> 263

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 263

Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 264

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 264

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 265

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 265

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala

20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 266

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 266

Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala Val Val

1 5 10

<210> 267

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 267

Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 268

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 269
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 269

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 270

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.536.6 Dominio pesado variable (vh)

<400> 270

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 271

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 271

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Leu His

1 5 10

<210> 272

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 272

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser

1 5 10

<210> 273

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 273

Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 274

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 274

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 275

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 275

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 276

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 276

Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala Val Val

1 5 10

<210> 277

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 277

Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 278

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 278

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 279

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 279

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala

20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 280

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.536.7 Dominio pesado variable (vh)

<400> 280

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 281

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 281

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Leu His

1 5 10

<210> 282

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 282

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser

1 5 10

<210> 283

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 283

Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 284

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 284

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 285

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 285

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala

20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 286

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 286

Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala Val Val

1 5 10

<210> 287

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 287

Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 288

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 289

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 289

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 290

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.536.8 Dominio pesado variable (vh)

<400> 290

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 291

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 291

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Leu His

1 5 10

<210> 292

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 292

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser
1 5 10

<210> 293

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 293

Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 294

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 294

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 295

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 295

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala

20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 296

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 296

Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala Val Val
1 5 10

<210> 297

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 297

Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 298

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 298

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 299

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 299

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Ala
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 300

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.560.1 Dominio pesado variable (vh)

<400> 300

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 301
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR1

<400> 301

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 302
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR2

<400> 302

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr
1 5 10

<210> 303
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR3

<400> 303

Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 304

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 304

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 305

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 305

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 306

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 306

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn His Ala Asn

1 5 10

<210> 307

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 307

Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser

1 5

<210> 308

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 308

Ala Leu Trp Phe Ser Asn His Trp Val

1 5

<210> 309

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 309

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln Pro Lys

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 310
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CHA.9.560.3 Dominio pesado variable (vh)

<400> 310

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 311

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 311

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 312

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 312

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 313

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 313

Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 314

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 314

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 315

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 315

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 316

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 316

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn His Ala Asn
1 5 10

<210> 317

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 317

Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser

1 5

<210> 318

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 318

Ala Leu Trp Phe Ser Asn His Trp Val

1 5

<210> 319

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 319

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln Pro Lys

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 320

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.560.4 Dominio pesado variable (vh)

<400> 320

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 321
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR1

<400> 321

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 322
<211> 10
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 322

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 323

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 323

Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 324

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 324

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 325
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 325

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 326

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 326

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn His Ala Asn

1 5 10

<210> 327

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 327

Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser

1 5

<210> 328

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 328

Ala Leu Trp Phe Ser Asn His Trp Val

1 5

<210> 329

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 329

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln Pro Lys

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 330

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.560.5 Dominio pesado variable (vh)

<400> 330

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 331

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 331

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 332

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 332

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr
1 5 10

<210> 333

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 333

Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 334

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 334

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 335

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 335

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 336

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 336

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn His Ala Asn

1 5 10

<210> 337

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 337

Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser

1 5

<210> 338

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 338

Ala Leu Trp Phe Ser Asn His Trp Val

1 5

<210> 339

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 339

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln Pro Lys

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 340

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.560.6 Dominio pesado variable (vh)

<400> 340

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 341

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 341

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 342

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 342

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 343

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 343

Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 344

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 344

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 345

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 345

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 346

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 346

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn His Ala Asn

1 5 10

<210> 347

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 347

Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser

1 5

<210> 348

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 348

Ala Leu Trp Phe Ser Asn His Trp Val

1 5

<210> 349

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 349

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln Pro Lys

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 350

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.560.7 Dominio pesado variable (vh)

<400> 350

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Ala Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 351

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 351

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 352

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 352

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 353

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 353

Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 354

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 354

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 355

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 355

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 356

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 356

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn His Ala Asn

1 5 10

<210> 357

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 357

Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser

1 5

<210> 358

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 358

Ala Leu Trp Phe Ser Asn His Trp Val

1 5

<210> 359

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 359

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 360

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.560.8 Dominio pesado variable (vh)

<400> 360

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Ala Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 361

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 361

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 362

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 362

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 363

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 363

Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 364

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 364

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Ala Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Asn Gly Tyr Tyr Val Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 365

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 365

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 366

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 366

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn His Ala Asn

1 5 10

<210> 367

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 367

Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser
1 5

<210> 368

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 368

Ala Leu Trp Phe Ser Asn His Trp Val
1 5

<210> 369

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 369

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn His Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Arg Gly Thr Asn Gly Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Phe Ser Asn
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 370

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.546.1 Dominio pesado variable (vh)

<400> 370

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 371
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR1

<400> 371

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser
1 5 10

<210> 372
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR2

<400> 372

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 373

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 373

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 374

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 374

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 375

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 375

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 376

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 376

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Thr
1 5 10

<210> 377
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR2

<400> 377

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 378
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR3

<400> 378

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 379

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 379

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 380
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CHA.9.547.1 Dominio pesado variable (vh)

<400> 380

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 381

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 381

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 382

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 382

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 383

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 383

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 384

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 384

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 385

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 385

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 386

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 386

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 387

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 387

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 388

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 388

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 389

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 389

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 390

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.2 Dominio pesado variable (vh)

<400> 390

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 391

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 391

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 392

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 392

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 393

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 393

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 394

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 394

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 395

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 395

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 396

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 396

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 397

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 397

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 398

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 398

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 399

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 399

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 400

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.3 Dominio pesado variable (vh)

<400> 400

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 401

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 401

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 402

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 402

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 403
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR3

<400> 403

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 404
<211> 446
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 404

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 405

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 405

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 406

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 406

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Thr
1 5 10

<210> 407

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 407

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 408

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 408

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 409

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 409

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 410

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.4 Dominio pesado variable (vh)

<400> 410

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 411

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 411

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 412

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 412

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 413

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 413

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 414

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 414

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 415

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 415

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 416

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 416

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 417

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 417

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 418

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 418

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 419

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 419

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 420

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.6 Dominio pesado variable (vh)

<400> 420

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 421

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 421

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 422

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 422

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 423

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 423

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 424

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 424

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 425

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 425

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 426

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 426

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 427

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 427

Lys Ala Ser Lys Ser His Thr
1 5

<210> 428

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 428

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 429

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 429

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 430

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.7 Dominio pesado variable (vh)

<400> 430

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 431

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 431

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 432

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 432

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 433

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 433

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 434

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 434

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 435

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 435

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 436

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 436

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 437

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 437

Lys Ala Ser Lys Ser His Thr

1 5

<210> 438

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 438

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 439

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 439

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 440

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.8 Dominio pesado variable (vh)

<400> 440

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 441

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 441

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 442

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 442

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 443

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 443

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 444

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 444

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 445

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 445

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 446
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR1

<400> 446

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Thr
1 5 10

<210> 447
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR2

<400> 447

Lys Ala Ser Lys Ser His Thr

1 5

<210> 448

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 448

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 449

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 449

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 450

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.9 Dominio pesado variable (vh)

<400> 450

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 451

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 451

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 452

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 452

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 453

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 453

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 454

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 454

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 455

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 455

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 456

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 456

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 457

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 457

Lys Ala Ser Lys Ser His Thr
1 5

<210> 458

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 458

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 459

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 459

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 460

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.541.1 Dominio pesado variable (vh)

<400> 460

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 461

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 461

Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 462

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 462

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 463

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 463

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 464

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 464

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 465

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 465

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 466

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 466

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 467

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 467

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 468

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 468

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 469

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 469

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 470

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.541.3

<400> 470

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 471

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 471

Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 472

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 472

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 473

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 473

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 474

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 474

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 475

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 475

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 476

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 476

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 477

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 477

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 478
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR3

<400> 478

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 479
<211> 213
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 479

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 480

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.541.4 Dominio pesado variable (vh)

<400> 480

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 481

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 481

Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 482

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 482

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 483

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 483

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 484

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 484

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 485

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 485

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 486

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 486

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 487

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 487

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 488

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 488

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 489

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 489

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 490

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.541.5 Dominio pesado variable (vh)

<400> 490

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 491
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR1

<400> 491

Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 492
<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 492

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 493

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 493

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 494

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 494

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 495

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 495

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 496

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 496

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 497

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 497

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 498

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 498

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 499

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 499

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 500

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.541.6 Dominio pesado variable (vh)

<400> 500

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 501

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 501

Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 502

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 502

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr
1 5 10

<210> 503

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 503

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 504
<211> 446
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 504

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 505

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 505

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 506

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 506

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 507

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 507

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 508

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 508

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 509

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 509

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 510

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.541.7 Dominio pesado variable (vh)

<400> 510

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 511

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 511

Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 512

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 512

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 513

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 513

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 514

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 514

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 515

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 515

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 516

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 516

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 517

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 517

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 518

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 518

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 519

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 519

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 520

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.541.8 Dominio pesado variable (vh)

<400> 520

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 521

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 521

Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 522

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 522

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 523

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 523

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 524

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa (IgG4(S241P))

<400> 524

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 525

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 525

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 526

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 526

Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 527

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 527

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 528

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 528

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 529

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 529

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Gly Asn Gly Asn Pro Leu Gly Met Asp

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 530

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.10 Dominio pesado variable (vh)

<400> 530

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 531

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 531

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser
1 5 10

<210> 532

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 532

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 533

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 533

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 534

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa

<400> 534

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 535

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 535

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 536

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 536

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser

1 5 10

<210> 537

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 537

Lys Ala Ser Lys Ser His Thr

1 5

<210> 538

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 538

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 539

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 539

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 540

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.11 Dominio pesado variable (vh)

<400> 540

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 541

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 541

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 542

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 542

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 543

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 543

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 544

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa

<400> 544

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 545

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 545

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 546

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 546

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 547
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR2

<400> 547

Lys Ala Ser Lys Ser His Thr
1 5

<210> 548
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR3

<400> 548

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 549

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 549

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 550

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.547.12 Dominio pesado variable (vh)

<400> 550

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 551
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR1

<400> 551

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser
1 5 10

<210> 552

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 552

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 553

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 553

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 554

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa

<400> 554

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 555

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 555

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 556

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 556

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser

1 5 10

<210> 557

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 557

Lys Ala Ser Lys Ser His Thr

1 5

<210> 558

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 558

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 559

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 559

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 560
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CHA.9.547.13 Dominio pesado variable (vh)

<400> 560

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 561

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 561

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser

1 5 10

<210> 562

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 562

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 563

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 563

Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 564

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa

<400> 564

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Trp Leu Leu Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 565

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 565

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 566
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR1

<400> 566

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 567
<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 567

Lys Ala Ser Lys Ser His Thr

1 5

<210> 568

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 568

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 569

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 569

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Lys Ser His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 570

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHA.9.543 Dominio pesado variable (vh)

<400> 570

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Leu Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Val Arg Phe Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Ser Val Ser Ser

115

<210> 571

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 571

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn

1 5 10

<210> 572

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 572

Leu Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser
1 5 10

<210> 573
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR3

<400> 573

Gly Val Arg Phe Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 574
<211> 388
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC de longitud completa

<400> 574

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Leu Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Val Arg Phe Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Ser Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp

180 185 190

Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr

195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys

210 215 220

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys

225 230 235 240

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val

245 250 255

Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe

260 265 270

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu

275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His

290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala

305 310 315 320

Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg

325 330 335

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met

340 345 350

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro

355 360 365

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn

370 375 380

Tyr Lys Asn Thr

385

<210> 575

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 575

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly

1 5 10 15

Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser

20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile

65 70 75 80

Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly

85 90 95

Thr His Gln Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 576

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 576

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser

1 5 10 15

<210> 577

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 577

Glu Ile Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 578

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 578

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Trp Thr
1 5

<210> 579

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 579

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly
1 5 10 15

Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65 70 75 80

Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Gln Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg

145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu

180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser

195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210 215

<210> 580

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Clone 31C6 Dominio pesado variable (vh)

<400> 580

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 581

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 581

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Val

1 5

<210> 582

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 582

Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala
1 5

<210> 583
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vhCDR3

<400> 583

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 584
<211> 443
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC de longitud completa

<400> 584

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser

195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys

210 215 220

Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro

225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr

245 250 255

Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser

260 265 270

Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg

275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile

290 295 300

Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn

305 310 315 320

Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys

325 330 335

Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu

340 345 350

Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe

355 360 365

Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala

370 375 380

Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr

385 390 395 400

Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly

405 410 415

Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His

420 425 430

Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 585

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 585

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 586

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 586

Glu His Ile Tyr Ser Tyr
1 5

<210> 587
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR2

<400> 587

Asn Ala Lys
1

<210> 588
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vlCDR3

<400> 588

Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 589

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 589

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly

115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 590

<211> 130

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Clone 22G2 Dominio pesado variable (vh)

<400> 590

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr

100 105 110

Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

115 120 125

Ser Ser

130

<210> 591

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR1

<400> 591

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Ile Tyr Tyr

1 5 10

<210> 592

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR2

<400> 592

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 593

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vhCDR3

<400> 593

Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr Tyr

1 5 10 15

Phe Phe Gly Val Asp Val

20

<210> 594

<211> 454

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> HC de longitud completa

<400> 594

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr
100 105 110

Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly
130 135 140

Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr

180 185 190

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu

195 200 205

Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp

210 215 220

Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr

225 230 235 240

Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

245 250 255

Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp

260 265 270

Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp

275 280 285

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

290 295 300

Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp

305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro

325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala

340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp

355 360 365

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile

370 375 380

Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn

385 390 395 400

Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys

405 410 415

Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys

420 425 430

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu

435 440 445

Ser His Ser Pro Gly Lys

450

<210> 595

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio ligero variable (vl)

<400> 595

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 596

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR1

<400> 596

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 597

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR2

<400> 597

Asp Ala Ser

1

<210> 598

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vlCDR3

<400> 598

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 599

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de longitud completa

<400> 599

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Asp

100 105 110

Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr

115 120 125

Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys

130 135 140

Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly

145 150 155 160

Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165 170 175

Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn

180 185 190

Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210 215

<210> 600

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 600

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 601

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 601

Ile Ser Tyr Ala Gly Glu Val Lys
1 5

<210> 602

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 602

Ala Arg Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 603

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 603

Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg Pro
1 5

<210> 604

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 604

Ser Gln Asn

1

<210> 605

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 605

Ala Val Trp Asp Asp Ile Gly Arg Val Leu Gln

1 5 10

<210> 606

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 606

Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 607
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 607

Val Ile Ser Tyr Ala Gly Glu Val Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 608
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 608

Asp Pro Leu Pro Leu His Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 609

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 609

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Met Gly Arg Arg Pro Val Asn
1 5 10

<210> 610

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 610

Ser Gln Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 611

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencias CPA9.086 CDR

<400> 611

Ala Val Trp Asp Asp Ile Gly Arg Val Leu Gln

1 5 10

<210> 612

<211> 326

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de referencia NCBI: NP_076975

<400> 612

Met Arg Thr Glu Ala Gln Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Glu Pro Gly

1 5 10 15

Leu Glu Gly Ala Met Gly His Arg Thr Leu Val Leu Pro Trp Val Leu

20 25 30

Leu Thr Leu Cys Val Thr Ala Gly Thr Pro Glu Val Trp Val Gln Val

35 40 45

Arg Met Glu Ala Thr Glu Leu Ser Ser Phe Thr Ile Arg Cys Gly Phe

50 55 60

Leu Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Val Thr Val Ser Trp Gly Gly Pro

65 70 75 80

Asn Gly Ala Gly Gly Thr Thr Leu Ala Val Leu His Pro Glu Arg Gly

85 90 95

Ile Arg Gln Trp Ala Pro Ala Arg Gln Ala Arg Trp Glu Thr Gln Ser

100 105 110

Ser Ile Ser Leu Ile Leu Glu Gly Ser Gly Ala Ser Ser Pro Cys Ala

115 120 125

Asn Thr Thr Phe Cys Cys Lys Phe Ala Ser Phe Pro Glu Gly Ser Trp

130 135 140

Glu Ala Cys Gly Ser Leu Pro Pro Ser Ser Asp Pro Gly Leu Ser Ala

145 150 155 160

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Ile Leu Arg Ala Asp Leu Ala Gly Ile Leu

165 170 175

Gly Val Ser Gly Val Leu Leu Phe Gly Cys Val Tyr Leu Leu His Leu

180 185 190

Leu Arg Arg His Lys His Arg Pro Ala Pro Arg Leu Gln Pro Ser Arg

195 200 205

Thr Ser Pro Gln Ala Pro Arg Ala Arg Ala Trp Ala Pro Ser Gln Ala

210 215 220

Ser Gln Ala Ala Leu His Val Pro Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ser Cys

225 230 235 240

Arg Pro Ala Thr Leu Asp Thr Ala His Pro His Gly Gly Pro Ser Trp

245 250 255

Trp Ala Ser Leu Pro Thr His Ala Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala

260 265 270

Ala Trp Ala Ser Thr Pro Ile Pro Ala Arg Gly Ser Phe Val Ser Val

275 280 285

Glu Asn Gly Leu Tyr Ala Gln Ala Gly Glu Arg Pro Pro His Thr Gly

290 295 300

Pro Gly Leu Thr Leu Phe Pro Asp Pro Arg Gly Pro Arg Ala Met Glu

305 310 315 320

Gly Pro Leu Gly Val Arg

325

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2021/0009407
Recibo: 22-9145
Fecha: 07/02/2022

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 633238
CUS: 1317188231

Patente PCT
ANTICUERPOS ANTI-TIGIT, ANTICUERPOS ANTI-PVRIG Y COMBINACIONES DE ESTOS

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	$ 176,000	$ 176,000
		TOTAL			$ 176,000

Sede Centro: Carrera 13 No.27-00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá D.C. - Colombia
Web: www.sic.gov.co e-mail:contactenos@sic.gov.co Conmutador:(571)5870000 Contact Center: (571)5920400