



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①Número de publicación: 2 819 209

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01) C07K 14/705

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

16.07.2014 PCT/US2014/046896 (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional:

(87) Fecha y número de publicación internacional: 22.01.2015 WO15009856

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 16.07.2014 E 14750063 (1)

15.07.2020 (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: EP 3021869

(54) Título: Procedimientos de tratamiento del cáncer usando antagonistas de unión al eje de PD-1 e inhibidores de TIGIT

(30) Prioridad:

16.07.2013 US 201361846941 P 13.08.2013 US 201361865582 P 10.03.2014 US 201461950754 P 29.04.2014 US 201461985884 P 12.05.2014 US 201461992109 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 15.04.2021

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%) **Grenzacherstrasse 124** 4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

GROGAN, JANE; JOHNSTON, ROBERT, J.; IRVING, BRYAN; HACKNEY, JASON; YU, XIN; EATON, DAN; **BOWLES, KRISTIN y COMPS-AGRAR, LAETITIA**

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de tratamiento del cáncer usando antagonistas de unión al eje de PD-1 e inhibidores de TIGIT

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

5

10

15

20

30

35

40

45

60

65

La provisión de dos señales distintas a los linfocitos T es un modelo ampliamente aceptado para la activación de los linfocitos T en reposo por parte de células presentadoras de antígenos (APC). Lafferty *et al.*, Aust. J. Exp. Biol. Med. ScL 53: 27-42 (1975). Este modelo proporciona además la discriminación entre propio y extraño y la tolerancia inmunológica. Bretscher *et al.*, Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins *et al.*, J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987). La señal primaria, o señal específica de antígeno, se transduce a través del receptor de linfocitos T (TCR) después del reconocimiento del péptido del xenoantígeno presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La segunda señal o señal coestimuladora se envía a los linfocitos T a través de moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígenos (APC), e induce a los linfocitos T a promover la expansión clonal, la secreción de citocinas y la función efectora. Lenschow *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996). En ausencia de coestimulación, los linfocitos T se pueden volver insensibles a la estimulación antigénica, lo que da como resultado una respuesta tolerogénica a antígenos exógenos o endógenos.

En el modelo de dos señales, los linfocitos T reciben tanto señales coestimuladoras positivas como señales coinhibidoras negativas. La regulación de dichas señales positivas y negativas es fundamental para maximizar las respuestas inmunitarias protectoras del huésped, mientras se mantiene la tolerancia inmunológica y se previene la autoinmunidad. Las señales negativas parecen necesarias para la inducción de la tolerancia de los linfocitos T, mientras que las señales positivas promueven la activación de los linfocitos T.

Se proporcionan tanto señales coestimuladoras como coinhibidoras a los linfocitos T expuestos a antígenos, y la interacción entre las señales coestimuladoras y coinhibidoras es esencial para controlar la magnitud de una respuesta inmunitaria. Además, las señales proporcionadas a los linfocitos T cambian a medida que una infección o provocación inmunológica se elimina, empeora o persiste, y estos cambios afectan poderosamente a los linfocitos T que responden y reconforman la respuesta inmunitaria.

El mecanismo de coestimulación es de interés terapéutico porque la manipulación de las señales coestimuladoras ha demostrado proporcionar un medio para potenciar o finalizar la respuesta inmunitaria basada en células. Recientemente se ha descubierto que la disfunción de los linfocitos T o anergia se produce simultáneamente con una expresión inducida y mantenida del receptor inhibidor, el polipéptido de muerte programada 1 (PD-1). Como resultado, las dianas terapéuticas de PD-1 y otras moléculas que envían señales a través de interacciones con PD-1, tales como el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y el ligando de muerte programada 2 (PD-L2), son un área de gran interés.

El PD-L1 está sobreexpresado en muchos tipos de cáncer y a menudo se asocia con un mal pronóstico (Okazaki T *et al.*, Intern. Immun. 2007 19(7):813) (Thompson RH *et al.*, Cancer Res 2006, 66(7):3381). De forma interesante, la mayoría de los linfocitos T infiltrantes de tumor expresan predominantemente PD-1, en contraste con los linfocitos T en tejidos normales y los linfocitos T de sangre periférica, lo que indica que la regulación por incremento de PD-1 en linfocitos T reactivos al tumor puede contribuir a respuestas inmunitarias antitumorales deficientes (Blood 2009 114(8): 1537). Esto se puede deber a la explotación de la señalización de PD-L1 mediada por células tumorales que expresan PD-L1 que interactúan con los linfocitos T que expresan PD-1 para dar como resultado la atenuación de la activación de los linfocitos T y la evasión de la vigilancia inmunológica (Sharpe *et al.*, Nat Rev 2002) (Keir ME *et al.*, 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677). Por lo tanto, la inhibición de la interacción PD-L1/PD-1 puede potenciar la destrucción de tumores mediada por linfocitos T CD8⁺.

La inhibición de la señalización del eje de PD-1 a través de sus ligandos directos (por ejemplo, PD-L1, PD-L2) se ha propuesto como un medio para potenciar la inmunidad de los linfocitos T para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, la inmunidad tumoral). Además, se han observado potenciaciones similares en la inmunidad de los linfocitos T al inhibir la unión de PD-L1 al ligando B7-1. Además, la combinación de la inhibición de la señalización de PD-1 con otras vías de señalización que están desreguladas en las células tumorales puede potenciar aún más la eficacia del tratamiento. Inozume et al., Journal of Investigative Dermatology 2013, 133, Supl. 1, página S3, divulga que el cobloqueo de las vías de señalización tanto de CD155/TIGIT como de PD-1/PD-L1 tuvo un efecto aditivo en la inducción de una fuerte respuesta inmunitaria anti-melanoma in vitro. Sigue existiendo la necesidad de un tratamiento óptimo para tratar, estabilizar, prevenir y/o retrasar el desarrollo de diversos cánceres.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un tratamiento combinado que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.

En el presente documento se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un

anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.

En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para reducir o inhibir la recidiva o la progresión del cáncer en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.

5

15

20

25

30

35

40

60

65

- En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.
 - En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.
 - En algunos modos de realización, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunos modos de realización, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por una reactividad disminuida a la estimulación antigénica. En algunos modos de realización, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por la anergia de los linfocitos T o la disminución de la capacidad de secretar citocinas, de proliferar o de ejecutar actividad citolítica. En algunos modos de realización, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por un agotamiento de los linfocitos T. En algunos modos de realización, los linfocitos T son linfocitos T CD4+ y CD8+. En algunos modos de realización, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.
 - En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo mediante la administración al individuo de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.
 - En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en.
- En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para reducir o inhibir la recidiva o la progresión del cáncer en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.
- En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.
- En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprenden administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.
 - En algunos modos de realización, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunos modos de realización, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por una reactividad disminuida a la estimulación antigénica. En algunos modos de realización, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por la anergia de los linfocitos T o la disminución de la capacidad de secretar citocinas, de proliferar o de ejecutar actividad citolítica. En algunos modos de realización, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por un agotamiento de los linfocitos T. En algunos modos de realización, los linfocitos T son linfocitos

T CD4+ y CD8+. En algunos modos de realización, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

- En el presente documento también se proporciona un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para su uso en procedimientos para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo mediante la administración al individuo de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo.
- La presente divulgación también describe un tratamiento combinado que comprende un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales.

5

30

35

40

- En el presente documento se divulgan procedimientos para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo administrando al individuo una cantidad eficaz de un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales.
- En algunos aspectos, el uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo que consiste en PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA y VISTA. En algunos modos de realización, el uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo de PD-1, CTLA-4, LAG3 y TIM3.
- La divulgación también describe un tratamiento combinado que comprende un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales.
 - En el presente documento se divulgan procedimientos para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo administrando al individuo una cantidad eficaz de un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales.
 - En algunos aspectos, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo que consiste en CD226, OX-40, CD28, CD27, CD137, HVEM y GITR. En algunos aspectos, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo de CD226, OX-40, CD27, CD137, HVEM y GITR. En algunos aspectos, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo que consiste en OX-40 y CD27.
 - En algunos aspectos, cualquiera de los procedimientos anteriores comprende además administrar al menos un agente quimioterápico.
- En algunos modos de realización, el individuo en cualquiera de los procedimientos anteriores tiene cáncer. En algunos modos de realización, el individuo en cualquiera de los procedimientos anteriores es un humano.
- En algunos aspectos, los linfocitos T CD4 y/o CD8 en el individuo tienen una actividad de sensibilización, activación, proliferación, liberación de citocinas y/o citolítica incrementada o potenciada con respecto a antes de la administración de la combinación.
- En algunos aspectos, el número de linfocitos T CD4 y/o CD8 es elevado con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunos modos de realización, el número de linfocitos T CD4 y/o CD8 activados es elevado con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunos aspectos, los linfocitos T CD4 y/o CD8 activados se caracterizan por ser linfocitos T CD4 y/o CD8 productores de γ-IFN+ y/o tener actividad citolítica potenciada con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunos aspectos, los linfocitos T CD4 y/o CD8 presentan una liberación incrementada de citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IFN-γ, TNF-α e interleucinas.
- 55 En algunos aspectos, el linfocito T CD4 y/o CD8 es un linfocito T de memoria efector. En algunos aspectos, el linfocito T de memoria efector CD4 y/o CD8 se caracteriza por ser linfocitos T CD4 y/o CD8 productores de γ-IFN⁺ y/o tener actividad citolítica potenciada. En algunos aspectos, el linfocito T de memoria efector CD4 y/o CD8 se caracteriza por tener expresión de CD44^{alta} y expresión de CD62L^{baja}.
- 60 En algunos aspectos, el cáncer en cualquiera de los procedimientos anteriores tiene niveles elevados de infiltración de linfocitos T.
- En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos una HVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO: 1), ASIRFT (SEQ ID NO: 2), QQGINNPLT (SEQ ID NO: 3), GFTFSSFTMH (SEQ ID NO: 4), FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO: 5) y RPLGHNTFDS (SEQ ID NO: 6) o

RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO: 7), GISNRFS (SEQ ID NO: 8), LQGTHQPPT (SEQ ID NO: 9), GYSFTGHLMN (SEQ ID NO: 10), LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 11) y GLRGFYAMDY (SEQ ID NO: 12).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en

DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQS

15

30

40

45

PKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDG TKLEIKR (SEQ ID NO: 13) o

10 DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO: 14).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en

EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGI

VFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 15) o

EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGG

TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFYAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO: 16).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en

DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQS

25 PKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDG TKLEIKR (SEQ ID NO: 13) o

 ${\tt DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNR}$

FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO: 14) y la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en

EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGI

VFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 15) o

EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGG

35 TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFYAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO: 16).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo heteroconjugado y una inmunotoxina.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos una HVR que es al menos un 90 % idéntica a una HVR establecida en cualquiera de KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO: 1), ASIRFT (SEQ ID NO: 2), QQGINNPLT (SEQ ID NO: 3), GFTFSSFTMH (SEQ ID NO: 4), FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO: 5) y RPLGHNTFDS (SEQ ID NO: 6) o RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO: 7), GISNRFS (SEQ ID NO: 8), LQGTHQPPT (SEQ ID NO: 9), GYSFTGHLMN (SEQ ID NO: 10), LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:11) y GLRGFYAMDY (SEQ ID NO: 12).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento del mismo comprende la cadena ligera y/o la cadena pesada que comprende secuencias de aminoácidos al menos un 90 % idénticas a las secuencias de aminoácidos establecidas en

DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQS

PKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDG TKLEIKR (SEQ ID NO: 13) o

5 DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO: 14) o

EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGI

10

25

30

VFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 15) o

EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGG

TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFYAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO: 16), respectivamente.

En algunos aspectos, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1. En algunos aspectos, el antagonista de unión de PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a B7-1. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo.

En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en: YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI 4736.

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 17), la secuencia de HVR-H2 de AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18) y la secuencia de HVR-H3 de RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 19); y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 20), la secuencia de HVR-L2 de SASFLYS (SEQ ID NO: 21) y la secuencia de HVR-L3 de OOYLYHPAT (SEQ ID NO: 22).

En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG
STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG TLVTVSA (SEQ ID NO: 23) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de

35 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

En algunos modos de realización, el cáncer que se trata se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de páncreas, carcinoma gástrico, cáncer de vejiga, cáncer esofágico, mesotelioma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, sarcoma, cáncer de próstata, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, carcinoma tímico, leucemia, linfomas, mielomas, micosis fungoides, cáncer de células de Merkel y otras neoplasias hematológicas.

En algunos modos de realización, el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo se administra de forma continua. En algunos modos de realización, el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo se administra de forma intermitente. En algunos modos de realización, el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo se administra antes que el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o el fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos modos de realización, el un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo se administra simultáneamente con el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento del mismo se administra después del anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento del mismo se administra después del anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento del mismo.

En el presente documento también se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo.

En el presente documento también se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo, y un prospecto que comprende instrucciones para usar un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo.

En el presente documento también se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo.

10

15

40

45

50

55

60

65

En el presente documento también se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

En el presente documento también se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento del mismo, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

En el presente documento también se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o un fragmento de unión al antígeno del mismo y/o actividad y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

30 En el presente documento también se divulgan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo.

En el presente documento también se divulgan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo.

En el presente documento también se divulgan kits que comprenden un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente modula la expresión y/o actividad de CD226 en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo.

En el presente documento también se divulgan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

En el presente documento también se divulgan kits que comprenden un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

En el presente documento también se divulgan kits que comprenden un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento

para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, en el que el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo, en el que el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso para tratar o retrasar la progresión del cáncer en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

10

35

40

45

50

15 En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la recidiva o progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento 20 para reducir o inhibir la recidiva o progresión del cáncer en un individuo, en el que el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para reducir o inhibir la recidiva o progresión del cáncer en un individuo, en el que el anticuerpo 25 antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso para reducir o inhibir la recidiva o progresión del cáncer en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente 30 divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso para reducir o inhibir la recidiva o progresión del cáncer en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo, en el que el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo, en el que el un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión al antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una combinación que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo, en el que el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o el fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión al antígeno

del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de un cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo, en el que el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o el fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

10

15

20

25

30

35

40

45

65

En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por una disminución de la reactividad a la estimulación antigénica. En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por la anergia de los linfocitos T o la disminución de la capacidad de secretar citocinas, de proliferar o de ejecutar actividad citolítica. En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por un agotamiento de los linfocitos T. En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, los linfocitos T son linfocitos T CD4+ y CD8+. En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo, en el que el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo, en el que el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso para potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso para potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona una combinación que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o

fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

5

10

15

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer.

En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736. En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de HVR-H1 de GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 17), la secuencia de HVR-H2 de AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18) y la secuencia de HVR-H3 de RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 19); y una cadena ligera que comprende la secuencia de HVR-L1 de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 20), la secuencia de HVR-L2 de SASFLYS (SEQ ID NO: 21) y la secuencia de HVR-L3 de QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 22). En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de

30

35

45

50

55

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG TLVTVSA (SEQ ID NO: 23),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG TLVTVSSASTK (SEQ ID NO: 40) o

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 41) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de

40 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un agente

que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales en combinación con el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. En determinados aspectos que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, el uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo que consiste en PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4 v CD96. En determinados modos de realización que se pueden combinar con cualquiera de los modos de realización anteriores, el uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo que consiste en PD-1, CTLA-4, LAG3 y TIM3.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales, y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales en combinación con un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. En determinados aspectos que se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo que consiste en CD226, OX-40, CD28, CD27, CD137, HVEM, GITR, MICA, ICOS, NKG2D y 2B4. En determinados aspectos que se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo que consiste en CD226, OX-40, CD27, CD137, HVEM y GITR. En determinados aspectos que se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan del grupo que consiste en OX-40 y CD27.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

15

20

25

30

35

40

45

50

La **FIG. 1** muestra que TIGIT se expresa altamente en linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ agotados. La **FIG. 1A** representa linfocitos T CD8⁺ esplénicos de C57BL6/J enriquecidos por MACS que se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placas durante 24-48 horas *in vitro*. Histogramas de citometría de flujo representativos de la expresión de TIGIT (rojo) en relación con la tinción del isotipo (gris). También se muestra la cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P <0,001. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes; n = 3. En las **FIG. 1B-1C**, se infectó a ratones C57BL6/J con la cepa Armstrong de LCMV, y los esplenocitos se analizaron 7 días después de la infección. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes; n = 5. La **FIG. 1B** muestra el histograma de citometría de flujo representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ indiferenciados (CD44^{baja} CD62L^{alta}) y de memoria efectores (CD44^{alta} CD62L^{baja}). También se muestra la cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P <0,001. La **FIG. 1C** muestra el histograma de citometría de flujo representativo de la expresión de TIGIT por los linfocitos T CD8⁺ de memoria efectores PD-1^{alta} y PD-1^{baja}. También se muestra la cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P <0,001. La **FIG. 1D** muestra que los linfocitos T CD4⁺ de ratones C57BL6/J se disminuyeron brevemente y se infectó

a los ratones con la cepa Clon 13 de LCMV. Los esplenocitos se analizaron 42 días después de la infección. Histograma de citometría de flujo representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8⁺ indiferenciados (CD44^{blaja} CD62L^{alta}), de memoria centrales (CD44^{alta} CD62L^{alta}) y de memoria efectores (CD44^{alta} CD62L^{baja}). También se muestra la cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P <0,001. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes; n = 5. Las barras de error representan el error estándar de la media.

5

65

La **FIG. 2** muestra el diseño de ratones TIGIT^{loxP/loxP}. El exón 1 de TIGIT se flanqueó por sitios loxP usando técnicas estándar.

- La FIG. 3 muestra que los linfocitos T CD8+ y CD4+ deficientes en TIGIT responden normalmente a la infección vírica 10 aguda. Se infectó a las crías de una misma camada (WT) TIGITfl/fl CD4^{cre} (CKO) y TIGITfl/fl con la cepa Armstrong de LCMV. Los esplenocitos se analizaron 7 días después de la infección. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. La FIG. 3A muestra gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD8+, con los linfocitos activados (CD44alta) enmarcados. Cuantificación de linfocitos T CD8+ activados como un porcentaje del total de linfocitos T CD8⁺. La **FIG. 3B** muestra gráficos de FACS representativos seleccionados 15 para linfocitos T CD8⁺ después de la estimulación in vitro, con los linfocitos productores de IFNγ enmarcados. Cuantificación de células productoras de IFNy como un porcentaje del total de linfocitos T CD8+. La FIG. 3C muestra gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD4+, con los linfocitos activados (CD44alta) enmarcados. Cuantificación de linfocitos T CD4⁺ activados como un porcentaje del total de linfocitos T CD4⁺. La **FIG.** 20 3D muestra gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD4+ después de la estimulación in vitro, con los linfocitos productores de IFNy enmarcados. Cuantificación de células productoras de IFNy como un porcentaje del total de linfocitos T CD4⁺. Las barras de error representan el error estándar de la media.
- La FIG. 4 muestra que TIGIT y PD-1 regulan sinérgicamente la función efectora de los linfocitos T agotados in vivo. En las FIGS. 4A-4E, los linfocitos T CD4+ de ratones TIGIT^{fl/fl} CD4-cre- (WT) y TIGIT^{fl/fl} CD4-cre- (CKO) se 25 disminuyeron brevemente y se infectó a los ratones con la cepa Clon 13 de LCMV. La concentración vírica en esplenocitos e hígado se analizó 42 días después de la infección. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes, con n = 6-9 por grupo. La FIG. 4A representa gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD8+, con los linfocitos activados (CD44alta CD62Lbaja) enmarcados. Cuantificación de células activadas como un porcentaje del total de linfocitos T CD8⁺. La **FIG. 4B** representa gráficos de FACS representativos 30 seleccionados para linfocitos T CD8+ después de la estimulación in vitro, con los linfocitos IFNy+ enmarcados. Cuantificación de células productoras de IFNy como un porcentaje del total de linfocitos T CD8+. La FIG. 4C representa gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD4+, con los linfocitos activados (CD44alta CD62L^{baja}) enmarcados. Cuantificación de células activadas como un porcentaje del total de linfocitos T CD4+. La FIG. 4D representa gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD4+ después de la estimulación 35 in vitro, con los linfocitos IFNγ+ enmarcados. Cuantificación de células productoras de IFNγ como un porcentaje del total de linfocitos T CD4+. La FIG. 4E representa la cuantificación de la concentración de LCMV hepáticos. ***, P <0,0001. En las FIG. 4F-4H, los linfocitos T CD4+ de ratones C57BL6/J se disminuyeron brevemente y se infectó a los ratones con la cepa Clon 13 de LCMV. Se trató a los ratones con anticuerpos, anti-PD-L1, anti-TIGIT, anti-PD-40 L1 + anti-TIGIT o anticuerpos de control de isotipos emparejados comenzando 28 días después de la infección. La concentración vírica en esplenocitos e hígado se analizó 42 días después de la infección. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes; n = 10. La FIG. 4F representa gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD8+, con los linfocitos activados (CD44^{alta} CD62L^{baja}) enmarcados. Cuantificación de células activadas como un porcentaje del total de linfocitos T CD8+. ***, P <0,0001. La **FIG. 4G** representa gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD8+ activados después de la estimulación in vitro, con los 45 linfocitos IFNy⁺ enmarcados. Cuantificación de células productoras de IFNy como un porcentaje del total de linfocitos T CD8+ activados. *. P = 0,0352. **, P = 0,0047. La FIG. 4H representa la cuantificación de la concentración de LCMV hepáticos. *, P = 0,0106. **, P = 0,0047. Las barras de error representan el error estándar de la media.
- La FIG. 5 muestra que el cobloqueo de TIGIT/PD-L1 potencia la función efectora de linfocitos T CD4⁺ durante la infección vírica crónica. Los linfocitos T CD4⁺ de ratones C57BL6/J se disminuyeron y se infectó a los ratones con la cepa Clon 13 de LCMV. Se trató a los ratones con anticuerpos de control de isotipo, anti-PD-L1, anti-TIGIT o anti-PD-L1 + anti-TIGIT comenzando 28 días después de la infección. La concentración vírica en esplenocitos e hígado se analizó 42 días después de la infección. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes; n = 10. La
 FIG. 5A representa gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD4+, con los linfocitos activados (CD44^{alta} CD62L^{baja}) enmarcados. Cuantificación de linfocitos T CD4⁺ activados como un porcentaje del total de linfocitos T CD4⁺. La FIG. 5B representa gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD4⁺ después de la estimulación *in vitro*, con los linfocitos productores de IFNγ enmarcados. Cuantificación de células productoras de IFNγ como un porcentaje del total de linfocitos T CD4⁺. *, P = 0,019. Las barras de error representan el error estándar de la media.
 - La **FIG. 6** muestra que la expresión de TIGIT es elevada en el cáncer de mama humano y se correlaciona con la expresión de CD8 y correceptores inhibidores. Se analizaron los datos de micromatrices de expresión génica de cáncer de mama generados por la Cancer Gene Atlas Network. Los datos de expresión génica se normalizan y se expresan como proporciones relativas (log2). La **FIG. 6A** representa la expresión de TIGIT en muestras normales y de todo tipo de tumor de mama (izquierda) y en diferentes subtipos de tumor de mama (derecha). ****, P = 6 x 10-12.

Se muestran diagramas de cajas y bigotes. La **FIG. 6B** representa la correlación de la expresión de TIGIT y CD3 ϵ . R² = 0,61. La **FIG. 6C** representa la correlación de TIGIT y CD8 α (izquierda, R² = 0,80) o CD4 (derecha, R² = 0,42). La **FIG. 6D** representa la correlación de TIGIT y PD-1 (izquierda, R² = 0,87), LAG3 (centro, R² = 0,80) y CTLA4 (derecha, R² = 0,76).

5

10

15

20

25

La FIG. 7 muestra que TIGIT y PD-1 inhiben las respuestas de linfocitos T antitumorales. En las FIG. 7A-7B, a ratones BALB/C se les inocularon células de carcinoma colorrectal CT26. Los esplenocitos y los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se analizaron 14 días después de la inoculación, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 200 mm³. Los datos son representativos de un experimento; n = 6. La FIG. 7A representa el histograma de citometría de flujo representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8+ esplénicos e infiltrantes de tumor. También se muestra la cuantificación de MFI de TIGIT. **, P = 0,0023. La **FIG. 7B** representa el histograma de citometría de flujo representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD4⁺ esplénicos e infiltrantes de tumor. También se muestra la cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P = 0,0002. En las FIG. 7C-7E, a ratones BALB/C se les inocularon células de carcinoma colorrectal CT26. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 200 mm³, se trató a los ratones con anticuerpos de control de isotipo, anti-PD-L1, anti-TIGIT o anti-PD-L1 + anti-TIGIT durante tres semanas. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 10-20 (FIG. 7C-7D) o 7-10 (FIG. 7E). La FIG. 7C representa la mediana de los volúmenes tumorales de CT26 a lo largo del tiempo. La FIG. 7D representa la supervivencia de los ratones. La FIG. 7E muestra, aproximadamente 60 días después de la inoculación inicial, a ratones en remisión completa (RC) que habían recibido anticuerpos anti-TIGIT + anti-PD-L1, así como ratones BALB/c que no habían recibido tratamiento previo, a los que se les habían inoculado células CT26 en sus flancos torácicos izquierdos e inoculado células de carcinoma de mama EMT6 en sus cuerpos adiposos mamarios. Se muestran las medianas (izquierda) de los volúmenes tumorales y los volúmenes tumorales individuales (derecha) para CT26 (cuadrados) y EMT6 (triángulos) en tumores de ratones en RC (púrpura y verde) y ratones que no habían recibido tratamiento previo (negro y naranja). La FIG. 7F muestra ratones a los que se les inocularon tumores de CT26 y tratados como en la FIG. 7C. Los linfocitos T infiltrantes de tumor y residentes en ganglios linfáticos que drenan los tumores se analizaron mediante citometría de flujo. Gráficos de FACS representativos de TIL CD8+ después de la estimulación in vitro, con los linfocitos productores de IFNy enmarcados. Cuantificación de TIL CD8+ productores de IFNy como un porcentaje del total de TIL CD8⁺. ***, P = 0,0003. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. Las barras de error representan el error estándar de la media.

30

La **FIG. 8** muestra que la expresión de TIGIT por linfocitos infiltrantes de tumor de CT26 está correlacionada con la expresión de Tim-3. A ratones BALB/C se les inocularon células de carcinoma colorrectal CT26. Los esplenocitos y los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se analizaron aproximadamente 14 días después de la inoculación, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 200 mm³. Los datos son representativos de un experimento; n = 6. La **FIG. 8A** representa un histograma representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8+ esplénicos e infiltrantes de tumor. Cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P = 0,0026. La **FIG. 8B** representa un histograma representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD4+ esplénicos e infiltrantes de tumor. Cuantificación de MFI de TIGIT. ****, P <0,0001. Las barras de error representan el error estándar de la media.

35

40

45

La **FIG. 9** muestra que la expresión de TIGIT por linfocitos infiltrantes de tumor de MC38 está correlacionada con la expresión de PD-1 y Tim-3. A ratones C57BL6/J se les inocularon células de carcinoma colorrectal MC38. Los esplenocitos y los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se analizaron aproximadamente 14 días después de la inoculación, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 200 mm³. Los datos son representativos de un experimento; n = 5. La **FIG. 9A** representa un histograma representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8+ esplénicos e infiltrantes de tumor. Cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P <0,0001. La **FIG. 9B** representa un histograma representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD4+ esplénicos e infiltrantes de tumor. Cuantificación de MFI de TIGIT. *, P = 0,0136. ***, P = 0,0029. Las barras de error representan el error estándar de la media.

50

La **FIG. 10** muestra el crecimiento de un tumor de CT26 en ratones tratados con anticuerpos anti-PD-L1 y/o anti-TIGIT. A ratones BALB/c no sometidos a tratamiento previo se les inocularon células tumorales CT26 y se les trató con anticuerpos anti-PD-L1 y/o anti-TIGIT o de control de isotipos emparejados, como se describe en las FIG. 4D-4F. Se muestran los volúmenes tumorales a lo largo del tiempo para ratones individuales en cada grupo de tratamiento. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

55

60

65

La **FIG. 11** muestra el análisis por citometría de flujo de TIL CD4⁺ y linfocitos T de ganglios linfáticos que drenan los tumores. A ratones BALB/C se les inocularon células de carcinoma colorrectal CT26. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 200 mm³, se trató a los ratones con anticuerpos de control de isotipo, anti-PD-L1, anti-TIGIT o anti-PD-L1 + anti-TIGIT durante 7 días. Se recogieron tumores y ganglios linfáticos que drenan los tumores. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. Gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD8⁺ de ganglios linfáticos que drenan los tumores después de la estimulación *in vitro*, con los linfocitos productores de IFNγ enmarcados. Cuantificación de células IFNγ⁺ como un porcentaje del total de linfocitos T CD8⁺. ***, P <0,001. Cuantificación de linfocitos T CD8⁺ como un porcentaje del total de TIL. ***, P = 0,0065. Cuantificación de linfocitos T CD8⁺ activados (CD44^{alta} CD62L^{baja}) como un porcentaje del total de TIL CD8⁺. *, P = 0,012. Cuantificación de linfocitos T CD8⁺ como un porcentaje del total de linfocitos que drenan los tumores. Cuantificación de linfocitos T CD8⁺ activados como un porcentaje del total de linfocitos T CD8⁺ en el

ganglio linfático que drena el tumor. *, P <0,05. La **FIG. 11C** representa la cuantificación de linfocitos T CD4+ como un porcentaje del total de TIL. *, P = 0,016. La **FIG. 11D** representa la cuantificación de linfocitos T CD4+ activados como un porcentaje del total de TIL CD4+. La **FIG. 11E** representa la cuantificación de linfocitos T CD4+ como un porcentaje del total de células de ganglios linfáticos que drenan los tumores. La **FIG. 11F** representa la cuantificación de linfocitos T CD4+ activados como un porcentaje del total de linfocitos T CD4+ en el ganglio linfático que drena el tumor. La **FIG. 11A** representa la cuantificación de células IFNγ+ como un porcentaje de los TIL CD4+ después de la estimulación *in vitro*. La **FIG. 11B** representa la cuantificación de células IFNγ+ como un porcentaje de los linfocitos T CD4+ en el ganglio linfático que drena el tumor después de la estimulación *in vitro*. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La **FIG. 12** muestra otro análisis por citometría de flujo de TIL CD8⁺. A ratones BALB/C se les inocularon células de carcinoma colorrectal CT26 y se les trató con anticuerpos de control de isotipo, anti-PD-L1, anti-TIGIT o anti-PD-L1 + anti-TIGIT como se describe en la FIG. 4. Los tumores se recogieron después de 7 días de tratamiento y se analizaron por citometría de flujo. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. La **FIG. 12A** representa la cuantificación de células TNFα⁺ como un porcentaje del total de TIL CD8⁺. **, P <0,01. La **FIG. 12B** representa la cuantificación de TIL CD8⁺ como un porcentaje del total de TIL. **, P <0,01. La **FIG. 12C** representa la cuantificación de TIL CD8⁺ activados (CD44^{alta} CD62L^{baja}) como un porcentaje del total de TIL CD8⁺. *, P <0,05. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La **FIG. 13** muestra el análisis por citometría de flujo de linfocitos T CD8⁺ residentes en los ganglios linfáticos que drenan los tumores. A ratones BALB/C se les inocularon células de carcinoma colorrectal CT26 y se les trató con anticuerpos de control de isotipo, anti-PD-L1, anti-TIGIT o anti-PD-L1 + anti-TIGIT como se describe en la FIG. 4. Los ganglios linfáticos que drenan los tumores se recogieron después de 7 días de tratamiento y se analizaron por citometría de flujo. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. La **FIG. 13A** representa gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD8⁺ residentes en los ganglios linfáticos que drenan los tumores después de la estimulación *in vitro*, con los linfocitos productores de IFNγ enmarcados. Cuantificación de células IFNγ⁺ como un porcentaje del total de linfocitos T CD8⁺. ****, P <0,001. La **FIG. 13B** representa la cuantificación de linfocitos T CD8⁺ como un porcentaje del total de células en el ganglio linfático que drena el tumor. La **FIG. 13C** representa la cuantificación de linfocitos T CD8⁺ activados (CD44ªlta CD62L^{baja}) como un porcentaje del total de linfocitos T CD8⁺. *, P <0,05. Las barras de error representan el error estándar de la media. La **FIG. 13D** representa la cuantificación de los linfocitos productores de TNFα como un porcentaje del total de linfocitos T CD8⁺ en los ganglios linfáticos que drenan los tumores.

La **FIG. 14** muestra la coexpresión de CD226 y TIGIT por linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor. A ratones C57BF6/J se les inocularon células de carcinoma colorrectal MC38. Los esplenocitos y los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se analizaron aproximadamente 14 días después de la inoculación, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 200 mm³. Histograma representativo de la expresión de CD226 por linfocitos B esplénicos (gris), linfocitos T CD8⁺ esplénicos (azul) y linfocitos T CD8⁺ TIGIT⁺ infiltrantes de tumor (rojo). Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5.

La **FIG. 15** muestra el coinmunoprecipitado (co-IP) de CD226 y TIGIT en células transfectadas. Se cotransfectaron células COS-7 con plásmidos de expresión que contenían el ADNc para proteínas marcadas TIGIT-HA (5 ng) o CD226-Flag (10 ng), o un plásmido de control (pRK). Después de la transfección, las células se lavaron y centrifugaron y los sedimentos celulares se lisaron. El sobrenadante resultante se eliminó previamente y se centrifugó y, a continuación, se dividió por igual en dos tubos y se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-HA o un anticuerpo anti-Flag usando procedimientos estándar. Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a SDS-PAGE y se inmunoelectrotransfirieron. Las inmunoelectrotransferencias se exploraron con anticuerpos anti-Flag-HRP o anti-HA-HRP.

La **FIG. 16** muestra que TIGIT y CD226 interactúan en linfocitos T CD8⁺ primarios. Linfocitos T CD8⁺ esplénicos enriquecidos por MACS de ratones C57BL6/J se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa e IL-2 recombinante durante 48 horas y se lisaron. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-TIGIT y se exploraron con anticuerpos anti-CD226. Carriles: escala de pesos moleculares (1), entrada (2), flujo de coinmunoprecipitación (3) y coinmunoprecipitado. La flecha indica el peso molecular esperado de CD226.

La FIG. 17 muestra la detección de la interacción TIGIT/CD226 por TR-FRET. La FIG. 17A representa la disociación de los homodímeros Flag-ST-CD226 por HA-TIGIT. Proporción de FRET entre Flag-ST-CD226 medida en células COS-7 que expresan una cantidad constante de Flag-ST-CD226 y concentraciones crecientes de HA-TIGIT. La FIG. 17B representa la proporción de FRET entre Flag-ST-CD226 registrada después de una incubación de 15 minutos de PBS (barra blanca) o anticuerpo anti-TIGIT (barra negra). La FIG. 17C representa la asociación de Flag-ST-CD226 con HA-TIGIT. Intensidad de FRET entre Flag-ST-CD226 y HA-TIGIT sobre la expresión de Flag-ST-CD226 medida por un ELISA de anticuerpos anti-Flag en el mismo lote de células COS-7 transfectadas. La FIG. 17D representa la variación de FRET entre Flag-ST-CD226 y HA-TIGIT después de una incubación de 15 minutos de PBS (barra blanca) o anticuerpo anti-TIGIT (barra negra). Los datos en A y C son representativos de 4 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Los datos en B y D son representativos de 2 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

La **FIG. 18** muestra la expresión en superficie celular de Flag-ST-CD226 y HA-TIGIT. ELISA de anticuerpos anti-Flag y anti-HA en células COS-7 intactas que expresan las construcciones marcadas indicadas. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

La **FIG. 19** muestra que el bloqueo de CD226 revierte la respuesta antivírica potenciada de linfocitos T inducida por el cobloqueo de TIGIT/PD-L1. En las **FIG. 19A-19D**, los linfocitos T CD4⁺ de ratones C57BF6/J se disminuyeron brevemente y se infectó a los ratones con la cepa Clon 13 de LCMV. Se trató a los ratones con anticuerpos anti-CD226, anti-PD-L1 + anti-TIGIT, anti-PD-L1 + anti-TIGIT + anti-CD226 o anticuerpos de control de isotipos emparejados comenzando 28 días después de la infección. La concentración vírica en esplenocitos e hígado se analizó 42 días después de la infección. La **FIG. 19A** representa la cuantificación de linfocitos T CD8⁺ como un porcentaje de los esplenocitos. La **FIG. 19B** representa la cuantificación de linfocitos T CD8⁺ activados como un porcentaje del total de linfocitos T CD8⁺. ****, P <0,001. La **FIG. 19C** representa la cuantificación de los linfocitos productores de IFNy como un porcentaje de los linfocitos T CD8⁺ activados. ****, P <0,001. La **FIG. 19D** representa la cuantificación de la concentración de LCMV hepáticos. ****, P <0,001. Las barras de error representan el error estándar de la media.

10

15

20

25

30

35

50

55

60

65

La FIG. 20 muestra que la expresión de TIGIT es elevada en cáncer humano y está fuertemente correlacionada con CD8 y PD-1. Los análisis de expresión génica de cánceres humanos se realizaron como se describe en el ejemplo 11. Los gráficos de dispersión muestran datos de recuento por gen, normalizados por tamaño de genoteca. Los gráficos de cajas y bigotes muestran la proporción de expresión con varianza estabilizada de TIGIT y CD3e. La FIG. 20A representa la correlación de la expresión de ARN de TIGIT y CD3e en LUSC (gris) y pulmón normal (negro), ρ = 0,86. También se muestra la cuantificación de las proporciones de expresión TIGIT/CD3e. Incremento de la proporción de LUSC = 372 %. ***, P = 1,46 x 10⁻⁴⁶. La **FIG. 20B** representa la correlación de la expresión de ARN de TIGIT y CD3e en COAD (gris) y colon normal (negro), ρ = 0,83. También se muestra la cuantificación de las proporciones de expresión TIGIT/CD3e. Incremento de la proporción de COAD = 116 %. ***, P = 3,66 x 10-6. La FIG. 20C representa la correlación de la expresión de ARN de TIGIT y CD3e en UCEC (gris) y endometrio uterino normal (negro). ρ = 0,87. También se muestra la cuantificación de las proporciones de expresión TIGIT/CD3e. Incremento de la proporción de UCEC = 419 %. ***, P = 7,41 x 10⁻⁵. La **FIG. 20D** representa la correlación de la expresión de ARN de TIGIT y CD3e en BRCA (gris) y mama normal (negro). ρ = 0,82. También se muestra la cuantificación de las proporciones de expresión TIGIT/CD3e. Incremento de la proporción de BRCA = 313 %. ***, P = 4,6 x 10⁻⁴⁴. La **FIG.** 20E representa la correlación de la expresión de ARN de TIGIT y CD3e en el carcinoma renal de células claras (gris) y riñón normal (negro). ρ = 0,94. También se muestra la cuantificación de las proporciones de expresión TIGIT/CD3e. La FIG. 20F representa la correlación de TIGIT y CD8A (izquierda) o TIGIT y CD4 (derecha) en el carcinoma de células escamosas de pulmón (gris) y pulmón normal (negro). p = 0,77 y 0,48, respectivamente. La FIG. 20G representa la correlación de TIGIT y PD-1 (Pdcd1) en el carcinoma de células escamosas de pulmón (gris) y pulmón normal (negro). ρ = 0.82. La **FIG. 20H** representa la correlación de TIGIT y CD226 en el carcinoma de células escamosas de pulmón (rojo) y pulmón normal (negro). $\rho = 0.64$.

La **FIG. 21** muestra el análisis de la expresión génica asociada a linfocitos T en carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC). La expresión génica en muestras de LUSC y tejido normal se analizó como se describe en el ejemplo 11 y se generó un mapa de calor de los genes mejor correlacionados con la firma genética en muestras de LUSC. Los genes y las muestras se agruparon usando agrupamiento jerárquico usando la unión de Ward en la matriz de distancia euclidiana para los datos de expresión centrados y escalados.

La FIG. 22 muestra que linfocitos infiltrantes de tumor humanos y murinos expresan TIGIT y PD-1 de forma coordinada. Las FIG. 22A-22C muestran el análisis de linfocitos de un tumor de NSCLC humano recientemente resecado, sangre periférica emparejada con el tumor y sangre periférica de donante normal. Los datos son representativos de dos tumores analizados independientemente. La FIG. 22A representa gráficos de FACS representativos de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8+ periféricos e infiltrantes de tumor, con los linfocitos TIGIT+ enmarcados. La FIG. 22B representa gráficos de FACS representativos de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD4⁺ periféricos e infiltrantes de tumor, con los linfocitos TIGIT+ enmarcados. La FIG. 22C representa el histograma de citometría de flujo representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8+ (izquierda) y CD4+ (derecha) infiltrantes de NSCLC PD-1ªlta (rojo) y PD-1^{baja} (azul). En las **FIG. 22D-22G**, a ratones BALB/C se les inocularon células de carcinoma colorrectal CT26 singénicas. Los esplenocitos y los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se analizaron 14 días después de la inoculación, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 200 mm3. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5-6. La FIG. 22D representa un gráfico de FACS representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor, con los linfocitos TIGIT+ enmarcados. La FIG. 22E representa un gráfico de FACS representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD4⁺ infiltrantes de tumor, con los linfocitos TIGIT⁺ enmarcados. Cuantificación de la frecuencia de linfocitos T TIGIT⁺ como un porcentaje de todos los linfocitos T. *, P = 0,0134. ***, P <0,0001. La FIG. 22F representa el histograma de citometría de flujo representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor PD-1alta y PD-1^{baja} y por linfocitos T CD8⁺ esplénicos. También se muestra la cuantificación de MFI de TIGIT. **, P = 0,0023. La FIG. 22G representa el histograma de citometría de flujo representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD4⁺infiltrantes de tumor PD-1^{alta} y PD-1^{baja} y por linfocitos T CD4⁺ esplénicos. También se muestra la cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P = 0,0002. Las barras de error representan el error estándar de la media.

- La **FIG. 23** muestra la caracterización de la expresión de TIGIT por linfocitos T humanos infiltrantes de tumor. Las **FIG. 23A-23B** representan gráficos de FACS que muestran la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumor de NSCLC (**FIG. 23A**) y por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ de PBMC de donantes emparejados (**FIG. 23B**), con los linfocitos TIGIT⁺ enmarcados. Las **FIG. 23C-23D** representan gráficos de FACS que muestran la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumor CRC (**FIG. 23C**) y por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ de PBMC de donantes emparejados (**FIG. 23D**), con los linfocitos TIGIT⁺ enmarcados.
- La **FIG. 24** muestra que la interacción TIGIT:CD226 no está impulsada por PVR. Se detectaron interacciones TIGIT:CD226 y TIGIT Q56R:CD226 por TR-FRET y la proporción de FRET entre Flag-ST-CD226 y HA-TIGIT o HA-TIGIT Q56R muestra que TIGIT WT y Q56R se unen a CD226 con la misma eficacia. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

5

- La **FIG. 25** muestra la eficacia del cobloqueo con anticuerpos anti-TIGIT/PD-L1 en ratones portadores de tumores de MC38. En las **FIG.25A-25C**, se generaron ratones portadores de tumores de MC38 como se muestra anteriormente y se les trató con anticuerpos de bloqueo contra PD-L1 (rojo), TIGIT (azul), TIGIT y PD-L1 (púrpura) o anticuerpos de control de isotipos emparejados (negro) durante tres semanas. N = 10 (control, anticuerpo anti-PD-L1 solo, anticuerpo anti-TIGIT solo) o 20 (anticuerpo anti-TIGIT + anticuerpo anti-PD-L1). La **FIG. 25A** representa la mediana de los volúmenes tumorales de MC38 (izquierda) y los volúmenes tumorales de MC38 individuales (derecha) a lo largo del tiempo. La **FIG. 25B** representa los volúmenes tumorales de MC38 después de 14 días de tratamiento con anticuerpos.

 ****, P = 0,0005. ***, P = 0,0093. *, P = 0,0433. La **FIG. 25C** representa la supervivencia de los ratones a lo largo del tiempo. Las barras de error representan el error estándar de la media.
- La FIG. 26 muestra la caracterización adicional de la expresión de TIGIT por linfocitos T murinos infiltrantes de tumor. 25 La FIG. 26A representa que linfocitos T CD8+ esplénicos de C57BL6/J se enriquecieron por MACS y se cultivaron con anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28 recubiertos en placas. Histogramas representativos de tinción de TIGIT (rojo) y control de isotipos emparejados (gris sólido) a lo largo del tiempo. Cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P <0,001. Las células estimuladas expresaron induciblemente PD-1 y expresaron constitutivamente CD226 (datos no mostrados). Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. En las FIG. 26B-26E, a ratones 30 C57BL6/J silvestres se les inocularon por vía subcutánea células de carcinoma colorrectal MC38 singénicas. Los tumores se dejaron crecer sin intervención hasta alcanzaron un tamaño de 150-200 mm3. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. La FIG. 26B representa un gráfico de FACS representativo de linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor, con los linfocitos TIGIT+ enmarcados. Cuantificación de la frecuencia de linfocitos TIGIT+ como un porcentaje de todos los linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor o esplénicos. ***, P <0,0001. La FIG. 26C representa un gráfico de FACS representativo de linfocitos T CD4+ infiltrantes de tumor, 35 con los linfocitos TIGIT⁺ enmarcados. Cuantificación de la frecuencia de linfocitos TIGIT⁺ como un porcentaje de todos los linfocitos T CD4⁺ infiltrantes de tumor o esplénicos. ***, P <0,0001. La **FIG. 26D** representa un histograma representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8 ⁺ infiltrantes de tumor PD-1^{alta} y PD-1^{baja} (rojo y azul, respectivamente) y por linfocitos T CD8+ esplénicos (gris). Cuantificación de MFI de TIGIT. ***, P <0,0001. La **FIG.** 40 26E representa un histograma representativo de la expresión de TIGIT por linfocitos T CD4+ infiltrantes de tumor PD-1alta y PD-1baja y por linfocitos T CD4+ esplénicos. Cuantificación de MFI de TIGIT. *, P = 0,0136. **, P = 0,0029. Las barras de error representan el error estándar de la media.
- La **FIG. 27** muestra que los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumor mantienen un alto nivel de expresión de CD226. A ratones BALB/c silvestres se les inocularon células tumorales CT26 como se describe en el presente documento. Después de dejar crecer los tumores hasta un tamaño de aproximadamente 150-200 mm³, se analizaron los tumores y los bazos mediante citometría de flujo. La **FIG. 27A** representa la cuantificación de linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y células distintas de linfocitos T CD226⁺, como un porcentaje de todos los linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y células distintas de linfocitos T, respectivamente. La **FIG. 27B** representa histogramas representativos de la expresión de CD226 en tumor y bazo. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. Las barras de error representan el error estándar de la media.
- La FIG. 28 muestra que la supresión de TIGIT de las respuestas de linfocitos T CD8+ depende de CD226. A ratones BALB/C se les inocularon por vía subcutánea células de carcinoma colorrectal CT26 en sus flancos torácicos 55 derechos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 200 mm3, se trató a los ratones con anticuerpos de control de isotipo (negro), anti-CD226 (naranja), anti-PD-L1 (rojo), anti-TIGIT + anti-PD-L1 (púrpura) o anti-TIGIT + anti-PD-L1 + anti-CD226 (verde) durante tres semanas. Los datos son representativos de un experimento; n = 10 (A-B) o 5 (C-F). La FIG. 28A representa la mediana de los volúmenes tumorales de CT26 (izquierda) y los volúmenes tumorales de MC38 individuales (derecha) a lo largo del tiempo. La FIG. 28B representa la supervivencia de los ratones a lo largo del tiempo. En las FIG. 28C-28F, después de 7 días de tratamiento, los 60 linfocitos infiltrantes de tumor y los linfocitos residentes en ganglios linfáticos que drenan los tumores se evaluaron mediante citometría de flujo. La FIG. 28C representa la cuantificación de TIL CD8+ productores de IFNγ como un porcentaje del total de TIL CD8+ después de la estimulación in vitro. **, P <0,01. La **FIG. 28D** representa la cuantificación de células productoras de IFNy como un porcentaje del total de linfocitos T CD8+ después de la estimulación in vitro. *, P <0,05. La FIG. 28E representa la cuantificación de TIL CD8+ como un porcentaje del total de 65 TIL. **, P <0,01. La FIG. 28F representa la cuantificación de linfocitos T CD8+ como un porcentaje de todos los linfocitos

residentes en ganglios linfáticos que drenan los tumores. Las barras de error representan el error estándar de la media.

5

10

15

20

25

30

35

40

60

La FIG. 29 muestra que TIGIT perjudica la función de CD226 al alterar directamente la homodimerización de CD226. La FIG. 29A representa que los linfocitos T CD8+ se enriquecieron por MACS a partir de las crías de una misma camada (WT) TIGIT^{fl/fl} CD4^{cre} (CKO) y TIGIT^{fl/fl} CD4^{wt} y se estimularon en presencia de anticuerpos anti-CD226 o de control de isotipos emparejados como se indica. La captación de 3H-timidina se muestra como una proporción de las células cultivadas con anticuerpos anti-CD3 + PVR-Fc con respecto a las células cultivadas solo con anticuerpos anti-CD3. **, P = 0,0061. ***, P < 0,0001. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. La FIG. 29B representa que los linfocitos T CD8+ de ratones C57BL6/J silvestres se enriquecieron por MACS y se estimularon en presencia de anticuerpos anti-TIGIT, anti-CD226 y/o de control de isotipos emparejados como se indica. La captación de 3H-timidina se muestra como una proporción de las células cultivadas con anticuerpos anti-CD3 + PVR-Fc con respecto a las células cultivadas solo con anticuerpos anti-CD3. ***, P <0,001 en pruebas de la t para datos emparejados. La FIG. 29C representa que los linfocitos T CD8+ humanos primarios se enriquecieron por MACS a partir de sangre y se estimularon con niveles subóptimos de anticuerpos anti-CD3 unidos a placa en presencia o ausencia de PVR-Fc recombinante humano. Se añadieron anticuerpos anti-TIGIT o anticuerpos de control de isotipos emparejados como se indica. Cuantificación de la captación de 3H-timidina. **, P = 0,0071 y 0,0014, respectivamente. La FIG. 29D representa que células CHO se transfectaron de forma transitoria con concentraciones crecientes de FLAG-ST-CD226 aceptador y donante, como se indica. Cuantificación de la intensidad de FRET en relación con la emisión del donante. Los datos son representativos de tres experimentos independientes; n = 3. En las FIG. 29E-29F, células CHO se transfectaron de forma transitoria con FLAG-ST-CD226 y con concentraciones crecientes de HA-TIGIT, como se indica. Los datos son representativos de dos o más experimentos independientes; n = 4. Los datos están normalizados a la señal máxima. La **FIG. 29E** representa la cuantificación de la proporción de FRET CD226:CD226 (proporción de FRET 1). La FIG. 29F representa la cuantificación de la proporción de FRET TIGIT:CD226 (proporción de FRET 2). La FIG. 29G representa inmunotransferencias de anticuerpos anti-FLAG (izquierda) y anti-HA (derecha) realizadas en inmunoprecipitados anti-FLAG o anti-HA preparados a partir de células COS-7 transfectadas con un vector pRK vacío o con una combinación de Flag-CD226 y HA-TIGIT. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. La FIG. 29H representa la cuantificación de la proporción de FRET TIGIT:CD226 después de la incubación con PBS (blanco) o anticuerpos anti-TIGIT (rojo). ***, P <0,001. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes; n = 3. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La **FIG. 30** muestra linfocitos T humanos primarios que se enriquecieron por MACS a partir de sangre y se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Las células TIGIT⁺ y TIGIT⁻ se clasificaron, dejaron reposar, reestimularon y marcaron para FRET con los anticuerpos indicados. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. ***, P <0,001. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La **FIG. 31** muestra que el cobloqueo de TIGIT y PD-1 no restablece la función efectora de los linfocitos T CD4⁺ agotados durante una infección vírica crónica. La **FIG. 31A** representa la cuantificación de linfocitos T CD8⁺ como un porcentaje de todos los esplenocitos. La **FIG. 31B** representa la cuantificación de células Pentámero GP33⁺ como un porcentaje de todos los linfocitos T CD8⁺ esplénicos. **, P = 0,0040. La **FIG. 31C** representa gráficos de FACS representativos seleccionados para linfocitos T CD8⁺ Pentámero gp33⁺ después de la estimulación *in vitro*, con los linfocitos IFNγ⁺ enmarcados. Cuantificación de células productoras de IFNγ como un porcentaje del total de linfocitos T CD8⁺ Pentámero gp33⁺. *, P = 0,0319. **, P = 0,0030. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La **FIG. 32** muestra que la eficacia del cobloqueo de TIGIT/PD-L1 depende de los linfocitos T CD8⁺. En las **FIG. 32A-32B**, a ratones BALB/c silvestres se les inocularon tumores de CT26 como se describe en la FIG. 7. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 100-150 mm³, los linfocitos T CD8⁺ de los ratones se disminuyeron temporalmente y se trató a los ratones con anticuerpos anti-TIGIT + anti-PD-L1. Los datos son representativos de un experimento; n = 10/grupo. La **FIG. 32 A** representa la mediana de los volúmenes tumorales de CT26 (izquierda) y los volúmenes tumorales de MC38 individuales (derecha) a lo largo del tiempo. La **FIG. 32B** representa la cuantificación de los volúmenes tumorales de CT26 17 días después del inicio del tratamiento. ****, P = 0,0004. En la **FIG. 32C**, a ratones BALB/c silvestres se les inocularon tumores de CT26 y se les trató con anti-TIGIT + anti-PD-L1 y posteriormente se reexpusieron a tumores de CT26 con disminución temporal de los linfocitos T CD8⁺ en el momento de la reexposición. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. La **FIG. 32C** representa la mediana de los volúmenes tumorales de CT26 (izquierda) y los volúmenes tumorales de CT26 individuales (derecha) a lo largo del tiempo. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La **FIG. 33** muestra que la expresión de PVR en células tumorales es prescindible para la eficacia del cobloqueo de TIGIT/PD-L1. A ratones BALB/c silvestres se les inocularon tumores con PVR silvestre o suprimido (PVR.KO) como se describe. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 150-200 mm³, se trató a los ratones con anticuerpos anti-TIGIT + anti-PD-L1 o de control de isotipos emparejados. Los datos son representativos de un experimento; n = 10/grupo. La **FIG. 33** representa la mediana de los volúmenes tumorales de CT26 (izquierda) y los volúmenes tumorales de CT26 individuales (derecha) a lo largo del tiempo.

La **FIG. 34** muestra la eficacia del cobloqueo con anticuerpos anti-TIGIT/PD-L1 en ratones portadores de tumores de EMT6. Se generaron ratones portadores de tumores de EMT6 como se muestra anteriormente y se les trató con

anticuerpos de bloqueo contra PD-L1 (rojo), TIGIT (azul), TIGIT y PD-L1 (púrpura) o anticuerpos de control de isotipos emparejados (negro) durante tres semanas. N = 10 (control, anticuerpo anti-PD-L1 solo, anticuerpo anti-TIGIT solo) o 20 (anticuerpo anti-TIGIT + anticuerpo anti-PD-L1). La **FIG. 34** representa la mediana de los volúmenes tumorales de EMT6 (izquierda) y los volúmenes tumorales de CT26 individuales (derecha) a lo largo del tiempo.

5

10

15

- La **FIG. 35** muestra que TIGIT regula la función efectora de linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor. A ratones BALB/C se les inocularon subcutáneamente células de carcinoma colorrectal CT26 en sus flancos torácicos derechos y se les trató con anticuerpos anti-PD-L1, anti-TIGIT o anti-PD-L1 + anti-TIGIT, como se describe en la FIG. 7. Los linfocitos T residentes en los ganglios linfáticos que drenan los tumores (GLd) y los linfocitos T infiltrantes de tumor se analizaron mediante citometría de flujo 7 días después del inicio del tratamiento. Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. La **FIG. 35A** representa la cuantificación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ residentes en GLd de producción dual de IFNy/TNFα como porcentajes del total de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ residentes en GLd, respectivamente. También se muestra la producción dual de citocinas por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumor de producción dual de IFNy/TNFα como porcentajes del total de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumor, respectivamente. También se muestra la producción dual de citocinas por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumor, respectivamente. También se muestra la producción dual de citocinas por linfocitos T no estimulados. ***, P <0,0001. Las barras de error representan el error estándar de la media.
- La **FIG. 36** muestra el análisis de linfocitos de tumores de NSCLC humanos resecados, sangre periférica de tumores emparejados y sangre periférica de donante normal. Los datos son datos agrupados de tres conjuntos de muestras adquiridos independientemente. La **FIG. 36A** representa la cuantificación de células TIGIT⁺ como un porcentaje de todos los linfocitos T CD8⁺. *, P <0,05. La **FIG. 36B** representa la cuantificación de células TIGIT⁺ como un porcentaje de todos los linfocitos T CD4⁺.
- La **FIG. 37** muestra la caracterización de la expresión de TIGIT en tumores humanos. La **FIG. 37A** representa histogramas de citometría de flujo representativos de la expresión de TIGIT por linfocitos residentes en tumores de NSCLC (rojo, CD45⁺ FSC^{baja}), células mieloides (azul, CD45⁺ FSC^{alta}) y células no hematopoyéticas (verde, CD45⁻) en relación con la tinción de isotipos emparejados por subconjunto (gris). La **FIG. 37B** representa la estrategia de selección para linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumor de NSCLC PD-1^{alta} y PD-1^{baja}.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Técnicas generales

- 35 Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento en general se comprenden bien y se emplean comúnmente por los expertos en la técnica usando una metodología convencional, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3.ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, 40 Inc.): PCR2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y 45 C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds.,
- 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989);
 Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers,

55 II. Definiciones

60

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

El término "antagonistas de unión a PD-1" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-L1, PD-L2. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a

sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD 1 con PD-L1 y/o PD-L2. En un modo de realización, un antagonista de unión a PD-1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224, descrito en el presente documento.

10

15

20

25

30

35

40

El término "antagonistas de unión a PD-L1" es una molécula que disminuve, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunos aspectos, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En un aspecto, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, descrito en el presente documento. Todavía en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI 4736, descrito en el presente documento.

La expresión "antagonistas de unión a PD-L2" es una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales que resulta de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tal como PD-1. En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunos aspectos, los antagonistas de unión a PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tal como PD-1. En un aspecto, un antagonista de unión a PD-L2 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras con respecto al reconocimiento de antígenos). En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

El término "aptámero" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de unirse a una molécula diana, tal como un polipéptido. Por ejemplo, un aptámero de la divulgación se puede unir específicamente a un polipéptido de TIGIT, o a una molécula en una vía de señalización que modula la expresión de TIGIT. La generación y el uso terapéutico de aptámeros están bien establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.475.096, y la eficacia terapéutica de Macugen® (Eyetech, Nueva York) para tratar la degeneración macular senil.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido natural divulgado en el presente documento. De forma similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido natural divulgado en el presente documento. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos, péptidos, oligonucleótidos antisentido naturales, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido con una molécula candidata a agonista o antagonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido.

Los términos "antagonista de TIGIT" y "antagonista de la actividad de TIGIT o la expresión de TIGIT" se usan de manera intercambiable y se refieren a un compuesto que interfiere con el funcionamiento normal de TIGIT, ya sea disminuyendo la transcripción o traducción del ácido nucleico que codifica TIGIT, o inhibiendo o bloqueando la actividad del polipéptido TIGIT, o ambos. Ejemplos de antagonistas de TIGIT incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos antisentido, ARN interferentes, ARN catalíticos, quimeras de ARN-ADN, aptámeros específicos de TIGIT, anticuerpos anti-TIGIT, fragmentos de unión a TIGIT de anticuerpos anti-TIGIT, moléculas pequeñas de unión a TIGIT, péptidos de unión a TIGIT y otros polipéptidos que se unen específicamente a TIGIT (incluyendo, pero sin

limitarse a, fragmentos de unión a TIGIT de uno o más ligandos de TIGIT, opcionalmente fusionados a uno o más dominios adicionales), de modo que la interacción entre el antagonista de TIGIT y TIGIT dé como resultado una reducción o cese de la actividad o expresión de TIGIT. Un experto en la técnica entenderá que, en algunos casos, un antagonista de TIGIT puede antagonizar una actividad de TIGIT sin afectar a otra actividad de TIGIT. Por ejemplo, un antagonista de TIGIT deseable para su uso en determinados de los procedimientos en el presente documento es un antagonista de TIGIT que antagoniza la actividad de TIGIT en respuesta a una de interacción con PVR, interacción con PVRL3 o interacción con PVRL2, por ejemplo, sin afectar o afectando mínimamente a cualquiera de las otras interacciones de TIGIT.

- 10 Los términos "antagonista de PVR" y "antagonista de la actividad de PVR o la expresión de PVR" se usan de manera intercambiable y se refieren a un compuesto que interfiere con el funcionamiento normal de PVR, ya sea disminuyendo la transcripción o traducción del ácido nucleico que codifica PVR, o inhibiendo o bloqueando la actividad del polipéptido PVR, o ambos. Ejemplos de antagonistas de PVR incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos antisentido, ARN interferentes. ARN catalíticos, quimeras de ARN-ADN, aptámeros específicos de PVR, anticuerpos anti-PVR. fragmentos de unión a PVR de anticuerpos anti-PVR, moléculas pequeñas de unión a PVR, péptidos de unión a PVR 15 y otros polipéptidos que se unen específicamente a PVR (incluyendo, pero sin limitarse a, fragmentos de unión a PVR de uno o más ligandos de PVR, opcionalmente fusionados a uno o más dominios adicionales), de modo que la interacción entre el antagonista de PVR y PVR dé como resultado una reducción o cese de la actividad o expresión de PVR. Un experto en la técnica entenderá que, en algunos casos, un antagonista de PVR puede antagonizar una actividad de PVR sin afectar a otra actividad de PVR. Por ejemplo, un antagonista de PVR deseable para su uso en 20 determinados de los procedimientos en el presente documento es un antagonista de PVR que antagoniza la actividad de PVR en respuesta a la interacción con TIGIT sin afectar a las interacciones con PVR-CD96 y/o PVR-CD226.
- El término "disfunción", en el contexto de la disfunción inmunológica, se refiere a un estado de reactividad inmunitaria reducida a la estimulación antigénica. El término incluye los elementos comunes de agotamiento y/o anergia en los que se puede producir el reconocimiento de antígenos, pero la respuesta inmunitaria resultante es ineficaz para controlar la infección o el crecimiento tumoral.
- El término "disfuncional", como se usa en el presente documento, también incluye resistente o sin reactividad al reconocimiento de antígenos, específicamente, con capacidad deficiente de traducir el reconocimiento de antígenos a funciones efectoras de linfocitos T posteriores, tales como proliferación, producción de citocinas (por ejemplo, IL-2) y/o destrucción de células diana.
- El término "anergia" se refiere al estado de falta de reactividad a la estimulación antigénica que resulta de señales incompletas o insuficientes emitidas a través del receptor de linfocitos T (por ejemplo, aumento del Ca⁺² intracelular en ausencia de activación de ras). La anergia de linfocitos T también puede ser el resultado de la estimulación con antígeno en ausencia de coestimulación, lo que da como resultado que la célula se vuelva resistente a la activación posterior por el antígeno, incluso en el contexto de la coestimulación. El estado de falta de reactividad se puede contrarrestar a menudo por la presencia de interleucina-2. Los linfocitos T anérgicos no experimentan expansión clonal y/o no adquieren funciones efectoras.
 - El término "agotamiento" se refiere al agotamiento de los linfocitos T como un estado de disfunción de los linfocitos T que surge de la señalización mantenida de TCR que se produce durante muchas infecciones crónicas y cáncer. Se distingue de la anergia en que surge no de una señalización incompleta o insuficiente, sino de una señalización mantenida. Se define por una función efectora deficiente, expresión mantenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto del de los linfocitos T efectores o de memoria funcionales. El agotamiento evita el control óptimo de infecciones y tumores. El agotamiento puede ser el resultado de las vías reguladoras negativas extrínsecas (por ejemplo, citocinas inmunorreguladoras), así como de las vías reguladoras (coestimuladoras) negativas intrínsecas celulares (PD-1, B7-H3, B7-H4, etc.).

45

50

55

- "Potenciar la función de los linfocitos T" significa inducir, causar o estimular a un linfocito T para que tenga una función biológica mantenida o amplificada, o renovar o reactivar linfocitos T agotados o inactivos. Los ejemplos de potenciación de la función de linfocitos T incluyen: incremento de la secreción de interferón γ de los linfocitos T CD8⁺, incremento de la proliferación, incremento de la reactividad a antígenos (por ejemplo, eliminación de virus, patógenos o tumores) en relación con dichos niveles antes de la intervención. En un modo de realización, el nivel de potenciación es al menos un 50 %, de forma alternativa un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 %, 200 %. La manera de medir esta potenciación es conocida por un experto en la técnica.
- Un "trastorno disfuncional de linfocitos T" es un trastorno o afección de los linfocitos T que se caracteriza por una reactividad disminuida a la estimulación antigénica. En un aspecto particular, un trastorno disfuncional de linfocitos T es un trastorno que se asocia específicamente con un incremento inadecuado de la señalización a través de PD-1. En otro aspecto, un trastorno disfuncional de linfocitos T es uno en el que los linfocitos T son anérgicos o tienen una capacidad disminuida de secretar citocinas, proliferar o ejecutar actividad citolítica. En un aspecto específico, la reactividad disminuida da como resultado un control ineficaz de un patógeno o tumor que expresa un inmunógeno.

 Ejemplos de trastornos disfuncionales de linfocitos T caracterizados por la disfunción de linfocitos T incluyen infección aquda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

"Inmunidad tumoral" se refiere al proceso en el que los tumores evaden el reconocimiento y la eliminación por parte del sistema inmunitario. Por tanto, como concepto terapéutico, se "trata" la inmunidad tumoral cuando se atenúa dicha evasión y el sistema inmunitario reconoce y ataca a los tumores. Ejemplos de reconocimiento tumoral incluyen unión a tumor, reducción del volumen tumoral y eliminación tumoral.

5

10

15

20

50

55

60

65

"Inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de una sustancia particular de provocar una respuesta inmunitaria. Los tumores son inmunógenos y la potenciación de la inmunogenicidad tumoral ayuda en la eliminación de las células tumorales por la respuesta inmunitaria. Ejemplos de potenciación de la inmunogenicidad tumoral incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento con un antagonista de unión al eje de PD-1 (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-L1 y un inhibidor de TIGIT (por ejemplo, anticuerpos anti-TIGIT).

"Respuesta mantenida" se refiere al efecto mantenido en la reducción del crecimiento tumoral después de la interrupción de un tratamiento. Por ejemplo, el tamaño del tumor puede permanecer igual o más pequeño en comparación con el tamaño al *comienzo* de la fase de administración. En algunos modos de realización, la respuesta mantenida tiene una duración al menos igual a la duración del tratamiento, al menos 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 veces la duración del tratamiento.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con "anticuerpo" en el presente documento.

25 La unidad de anticuerpo tetracatenaria básica es una glucoproteína heterotetrámera compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetrámeras básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden de 2 a 5 de las unidades tetracatenarias básicas que se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la 30 unidad tetracatenaria es, en general, de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L se une a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y y y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene, 35 en el extremo N, un dominio variable (VL) seguido de un dominio constante en su otro extremo. El VL se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L conjuntamente forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véanse, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8.ª edición, 40 Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6. La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente diferenciados, llamados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen 45 cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases basadas en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera se pueden denominar "VH" y "VL", respectivamente. Estos dominios son, en general, las partes más variables del anticuerpo (en relación con otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en las secuencias entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en todo el tramo de los dominios variables. En cambio, se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, que se conectan mediante tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las HVR de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad

celular dependiente de anticuerpos.

10

15

20

25

30

45

50

55

65

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un sitio antigénico único. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, no estando contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por eiemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.º ed. 1988); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, NY, 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004) y Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen parte o la totalidad de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol.13: 65-93 (1995).

La expresión "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto citotóxico o radiomarcador.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de forma intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, a diferencia de un fragmento de anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadenas pesadas y ligeras que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno y/o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de los anticuerpos produjo dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en toda una cadena L junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo proporciona un único fragmento F(ab')2 grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por puente disulfuro que tiene diferente actividad de unión a antígeno y que todavía se puede reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que tienen unos pocos residuos adicionales en el extremo carboxílico del dominio C_H1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')2 se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

60 El fragmento Fc comprende las partes carboxiterminales de ambas cadenas H mantenidas unidas por puentes disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, la región que también reconocen los receptores Fc (FcR) encontrados en determinados tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión a y de reconocimiento de antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de una cadena pesada y una ligera en estrecha asociación no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles

de cada una de las cadenas H y L) que aportan los residuos de aminoácido para la unión a antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

5

10

15

"Fv monocatenario", también abreviado como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

Los "fragmentos funcionales" de los anticuerpos de la divulgación comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que en general incluye la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que conserva la capacidad de unión a FcR o la tiene modificada. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

20

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (de aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L, de modo que se logra el emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado de este modo un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "entrecruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen con mayor detalle, por ejemplo, en el documento EP404.097; documento WO 93/11161; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

25

30

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, por la inmunización de monos macacos con un antígeno de interés. Como se usa en el presente documento, "anticuerpo humanizado" se usa como un subconjunto de "anticuerpos quiméricos".

40

45

50

55

35

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En un modo de realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR (definida a continuación en el presente documento) del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales ("FR") de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden elaborar para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una secuencia de inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de residuos de FR individuales que mejoren el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión, la isomerización, la inmunogenicidad, etc. El número de estas sustituciones aminoacídicas en la FR es típicamente de no más de 6 en la cadena H y de no más de 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Alergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y las patentes de EE. UU. n.ºs 6.982.321 y 7.087.409.

60

65

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo colecciones de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581

(1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los procedimientos descritos en Cole *et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,* Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner *et al., J. Immunol.,* 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.,* <u>5</u>: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* <u>103</u>:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

10

15

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel especial en la atribución de una especificidad precisa a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido naturales que consisten en una cadena pesada solo son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

20

25

Varias delimitaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las HVR de AcM representan un término medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan en el programa informático de modelado de anticuerpos AcM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AcM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

30

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

35

40

La expresión "numeración de residuos de dominio variable según Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos según Kabat", y las variaciones de la misma, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., supra. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de o inserción en una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido único (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

45

Los residuos "estructurales" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de HVR, como se definen en el presente documento.

50

55

Una "estructura consenso humana" o "estructura humana aceptadora" es una estructura que representa los residuos de aminoácido que aparecen más comúnmente en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los ejemplos incluyen, para el VL, que el subgrupo pueda ser el subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV como en Kabat et al., supra. Adicionalmente, para el VH, el subgrupo puede ser el subgrupo I, subgrupo II o subgrupo III como en Kabat et al., supra. De forma alternativa, una estructura consenso humana se puede derivar de lo anterior, en la que se seleccionan residuos particulares, tal como cuando se selecciona un residuo estructural humano en base a su homología con la estructura de donante alineando la secuencia estructural de

donante con una colección de diversas secuencias estructurales humanas. Una estructura humana aceptadora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos preexistentes es 10 o menos, 9 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos.

Una "estructura consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos del subgrupo III de cadena variable pesada de Kabat et al., supra. En un modo de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una parte o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (HC-FR1) (SEQ ID NO: 25), WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2) (SEQ ID NO: 26), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3, SEQ ID NO: 27), WGQGTLVTVSA (HC-FR4) (SEQ ID NO: 28).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Una "estructura consenso de kappa I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos del subgrupo kappa I de cadena variable ligera de Kabat et al., supra. En un modo de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una parte o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (LC-FR1) (SEQ ID NO: 29), WYQQKPGKAPKLLIY (LC-FR2) (SEQ ID NO: 30), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (LC-FR3) (SEQ ID NO: 31), FGQGTKVEIKR (LC-FR4) (SEQ ID NO: 32).

Una "modificación de aminoácido" en una posición específica, por ejemplo de la región Fc, se refiere a la sustitución o deleción del residuo especificado, o la inserción de al menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo especificado. La inserción "adyacente" a un residuo específico significa la inserción a una distancia de uno a dos residuos del mismo. La inserción puede ser N terminal o C terminal al residuo específicado. La modificación de aminoácido preferente en el presente documento es una sustitución.

Un anticuerpo "de afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones. En un modo de realización, un anticuerpo de afinidad madurada tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad mediante reordenación de los dominios de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de la HVR y/o de la región estructural se describe, por ejemplo, en: Barbas et al.Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al.Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al.J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al.,J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al.J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente a" o "es específico para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, tales como la unión entre una diana y un anticuerpo, que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluyendo moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a una diana (que puede ser un epítopo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o durante mayor duración que con la que se une a otras dianas. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la diana medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (Kd) de ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤10 nM. En determinados modos de realización, un anticuerpo se une específicamente a un epítopo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. En otro modo de realización, la unión específica puede incluir, pero no requiere, una unión exclusiva.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, que es distinta de la del sitio de unión y reconocimiento de antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2 (incluyendo IgG2A e IgG2B), IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de lg. En un modo de realización preferente en particular, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las bisagra, CH1, CH2 y CH3, de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de EE. UU. n.º 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995. Por ejemplo, las inmunoadhesinas útiles como segundos medicamentos útiles para la politerapia en el presente documento incluyen polipéptidos que comprenden las partes de unión a PD-1 o extracelulares de PD-L1 o PD-L2 o las partes de unión a PD-L1 o PD-L2 o extracelulares de PD-1, fusionadas a un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina, tal como un PD-L1

ECD-Fc, un PD-L2 ECD-Fc y un PD-1 ECD-Fc, respectivamente. Las combinaciones de inmunoadhesinas de Ig Fc y ECD de receptores de superficie celular a veces se denominan receptores solubles.

Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos partes unidas covalentemente, en el que cada una de las partes es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una propiedad química o física simple, tal como unión a una molécula diana, catálisis de una reacción, etc. Las dos partes se pueden unir directamente mediante un enlace peptídico único o a través de un conector peptídico, pero están en el marco de lectura entre sí.

10

15

20

25

5

Un "oligopéptido PD-1", "oligopéptido PD-L1" u " oligopéptido PD-L2" es un oligopéptido que se une, preferentemente de manera específica, a un polipéptido coestimulador negativo de PD-1, PD-L1 o PD-L2, respectivamente, incluyendo un receptor, ligando o componente de señalización, respectivamente, como se describe en el presente documento. Dichos oligopéptidos se pueden sintetizar químicamente usando una metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar usando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos suelen tener al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, de forma alternativa al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos de longitud o más. Dichos oligopéptidos se pueden identificar usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que las técnicas para cribar colecciones de oligopéptidos para seleccionar oligopéptidos que sean capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las publicaciones PCT n. $^{\circ}$ WO 84/03506 y WO 84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., $\underline{81}$:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., $\underline{82}$:178-182 (1985); Geysen et al., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378 (1990); Lowman, H.B. et al. Biochemistry, 30:10832 (1991); Clackson, T. et al. Nature, 352:624 (1991); Marks, J. D. et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Kang, A.S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 (1991) y Smith, G. P., Current Opin. Biotechnol., 2:668 (1991).

30

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. En algunos modos de realización, los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención bloquean la señalización a través de PD-1 para restablecer una respuesta funcional de los linfocitos T (por ejemplo, proliferación, producción de citocinas, destrucción de células diana) desde un estado disfuncional a la estimulación antigénica.

35

Un anticuerpo "agonista" o activador es uno que potencia o inicia la señalización por el antígeno al que se une. En algunos modos de realización, los anticuerpos agonistas causan o activan la señalización sin la presencia del ligando

40

45

50

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los delimitadores de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente para que se extienda desde un residuo aminoacídico en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxiterminal de la misma. La lisina C terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede retirar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o genomanipulando de forma recombinante el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 retirados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones Fc de secuencia natural adecuadas para su uso en los anticuerpos de la invención incluyen IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 humanas.

55

60

65

El "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y, formas empalmadas de forma alternativa de estos receptores, los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se vayan a identificar en el futuro, se engloban por el término "FcR" en el presente documento.

El término "receptor de Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto. Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim et al., J. Immunol .24: 249 (1994). Se conocen procedimientos de medición de la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6 (2004); el documento WO 2004/92219 (Hinton et al.). Se pueden someter a ensayo la unión al FcRn in vivo y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humanos, por ejemplo, en líneas celulares humanas transfectadas o de ratones transgénicos que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos que tienen una región Fc variante. El documento WO 2004/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase también, por ejemplo, Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

La frase "sustancialmente reducida" o "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (en general, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora), de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores, por ejemplo, es mayor que aproximadamente un 10 %, mayor que aproximadamente un 20 %, mayor que aproximadamente un 30 %, mayor que aproximadamente un 40 % y/o mayor que aproximadamente un 50 % como una función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

20

25

10

15

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores, por ejemplo, es de menos de aproximadamente un 50 %, de menos de aproximadamente un 40 %, de menos de aproximadamente un 30 %, de menos de aproximadamente un 20 % y/o de menos de aproximadamente un 10 % como una función del valor de referencia/comparador.

30

35

Los "vehículos", como se usan en el presente documento, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que está expuesto a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

40

Un "prospecto" se refiere a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de medicamentos que contienen información sobre las indicaciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de medicamentos que contienen información sobre indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros medicamentos que se van a combinar con el producto envasado, y/o advertencias sobre el uso de dichos medicamentos, etc.

45

50

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar la evolución natural del individuo o la célula que se está tratando durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. Por ejemplo, a un individuo se le "trata" con éxito si uno o más síntomas asociados con el cáncer se mitigan o eliminan, lo que incluye, pero no se limita a, reducir la proliferación de (o destruir) las células cancerosas, disminuir los síntomas resultantes de la enfermedad, incrementar la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

55

Como se usa en el presente documento, "retrasar la progresión de una enfermedad" significa diferir, dificultar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (tal como el cáncer). Este retraso puede tener duraciones de tiempo variables dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del individuo que se trata. Como es evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, englobar la prevención, en tanto que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, se puede retrasar un cáncer en estadio tardío, tal como el desarrollo de metástasis.

60

Como se usa en el presente documento, "reducir o inhibir la recidiva del cáncer" significa reducir o inhibir la recidiva del tumor o cáncer o la progresión del tumor o cáncer.

65

Como se usan en el presente documento, "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en

mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos, así como los tumores latentes o micrometástasis. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma yleucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo el carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma pulmonar de células escamosas), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o cáncer de estómago (incluyendo el cáncer gastrointestinal), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o cáncer 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 linfocitos B (incluyendo el linfoma no Hodgkin (LNH) folicular/de grado bajo; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH folicular/de grado intermedio; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto; LNH con gran masa tumoral; linfoma de células de manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y el trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como la proliferación vascular anormal asociada con las facomatosis, el edema (tal como el asociado con los tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

65

Como se usa en el presente documento, por "metástasis" se entiende la diseminación del cáncer desde su sitio primario a otras partes del cuerpo. Las células cancerosas se pueden separar de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través de la circulación sanguínea y crecer en un foco a distancia (metastatizar) en los tejidos normales de cualquier parte del cuerpo. Las metástasis pueden ser locales o a distancia. La metástasis es un proceso secuencial, dependiente de que las células tumorales se separen del tumor primario, se desplacen a través de la circulación sanguínea y se detengan en un sitio a distancia. En el nuevo sitio, las células establecen un riego sanguíneo y pueden crecer para formar una masa potencialmente mortal. Tanto las vías moleculares estimuladoras como las inhibidoras en la célula tumoral regulan este comportamiento, y las interacciones entre la célula tumoral y las células huésped en el sitio a distancia también son significativas.

Una "cantidad eficaz" es al menos la concentración mínima requerida para conseguir una mejora o prevención medible de un trastorno particular. Una cantidad eficaz en el presente documento puede variar de acuerdo con factores tales como la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento se compensa con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, reducir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas que resultan de la enfermedad, el incremento de la calidad de vida de los que padecen la enfermedad, la disminución de la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, la potenciación del efecto de otro medicamento, tal como por medio de direccionamiento, el retraso de la progresión de la enfermedad y/o la prolongación de la supervivencia. Én el caso de cáncer o tumor, una cantidad eficaz del fármaco puede tener el efecto de reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida o de forma deseable detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y de forma deseable detener) la metástasis tumoral; inhibir en cierta medida el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los propósitos de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para conseguir un tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, se puede considerar una "cantidad eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un único agente se administre en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

Como se usa en el presente documento, "*conjuntamente con*" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, "conjuntamente con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

Como se usa en el presente documento, "sujeto" se entiende un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, un mamífero humano o no humano, tal como bovino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Los pacientes también son sujetos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "respuesta completa" o "RC" se refiere a la desaparición de todas las lesiones diana; "respuesta parcial" o "RP" se refiere a una disminución de al menos un 30 % en la suma de los diámetros más largos (SDML) de las lesiones diana, tomando como referencia la SDML de referencia; y "enfermedad estable" o "EE" se refiere a una reducción no suficiente de las lesiones diana para calificarla como RP y a un aumento no suficiente

para calificarlo como EP, tomando como referencia la SDML más pequeña desde que comenzó el tratamiento.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Como se usa en el presente documento, "enfermedad progresiva" o "EP" se refiere a un incremento de al menos un 20 % en la SDML de las lesiones diana, tomando como referencia la SDML más pequeña registrada desde que comenzó el tratamiento o la presencia de una o más lesiones nuevas.

Como se usa en el presente documento, "supervivencia sin progresión" (SSP) se refiere a la cantidad de tiempo durante y después del tratamiento durante el que la enfermedad que se está tratando (por ejemplo, cáncer) no empeora. La supervivencia sin progresión puede incluir la cantidad de tiempo en el que los pacientes han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como la cantidad de tiempo en el que los pacientes han experimentado una enfermedad estable.

Como se usa en el presente documento, "tasa de respuesta global" (TRG) se refiere a la suma de la tasa de respuesta completa (RC) y la tasa de respuesta parcial (RP).

Como se usa en el presente documento, "supervivencia global" se refiere al porcentaje de individuos de un grupo que probablemente estén vivos después de un período de tiempo particular.

Un ""agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aciridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (en especial, bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9aminocamptotecina); briostatina; pemetrexed; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo sus análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; TLK-286; CDP323, un inhibidor oral de alfa-4 integrina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial, caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omegal1 (véase, por ejemplo, Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorrubicina HCI liposoma inyectable (DOXIL®) y desoxidoxorrubicina), epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5fluorouracilo (5-FU); análogos del 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 e imatinib (un derivado de 2-fenilaminopirimidina), así como otros inhibidores de c-kit; antisuprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; refuerzo de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina diaciquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbacina; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziguona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (en especial, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de paclitaxel en nanopartículas genomanipuladas con albúmina (ABRAXANE™)y doxetaxel (TAXOTERE®), cloranbucilo; 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; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como el CHOP, una abreviatura de una politerapia de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir

los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y que, a menudo, son tratamientos sistémicos o de todo el organismo. Ellos mismos pueden ser hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FARESTON®); antiprogesteronas; reguladores por disminución de receptores de estrógenos (ERD); antagonistas de receptores de estrógenos tales como fulvestrant (FASLODEX®); agentes que funcionan suprimiendo o paralizando los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, dicha definición de agentes quimioterápicos incluye bifosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); así como troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano de nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en una proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de genoterapia, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); un antiestrógeno tal como fulvestrant; un inhibidor de Kit tal como imatinib o EXEL-0862 (un inhibidor de la tirosina cinasa); inhibidor de EGFR tal como erlotinib o cetuximab; un inhibidor anti-VEGF tal como bevacizumab; arinotecán; rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); lapatinib y lapatinib ditosilato (un inhibidor doble de molécula pequeña de la tirosina cinasa de ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); 17AAG (derivado de geldanamicina que es un tóxico para la proteína de choque térmico (Hsp) 90) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

10

15

20

25

30

45

50

55

60

65

Como se usa en el presente documento, el término "citocina" se refiere genéricamente a proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares o tienen un efecto autocrino sobre las células que producen las proteínas. Los ejemplos de dichas citocinas incluyen linfocinas, monocinas; interleucinas ("IL") tales como IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A-F, IL-18 a IL-29 (tales como IL-23), IL-31, incluyendo rIL-2 PROLEUKIN®; un factor de necrosis tumoral tal como TNF-α o TNF-β, TGF-β1-3; y otros factores polipeptídicos que incluyen el factor inhibidor de la leucemia ("LIF"), el factor neurotrófico ciliar ("CNTF"), la citocina de tipo CNTF ("CLC"), la cardiotrofina ("CT") y el ligando de Kit ("KL").

- Como se usa en el presente documento, el término "quimiocina" se refiere a factores solubles (por ejemplo, citocinas) que tienen la capacidad de inducir selectivamente la quimiotaxia y la activación de leucocitos. También desencadenan procesos de angiogénesis, inflamación, cicatrización y oncogénesis. Los ejemplos de quimiocinas incluyen IL-8, un homólogo humano de factor quimiotáctico de queratinocitos (KC) murino.
- 40 Como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a", "o" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.
 - La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se refieren a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Sales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato", etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio) y sales de amonio. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier procedimiento adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosidílico tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa hidroxiácido tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un

aminoácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico tal como ácido p-toluensulfónico o ácido etanosulfónico o similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, el tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo o similares. Ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias y terciarias y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

La frase "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser química y/o toxicológicamente compatible con los otros ingredientes que comprende una formulación y/o con el mamífero al que se está tratando con la misma.

III. Procedimientos

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

En un aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la recidiva del cáncer o la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. Como se divulga en el presente documento, la recidiva del cáncer y/o progresión del cáncer incluyen, sin limitación, metástasis del cáncer.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT.

En algunos aspectos, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunos aspectos, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por una reactividad disminuida a la estimulación antigénica. En algunos aspectos, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por la anergia de los linfocitos T o la disminución de la capacidad de secretar citocinas, de proliferar o de ejecutar actividad citolítica. En algunos aspectos, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por un agotamiento de los linfocitos T. En algunos aspectos, los linfocitos T son linfocitos T CD4+ y CD8+. En algunos aspectos, el trastorno disfuncional de linfocitos T incluye infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226.

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la recidiva del cáncer o la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226.

60 En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226.

65 En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una

cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226.

En algunos aspectos, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario está asociada con un trastorno disfuncional de linfocitos T. En algunos aspectos, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por una reactividad disminuida a la estimulación antigénica. En algunos aspectos, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por la anergia de los linfocitos T o la disminución de la capacidad de secretar citocinas, de proliferar o de ejecutar actividad citolítica. En algunos aspectos, el trastorno disfuncional de linfocitos T se caracteriza por un agotamiento de los linfocitos T. En algunos aspectos, los linfocitos T son linfocitos T CD4+ y CD8+. En algunos aspectos, la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en infección aguda no resuelta, infección crónica e inmunidad tumoral.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En otro aspecto, en el presente documento se divulga un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo administrando al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226.

En algunos aspectos, el agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 puede incrementar y/o estimular la expresión y/o actividad de CD226; incrementar y/o estimular la interacción de CD226 con PVR, PVRL2 y/o PVRL3; e incrementar y/o estimular la señalización intracelular mediada por la unión de CD226 a PVR, PVRL2 y/o PVRL3. Como se usa en el presente documento, un agente que puede incrementar y/o estimular la expresión y/o actividad de CD226 incluye, sin limitación, agentes que incrementan y/o estimular la interacción de CD226. Como se usa en el presente documento, un agente que puede incrementar y/o estimular la interacción de CD226 con PVR, PVRL2 y/o PVRL3 incluye, sin limitación, agentes que incrementan y/o estimulan la interacción de CD226 con PVR, PVRL2 y/o PVRL3. Como se usa en el presente documento, un agente que puede incrementar y/o estimular la señalización intracelular mediada por la unión de CD226 a PVR, PVRL2 y/o PVRL3 incluye, sin limitación, agentes que incrementan y/o estimulan la señalización intracelular mediada por la unión de CD226 a PVR, PVRL2 y/o PVRL3.

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

En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT es un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT es un ácido nucleico inhibidor seleccionado de un polinucleótido antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico y una quimera de ARN-ADN.

En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un ácido nucleico inhibidor seleccionado de un polinucleótido antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico y una quimera de ARN-ADN.

En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de PVR es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de PVR se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVR es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos modos de realización, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVR se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL2 se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL3 se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL2 se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL3 se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo administrando al individuo una cantidad eficaz de un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales. En algunos aspectos, el uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales se seleccionan de PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA VISTA, B7H4 y CD96. En algunos aspectos, uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales se seleccionan de PD-1, CTLA-4, LAG3 y TIM3.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo administrando al individuo una cantidad eficaz de un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que incrementa o activa la expresión y/o actividad de uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales. En algunos aspectos, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan de CD226, OX-40, CD28, CD27, CD137, HVEM, GITR, MICA, ICOS, NKG2D y 2B4. En algunos aspectos, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan de CD226, OX-40, CD28, CD27, CD137, HVEM y GITR. En algunos aspectos, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan de OX-40 y CD27.

Los procedimientos de la presente divulgación pueden encontrar uso en el tratamiento de afecciones en las que se desea una inmunogenicidad potenciada, tal como una inmunogenicidad tumoral incrementada para el tratamiento del cáncer o de trastornos disfuncionales de linfocitos T.

Se pueden tratar una variedad de cánceres o se puede retrasar su progresión.

15

30

35

40

45

50

55

60

65

En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de pulmón no microcítico. El cáncer de pulmón no microcítico puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos modos de realización, el individuo tiene cáncer de pulmón microcítico. El cáncer de pulmón microcítico puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de células renales. El cáncer de células renales puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer colorrectal. El cáncer colorrectal puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de ovario. El cáncer de ovario puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de mama. El cáncer de mama puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de páncreas. El cáncer de páncreas puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene carcinoma gástrico. El carcinoma gástrico puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de vejiga. El cáncer de vejiga puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer esofágico. El cáncer esofágico puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene mesotelioma. El mesotelinoma puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene melanoma. El melanoma puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de cabeza y cuello. El cáncer de cabeza y cuello puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de tiroides. El cáncer de tiroides puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene sarcoma. El sarcoma puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de próstata. El cáncer de próstata puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene glioblastoma. El glioblastoma puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de cuello uterino. El cáncer de cuello uterino puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene carcinoma tímico. El carcinoma tímico puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene leucemia. La leucemia puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene linfomas. Los linfomas pueden estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene mielomas. Los mielomas pueden estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene micosis

fungoides. Las micosis fungoides pueden estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene cáncer de células de Merkel. El cáncer de células de Merkel puede estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo tiene neoplasias hematológicas. Las neoplasias hematológicas pueden estar en fase precoz o en fase tardía. En algunos aspectos, el individuo es un ser humano.

En algunos aspectos de los procedimientos de la presente divulgación, los linfocitos T CD4 y/o CD8 en el individuo tienen una actividad de sensibilización, activación, proliferación, liberación de citocinas y/o citolítica incrementada o potenciada con respecto a antes de la administración de la combinación.

- En algunos aspectos de los procedimientos de la presente divulgación, el número de linfocitos T CD4 y/o CD8 es elevado con respecto a antes de la administración de la combinación. En algunos aspectos de los procedimientos de la presente divulgación, el número de linfocitos T CD4 y/o CD8 activados es elevado con respecto a antes de la administración de la combinación.
- 15 En algunos aspectos de los procedimientos de la presente divulgación, los linfocitos T CD4 y/o CD8 activados se caracterizan por ser linfocitos T CD4 y/o CD8 productores de γ-IFN⁺ y/o tener actividad citolítica potenciada con respecto a antes de la administración de la combinación.
- En algunos aspectos de los procedimientos de la presente divulgación, los linfocitos T CD4 y/o CD8 presentan una liberación incrementada de citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IFN-γ, TNF-α e interleucinas.

En algunos aspectos de los procedimientos de la presente divulgación, el linfocito T CD4 y/o CD8 es un linfocito T de memoria efector. En algunos aspectos de los procedimientos de la presente divulgación, el linfocito T de memoria efector CD4 y/o CD8 se caracteriza por ser linfocitos T CD4 y/o CD8 productores de γ-IFN⁺ y/o tener actividad citolítica potenciada. En algunos aspectos de los procedimientos de la presente divulgación, el linfocito T de memoria efector CD4 y/o CD8 se caracteriza por tener expresión de CD44^{alta} y expresión de CD62L^{baja}.

En algunos aspectos de los procedimientos de la presente divulgación, el cáncer tiene niveles elevados de infiltración de linfocitos T.

En algunos aspectos, los procedimientos de la divulgación pueden comprender además administrar un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser radioterapia, cirugía, quimioterapia, tratamiento génico, tratamiento con ADN, tratamiento vírico, tratamiento con ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, tratamiento con anticuerpos monoclonales o una combinación de los anteriores. El tratamiento adicional puede ser en forma de un tratamiento adyuvante o neoadyuvante. En algunos aspectos, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (por ejemplo, agentes destinados a reducir la aparición y/o la gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, tales como agentes antieméticos, etc.). En algunos aspectos, el tratamiento adicional es radioterapia. En algunos aspectos, el tratamiento adicional puede ser uno o más de los agentes quimioterápicos descritos anteriormente en el presente documento.

Cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT descritos a continuación se puede usar en los procedimientos de la divulgación.

En algunos aspectos, cualquiera de las dianas descritas en el presente documento (por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4, CD96, B7-1, TIGIT, CD226, OX -40, CD28, CD27, CD137, HVEM, GITR, MICA, ICOS, NKG2D, 2B4, etc.) es una proteína humana.

Antagonistas de unión al eje de PD-1

5

25

30

35

40

65

50 En el presente documento se divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. En el presente documento también se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la recidiva del cáncer o la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. En el presente documento también se 55 divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. En el presente documento también se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al 60 eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. En el presente documento también se divulga un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT.

Por ejemplo, un antagonista de la unión al eje de PD-1 incluye un antagonista de la unión a PD-1, un antagonista de

la unión a PD-L1 y un antagonista de la unión a PD-L2.

En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus compañeros de unión ligandos. En un aspecto específico, los compañeros de unión ligandos de PD-1 son PD-L1 y/o PD-L2. En otro aspecto, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, los compañeros de unión de PD-L1 son PD-1 y/o B7-1. En otro aspecto, el antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, un compañero de unión de PD-L2 es PD-1. El antagonista puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, una inmunoadhesina, una proteína de fusión u oligopéptido.

10

15

20

5

En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 se selecciona de MDX-1106 (nivolumab), Merck 3745 (lambrolizumab), CT-011 (pidilizumab) y AMP-224. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 se selecciona de YW243,55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-L2 es AMP-224. En algunos aspectos, el antagonista de unión a PD-1 es AMP-224. MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO2007/005874. El anticuerpo YW243.55.S70 (SEQ ID NO: 20) es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el documento WO 2010/077634 A1 y el documento US 8.217.149. MDX-1106, también conocido como MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 o nivolumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2006/121168. Merck 3745, también conocido como MK 3475, MK-3475, SCH-900475 o lambrolizumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2009/114335. CT-011, también conocido como hBAT, hBAT-1 o pidilizumab, es un anticuerpo anti-PD-1 descrito en el documento WO2009/101611. AMP-224, también conocido como B7-DClg, es un receptor soluble de fusión de PD-L2-Fc descrito en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342.

En la solicitud de patente PCT WO2010/077634 A1 y el documento US 8.217.149 se describen ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 útiles para el uso médico de acuerdo con la presente invención y procedimientos para producir los mismos.

En algunos aspectos, el antagonista de la unión al eje de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 puede inhibir la unión entre PD-L1 y PD-1 y/o entre PD-L1 y B7-1. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')₂. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humanizado. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano.

Los anticuerpos anti-PD-L1 útiles en la presente invención, que incluyen composiciones que contienen dichos anticuerpos, tales como los descritos en los documentos WO 2010/077634 A1 y US 8.217.149, se pueden usar en combinación con un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT con o sin tratamiento adicional (por ejemplo, quimioterapia) para tratar el cáncer o una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario (por ejemplo, trastorno disfuncional de linfocitos T, infección vírica, infección vírica crónica, etc.).

40

45

55

En un aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 contiene un polipéptido de región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en el que:

(a) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO: 33);

(b) la secuencia de HVR-H2 es AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG

(SEQ ID NO: 34);

(c) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGFDY

(SEQ ID NO: 19);

en el que además: X₁ es D o G; X₂ es S o L; X₃ es T o S.

En un aspecto específico, X₁ es D; X₂ es S y X₃ es T. En otro aspecto, el polipéptido comprende además secuencias estructurales de región variable de la cadena pesada yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales son la estructura consenso de subgrupo III de VH. Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

60	HC-FR1 es	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 25)
	HC-FR2 es	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 26)
	HC-FR3 es	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 27)
65	HC-FR4 es	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO: 28).

Todavía en otro aspecto, el polipéptido de la cadena pesada se combina además con una región variable de la cadena ligera que comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en el que:

5 (a) la secuencia de HVR-L1 es $RASQX_4X_5X_6TX_7X_8A$ (SEQ ID NO: 35);

10

25

40

(b) la secuencia de HVR-L2 es $SASX_0LX_{10}S$, (SEQ ID NO: 36);

(c) la secuencia de HVR-L3 es $QQX_{11}X_{12}X_{13}X_{14}PX_{15}T$ (SEQ ID NO: 37);

en el que además: X_4 es D o V; X_5 es V o I; X_6 es S o N; X_7 es A o F; X_8 es V o L; X_9 es F o T; X_{10} es Y o A; X_{11} es Y, G, F o S; X_{12} es L, Y, F o W; X_{13} es Y, N, A, T, G, F o I; X_{14} es H, V, P, T o I; X_{15} es A, W, R, P o T.

Todavía en otro aspecto, X₄ es D; X₅ es V; X₆ es S; X₇ es A; X₈ es V; X₉ es F; X₁₀ es Y; X₁₁ es Y; X₁₂ es L; X₁₃ es Y; X₁₄ es H; X₁₅ es A. Todavía en otro aspecto, la cadena ligera comprende además secuencias estructurales de la región variable de la cadena ligera yuxtapuestas entre las HVR de acuerdo con la fórmula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales son una estructura consenso de VL de kappa I. Todavía en otro aspecto, al menos una de las secuencias estructurales es la siguiente:

LC-FR1 es	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO: 29)
FC-FR2 es	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 30)
LC-FR3 es	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 31)
LC-FR4 es	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 32).

- 30 En otro aspecto se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado o fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:
 - (a) la cadena pesada comprende una HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en el que además:
- 35 (i) la secuencia de HVR-H1 es GFTFSX₁SWIH; (SEQ ID NO: 33)
 - (ii) la secuencia de HVR-H2 es AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO: 34)
 - (iii) la secuencia de HVR-H3 es RHWPGGFDY, y (SEQ ID NO: 19)
 - (b) la cadena ligera comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, en el que además:
 - (i) la secuencia de HVR-L1 es RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 35)
- 45 (ii) la secuencia de HVR-L2 es $SASX_9LX_{10}S$; y (SEQ ID NO: 36)
 - (iii) la secuencia de HVR-L3 es QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T; (SEQ ID NO: 37)
- en el que además: X_1 es D o G; X_2 es S o L; X_3 es T o S; X_4 es D o V; X_5 es V o I; X_6 es S o N; X_7 es A o F; X_8 es V o L; X_9 es F o T; X_{10} es Y o A; X_{11} es Y, G, F o S; X_{12} es L, Y, F o W; X_{13} es Y, N, A, T, G, F o I; X_{14} es H, V, P, T o I; X_{15} es A, W, R, P o T.

En un aspecto específico, X₁ es D; X₂ es S y X₃ es T. En otro aspecto, X₄ es D; X₅ es V; X₆ es S; X₇ es A; X₈ es V; X₉ es F; X₁₀ es Y; X₁₁ es Y; X₁₂ es L; X₁₃ es Y; X₁₄ es H; X₁₅ es A. Aún en otro aspecto, X₁ es D; X₂ es S y X₃ es T, X₄ es D; X₅ es V; X₆ es S; X₇ es A; X₈ es V; X₉ es F; X₁₀ es Y; X₁₁ es Y; X₁₂ es L; X₁₃ es Y; X₁₄ es H y X₁₅ es A.

En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una estructura consenso de VH de subgrupo III. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es la siguiente:

5	HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 25)
	HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 26)
	HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 27)
	HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO: 28).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, II o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una estructura consenso de VL de kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

15	LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO: 29)
	LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 30)
20	LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 31)
	LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 32).

25

30

35

40

45

50

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. Todavía en otro modo de realización, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Aún en otro aspecto se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

- (a) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 17), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 19), respectivamente, o
- (b) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 20), SASFLYS (SEQ ID NO: 21) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 22), respectivamente.
- (c) En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una estructura consenso de VH de subgrupo III. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es la siguiente:

55	HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 25)
	HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 26)
00	HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 27)
60	HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO: 28).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo

kappa I, II, II o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una estructura consenso de VL de kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

5	LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO: 29)
	LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 30)
10	LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 31)
	LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 32).

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. Todavía en otro modo de realización, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Todavía en otro aspecto se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

25 (a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG

15

20

30

35

STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG TLVTVSA (SEQ ID NO: 23),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG

STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG TLVTVSSASTK (SEQ ID NO: 40) o

 ${\tt EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG}$

STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 41) o

- (b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:
- 40 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es una estructura consenso de VH de subgrupo III. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es la siguiente:

55	HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 25)
	HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 26)
	HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 27)

HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 28).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, II o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una estructura consenso de VL de kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

	LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO: 29)
10	LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 30)
	LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 31)
	LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 32).

15

20

5

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de la producción en células procariotas. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. Todavía en otro modo de realización, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

25

Todavía en otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos anteriormente en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Todavía en otro aspecto se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de la región variable de la cadena ligera o cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-L1, en el que:

(a) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y una HVR-H3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 17), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 19), respectivamente, y

35

(b) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 20), SASFLYS (SEQ ID NO: 21) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 22), respectivamente.

En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En un aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales

50

de la cadena pesada es la siguiente:

00	HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 25)
	HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 26)
55	HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 27)
	HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO: 28).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, II o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una estructura consenso de VL de kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 29)

	LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 30)
	LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 31)
)	I C-FR4	FGOGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 32)

5

10

15

20

25

30

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de la producción en células procariotas. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. Todavía en otro aspecto, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

En otro aspecto más se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena

pesada: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVA WISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41) o

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de setructurales consenso humanas. En otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es una estructura consenso de VH de subgrupo III. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es la siguiente:

45	HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 25)
	HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 26)
50	HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 27)
	HC-FR4	WGOGTLVTVSS	(SEQ ID NO: 42).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, II o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una estructura consenso de VL de kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

	LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO: 29)
60	LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 30)
	LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 31)
	LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 32).

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de la producción en células procariotas. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. Todavía en otro modo de realización, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una estructura consenso de VH de subgrupo III. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es la siguiente:

\sim	•	٦
_	ı	
_	•	J

5

10

15

20	HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO: 43)
	HC-FR2	WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO: 44)
25	HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 27)
	HC-FR4	WGQGTLVTVSS	(SEQ ID NO: 45).

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, II o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una estructura consenso de VL de kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

35	LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO: 29)
	LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 30)
	LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 31)
40	LC-FR4	FGOGTKVEIK	(SEQ ID NO: 46).

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. Todavía en otro modo de realización, la mutación de Fc de anulación de Ia función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

50

60

65

45

Aún en otro aspecto se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

- (d) la cadena pesada comprende además una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y una HVR-H3 que tiene al menos
 55 un 85 % de identidad de secuencia con GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 17), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18) y RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 19), respectivamente, o
 - (e) la cadena ligera comprende además una secuencia de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 20), SASFLYS (SEQ ID NO: 21) y QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 22), respectivamente.

En un aspecto específico, la identidad de secuencia es un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 %. En otro aspecto, la región variable de la cadena pesada comprende una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), y las regiones variables de la cadena ligera

comprenden una o más secuencias estructurales yuxtapuestas entre las HVR como: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Aún en otro aspecto, las secuencias estructurales se derivan de secuencias estructurales consenso humanas. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena pesada se derivan de una secuencia del subgrupo I, II o III de Kabat. Todavía en otro aspecto, la secuencia estructural de la cadena pesada es una estructura consenso de VH de subgrupo III. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena pesada es la siguiente:

	HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO: 25)
10	HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO: 26)
	HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 27)
	HC-FR4	WGQGTLVTVSSASTK	(SEQ ID NO: 47).

15

5

Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera se derivan de una secuencia del subgrupo kappa I, II, II o IV de Kabat. Todavía en otro aspecto, las secuencias estructurales de la cadena ligera son una estructura consenso de VL de kappa I. Todavía en otro aspecto, una o más de las secuencias estructurales de la cadena ligera es la siguiente:

20

20	LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO: 29)
	LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO: 30)
25	LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO: 31)
	LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO: 32).

Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo comprende además una región constante humana o murina. Todavía en otro aspecto, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Todavía en otro aspecto específico, la región constante humana es IgG1. Todavía en otro aspecto, la región constante murina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Todavía en otro aspecto, la región constante murina es IgG2A. Todavía en otro aspecto específico, el anticuerpo tiene una función efectora reducida o mínima. Todavía en otro aspecto específico, la función efectora mínima es el resultado de una "mutación de Fc de anulación de la función efectora" o aglucosilación. Todavía en otro modo de realización, la mutación de Fc de anulación de la función efectora es una sustitución N297A o D265A/N297A en la región constante.

Todavía en otro aspecto se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una secuencia de región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

40

45

55

60

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG

STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG TLVTVSSASTK (SEQ ID NO: 40) o

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

50 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

En algunos aspectos se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región variable de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En algunos aspectos se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región variable de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. En algunos aspectos se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1

aislado que comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región variable de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90%, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y la secuencia de la región variable de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

10

5

Todavía en otro aspecto se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que:

15

(a) la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85~% de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG
STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 48), o

20

25

30

(b) la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 49).

35

En algunos aspectos se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49. En algunos aspectos se proporciona un anticuerpo anti-PD-L1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48. En algunos aspectos se proporciona un anticuerpo anti-PDL1 aislado que comprende una secuencia de la cadena pesada y una de la cadena ligera, en el que la secuencia de la cadena ligera tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y la secuencia de la cadena pesada tiene al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

45

50

40

Todavía en otro aspecto, el ácido nucleico comprende además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos previamente. Todavía en otro aspecto específico, el vector comprende además una célula huésped adecuada para la expresión del ácido nucleico. Todavía en otro aspecto específico, la célula huésped es una célula eucariota o una célula procariota. Todavía en otro aspecto específico, la célula eucariota es una célula de mamífero, tal como de ovario de hámster chino (CHO).

El anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede preparar usando procedimientos

conocidos en la técnica, por ejemplo, por un procedimiento que comprende cultivar una célula huésped que contiene ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno descritos previamente en una forma adecuada para la expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento.

Todavía en otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo como se proporciona en el presente documento y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT

5

15

20

25

30

35

40

55

60

En el presente documento se divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. En el presente documento también se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la recidiva del cáncer o la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. En el presente documento también se divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. En el presente documento también se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. En el presente documento también se divulga un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuya o inhiba la expresión y/o actividad de TIGIT. En el presente documento también se divulga un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales. En el presente documento también se divulga un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales. Por ejemplo, el agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT incluye un antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT, un antagonista de la expresión y/o actividad de PVR, un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVR, un agente que inhibe v/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL2, un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL3, un agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR, un agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL2, un agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL3 y combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

- 45 En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de PVR incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.
- En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVR incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.
 - En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL2 incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.
 - En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL3 incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.
 - En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.
- En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL2 incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo,

un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL3 incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un ácido nucleico inhibidor seleccionado de un polinucleótido antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico y una quimera de ARN-ADN.

10 En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los anticuerpos anti-TIGIT útiles en la presente invención, incluyendo composiciones que contienen dichos anticuerpos, tales como las descritas en el documento WO 2009/126688, se pueden usar en combinación con antagonistas de unión al eje de PD-1.

Anticuerpos anti-TIGIT

5

15

25

30

35

45

50

55

60

65

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-TIGIT. Anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policionales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados. Un experto en la técnica entenderá que la divulgación también proporciona anticuerpos contra otros polipéptidos (es decir, anticuerpos anti-PVR) y que cualquiera de las descripciones en el presente documento expuestas específicamente para el procedimiento de creación, producción, variedades, uso u otros aspectos de los anticuerpos anti-TIGIT también serán aplicables a los anticuerpos específicos para otros polipéptidos distintos de TIGIT.

Anticuerpos policionales

Los anticuerpos anti-TIGIT pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la técnica. Los anticuerpos policlonales se pueden generar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará al mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido de TIGIT o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunógena en el mamífero que se inmuniza. Ejemplos de dichas proteínas inmunógenas incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Un experto en la técnica puede seleccionar el protocolo de inmunización sin experimentación excesiva.

40 <u>Anticuerpos monoclonales</u>

Los anticuerpos anti-TIGIT pueden, de forma alternativa, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para inducir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá típicamente el polipéptido de TIGIT o una proteína de fusión del mismo. En general, o bien se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o bien se usan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan a continuación con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) págs. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Normalmente se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células carentes de HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferentes son las que se fusionan eficazmente, soportan un alto nivel de expresión estable de anticuerpo en las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Líneas celulares inmortalizadas más preferentes son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma murinohumano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur

et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987), págs. 51-63].

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede someter a ensayo a continuación para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem. 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, se pueden subclonar los clones mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar [Goding, <u>supra</u>]. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. De forma alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar mediante procedimientos de ingeniería genética, tales como los descritos en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la divulgación sirven como una fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, se puede disponer el ADN en vectores de expresión, que, a continuación, se transfectan en células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. También se puede modificar el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas [patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison et al., supra] o uniendo de forma covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulínia toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. Dicho polipéptido no inmunoglobulínico se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Son bien conocidos en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca en general en cualquier punto de la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. De forma alternativa, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular, fragmentos Fab, se puede lograr usando técnicas de rutina conocidas en la técnica.

Anticuerpos humanos y humanizados

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Los anticuerpos anti-TIGIT de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos 50 humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una 55 CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de la región estructural de Fv de la inmunoglobulina humana por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de región estructural importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al 60 menos un dominio variable, y típicamente dos, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. De manera óptima, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature. 332:323-329 (1988); y 65 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Son bien conocidos en la técnica procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que típicamente se toman de un dominio variable de "importación".

La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, <u>Nature</u>, <u>321</u>:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, <u>Nature</u>, <u>332</u>:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, <u>Science</u>, <u>239</u>:1534-1536 (1988)], sustituyendo las secuencias de un anticuerpo humano por las correspondientes CDR o secuencias de CDR de roedor. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen con residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

15 Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las colecciones de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. están también disponibles para la preparación de anticuerpos monocionales humanos (Cole et al., Monocional Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. De forma similar, los anticuerpos humanos se pueden 20 preparar introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la que se observa en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento génico, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.545.807; 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et 25 al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

También se pueden preparar anticuerpos de afinidad madurada usando procedimientos conocidos de selección y/o mutagénesis como se describe anteriormente. Los anticuerpos de afinidad madurada preferentes tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, incluso más preferentemente 20 o 30 veces mayor que la del anticuerpo de partida (en general, murino, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo madurado.

Anticuerpos biespecíficos

5

10

30

35

40

45

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por TIGIT, la otra es por cualquier otro antígeno, y preferentemente por una proteína de la superficie celular o receptor o subunidad de receptor.

Son conocidos en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades [Milstein y Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se divulgan en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpoantígeno) se pueden fusionar con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente
con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones
bisagra, CH2 y CH3. Es preferente que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) contenga el sitio
necesario para la unión a la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las
fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan
en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para obtener más
detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology,
121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferente comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes

por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan et al., Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., <u>J. Exp. Med.</u>, 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado se pudo unir a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos frente a las dianas de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios V_H y V_L de un fragmento se emparejen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Como un ejemplo no limitante, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Véase, por ejemplo, Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

Anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes en un polipéptido de TIGIT dado en el presente documento. De forma alternativa, se puede combinar un brazo de anti-polipéptido de TIGIT con un brazo que se una a una molécula de activación en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7) o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el polipéptido de TIGIT particular. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un polipéptido de TIGIT particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TIGIT y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido de TIGIT y se une adicionalmente al factor tisular (TF).

Anticuerpos heteroconjugados

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

65

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas [patente de EE. UU. n.º 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por el VIH [documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; documento EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando procedimientos conocidos en química sintética de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los divulgados, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980.

Genomanipulación de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora para potenciar, por

ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se puede(n) introducir (un) residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementadas. Véase Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando agentes de reticulación heterobifuncionales como se describe en Wolff et al. Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). De forma alternativa, se puede genomanipular un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y que, de este modo, pueda tener capacidades de lisis mediada por el complemento y de ADCC potenciadas. Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989).

En algún aspecto, se generaron anticuerpos anti-TIGIT que eran anticuerpos anti-ratón de hámster. Dos anticuerpos, 10A7 y 1F4, también se unieron específicamente al TIGIT humano. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 10A7 se determinaron usando técnicas estándar. La secuencia de la cadena ligera de este anticuerpo es:

DIVMTOSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQS

10

15

30

PKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDG TKLEIKR (SEQ ID NO: 13) y la secuencia de la cadena pesada de este anticuerpo es:

EVOLVESGGGLTOPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVROSPGKGLEWVAFIRSGSGI

VFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 15), donde las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cada cadena se representan por texto en negrita. Por tanto, la CDR1 de la cadena ligera de 10A7 tiene la secuencia KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO: 1), la CDR2 de la cadena ligera de 10A7 tiene la secuencia ASIRFT (SEQ ID NO: 2) y la CDR3 de la cadena ligera de 10A7 tiene la secuencia QQGINNPLT (SEQ ID NO: 3). La CDR1 de la cadena pesada de 10A7 tiene la secuencia GFTFSSFTMH
 (SEQ ID NO: 4), CDR2 de la cadena pesada de 10A7 tiene la secuencia FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO: 5) y CDR3 de la cadena pesada de 10A7 tiene la secuencia RPI GHNTFDS (SEQ ID NO: 6).

También se determinaron las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 1F4. La secuencia de la cadena ligera de este anticuerpo es:

DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO: 14) y la secuencia de la cadena pesada de este anticuerpo es:

EVOLOOSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKOSHGKNLEWIGLIIPYNGG

TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFYAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO: 16), donde las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cada cadena se representan por texto en negrita. Por tanto, la CDR1 de la cadena ligera de 1F4 tiene la secuencia RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO: 7), la CDR2 de la cadena ligera de 1F4 tiene la secuencia GISNRFS (SEQ ID NO: 8) y la CDR3 de la cadena ligera de 1F4 tiene la secuencia LQGTHQPPT (SEQ ID NO: 9). La CDR1 de la cadena pesada de 1F4 tiene la secuencia GYSFTGHLMN (SEQ ID NO: 10), CDR2 de la cadena pesada de 1F4 tiene la secuencia LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 11) y CDR3 de la cadena pesada de 1F4 tiene la secuencia GLRGFYAMDY (SEQ ID NO: 12).

Se determinó que la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de 1F4 es

GATGTTGTGTTGACTCAAACTCCACTCTCCCTGTCTGTCAGCTTTGGAGATCAAGT
TTCTATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGTCTTGTAAACAGTTATGGGAACACCTTTT
TGTCTTGGTACCTGCACAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTTTGGGATT
TCCAACAGATTTTCTGGGGTGCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGTTCAGGGACA
GATTTCACACTCAAGATCAGCACAATAAAGCCTGAGGACTTGGGAATGTATTACT

45 GCTTACAAGGTACGCATCAGCCTCCCACGTTCGGTCCTGGGACCAAGCTGGAGGT GAAA (SEQ ID NO: 38) y se determinó que la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de 1F4 es

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAACTTCAATG
AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCCATCTTATGAACTGGG
TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTATTCCTTACAA
TGGTGGTACAAGCTATAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGA
CAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCTCAGTCTGACTTCTGATGACTCT
GCAGTCTATTTCTGTTCAAGAGGCCTTAGGGGCTTCTATGCTATGGACTACTGGG
GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 39).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos una HVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos expuestas en (1) KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO: 1), ASIRFT (SEQ ID NO: 2), QQGINNPLT (SEQ ID NO: 3), GFTFSSFTMH (SEQ ID NO: 4), FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO: 5) y RPLGHNTFDS (SEQ ID NO: 6), o (2) RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO: 7), GISNRFS (SEQ ID NO: 8), LQGTHQPPT (SEQ ID NO: 9), GYSFTGHLMN (SEQ ID NO: 10), LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 11) y GLRGFYAMDY (SEQ ID NO: 12).

10

5

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en

DIVMTOSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQS

PKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDG TKLEIKR (SEQ ID NO: 13) o

15

DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO: 14).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la cadena pesada 20 del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en

EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGI

VFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 15) o

EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGG

TSYNOKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFYAMDYWGOG TSVTVSS (SEQ ID NO: 16).

25

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en

DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQS

PKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDG TKLEIKR (SEQ ID NO: 13) o

30

45

DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO: 14) y la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en

EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGI

35 VFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 15) o

EVOLOOSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGG

TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFYAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO: 16).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo heteroconjugado y una inmunotoxina.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos una HVR que es al menos un 90 % idéntica a una HVR establecida en cualquiera de (1) KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO: 1), ASIRFT (SEQ ID NO: 2), QQGINNPLT (SEQ ID NO: 3), GFTFSSFTMH (SEQ ID NO: 4), FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO: 5) y RPLGHNTFDS (SEQ ID NO: 6) o (2) RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO:

7), GISNRFS (SEQ ID NO: 8), LQGTHQPPT (SEQ ID NO: 9), GYSFTGHLMN (SEQ ID NO: 10), LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:11) y GLRGFYAMDY (SEQ ID NO: 12).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TIGIT o fragmento del mismo comprende la cadena ligera y/o la cadena pesada que comprenden secuencias de aminoácidos al menos un 90 % idénticas a las secuencias de aminoácidos establecidas en

DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQS

5

45

PKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDG TKLEIKR (SEQ ID NO: 13) o

DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO: 14), o

EVOLVESGGGLTOPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVROSPGKGLEWVAFIRSGSGI

VFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 15) o

EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGG

15 TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFYAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO: 16), respectivamente.

Agentes que modulan la expresión y/o actividad de CD226

- 20 En el presente documento se divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226. En el presente documento también se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la recidiva del cáncer o la progresión del cáncer en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de 25 CD226. En el presente documento también se divulga un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226. En el presente documento también se divulga un procedimiento para reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una 30 cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226. En el presente documento también se divulga un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo administrando al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226.
- Por ejemplo, los agentes que modulan la expresión y/o actividad de CD226 son agentes que pueden incrementar y/o estimular la expresión y/o actividad de CD226, incrementar y/o estimular la interacción de CD226 con PVR, PVRL2 y/o PVRL3 e incrementar y/o estimular la señalización intracelular mediada por la unión de CD226 a PVR, PVRL2 y/o PVRL3. En algunos aspectos, los agentes que pueden incrementar y/o estimular la expresión y/o actividad de CD226 son agentes que incrementar y/o estimular la interacción de CD226 con PVR, PVRL2 y/o PVRL3 son agentes que incrementar y/o estimular la interacción de CD226 con PVR, PVRL2 y/o PVRL3. En algunos aspectos, los agentes que pueden incrementar y/o estimular la señalización intracelular mediada por la unión de CD226 a PVR, PVRL2 y/o PVRL3 son agentes que incrementan y/o estimular la señalización intracelular mediada por la unión de CD226 a PVR, PVRL2 y/o PVRL3.

En algunos aspectos, el agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 se selecciona de un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT, un antagonista de la expresión y/o actividad de PVR, un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVR, un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL2, un agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL3, un agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR, un agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL2, un agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL3 y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT se selecciona de un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT es un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de CD226 con TIGIT es un ácido nucleico inhibidor seleccionado de un polinucleótido antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico y una quimera de ARN-ADN.

60 En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un

polipéptido inhibidor. En algunos modos de realización, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un anticuerpo anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un ácido nucleico inhibidor seleccionado de un polinucleótido antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico y una quimera de ARN-ADN. En algunos modos de realización, el antagonista de la expresión y/o actividad de PVR es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVR es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL2 es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la interacción de TIGIT con PVRL3 es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL2 es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos modos de realización, el agente que inhibe y/o bloquea la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVRL3 es un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor.

En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de PVR incluye un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el agente que inhibe la señalización intracelular mediada por la unión de TIGIT a PVR se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo inhibidor o fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero, un ácido nucleico inhibidor y un polipéptido inhibidor. En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un antígeno del mismo. En algunos aspectos, el antagonista de la expresión y/o actividad de TIGIT es un ácido nucleico inhibidor seleccionado de un polinucleótido antisentido, un ARN interferente, un ARN catalítico y una quimera de ARN-ADN.

35 <u>Combinaciones de dianas celulares para el tratamiento con anticuerpos inmunorreguladores</u>

Además del reconocimiento de antígeno específico a través del TCR, la activación de los linfocitos T se regula a través de un equilibrio de señales positivas y negativas proporcionadas por los receptores coestimuladores. Estas proteínas de superficie son típicamente miembros de las superfamilias del receptor TNF o de B7. Los receptores coestimuladores activadores incluyen CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM, MICA, ICOS, NKG2D y 2B4. Los receptores coestimuladores inhibidores incluyen CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7H4 y CD96. Los anticuerpos agonistas dirigidos contra la activación de moléculas coestimuladoras y los anticuerpos de bloqueo contra moléculas coestimuladoras negativas pueden potenciar la estimulación de linfocitos T para promover la destrucción del tumor.

En el presente documento se divulga un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo administrando al individuo una cantidad eficaz de un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales. En algunos modos de realización, el uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales se seleccionan de PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA VISTA, B7H4 y CD96. En algunos aspectos, el uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales se seleccionan de PD-1, CTLA-4, LAG3 y TIM3.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para incrementar, potenciar o estimular una respuesta o función inmunitaria en un individuo administrando al individuo una cantidad eficaz de un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales. En algunos aspectos, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan de CD226, OX-40, CD28, CD27, CD137, HVEM, GITR, MICA, ICOS, NKG2D y 2B4. En algunos aspectos, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan de CD226, OX-40, CD27, CD137, HVEM y GITR. En algunos aspectos, el uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales se seleccionan de OX-40 y CD27.

IV Kits

10

15

20

25

30

40

45

50

55

60

65

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un antagonista de unión al eje de PD-1 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la

función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT descritos en el presente documento.

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 y el agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT descritos en el presente documento.

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT en combinación con un antagonista de unión al eje de PD-1 para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT descritos en el presente documento.

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un antagonista de unión al eje de PD-1 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 para tratar o retrasar la progresión de cáncer en un individuo. Se puede incluir en el kit cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o agentes que modulan la expresión y/o actividad de CD226 descritos en el presente documento.

15

30

35

40

45

65

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 con el agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 para tratar o retrasar la progresión de cáncer en un individuo. Se puede incluir en el kit cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o agentes que modulan la expresión y/o actividad de CD226 descritos en el presente documento.

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 en combinación con un antagonista de unión al eje de PD-1 para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo. Se puede incluir en el kit cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o agentes que modulan la expresión y/o actividad de CD226 descritos en el presente documento.

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un antagonista de unión al eje de PD-1 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 en combinación con un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o agentes que modulan la expresión y/o actividad de CD226 descritos en el presente documento.

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un antagonista de unión al eje de PD-1 y un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el antagonista de unión al eje de PD-1 con el agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o agentes que modulan la expresión y/o actividad de CD226 descritos en el presente documento.

- En otro aspecto se divulga un kit que comprende un agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que modula la expresión y/o actividad de CD226 en combinación con un antagonista de unión al eje de PD-1 para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y/o agentes que modulan la expresión y/o actividad de CD226 descritos en el presente documento.
- En otro aspecto se divulga un kit que comprende un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT en combinación con un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT y/o agentes que disminuyen o inhiben uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales descritos en el presente documento.

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y el agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales para tratar o retrasar la progresión

del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT y/o agentes que disminuyen o inhiben uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales descritos en el presente documento.

5

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que disminuye o inhibe uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales en combinación con un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT y/o agentes que disminuyen o inhiben uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales descritos en el presente documento.

15

10

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT en combinación con un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT y/o agentes que incrementan o activan uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales descritos en el presente documento.

25

20

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT y el agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT y/o agentes que incrementan o activan uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales descritos en el presente documento.

30

En otro aspecto se divulga un kit que comprende un agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales y un prospecto que comprende instrucciones para usar el agente que incrementa o activa uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales en combinación con un agente que disminuye o inhibe la expresión y/o actividad de TIGIT para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o para potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. Se puede incluir en el kit cualquiera de los agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT y/o agentes que incrementan o activan uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales descritos en el presente documento.

35

40

45

En algunos aspectos, el kit comprende un recipiente que contiene uno o más de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT descritos en el presente documento. En algunos aspectos, el kit comprende un recipiente que contiene uno o más de los antagonistas de unión al eje de PD-1 y agentes que modulan la expresión y/o actividad de CD226 descritos en el presente documento. En algunos aspectos, el kit comprende un recipiente que contiene uno o más de los agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT y agentes que disminuyen o inhiben uno o más receptores coinhibidores inmunitarios adicionales descritos en el presente documento. En algunos aspectos, el kit comprende un recipiente que contiene uno o más de los agentes que disminuyen o inhiben la expresión y/o actividad de TIGIT y agentes que incrementan o activan uno o más receptores coestimuladores inmunitarios adicionales descritos en el presente documento. Los recipientes apropiados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringuillas (tales como jeringuillas de cámara única o doble) y tubos de ensayo. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. En algunos modos de realización, el kit puede comprender una etiqueta (por ejemplo, en o asociada con el recipiente) o un prospecto. La etiqueta o el prospecto pueden indicar que el compuesto contenido en el mismo puede ser útil para o está destinado a tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo o potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. El kit puede comprender además otros

50

un individuo o potenciar la función inmunitaria de un individuo que tiene cáncer. El kit puede comprender además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del consumidor, incluyendo otros tampones, diluyentes,

55 filtros, agujas y jeringuillas.

EJEMPLOS

60

La invención se puede entender adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y que no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1: TIGIT se expresa altamente en linfocitos T CD8* y CD4* agotados y se correlaciona con la expresión de PD-1.

Para confirmar que los linfocitos T CD8⁺ son competentes para expresar TIGIT después de la estimulación *in vitro*, linfocitos T CD8⁺ esplénicos de C57BL6/J enriquecidos por MACS se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-

CD28 unidos a placa durante 24-48 horas *in vitro*. Se usó citometría de flujo para medir la expresión de TIGIT. En línea con la expresión de TIGIT por los linfocitos T CD4⁺ (Yu, X., *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology* **10**, 48-57 (2009)), los linfocitos T CD8⁺ murinos expresaron TIGIT dentro de las 48 horas posteriores a la estimulación *in vitro* (**FIG. 1A**).

Para evaluar la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8⁺ activados *in vivo*, se infectó a ratones C57BL6/J con la cepa Armstrong del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), y los esplenocitos se analizaron 7 días después de la infección. En resumen, para las infecciones agudas, se infectó a los ratones por vía intravenosa con 2 x 10⁶ unidades formadoras de placa (UFP) de la cepa Armstrong de LCMV. Se usó citometría de flujo para medir la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ indiferenciados (CD44^{baja} CD62L^{alta}) y de memoria efectores (CD44^{alta} CD62L^{baja}). En el máximo de la respuesta de los linfocitos T al LCMV, un subconjunto de linfocitos T de memoria efectores (TME) CD4⁺ y casi todos los linfocitos T_{ME} CD8⁺ expresaron fuertemente TIGIT (**FIG. 1B**). Se usó citometría de flujo para medir la expresión de TIGIT por los linfocitos T CD8⁺ de memoria efectores PD-1^{alta} y PD-1^{baja}. De forma interesante, la expresión de TIGIT estaba casi perfectamente correlacionada con la expresión de PD-1 (**FIG. 1C**).

10

15

20

25

30

35

40

45

60

65

Debido a que PD-1 se asocia con el agotamiento de los linfocitos T, se examinó la expresión de TIGIT en linfocitos T estimulados crónicamente. En resumen, para las infecciones crónicas, se infectó a ratones C57BL6/J por vía intravenosa con 2 x 10⁶ UFP de la cepa Clon 13 de LCMV y se trataron con 500 ug y 250 ug de anticuerpos anti-CD4 ablativos (clon GK1.5) 3 días antes y 4 días después de la infección, respectivamente. Cuando estaba indicado, los ratones infectados con la cepa Clon 13 de LCMV recibieron inyecciones intraperitoneales de 200 ug de anticuerpos de control de isotipo, 200 ug de anticuerpos anti-PD-L1 y/o 500 ug de anticuerpos anti-TIGIT 3 veces por semana desde el día 28 al 42 después de la infección. Los esplenocitos se analizaron 42 días después de la infección. Se usó citometría de flujo para medir la expresión de TIGIT por linfocitos T CD8⁺ indiferenciados (CD44^{baja} CD62L^{alta}), de memoria centrales (CD44^{alta} CD62L^{alta}) y de memoria efectores (CD44^{alta} CD62L^{baja}). De hecho, en ratones infectados crónicamente con la cepa Clon 13 de LCMV, TIGIT se expresó altamente de manera predominante en linfocitos T PD-1^{alta} pero no en linfocitos T indiferenciados, linfocitos T_{ME} PD-1^{baja} o linfocitos T de memoria centrales (**FIG. 1D**).

Ejemplo 2: Papel de TIGIT en el agotamiento de linfocitos T en ratones con deficiencia de TIGIT.

Para caracterizar el papel de TIGIT en el agotamiento de linfocitos T, se generaron ratones en los que TIGIT se había eliminado condicionalmente en linfocitos T (TIGIT^{fl/fl} CD4-cre⁺ (CKO), **FIG. 2**). En resumen, se generaron ratones CD4^{cre} y ratones TIGIT^{loxP/loxP} sobre una base de ratones C57BL/6J con técnicas estándar y se cruzaron. La línea celular ES de calidad probada (Art B6/3.6 (base genética: C57BL/6 NTac) se cultivó en una capa de alimentación mitóticamente inactivada compuesta de fibroblastos embrionarios de ratón en medio de cultivo de células ES que contenía factor inhibidor de leucemia y suero bovino fetal. Las células se electroporaron con el vector de direccionamiento de ADN linealizado de acuerdo con los procedimientos de operación estándar de Taconic Artemis. La selección con G418 y ganciclovir se usaron como mecanismos para el enriquecimiento de clones recombinados homólogamente. Las colonias de células ES resistentes (clones ES) con una morfología diferenciada se aislaron el día 8 después de la transfección y se analizaron mediante transferencia de Southern y/o PCR en un cribado primario. Los clones de células ES recombinantes homólogas se expandieron y congelaron en nitrógeno líquido después de una extensa validación molecular. El casete neo se retiró mediante flpE recombinasa antes de la microinyección en donantes B1/6 hembras albinas. Se produjeron descendientes quiméricos y las colas se cribaron por PCR para determinar la transmisión de la línea germinal. La expresión de TIGIT se eliminó con un 96 % de eficacia de los linfocitos T en ratones TIGIT^{loxP/loxP} CD4^{cre}.

Los ratones cuyos linfocitos T carecían de TIGIT generaron una respuesta de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a la infección aguda por la cepa Armstrong de LCMV que era similar a la de los ratones silvestres (**FIG. 3**).

Para evaluar el efecto en un entorno de infección crónica, los linfocitos T CD4+ de ratones TIGIT^{fl/fl} CD4-cre- (WT) y TIGIT^{fl/fl} CD4-cre+ (CKO) se disminuyeron brevemente y se infectó a los ratones con la cepa Clon 13 de LCMV. La concentración vírica en esplenocitos e hígado se analizó 42 días después de la infección. Después de la infección crónica con la cepa Clon 13 de LCMV, el número de linfocitos T CD8+ y CD4+ de ratones TIGIT^{fl/fl} CD4-cre+ (CKO) que fueron competentes para producir interferón gamma (IFNγ) fue significativamente mayor que el de linfocitos T de ratones de la camada silvestre (TIGIT^{fl/fl} CD4-cre+ (WT)) (incremento del 82-86 %, P <0,01, **FIG. 4A-4D**). Además, las cargas víricas se redujeron significativamente en los ratones TIGIT^{fl/fl} CD4-cre+ (CKO) con infección crónica (disminución del 68 %, P <0,0001, **FIG. 4E**).

Estos resultados sugieren que TIGIT desempeña un papel importante en la regulación de la actividad y la respuesta de los linfocitos T durante las respuestas inmunitarias crónicas, tal como durante una infección vírica crónica, y que TIGIT puede regular la función efectora, en particular la competencia para producir citocinas efectoras, tales como IFNγ y TNFα, de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ crónicamente estimulados o agotados.

Ejemplo 3: TIGIT y PD-1 regulan sinérgicamente la función efectora de los linfocitos T agotados in vivo.

Dado que la expresión de TIGIT se correlacionó estrechamente con la expresión de PD-1, especialmente en los

linfocitos T CD8⁺ durante la infección vírica aguda y crónica (**FIG. 1**), el bloqueo de TIGIT y de PD-1 en combinación puede restablecer la función efectora de los linfocitos T a niveles mayores de los que se obtendrían bloqueando cualquiera de los correceptores individualmente.

Para someter a prueba esta hipótesis, los linfocitos T CD4⁺ de ratones C57BL6/J se disminuyeron brevemente y se infectó a los ratones con la cepa Clon 13 de LCMV. Para las infecciones crónicas, se infectó a los ratones por vía intravenosa con 2 x 10⁶ UFP de la cepa Clon 13 de LCMV y se trataron con 500 ug y 250 ug de anticuerpos anti-CD4 ablativos (clon GK1.5) 3 días antes y 4 días después de la infección, respectivamente. Cuando estaba indicado, los ratones infectados con la cepa Clon 13 de LCMV recibieron inyecciones intraperitoneales de 200 ug de anticuerpos de control de isotipo, 200 ug de anticuerpos anti-PD-L1 y/o 500 ug de anticuerpos anti-TIGIT 3 veces por semana desde el día 28 al 42 después de la infección. El tratamiento se inició 28 días después de la infección porque la respuesta de los linfocitos T se había agotado en gran medida en ese momento en ese modelo de infección vírica crónica (Wherry et al., Molecular Signature of CD8+T cell Exhaustion During Chronic Viral Infection, Immunity. 2007 Oct; 27(4):670-84). La concentración vírica en esplenocitos e hígado se analizó 42 días después de la infección.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En estos ratones, el tratamiento con anticuerpos anti-PD-L1 indujo una activación de linfocitos T CD8+ más robusta que el tratamiento con anticuerpos de anticuerpos de control de isotipos emparejados (incremento del 88 %, P <0,0001, FIG. 4F), como se informó previamente (Barber, D.L., et al., Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature 439, 682-687 (2006)). El tratamiento con anticuerpos anti-TIGIT no tuvo ningún efecto aparente sobre la activación de linfocitos T CD8+ por sí solo ni en combinación con anticuerpos anti-PD-L1 (FIG. 4F). De forma similar, el bloqueo solo de PD-1 incrementó moderadamente la competencia para producir citocinas de los linfocitos T CD8+, mientras que el bloqueo solo de TIGIT no tuvo ningún efecto (FIG. 4G). Sin embargo, la frecuencia de los linfocitos T CD8+ productores de IFNγ se incrementó drásticamente en ratones tratados con anticuerpos tanto anti-TIGIT como anti-PD-L1, y en un grado significativamente mayor que el observado en ratones tratados solo con anticuerpos anti-PD-L1 (FIG. 4G, incremento del 93 %, P = 0,0050). Se observó un efecto similar con los linfocitos T CD4+ (FIG. 5). Como también se muestra en la FIG. 31, el cobloqueo de TIGIT/PD-L1 potenció significativamente la función efectora de los linfocitos T CD8+, pero no la función efectora de los linfocitos T CD4+, en ratones en comparación con ratones tratados solo con anticuerpos anti-PD-L1. También se observaron efectos similares sobre la expansión y la función efectora de linfocitos T en linfocitos T específicos del antígeno gp33 de LCMV (FIG. 31). Estos resultados demuestran una fuerte sinergia entre PD-1 y TIGIT en los linfocitos T CD8+ agotados, e indican que TIGIT regula específicamente la competencia para producir citocinas y la función efectora de los linfocitos T CD8+.

De acuerdo con estos resultados, las cargas víricas de LCMV se redujeron moderadamente en ratones tratados solo con anticuerpos anti-PD-L1, no se redujeron en ratones tratados solo con anticuerpos anti-TIGIT y se redujeron sustancialmente en ratones tratados con anticuerpos tanto anti-TIGIT como anti-PD-L1 (68 % de reducción de la concentración vírica con tratamiento con anticuerpos anti-PD-L1, P = 0,0004. 92 % de reducción de la concentración vírica con tratamiento con anticuerpos anti-TIGIT + anti-PD-L1, P <0,0001, FIG. 4H). Estos datos demuestran una fuerte sinergia entre los efectos inhibidores de PD-1 y TIGIT, y sugieren que, a diferencia de PD-1, TIGIT no es un inhibidor amplio de la activación de los linfocitos T efectores, sino que tiene un papel restringido en la limitación de la competencia para producir citocinas y la función efectora de los linfocitos T.

Ejemplo 4: La expresión de TIGIT es elevada en el cáncer de mama humano y se correlaciona con la expresión de CD8 y correceptores inhibidores.

El agotamiento de linfocitos T también es un rasgo característico inmunológico importante del cáncer, ya que muchos linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) expresan altos niveles de correceptores inhibidores y carecen de la capacidad de producir citocinas efectoras (Wherry, E.J. T cell exhaustion. *Nature Immunology* **12**, 492-499 (2011); Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E.M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of immunology* **25**, 267-296 (2007)).

Para determinar si TIGIT inhibe la función efectora de los TIL, se analizaron los datos de micromatrices de expresión génica del cáncer de mama generados por la Cancer Genome Atlas Network (CGAN) (Network, C.G.A. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61-70 (2012)).

La expresión de TIGIT se incrementó significativamente en los tumores de mama en general (incremento del 135 % con respecto a las muestras normales, $P = 6 \times 10^{-12}$, **FIG. 6A**) y en los cuatro subtipos moleculares principales del cáncer de mama (**FIG. 6A**) (Perou, C.M., *et al.*Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752 (2000); Sorlie, T., *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10869-10874 (2001)). La expresión de TIGIT estuvo altamente correlacionada con la expresión de CD3 ϵ , consecuente con su expresión por TIL ($R^2 = 0.61$, **FIG. 6B**). De forma interesante, la expresión TIGIT estuvo altamente correlacionada con CD8 α pero no con CD4, o sólo moderadamente correlacionada con CD4, lo que sugiere que TIGIT podría ser un regulador principal de la función de los TIL CD8 $^+$ (CD8 α , $R^2 = 0.80$. CD4, $R^2 = 0.42$. **FIG. 6C**).

Dada la coexpresión de TIGIT y PD-1 durante una infección vírica crónica, también se evaluó la correlación de PD-1

y otros correceptores inhibidores con TIGIT en el cáncer de mama. La correlación entre TIGIT y PD-1, CTLA4 y LAG3 fue muy fuerte (PD-1, R^2 = 0,87. CTLA4, R^2 = 0,76. LAG3, R^2 = 0,80. **FIG. 6D**). Conjuntamente, estos datos sugirieron que TIGIT se expresaba en los TIL, especialmente en los linfocitos T CD8+, y que podría suprimir su función.

Ejemplo 5: TIGIT y PD-1 inhiben las respuestas antitumorales de los linfocitos T.

10

15

20

25

40

Para caracterizar mejor la expresión de TIGIT por TIL en ratones, a ratones BALB/C se les inocularon células de carcinoma colorrectal CT26. En resumen, a ratones BALB/c se les inocularon subcutáneamente 1 x 10⁵ células de carcinoma de colon CT26 suspendidas en matrigel (BD Biosciences) en el flanco torácico unilateral derecho. Después de dos semanas, se reclutaron aleatoriamente ratones portadores de tumores de aproximadamente 200 mm³ en grupos de tratamiento que recibieron 35 mg/kg de anticuerpos de control de isotipo, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-TIGIT mediante inyección intraperitoneal 3 veces por semana durante 3 semanas. Se midieron los tumores 2 veces por semana mediante calibre. Los animales cuyos tumores se ulceraron/necrotizaron o crecieron hasta más de 2000 mm³ se sacrificaron. Los esplenocitos y los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se analizaron 14 días después de la inoculación, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 200 mm³.

Consecuente con la expresión de TIGIT en tumores humanos (**FIG. 6**), tanto los TIL de CT26 CD8⁺ como CD4⁺ expresaron altos niveles de TIGIT (**FIG. 7A-7B**). Además, en línea con los estudios de infección vírica crónica, la expresión de TIGIT por TIL se correlacionó estrechamente con la expresión de otros correceptores inhibidores que incluyen PD-1 (**FIG. 7A-7B**) y Tim-3 (**FIG. 8**). Se encontró un patrón similar de expresión de TIGIT en tumores de carcinoma de colon MC38 (**FIG. 9**).

Para someter a prueba la relevancia fisiológica de la expresión de TIGIT en el contexto de una respuesta inmunitaria antitumoral, se trató a ratones BALB/C con tumores de CT26 establecidos (de aproximadamente 200 mm³ de tamaño) con 200 ug de anticuerpo de control de isotipo, 200 ug de anticuerpo anti-PD-L1, 500 ug de anticuerpo anti-TIGIT o 200 ug de anticuerpo anti-PD-L1 + 500 ug de anticuerpo anti-TIGIT durante tres semanas.

El crecimiento del tumor de CT26 solo se ralentizó ligeramente mediante el tratamiento solo con anticuerpos anti-TIGIT o anti-PD-L1, dando ambos como resultado un incremento modesto de 3 días en la mediana de supervivencia (FIG. 7C-7D). Sin embargo, la politerapia con ambos anticuerpos anti-PD-L1 y anti-TIGIT redujo drásticamente el crecimiento del tumor (disminución del 75 % de la mediana del volumen del tumor el día 16, P <0,0001, FIG. 7C y FIG. 10). Además, el 70 % de los ratones que recibieron anticuerpos tanto anti-TIGIT como anti-PD-L1 experimentaron una remisión tumoral completa y duradera y sobrevivieron durante la duración del estudio, incluso en ausencia de tratamiento con anticuerpos adicionales (FIG. 7C-7D). Estos efectos también se observaron en ratones portadores de tumores tratados con una combinación de anticuerpos de bloqueo contra TIGIT y PD-1.

Para someter a prueba la inmunidad de estos ratones supervivientes a las células tumorales CT26, aproximadamente 60 días después de la inoculación inicial, a los ratones en remisión completa (RC) que habían recibido anticuerpos anti-TIGIT + anti-PD-L1, así como a ratones BALB/c no sometidos a tratamiento previo, se les reinocularon células CT26 en sus flancos torácicos unilaterales izquierdos (no sometidos a inoculación previamente). A estos ratones también se les inocularon 1 x 10⁵ células de carcinoma de mama EMT6 en matrigel en el cuarto cuerpo adiposo mamario. Se midieron los tumores 2 veces por semana. Los animales cuyos tumores se ulceraron/necrotizaron o cuya carga tumoral total excedió 2000 m³ se sacrificaron.

- Como se muestra en la **FIG. 7E**, ambos tumores crecieron fácilmente en ratones de control no sometidos a tratamiento previo, pero solo los tumores de EMT6 crecieron en ratones que habían eliminado previamente un tumor de CT26. Estos resultados indicaron que el cobloqueo de TIGIT y PD-1 durante la oncogénesis estableció un estado de inmunidad específica contra las células tumorales CT26.
- Para determinar si la eficacia del cobloqueo de TIGIT/PD-L1 estuvo mediada por linfocitos T CD8⁺, ratones que portaban tumores de CT26 se sometieron a ablación de linfocitos T CD8⁺ usando anticuerpos ablativos al inicio del tratamiento con anticuerpos anti-TIGIT y anti-PDL1. Los ratones tratados con anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD-L1 no pudieron rechazar los tumores de CT26 cuando se disminuyeron los linfocitos T CD8⁺ al comienzo del tratamiento (incremento del 1532 % del volumen tumoral medio después de 17 días de tratamiento, P = 0,0004, **FIG. 32A-32B**).
- Además, la disminución de linfocitos T CD8⁺ alteró la capacidad de los ratones con RC tratados previamente para controlar los tumores de CT26 reinoculadas (**FIG. 32C**). Tomados conjuntamente, estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD-L1 actuaban a través de los linfocitos T CD8⁺ para provocar respuestas inmunitarias antitumorales primarias y secundarias eficaces.
- Para determinar si la expresión de PVR de las células tumorales es prescindible para la eficacia del cobloqueo de TIGIT/PD-L1, a ratones BALB/c silvestres se les inocularon tumores de CT26 naturales (que expresan PVR) o tumores de CT26 deficientes en PVR. En resumen, se transfectaron células tumorales CT26 naturales de forma transitoria con un ácido nucleico que redujo la expresión de PVR. Aproximadamente dos semanas después de la transfección, las células CT26 se subclonaron en base a la pérdida de expresión de PVR por citometría de flujo y qPCR. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 150-200 mm³, se trató a los ratones con anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD-L1 o anticuerpos de control de isotipos emparejados. Los ratones tratados con anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD-L1 pudieron

rechazar tanto los tumores naturales como los deficientes en PVR, en comparación con los ratones a los que se les inoculó el tumor que fueron tratados con anticuerpos de control (**FIG. 33**). Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD-L1 actúan independientemente del PVR expresado por el tumor.

- La eficacia del cobloqueo de TIGIT/PD-L1 en el modelo de tumor de MC38 también se sometió a prueba y se confirmó. A ratones C57BL6/J silvestres se les inocularon por vía subcutánea células de carcinoma colorrectal MC38 singénicas y se trataron los tumores establecidos con una combinación de anticuerpos de bloqueo de TIGIT y PD-L1, como anteriormente. A diferencia del modelo de CT26, el tratamiento solo con anticuerpos anti-PD-L1fue suficiente para inducir una respuesta completa en algunos ratones (**FIG. 25**). Sin embargo, como en el modelo de CT26, el tratamiento de los ratones portadores de tumores de MC38 con anticuerpos tanto anti-TIGIT como anti-PD-L1 revirtió sinérgicamente el crecimiento tumoral e indujo la eliminación del tumor en la mayoría de los ratones (**FIG. 26**). Estos efectos también se observaron en ratones a los que se les inocularon células de carcinoma de mama EMT6 singénicas (**FIG. 34**).
- Estos resultados demostraron que el cobloqueo de TIGIT y PD-1 podría provocar una respuesta inmunitaria antitumoral mantenida y específica de antígeno. Estos resultados también sugirieron que las respuestas antitumorales adaptativas fueron completamente funcionales y se reactivaron en ratones tratados terapéuticamente.
- Para evaluar los efectos funcionales de los bloqueos de TIGIT y PD-1 en los propios linfocitos infiltrantes de tumor, a los ratones se les inocularon células tumorales CT26 y se les trató con anticuerpos anti-TIGIT y/o anti-PD-L1 como anteriormente. Siete días después del inicio del tratamiento, se recogieron los tumores y los ganglios linfáticos que drenan los tumores para su análisis mediante citometría de flujo.
- Los linfocitos T CD4⁺ infiltrantes de tumor y residentes en los ganglios linfáticos que drenan los tumores produjeron escasa cantidad de IFNγ, y no produjeron más tras el bloqueo de TIGIT/PD-1 (**FIG. 11**). Sin embargo, los linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor de los ratones tratados con anticuerpos tanto anti-TIGIT como anti-PD-L1, pero no los de ratones tratados solo con anticuerpos anti-TIGIT o anti-PD-L1, fueron significativamente más competentes para producir IFNγ tras estimulación *in vitro* (incremento del 174 % con respecto al control, P = 0,0001, **FIG. 13D**). Se observaron resultados similares para la producción por TIL CD8⁺ de TNFα (**FIG. 12**).
 - De forma interesante, los ratones tratados solo con anticuerpos anti-TIGIT o anti-PD-L1, o con ambos, mostraron una competencia incrementada para producir citocinas de los linfocitos T CD8⁺ residentes en los ganglios linfáticos que drenan los tumores (incremento del 75-113 %, P <0,001, **FIG. 13**), lo que sugiere que los linfocitos T CD8⁺ residentes en los ganglios linfáticos tenían un menor grado de supresión que sus equivalentes infiltrantes de tumor. La acumulación y la activación fenotípica de los linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺ infiltrantes de tumor y de los residentes en los ganglios linfáticos que drenan los tumores no cambiaron y se potenciaron débilmente mediante el tratamiento con un solo anticuerpo y doble anticuerpo y el tratamiento con doble anticuerpo, respectivamente (**FIG. 12-13**). Las frecuencias de los linfocitos T CD8⁺ productores dobles de IFNγ/TNFα en los tumores y en los ganglios linfáticos que drenan los tumores siguieron patrones similares (**FIG. 35A-35B**).

En consecuencia, si bien el bloqueo solo de TIGIT o PD-L1 fue suficiente para potenciar la función efectora de los linfocitos T CD8⁺ en los ganglios linfáticos que drenan los tumores, fue necesario el bloqueo de ambos receptores para restablecer la función de los linfocitos T CD8⁺ agotados dentro del propio tumor, de forma consecuente con la noción de que los microentornos tumorales son altamente inmunosupresores.

Ejemplo 6: Coexpresión de TIGIT con CD226 en linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor.

30

35

40

45

TIGIT compite con el receptor coestimulador CD226 por la unión al receptor de poliovirus (PVR) (Yu, X., *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology* **10**, 48-57 (2009)). Dado que la deficiencia de CD226 puede potenciar el agotamiento de linfocitos T durante la infección vírica crónica (Celia, M., *et al.* Loss of DNAM-1 contributes to CD8+ T-cell exhaustion in chronic HIV-1 infection. *European Journal of Immunology* 40(4), 949-954 (2010); Welch, M., *et al.* CD8 T cell defect of TNA-a and IL-2 in DNAM-1 deficient mice delays clearance in vivo of a persistent virus infection. *Virology* 429(2) 163-170 (2012)), es posible que TIGIT pueda inhibir las respuestas de los linfocitos T en parte interfiriendo en la actividad de CD226.

- Para evaluar si existe una relación entre CD226 y TIGIT en la inhibición de las respuestas de los linfocitos T, se determinó la expresión de TIGIT y CD226 en linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor.
- Como se muestra en la **FIG. 14**, a ratones C57BL6/J se les inocularon células de carcinoma colorrectal MC38. Los esplenocitos y los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se analizaron mediante análisis FAC aproximadamente 14 días después de la inoculación, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 200 mm³. Histograma representativo de la expresión de CD226 por linfocitos B esplénicos (gris), linfocitos T CD8+ esplénicos (azul) y linfocitos T CD8+ TIGIT+ infiltrantes de tumor (rojo). Los datos son representativos de dos experimentos independientes; n = 5. La **FIG. 14** illustra que los linfocitos T CD8+ esplénicos expresan altas concentraciones de CD226 y, además, que los linfocitos T CD8+ TIGIT+ infiltrantes de tumor también expresan altas concentraciones de

CD226. Los datos demuestran que TIGIT y CD226 se expresan de manera coordinada en linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor murinos, y pueden regular la función del otro en los linfocitos T CD8⁺. Esta observación es similar a la de los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos NK activados, que también coexpresan TIGIT y CD226.

Ejemplo 7: Coinmunoprecipitación de TIGIT y CD226 en células transfectadas.

10

15

25

30

35

40

45

65

Para determinar si TIGIT interactúa con CD226 en la superficie celular, se cotransfectaron células con TIGIT humano y CD226 humano y se sometieron a inmunoprecipitación. En resumen, se cotransfectaron células COS-7 en placas de 15 cm con plásmidos de expresión que contenían el ADNc para proteínas marcadas TIGIT-HA (5 ng) o CD226-Flag (10 ng), o un plásmido de control (pRK). 23 horas después de la transfección, las células se lavaron con PBS y se recogieron en 4 ml de PBS enfriado con hielo y se centrifugaron a 300 x g durante 5 min y los sedimentos celulares se resuspendieron en 2 ml de tampón de lisis a 4 °C. Las células se lisaron durante 50 min con agitación en vórtex cada 15 min y posteriormente se centrifugaron a 10,00 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se eliminó previamente con 160 µl de suspensión en Sepharose de CL6B mediante agitación durante 30 min a 4 °C, y se centrifugó durante 2 min a 3000 x g. El sobrenadante se dividió por igual en dos tubos y se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-HA o un anticuerpo anti-Flag usando procedimientos estándar. Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a SDS-PAGE y se inmunoelectrotransfirieron. Las inmunoelectrotransferencias se exploraron con anticuerpos anti-Flag-HRP o anti-HA-HRP.

20 Como se muestra en la FIG. 15, los anticuerpos anti-TIGIT disminuyeron los niveles de CD226 y los anticuerpos anti-CD226 disminuyeron los niveles de TIGIT, lo que demuestra que TIGIT y CD226 están en contacto físico en la superficie celular.

Ejemplo 8: TIGIT y CD226 interactúan en los linfocitos T CD8+ primarios.

Además de demostrar la capacidad de CD226 y TIGIT para interactuar en las células transfectadas, también se evaluó la interacción de CD226 y TIGIT en linfocitos T CD8⁺ primarios. En resumen, linfocitos T CD8⁺ esplénicos enriquecidos por MACS de ratones C57BL6/J se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa e IL-2 recombinante durante 48 horas y se lisaron. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-TIGIT y se exploraron con anticuerpos anti-CD226. La **FIG. 16** ilustra que TIGIT y CD226 interactúan en linfocitos T CD8⁺ primarios activados, ya que ambos fueron detectables en el coinmunoprecipitado. Estos datos demuestran que CD226 y TIGIT también interactúan entre sí en los linfocitos primarios.

Ejemplo 9: Interacción TIGIT/CD226 en células transfectadas usando TR-FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia con resolución temporal)

Para evaluar si existió alguna interacción molecular entre TIGIT y CD226, se empleó la metodología TR-FRET. FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) se basa en la transferencia de energía entre dos fluoróforos, un donante y un aceptador, cuando están en estrecha proximidad. Las interacciones moleculares entre las biomoléculas se pueden evaluar acoplando cada uno de los compañeros con un marcador fluorescente y detectando el nivel de transferencia de energía. Cuando dos entidades se acercan lo suficiente entre sí, la excitación del donante por una fuente de energía desencadena una transferencia de energía hacia el aceptador, que a su vez emite fluorescencia específica a una longitud de onda dada. Gracias a estas propiedades espectrales, se puede detectar un complejo donante-aceptador sin necesidad de separación física de los compañeros no unidos. La combinación de mediciones con resolución temporal (TR) de FRET permite eliminar la señal de la fluorescencia de fondo. Esto se hace típicamente mediante la introducción de un retardo temporal entre la excitación del sistema y la medición de fluorescencia para permitir que la señal se elimine de todas las emisiones no específicas de corta duración.

Usando TR-FRET, se demuestra aquí que TIGIT y CD226 provocaron una FRET cuando se expresaron en la misma célula, lo que indica la interacción molecular de estas dos moléculas. En resumen, se transfectaron células COS-7 con CD226 marcado con SNAP (ST) y HA-TIGIT usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies) y se cultivaron en una placa blanca de 96 pocillos (Costar) a 100.000 células por pocillo. 24 horas después, las células se marcaron con bencil-guanina SNAP-Lumi-4Tb conjugada con donante 100 nM (Cisbio) y bencil-guanina SNAP-A647 conjugada con donante 1 μM (New England Biolabs) diluidas en FCS al 10 % en DMEM durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de tres lavados en PBS, la señal FRET se registró a 665 nm durante 400 μs después de un retardo de 60 μs tras la excitación con láser a 343 nm usando un lector de placas Safire2 (Tecan). Cuando se sometió a prueba el anticuerpo anti-TIGIT, la señal de FRET también se registró después de 15 min de incubación. A continuación, se calculó la proporción de FRET como la intensidad de FRET dividida por la emisión del donante a 620 nm. La intensidad de FRET es: (señal a 665 nm del mismo lote de células transfectadas marcadas solo con SNAP-donante).

Como se muestra en la **FIG. 17**, TIGIT pudo alterar directamente y causar la disociación de los homodímeros de CD226. Como se muestra en la **FIG. 17A**, se observó disociación de los homodímeros de Flag-ST-CD226 con concentraciones crecientes de HA-TIGIT, como se ilustra por la disminución de la proporción de FRET entre Flag-ST-CD226 medido en células COS-7 que expresan una cantidad constante de Flag-ST-CD226 y concentraciones

crecientes de HA-TIGIT. Sin embargo, como se muestra en la **FIG. 17B**, cuando se añadió anticuerpo anti-TIGIT al cultivo celular, esto bloqueó la capacidad de TIGIT y CD226 de asociarse. Esto se ilustra por la falta de una disminución en la intensidad de FRET de los homodímeros de Flag-ST-CD226. Esto demuestra que CD226 y TIGIT se asocian como complejos, pero que los anticuerpos anti-TIGIT pueden alterar dichas interacciones (FIG. 17A y 17B).

5

10

15

30

35

40

Usando TR-FRET, la capacidad de TIGIT de asociarse con CD226 también se demostró y se mostró en la **FIG. 17C** y **17D**. En resumen, después del marcado con SNAP-tag usando bencil-guanina SNAP-A647 conjugada con donante 1 μ M (ver arriba), las células se lavaron tres veces en PBS y se incubaron con Lumi-4Tb conjugado con anticuerpo anti-HA donante 2 nM (Cisbio) diluido en PBS + BSA al 0,2 % durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se registró la señal de FRET. En ese caso, la intensidad de FRET es: (señal a 665 nm de células marcadas con SNAP-aceptador y) — (señal a 665 nm de células con transfección simulada marcadas con SNAP-receptor y anticuerpo anti-HA donante).

Como se muestra en la **FIG. 17C**, la asociación de Flag-ST-CD226 con HA-TIGIT se observó como se ilustra por la intensidad creciente de FRET entre Flag-ST-CD226 y HA-TIGIT medida en células COS-7 que expresan una cantidad constante de Flag-ST-CD226 y concentraciones crecientes de HA-TIGIT. Cuando se añadió anticuerpo anti-TIGIT, la intensidad de FRET entre Flag-ST-CD226 y HA-TIGIT disminuyó, como se muestra en la **FIG. 17D**, lo que sugiere que la interacción de TIGIT con CD226 se puede bloquear con un anticuerpo de bloqueo anti-TIGIT.

Para confirmar la expresión en la superficie celular de Flag-ST-CD226 y HA-TIGIT en los experimentos de FRET, se realizó un ELISA de anticuerpos anti-Flag y anti-HA en células COS-7 inalteradas que expresaban las construcciones marcadas indicadas. En resumen, se fijaron células COS-7 con paraformaldehído al 4 %, se lavaron dos veces y se bloquearon en solución salina tamponada con fosfato + suero bovino fetal (FCS) al 1 %. Las células se incubaron a continuación con un anticuerpo monoclonal anti-HA (clon 3F10, Roche Applied Science) o anticuerpo monoclonal anti-Flag-M2 (Sigma), ambos conjugados con peroxidasa de rábano picante. Después de los lavados, se incubaron las células con un sustrato SuperSignal ELISA (Pierce) y se detectó quimioluminiscencia en un lector de placas Safire2 (Tecan). La señal específica se calculó restando la señal registrada en células con transfección simulada. Como se ilustra en la FIG. 18, la expresión en la superficie celular tanto de CD226 como de TIGIT se confirmó en el ensayo ELISA.

Para confirmar que la interacción TIGIT:CD226 no está impulsada por la unión a PVR, se generaron Flag-ST-CD226 y HA-TIGIT (WT) o HA-TIGIT Q56R como se describe en Stengel *et al.*, (2012) *PNAS* 109(14):5399-5904 y se determinaron las proporciones de FRET como se describe. Como se muestra en la **FIG. 24**, TIGIT WT y TIGIT Q56R se unen a CD226 con la misma eficacia.

Estos datos no solo demuestran que el CD226 y el TIGIT se asocian como complejos, sino que un anticuerpo anti-TIGIT puede alterar dichas interacciones y que la interacción TIGIT:CD226 no está impulsada por la unión a PVR. Los datos apoyan un papel de TIGIT en la limitación de la activación de linfocitos T mediada por CD226 y esa interferencia en la actividad de CD226 puede ser un mecanismo de acción importante por el cual TIGIT inhibe las respuestas y la actividad de los linfocitos T.

Ejemplo 10: El bloqueo de CD226 invierte los efectores del bloqueo de TIGIT/PD-L1 in vivo.

Para evaluar la relevancia fisiológica de la interacción entre CD226 y TIGIT, se infectó crónicamente a ratones con la cepa Clon 13 de LCMV y, a continuación, se trataron con anticuerpos anti-TIGIT + anti-PD-L1 en ausencia o en 45 presencia de anticuerpos de bloqueo anti-CD226. En resumen, los linfocitos T CD4+ de ratones C57BL6/J se disminuyeron brevemente y se infectó a los ratones con la cepa Clon 13 de LCMV. Para las infecciones crónicas, se infectó a los ratones por vía intravenosa con 2 x 106 UFP de la cepa Clon 13 de LCMV y se trataron con 500 ug y 250 ug de anticuerpos anti-CD4 ablativos (clon GK1.5) 3 días antes y 4 días después de la infección, respectivamente. 50 Cuando estaba indicado, los ratones infectados con la cepa Clon 13 de LCMV recibieron inyecciones intraperitoneales de 200 ug de anticuerpos de control de isotipo, 500 ug de anticuerpos anti-CD226, 200 ug de anticuerpos anti-PD-L1 + 500 ug de anticuerpos anti-TIGIT o 500 ug de anticuerpos anti-CD226 + 200 ug de anticuerpos anti-PD-L1 + 500 ug de anticuerpos anti-TIGIT 3 veces por semana durante los días 28 a 42 después de la infección. El tratamiento se inició 28 días después de la infección porque la respuesta de los linfocitos T se había agotado en gran 55 medida en ese momento en ese modelo de infección vírica crónica (Wherry et al., Molecular Signature of CD8+T cell Exhaustion During Chronic Viral Infection, Immunity. 2007 Oct; 27(4):670-84). La concentración vírica en esplenocitos e hígado se analizó 42 días después de la infección.

En estos ratones, el tratamiento solo con anticuerpos anti-CD226 tuvo efectos limitados sobre la frecuencia, la activación o la competencia para producir citocinas de los linfocitos T CD8+ (**FIG. 19A-19C**). Sin embargo, el tratamiento con anticuerpos anti-CD226 revirtió potentemente los incrementos en la activación de linfocitos T CD8+ y la producción de IFNγ observados en ratones tratados con anticuerpos anti-PD-L1 + anti-TIGIT (disminuciones del 59 % y 58 %, respectivamente, P <0,001, **FIG. 19B-19D**).

De acuerdo con estos resultados, las cargas víricas de LCMV fueron significativamente mayores en ratones tratados con anticuerpos anti-CD226 + anti-PD-L1 + anti-TIGIT que en ratones tratados solo con anticuerpos anti-PD-L1 + anti-

TIGIT (incremento del 272 %, P <0,001, FIG. 19D).

Estos datos sugieren que un mecanismo principal por el cual TIGIT limita las respuestas crónicas de linfocitos T es la interferencia con la coestimulación mediada por CD226. Los datos identifican un papel de TIGIT previamente desconocido en la interacción y alteración de CD226, lo que da como resultado la reducción o pérdida de una señal coestimuladora clave en los linfocitos T CD8⁺. Los datos demuestran que la interferencia con la coestimulación de linfocitos T mediada por CD226 puede ser un mecanismo principal por el cual TIGIT limita las respuestas crónicas de linfocitos T, tal como durante un cáncer o una infección vírica crónica. Los datos también definen un parámetro esencial para los anticuerpos anti-TIGIT destinados a restablecer la función efectora de los linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ crónicamente estimulados o agotados al interferir con la capacidad de TIGIT de interactuar con CD226 y/o la capacidad de TIGIT de alterar la dimerización de CD226.

Materiales y procedimientos

5

10

25

30

35

40

45

- Ratones. Los ratones C57BL/6J y BALB/c se compraron a Jackson Laboratory y Charles River Laboratories. Se generaron ratones CD4^{cre} y ratones TIGIT^{loxP/loxP} sobre una base de ratones C57BL/6J con técnicas estándar y se cruzaron. La expresión de TIGIT se eliminó con un 96 % de eficacia de los linfocitos T en ratones TIGIT^{loxP/loxP} CD4^{cre}.
- Citometría de flujo. Se prepararon suspensiones de células individuales de bazo, ganglio linfático y tumor con una suave ruptura mecánica. La tinción de la superficie se realizó con anticuerpos comerciales contra CD4, CD8, CD44, CD62L, PD-1 (eBioscience) y CD226 (Biolegend). Los anticuerpos contra TIGIT se generaron en Genentech como se describe previamente (Yu, X. et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. Nature Immunology 10, 48-57 (2009)) y se conjugaron con Alexa Fluor 647 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes).
 - Para la tinción intracelular de citocinas (ICS), se estimularon las células durante 4 horas con 20 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma) y ionomicina 1 μM (Sigma) en presencia de 3 μg/ml de Brefeldina A (eBioscience). Después de la estimulación, se tiñeron los marcadores de superficie de las células como se describe y se fijaron y permeabilizaron con el conjunto de tampones de fijación FoxP3 de eBioscience de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fijadas se tiñeron con anticuerpos contra IFNy y TNFα (eBioscience).
 - Anticuerpos de bloqueo. Se generó un anticuerpo monoclonal IgG2a anti-TIGIT de bloqueo (clon 10A7, reactivo contra TIGIT tanto de ratón como humano) como se describe previamente y se clonó en una cadena principal de IgG2a murina. Se generó un anticuerpo monoclonal IgG2a anti-PD-L1 de bloqueo (clon 25A1) inmunizando ratones PdI1-/- con una proteína de fusión PD-1-Fc y se clonó en una cadena principal de IgG2a murina. El clon 25A1 se modificó con mutaciones descritas previamente que eliminaban la unión a los receptores Fcγ. Se generó un anticuerpo monoclonal IgG2a anti-CD226 de bloqueo (clon 37F6) por inmunización de hámsters con CD226 murino recombinante y se clonó en una cadena principal de IgG2a murina. Estos anticuerpos también se usaron en pruebas descritas en otros ejemplos descritos en el presente documento.
 - **Infecciones víricas.** Para las infecciones agudas, se infectó a los ratones por vía intravenosa con 2 x 10⁶ unidades formadoras de placa (UFP) de la cepa Armstrong de LCMV. Para las infecciones crónicas, se infectó a los ratones por vía intravenosa con 2 x 10⁶ UFP de la cepa Clon 13 de LCMV y se trataron con 500 ug y 250 ug de anticuerpos anti-CD4 ablativos (clon GK1.5) 3 días antes y 4 días después de la infección, respectivamente. Cuando estaba indicado, los ratones infectados con la cepa Clon 13 de LCMV recibieron inyecciones intraperitoneales de 200 ug de anticuerpos de control de isotipo, 200 ug de anticuerpos anti-PD-L1 y/o 500 ug de anticuerpos anti-TIGIT 3 veces por semana desde el día 28 al 42 después de la infección.
- Ensayo de concentración vírica. Se cultivaron monocapas de células MC57 con una superposición de metilcelulosa al 1 % y se infectaron con homogeneizados de hígado diluidos en serie de ratones infectados por LCMV. 72 horas después de la infección, se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % y se permeabilizaron con Triton-X al 0,5 %. Las placas víricas se tiñeron con anticuerpos anti-LCMV NP (clon VL-4) y anti-IgG de rata conjugada con HRP y se visualizaron con O-fenilendiamina (OPD, Sigma).
- Bioinformática. Los datos de micromatrices de datos de expresión génica de cáncer de mama se obtuvieron de la Cancer Gene Atlas Network (Network, T.C.G.A. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489, 519-525 (2012)). El procesamiento y la normalización de los datos de las micromatrices se realizaron usando el lenguaje de programación R (http://r-project.org) y el paquete Limma de Bioconductor (http://bioconductor.org). Los valores de intensidad de las micromatrices de cada canal se preprocesaron usando el procedimiento de corrección de fondo normal + exponencial, como se describe previamente.²² Los valores de intensidad corregidos se normalizaron a continuación usando la normalización de cuantiles, como se describe previamente.²³ Los datos normalizados de proporción logarítmica se calcularon restando el canal de referencia del canal de prueba para cada matriz. Los datos se filtraron adicionalmente usando un filtro no específico, como se describe previamente,²⁴ retirando las sondas que no producen genes conocidos y reduciendo el conjunto de datos a una sonda por gen. Para el análisis de expresión diferencial, se calcularon los estadísticos t moderados con el paquete Limma, como se describe previamente (Smyth, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing

differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology***3**, artículo 3 (2004)). Para evaluar la correlación se usaron los coeficientes de correlación de Pearson.

Carcinoma de colon de CT26. A ratones BALB/c se les inocularon subcutáneamente 1 x 10⁵ células de carcinoma de colon CT26 suspendidas en matrigel (BD Biosciences) en el flanco torácico unilateral derecho. Después de dos semanas, se reclutaron aleatoriamente ratones portadores de tumores de aproximadamente 200 mm³ en grupos de tratamiento que recibieron 35 mg/kg de anticuerpos de control de isotipo, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-TIGIT mediante inyección intraperitoneal 3 veces por semana durante 3 semanas. Se midieron los tumores 2 veces por semana mediante calibre. Los animales cuyos tumores se ulceraron/necrotizaron o crecieron hasta más de 2000 mm³ se sacrificaron.

Carcinoma de mama de EMT6. A ratones BALB/c se les inocularon por vía subcutánea en el cuarto cuerpo adiposo mamario 1 x 10⁵ células de carcinoma de mama EMT6 singénicas en matrigel (BD Biosciences). Después de dos semanas, se reclutaron aleatoriamente ratones portadores de tumores de 150-200 mm³ en grupos de tratamiento que recibieron 35 mg/kg de anticuerpos de control de isotipo, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-TIGIT mediante inyección intraperitoneal 3 veces por semana durante 3 semanas. Los tumores se midieron 2 veces por semana con un calibre, y los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula elipsoide modificada, ½ x (longitud x anchura²). Se consideró que los animales cuyos tumores se redujeron a 32 mm³ o menos mostraban respuesta completa (RC). Se consideró que los animales cuyos tumores crecieron hasta más de 2000 mm³ mostraban progresión y se sacrificaron. Los animales cuyos tumores se ulceraron antes de la progresión o la respuesta completa se sacrificaron y eliminaron del estudio.

Reexposición a CT26. Cuando estaba indicado, a los ratones BALB/c a los que se les habían inoculado previamente células de carcinoma de colon CT26 como se describe anteriormente se les reinocularon células CT26 en el flanco torácico unilateral izquierdo (no sometidos a inoculación previamente). A estos ratones también se les inocularon 1 x 10⁵ células de carcinoma de mama EMT6 en matrigel en el cuarto cuerpo adiposo mamario. Se midieron los tumores 2 veces por semana. Los animales cuyos tumores se ulceraron/necrotizaron o cuya carga tumoral total excedió 2000 mm³ se sacrificaron.

30 **Estadística.** Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo usando pruebas t de Student de 2 colas sin emparejar (emparejadas donde se especifica). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Supervisión de estudios en animales. Todos los estudios en animales fueron aprobados por un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Genentech.

Ejemplo 11: La expresión de TIGIT es elevada en cáncer humano y se correlaciona con la expresión de CD8 y PD-1 y la infiltración de linfocitos T CD8⁺.

Materiales y procedimientos

5

10

15

20

25

35

40

45

50

55

60

65

Bioinformática. El procesamiento y análisis de los datos de secuenciación de ARN se realizó usando el lenguaje de programación R (http://www.r-project.org) junto con varios paquetes del proyecto de Bioconductor (http://www.bioconductor.org). Se obtuvieron datos de secuenciación de ARN para muestras de cáncer y muestras normales emparejadas del TCGA para cinco indicaciones diferentes: cáncer de mama (Network, C.G.A. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70 (2012)), adenocarcinoma de colon (Network, T.C.G.A. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330-337 (2012)), carcinoma renal de células claras (Network, T.G.A. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499, 43-49 (2013)), carcinoma de células escamosas de pulmón (Network, T.C.G.A. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489, 519-525 (2012)) y carcinoma endometrial (Network, T.C.G.A. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497, 67-73 (2012)).

Las lecturas de secuenciación de ARN sin procesar se procesaron usando el paquete HTSeqGenie de Bioconductor. En resumen, las lecturas se alinearon con el genoma humano (NCBI build 37) usando el algoritmo GSNAP (Wu, T.D. & Nacu, S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. Bioinformatics (Oxford, Inglaterra) 26, 873-881 (2010)). Se contaron pares de lectura alineados de forma única que se encontraban dentro de los exones para obtener una estimación del nivel de expresión génica para genes individuales. Se usó la estimación del tamaño de la colección del paquete edgeR (Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics (Oxford, Inglaterra) 26, 139-140 (2010)) para normalizar diferentes muestras por sus respectivas profundidades de secuenciación.

Para derivar una firma genética específica para linfocitos T, se curaron manualmente los genes de linfocitos T identificados por el proyecto IRIS, eliminando genes asociados con procesos de ciclo celular, genes altamente expresados en otros tejidos y receptores coactivadores y coinhibidores conocidos. Esto proporciona una firma de 15 genes que es específica para linfocitos T. Para calcular la puntuación de la firma de expresión génica para linfocitos T en los datos del carcinoma de células escamosas de pulmón, primero se realizó una transformación estabilizadora

de la varianza de los datos de recuento sin procesar usando la función voom del paquete Limma de Bioconductor. A continuación, se calculó el primer vector propio de los datos con varianza estabilizada centrados y escalados a partir de la firma de linfocitos T de 15 genes. Este enfoque proporciona una estimación robusta por muestra de la abundancia relativa de linfocitos T. A continuación, se ajustó un modelo lineal que incluye la puntuación de la firma de linfocitos T para cada gen, nuevamente usando el paquete Limma. A continuación, se clasificaron los genes por su correlación con la firma de linfocitos T en el modelo lineal, eligiendo solo genes con una correlación positiva con la firma de linfocitos T. Para visualizar los genes asociados a linfocitos T como un mapa de calor, se centraron y escalaron los datos con varianza estabilizada a la varianza unitaria, lo que permite la comparación de genes con diferentes niveles de expresión promedio.

10

15

Para determinar la correlación entre la expresión de TIGIT y otros genes, se normalizaron los datos de recuento de secuenciación de ARN para tener en cuenta las diferencias en el tamaño de la colección, usando el procedimiento del paquete edgeR de Bioconductor (Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics (Oxford, Inglaterra) 26, 139-140 (2010)). A continuación, se calculó el coeficiente de correlación de rango de Spearman en los recuentos normalizados. Se consideró que rho >0,75 es indicativo de una fuerte correlación, rho ≤0,75 pero >0,5 es indicativo de una correlación moderada, y rho ≤0,5 pero >0,25 es indicativo de una correlación débil.

20

Para el cálculo de las proporciones TIGIT/CD3ɛ en cada indicación, primero se calcularon los datos con varianza estabilizada para cada conjunto de datos de secuenciación de ARN. A continuación, se calculó la proporción log2 de los datos con varianza estabilizada para TIGIT y CD3ε. Para calcular la diferencia entre las muestras tumorales y normales, se realizó un análisis de modelo lineal estándar usando funciones R estándar. Se aceptó un valor de p <0,01 como evidencia de una diferencia significativa entre la muestra tumoral y la normal.

Para identificar genes asociados con linfocitos T infiltrantes de tumor, se usó un enfoque basado en la firma de genes

para interrogar los datos de expresión génica de la colección de carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC) 30

25

del Cancer Genome Atlas (TCGA) (Network, T.C.G.A. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. Nature 489, 519-525 (2012)). Usando conjuntos de genes específicos de células inmunitarias definidos por el proyecto Immune Response In Silico (Abbas, A.R. et al. Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. Genes and immunity 6, 319-331 (2005)) y los procedimientos descritos anteriormente, se desarrolló una firma de 15 genes altamente específica. Examinando los genes más altamente asociados con la firma de linfocitos T, se identificaron varios receptores coinhibidores previamente asociados con la disfunción de linfocitos T en los tumores, en particular PD-1 (FIG. 21). En LUSC, la expresión de TIGIT y CD3ε se correlacionó altamente con un coeficiente de correlación de rango de Spearman ρ de 0,82 (FIG. 20A). De hecho, la expresión de TIGIT y CD3ɛ también se correlacionó altamente en muchos conjuntos de datos de expresión génica tumoral TCGA adicionales, incluyendo el adenocarcinoma de colon (COAD), el carcinoma endrometroide de cuerpo uterino (UCEC), el carcinoma de mama (BRCA) y el carcinoma renal de células claras renales (KIRC), con p que varía de 0,83 a 0,94 (FIG. 20B-20E). Además, la expresión de TIGIT fue elevada en relación

40

35

con la expresión de CD3ɛ en muchas muestras tumorales, con un incremento de las proporciones TIGIT/CD3ɛ en muestras de tumor LUSC, COAC, UCEC y BRCA en comparación con tejido normal correspondiente (incremento del 116 % al 419 %, FIG. 20A-20D). La proporción de expresión de TIGIT respecto a CD3ε en muestras de KIRC no cambió, aunque la expresión tanto de TIGIT como de CD3ε fue mucho mayor en las muestras de KIRC que en las muestras de tejido normal (FIG. 20E). Estos datos indicaron que la expresión de TIGIT estaba regulada por incremento por linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una amplia gama de tumores sólidos.

45

50

60

65

TIGIT se ha descrito previamente como un inhibidor de la sensibilización de linfocitos T CD4+, sin función conocida en los linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, la expresión de TIGIT en muestras de LUSC se correlacionó altamente con CD8A y solo débilmente con CD4 (ρ = 0,77 y 0,48, respectivamente, **FIG. 20F**). La expresión de TIGIT también se correlacionó con la expresión de su receptor coestimulador complementario, CD226, así como con la expresión de PD-1, un mediador clave de la supresión de linfocitos T en tumores y durante otras respuestas inmunitarias crónicas (ρ = 0,64 y 0,82, respectivamente, **FIG. 20G-20H**). Aunque en los tumores existen algunas fuentes de células que no son linfocitos de estos genes, estos datos sugieren fuertemente que los linfocitos T infiltrantes de tumor, en particular los linfocitos T CD8+ "agotados", expresaron altos niveles de TIGIT.

55

Ejemplo 12: Linfocitos infiltrantes de tumor humanos y murinos expresan TIGIT y PD-1 de forma coordinada

Materiales y procedimientos

Muestras de tumores y PBMC humanos. Se obtuvieron sangre completa y tejidos tumorales frescos resecados quirúrgicamente emparejados de Conversant Biosciences o Foundation Bio. Todas las muestras se obtuvieron con consentimiento informado por escrito y se recogieron usando un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB) del Hospital de Hartford (paciente 1 de NSCLC, representado en la FIG. 22) o la IRB de Western (paciente 2 de NSCLC y paciente 1 de CRC, representados en FIG. 23 y FIG. 37). Se obtuvo sangre completa normal de adulto de un voluntario sano. Las PBMC se purificaron de sangre completa mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Los tejidos tumorales se cortaron en partes pequeñas y se incubaron con colagenasa y DNAsa (Roche), y se disociaron usando un disociador gentleMACS (Miltenyi).

Citometría de flujo. Se prepararon suspensiones de células individuales de bazo, ganglio linfático y tumor de ratón con una suave ruptura mecánica. La tinción de la superficie se realizó con anticuerpos comerciales contra CD4, CD8, CD44, CD62L, PD-1 (eBioscience) y CD226 (Biolegend). Los anticuerpos contra TIGIT se generaron en Genentech y se conjugaron con Alexa Fluor 647 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes).

5

10

15

35

40

50

Para la tinción intracelular de citocinas (ICS), se estimularon las células durante 4 horas con 20 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma) y ionomicina 1 μM (Sigma) en presencia de 3 μg/ml de Brefeldina A (eBioscience). Después de la estimulación, se tiñeron los marcadores de superficie de las células como se describe y se fijaron y permeabilizaron con el conjunto de tampones de fijación FoxP3 de eBioscience de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fijadas se tiñeron con anticuerpos contra IFNy y TNFα (eBioscience).

Se prepararon muestras de tumor y PBMC humanas como se describe anteriormente. La tinción de la superficie se realizó con un tinte de viabilidad (Molecular Probes), anticuerpos comerciales contra CD45 (eBioscience), CD3, CD4, CD8, PD-1 (BD Biosciences), y con anticuerpos anti-TIGIT preparados como se describe anteriormente.

Todas las muestras se adquirieron en instrumentos LSR-II o LSR-Fortessa (BD Biosciences) y se analizaron usando el programa informático FlowJo (Treestar).

Para confirmar la regulación por incremento de TIGIT por linfocitos T infiltrantes de tumor, se evaluó la expresión de la proteína TIGIT en linfocitos T infiltrantes de tumor de carcinoma de pulmón no microcítico humano, linfocitos T periféricos emparejados y linfocitos T periféricos de donantes normales. El TIGIT de la superficie celular se expresó mediante subconjuntos de linfocitos T CD8+ y CD4+ infiltrantes de NSCLC (51 % y 39 %, respectivamente, FIG. 22A-22B). La FIG. 36 demuestra además que el TIGIT de la superficie celular se expresó en un gran porcentaje de linfocitos T CD8+ y CD4+ infiltrantes de NSCLC (58 % y 28 % de TIGIT+, respectivamente, FIG. 36A-36B). De forma interesante, los linfocitos T CD8+ y CD4+ periféricos del donante de tumor NSCLC también expresaron niveles más altos de TIGIT que los linfocitos de donantes sanos (FIG. 22A-22B y FIG. 36A-36B). Se obtuvieron resultados similares con un segundo conjunto de muestras de NSCLC y PBMC emparejadas y en un conjunto de muestras de carcinoma colorrectal (CRC) y PBMC emparejadas (FIG. 23 y FIG. 37). Casi todos los linfocitos T infiltrantes de tumor que expresan altos niveles de TIGIT coexpresaron PD-1, de manera consecuente con la correlación entre la expresión de TIGIT y de PD-1 descrita en la FIG. 1 (FIG. 22C).

Para extender hallazgos de los inventores en humanos a modelos preclínicos de cáncer, se caracterizaron la expresión de TIGIT por linfocitos T infiltrantes de tumores colorrectales subcutáneos de CT26 y MC38 en ratones silvestres BALB/c y C57BL6/J, respectivamente. Dos semanas después de la inoculación, cuando los tumores de CT26 y MC38 se habían establecido y crecido hasta un tamaño de 150-200 mm³, se había expresado TIGIT en aproximadamente en un 50 % de los linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor y un 25 % de linfocitos T CD4+ infiltrantes de tumor, a niveles similares a los de los linfocitos T CD8+ primarios estimulados *in vitro* (**FIG. 22D-22E** y **FIG. 26**). En ambos TIL CD8+ y CD4+ murinos, CD226 se expresó constitutivamente, y la expresión de TIGIT y PD-1 se correlacionó de nuevo estrechamente (**FIG. 22F-22G**).

Estos resultados confirmaron que los linfocitos T infiltrantes de tumor expresaron altos niveles de TIGIT y que la expresión de TIGIT se produjo en paralelo con la expresión de otros receptores coinhibidores, especialmente PD-1.

45 Ejemplo 13: La supresión de TIGIT de las respuestas de linfocitos T CD8* depende de CD226

A diferencia de PD-1 o CTLA-4, no hay pruebas bioquímicas directas de una cascada de señalización inhibidora de linfocitos T iniciada por TIGIT en *cis*. Sin embargo, los receptores coinhibidores también pueden funcionar limitando la actividad de un receptor coestimulador complementario, tal como con la supresión de la señalización de CD28 por CTLA-4. Habiendo establecido que TIGIT es un regulador negativo de los linfocitos T CD8⁺ antivíricos e infiltrantes de tumor, los inventores se preguntaron si TIGIT indujo el agotamiento de linfocitos T indirectamente a través de la supresión de su receptor coestimulador complementario, CD226, que se expresa altamente por linfocitos T CD8⁺ periféricos e infiltrantes de tumor (**FIG. 27**).

Se trató a ratones BALB/c silvestres portadores de tumores de CT26 de 150-200 mm³ con una combinación de anticuerpos anti-PD-L1 y anti-TIGIT en presencia o ausencia de anticuerpo anti-CD226 de bloqueo, o solo con anticuerpo anti-CD226. El tratamiento solo con anticuerpos anti-CD226 aceleró ligeramente el crecimiento tumoral en relación con los ratones control, dando como resultado una mediana de supervivencia disminuida de 2 días (solo anticuerpos anti-CD226 versus control, *P* = 0,0118, **FIG. 28A-28B**). De manera sorprendente, la adición de anticuerpos de bloqueo anti-CD226 a ratones tratados con anticuerpos de cobloqueo anti-TIGIT y anti-PD-L1 potenció en gran medida el crecimiento tumoral y revirtió por completo la eficacia del cobloqueo de TIGIT/PD-L1 en la regresión tumoral y la supervivencia (**FIG. 28A-28B**). Se observó un efecto similar en la concentración de LCMV en ratones con infección crónica tratados con anticuerpos anti-TIGIT, anti-PD-L1 y/o anti-CD226 (**FIG. 19D**). Estos datos indicaron que CD226 contribuyó a las respuestas antitumorales y otras respuestas crónicas de linfocitos T, y que TIGIT suprimió estas respuestas al menos en parte mediante la supresión de CD226.

Para comprender mejor cómo afectó la actividad de TIGIT y CD226 a las respuestas de linfocitos T antitumorales, se sometió a prueba la influencia de CD226 solo y junto con TIGIT sobre la activación de linfocitos T, la infiltración tumoral y la función efectora. Se analizaron los tumores y los ganglios linfáticos que drenan los tumores de ratones portadores de tumor de CT26 tratados como anteriormente durante siete días. Como antes, el cobloqueo de PD-L1 y TIGIT potenció la producción de IFNy tanto de linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor como de residentes en los ganglios linfáticos que drenan el tumor (incremento del 130 % y 99 %, respectivamente, P <0 001, FIG. 28C-28D). El bloqueo solo de CD226 no tuvo ningún efecto sobre la producción de IFNy por linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor y residentes en los ganglios linfáticos que drenan el tumor, lo que sugiere que los efectos de la coestimulación de CD226 ya eran limitados en los linfocitos T agotados (FIG. 28C-28E). Sin embargo, el bloqueo de CD226 deterioró tanto la frecuencia como la función efectora de los linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor en ratones tratados con la combinación de anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD-L1 (disminución del 57 %, P = 0,0015, FIG. 28D). El tratamiento con anticuerpo anti-CD226 no tuvo dicho efecto sobre los linfocitos T CD8+ residentes en los ganglios linfáticos que drenan los tumores, mientras que el tratamiento solo con anticuerpo anti-PD-L1 potenció la función efectora de los linfocitos T CD8⁺. lo que sugiere que el bloqueo de PD-L1 fue suficiente para potenciar la función efectora de los linfocitos T CD8+, incluso en ausencia de CD226. El bloqueo de CD226 también dio como resultado una frecuencia reducida de linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor (reducción del 53 %, P = 0,0044, FIG. 28E-28F). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que CD226 funciona para soportar tanto la acumulación como la función efectora de los linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor, y que TIGIT contrarresta a estos últimos.

10

15

20

25

30

35

55

60

65

Ejemplo 14: TIGIT perjudica la función de CD226 al alterar directamente la homodimerización de CD226

Para someter a prueba si TIGIT puede antagonizar la actividad de CD226 en *cis*, se sometió a prueba el efecto de TIGIT sobre la coestimulación de CD226 *in vitro*. Los linfocitos T CD8⁺ deficientes en TIGIT estimulados con niveles subóptimos de anticuerpos anti-CD3 respondieron de manera más sólida a la coestimulación con PVR que los linfocitos T CD8⁺ de ratones de la camada silvestre, y esta respuesta potenciada dependía de CD226 (incremento del 46 % en la proliferación, *P* = 0,0061, **FIG. 29A**). De manera consecuente con estos datos, los linfocitos T CD8⁺ naturales, estimulados con anticuerpos anti-CD3 y PVR a niveles subóptimos, proliferaron de manera más sólida en presencia de anticuerpos anti-TIGIT que en presencia de anticuerpos de control de isotipo emparejado, y este efecto también fue dependiente de CD226 (incremento del 105 % en la proliferación, *P* = 0,0010, **FIG. 29B**).

Para someter a prueba la relevancia de TIGIT para los linfocitos T CD8⁺ humanos primarios, se purificaron linfocitos T CD8⁺ de sangre de donantes sanos y se estimularon con niveles subóptimos de anticuerpo anti-CD3 unido a placa y proteína de fusión PVR-Fc humana recombinante. En presencia de anticuerpos de control de isotipos emparejados, la coestimulación con PVR potenció moderadamente la estimulación y proliferación de linfocitos T. Además, la adición de anticuerpos anti-TIGIT de bloqueo potenció significativamente los efectos de la coestimulación con PVR, de manera consecuente con los efectos de TIGIT sobre los linfocitos T CD8⁺ murinos primarios (incremento del 69 % en la proliferación, *P* = 0,0071, **FIG. 29C**). Estos datos demostraron un papel intrínseco celular para la inhibición por TIGIT de la función de CD226 en linfocitos T CD8⁺ murinos y humanos primarios.

Se usó TR-FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia con resolución temporal) para determinar el mecanismo molecular por el cual TIGIT perjudicaba la actividad de CD226. En primer lugar, se expresaron y etiquetaron ST-CD226 humanos con fluoróforos donantes y aceptadores no penetrantes. Estas células proporcionaron una fuerte señal de FRET, confirmando la capacidad de CD226 para homodimerizarse (FIG. 29D). Para monitorizar las interacciones entre CD226 y TIGIT en la superficie celular, se expresó ST-CD226 en ausencia o presencia de HA-TIGIT humano que se marcó con el sustrato SNAP-tag y un anticuerpo anti-HA, respectivamente. De manera sorprendente, la coexpresión de cantidades crecientes de TIGIT (monitorizado por ELISA) atenuó la señal de FRET de CD226/CD226, lo que indica que TIGIT podría alterar la homodimerización de CD226 (FIG. 29E). De hecho, el aceptador CD226 y el donante TIGIT también dieron como resultado una señal de FRET significativa, lo que indica una interacción directa entre estas dos proteínas (FIG. 29F). Esta interacción se confirmó adicionalmente por coinmunoprecipitación (FIG. 29G). Estos datos demostraron que TIGIT y CD226 interactúan directamente en la superficie celular, y que esta interacción puede perjudicar la homodimerización de CD226.

Para someter a prueba los efectos del bloqueo con anticuerpos contra TIGIT sobre la interacción TIGIT-CD226, nuevamente se coexpresaron ST-CD226 y HA-TIGIT humanos, esta vez en presencia o ausencia de anticuerpos de bloqueo contra TIGIT humano. La adición de anticuerpos anti-TIGIT a los cultivos celulares redujo significativamente la capacidad de TIGIT y CD226 para asociarse (**FIG. 29H**). Estos datos sugieren que el tratamiento anti-TIGIT puede limitar la interacción de TIGIT con CD226, y son consecuentes con la noción de que la supresión de la actividad de CD226 es un mecanismo de acción clave por el cual TIGIT ejerce el agotamiento de los linfocitos T CD8⁺. Esto también es consecuente con la capacidad de los anticuerpos anti-TIGIT de mejorar la coestimulación de CD226.

A continuación, se confirmó la capacidad de TIGIT y CD226 endógenos para interactuar (**FIG. 30**). Se estimularon linfocitos T humanos primarios *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, se clasificaron en base a la expresión de TIGIT, se dejaron reposar, se reestimularon y se marcaron con anticuerpos contra TIGIT y CD226 endógenos que se conjugaron con fluoróforos compatibles con TR-FRET. Los linfocitos T que expresaban TIGIT marcados con anticuerpos anti-TIGIT conjugados con donantes y anticuerpos anti-CD226 conjugados con aceptadores proporcionaron una señal fuerte de FRET (**FIG. 30**). Por el contrario, solo se detectó una señal FRET insignificante en

los linfocitos T que no expresaban TIGIT o que estaban marcados con anticuerpos anti-TIGIT conjugados con donantes y anticuerpos anti-HVEM conjugados con aceptadores (**FIG. 30**), confirmando la especificidad de la interacción detectada entre TIGIT y CD226 endógenos.

Estos resultados demuestran que TIGIT y CD226 endógenos pueden interactuar directamente en la superficie celular, y que esta interacción perjudica la homodimerización de CD226. Dado el papel de CD226 como coestimulador de las respuestas de los linfocitos T *in vivo*, y sin quedar vinculado a ninguna teoría, se cree que la supresión de CD226 puede ser un mecanismo de acción clave por el cual TIGIT ejerce el agotamiento de los linfocitos T CD8⁺ durante una infección vírica crónica y durante un cáncer.

Materiales y procedimientos

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia con resolución temporal con líneas celulares transfectadas. Se transfectaron células CHO con CD226 marcado con SNAP en su extremo N (ST) y HA-TIGIT en su extremo N usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies) y se cultivaron en una placa blanca de 96 pocillos (Costar) a 100.000 células por pocillo. 24 horas después, se marcaron las células para medir la TR-FRET entre el SNAP-donante y el SNAP-aceptador o entre el SNAP-aceptador y el anticuerpo anti-HA donante. 1) Marcado de SNAP-donante / SNAP-aceptador: Se incubaron las células con bencil-quanina SNAP-Lumi-4Tb conjugada con donante 100 nM (Cisbio) y bencil-quanina SNAP-A647 conjugada con aceptador 1 µM (New England Biolabs) diluidas en FCS al 10 % en DMEM durante 1 h a 37 °C, CO2 al 5 %. A continuación, se lavaron las células tres veces en PBS antes de leer la señal de FRET. 2) SNAP-aceptador/anticuerpo anti-HA donante: Se incubaron las células con bencilguanina SNAP-A647 conjugada con aceptador 1 µM diluido en FCS al 10 % en DMEM durante 1 h a 37 °C, CO2 al 5 %. Después de tres lavados en PBS, las células se incubaron durante 2 horas con anticuerpo anti-HA Lumi-4Tb (Cisbio) 2 nM en PBS + BSA al 0,2 % a temperatura ambiente. A continuación, la señal de FRET se registró a 665 nm durante 400 µs después de un retardo de 60 µs tras la excitación con láser a 343 nm usando un lector de placas Safire2 (Tecan). Cuando se sometió a prueba el anticuerpo anti-TIGIT a una concentración final de 10 µg/ml, la señal de FRET también se registró después de 15 min de incubación. Para la interacción Flag-ST-CD226/Flag-ST-CD226, la proporción de FRET se calculó como la intensidad de FRET dividida por la emisión del donante a 620 nm, que es proporcional a la expresión de CD226. La intensidad de FRET es: (señal a 665 nm de células marcadas con SNAPdonante y aceptador) — (señal a 665 nm del mismo lote de células transfectadas marcadas solo con SNAP-donante). Para la interacción Flag-ST-CD226/HA-TIGIT, la proporción de FRET representa la intensidad de FRET dividida por la expresión de Flag-ST-CD226 medida por un ELISA de anticuerpo anti-Flag. En ese caso, la intensidad FRET = (señal a 665 nm de células marcadas con SNAP-aceptador y anticuerpo anti-HA donante) — (señal a 665 nm de células transfectadas simuladas marcadas con SNAP-receptor y anticuerpo anti-HA donante).

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia con resolución temporal con linfocitos T humanos. Anticuerpos anti-TIGIT (clon 1F4 de Genentech), anti-CD226 (Santa Cruz Biotechnology) y anti-HVEM (eBioscience) humanos se conjugaron con fluoróforos compatibles con TR-FRET (Cisbio). Los linfocitos T humanos primarios se enriquecieron por MACS a partir de sangre y se estimularon in vitro con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa durante 72 horas. A continuación los linfocitos T que expresaban y no expresaban TIGIT (todos expresaban CD226) se clasificaron, se dejaron reposar sin estimulación durante 72 horas y se volvieron a estimular durante 48 horas. A continuación, cada población se lavó una vez con tampón Tris-KREBS (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 118 mM, glucosa 5,6 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 1,8 mM) y se cultivó en las siguientes condiciones, por triplicado: 1) Anticuerpo anti-TIGIT-Lumi4-Tb (5 μg/ml), 2) Anticuerpo anti-TIGIT-Lumi4-Tb (5 μg/ml) + anti-HVEM-d2 (10 μg/ml), 3) Anticuerpo anti-TIGIT-Lumi4-Tb (5 μg/ml) + anti-CD226 (10 μg/ml), 4) Anticuerpo anti-TIGIT-Lumi4-Tb (5 μg/ml) + anti-CD226 (10 μg/ml) + Anticuerpo anti-TIGIT frío (clon 1F4) (50 μg/ml). Las concentraciones indicadas se optimizaron para garantizar la señal de FRET más alta. Las células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un rotador y a continuación se lavaron 3 veces en tampón Tris-KREBS. A continuación, se cultivaron linfocitos T a 400.000 células/pocillo en una placa blanca de 96 pocillos (Costar) y se registró la TR-FRET a 665 nm durante 400 µs después de un retardo de 60 µs tras la excitación con láser a 343 nm usando un lector de placas PHERAstar (BMG Labtech). La intensidad de FRET se expresó como la señal a 665 nm de las células marcadas con anticuerpo-Lumi4-Tb + anticuerpo-d2 menos la señal a 665 nm del mismo lote de células marcadas solo con anticuerpo-Lumi4-Tb. La señal de FRET no específica se obtuvo con linfocitos T incubados con Lumi4-Tb + d2 + un exceso de anticuerpo frío.

Coinmunoprecipitación. En resumen, se cotransfectaron células COS-7 en placas de 15 cm con plásmidos de expresión que contenían el ADNc para proteínas marcadas TIGIT-HA (5 ng) o CD226-Flag (10 ng), o un plásmido de control (pRK). 23 horas después de la transfección, las células se lavaron con PBS y se recogieron en 4 ml de PBS enfriado con hielo y se centrifugaron a 300 x g durante 5 min y los sedimentos celulares se resuspendieron en 2 ml de tampón de lisis a 4 °C. Las células se lisaron durante 50 min con agitación en vórtex cada 15 min y posteriormente se centrifugaron a 10,00 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se eliminó previamente con 160 µl de suspensión en Sepharose de CL6B mediante agitación durante 30 min a 4 °C, y se centrifugó durante 2 min a 3000 x g. El sobrenadante se dividió por igual en dos tubos y se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-HA o un anticuerpo anti-Flag usando procedimientos estándar. Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a SDS-PAGE y se inmunoelectrotransfirieron. Las inmunoelectrotransferencias se exploraron con anticuerpos anti-Flag-HRP o anti-HA-HRP.

LISTADO DE SECUENCIAS

```
<110> GENENTECH, INC.
            F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
 5
            GROGAN, Jane
            JOHNSTON, Robert J.
            IRVING, Bryan
            HACKNEY, Jason
            YU, Xin
            EATON, Dan
10
            BOWLES, Kristin
            COMPS-AGRAR, Laetitia
      <120> PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR EL CÁNCER USANDO
      ANTAGONISTAS DE UNIÓN AL EJE DE PD-1 E INHIBIDORES DE TIGIT
15
      <130> 14639-2025940
      <140> Aún sin asignar
20
      <141> Conjuntamente con la presente
      <150> US 61/846.941
      <151> 16/07/2013
25
      <150> US 61/865.582
      <151> 13/08/2013
      <150> US 61/950.754
      <151> 10/03/2014
30
      <150> US 61/985.884
      <151> 29/04/2014
      <150> US 61/992.109
      <151> 12/05/2014
35
      <160>49
      <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
40
      <210> 1
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
45
      <220>
      <223> Construcción sintética
      <400> 1
      Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Tyr Ser Gly Val Lys Glu Asn Leu Leu
                           5
       1
                                                   10
                                                                            15
      Ala
50
      <210> 2
      <211> 6
      <212> PRT
55
      <213> Secuencia artificial
      <223> Construcción sintética
60
      <400> 2
      Ala Ser Ile Arg Phe Thr
       1
                           5
```

```
<210> 3
     <211> 9
      <212> PRT
 5
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
10
      <400> 3
      Gln Gln Gly Ile Asn Asn Pro Leu Thr
                          5
     <210> 4
     <211> 10
15
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
20
      <400> 4
      Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Thr Met His
       1
                           5
                                                  10
     <210> 5
25
     <211> 17
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <220>
30
     <223> Construcción sintética
     <400> 5
     Phe Ile Arg Ser Gly Ser Gly Ile Val Phe Tyr Ala Asp Ala Val Arg
                          5
      Gly
35
     <210> 6
     <211> 10
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
40
     <220>
     <223> Construcción sintética
     <400> 6
     Arg Pro Leu Gly His Asn Thr Phe Asp Ser
                          5
                                                  10
45
     <210> 7
     <211> 16
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
50
      <220>
      <223> Construcción sintética
      <400> 7
      Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser
                                                  10
55
     <210>8
```

```
<211> 7
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
 5
     <223> Construcción sintética
      <400> 8
      Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
                           5
10
     <210>9
     <211> 9
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
15
     <220>
     <223> Construcción sintética
     <400> 9
      Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Pro Thr
                           5
20
     <210> 10
     <211> 10
     <212> PRT
25
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
     <400> 10
30
      Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His Leu Met Asn
     <210> 11
      <211> 17
      <212> PRT
35
      <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
40
      Leu Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
                           5
       1
                                                                            15
      Gly
     <210> 12
45
     <211> 10
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
     <220>
50
     <223> Construcción sintética
      <400> 12
      Gly Leu Arg Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
                           5
                                                   10
55
     <210> 13
     <211> 114
      <212> PRT
```

```
<220>
     <223> Construcción sintética
5
     <400> 13
     Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
     Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Tyr Ser
     Gly Val Lys Glu Asn Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
     Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ile Arg Phe Thr Gly Val
                               55
     Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr
                                                75
     Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Met Gly Gln Tyr Phe Cys Gln Gln
                                            90
     Gly Ile Asn Asn Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile
                  100
                                       105
     Lys Arg
     <210> 14
     <211> 112
10
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
15
     <400> 14
     Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser Phe Gly
      1
                                            10
     Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asn Ser
                  20
                                       25
     Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
                                   40
                                                        45
     Pro Gln Leu Leu Ile Phe Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
                               55
                                                    60
     Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
                          70
                                                75
     Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
     Thr His Gln Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
20
     <210> 15
     <211> 119
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
25
     <220>
     <223> Construcción sintética
     <400> 15
     Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Thr Gln Pro Gly Lys
                                           10
     Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
     Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
30
```

<213> Secuencia artificial

```
Ala Phe Ile Arg Ser Gly Ser Gly Ile Val Phe Tyr Ala Asp Ala Val
    50
                          55
                                                60
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe
                      70
                                           75
Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                                       90
Ala Arg Arg Pro Leu Gly His Asn Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
             100
                                   105
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
<210> 16
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 16
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
                                       10
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His
Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
                               40
Gly Leu Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
    50
                                                60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65
                      70
                                           75
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                 85
                                       90
Ser Arg Gly Leu Arg Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
             100
                                   105
                                                         110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 17
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
                   5
<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                   5
                                                              15
 1
                                        10
 Lys Gly
```

5

10

15

20

25

30

35

<210> 19

```
<211>9
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
 5
     <223> Construcción sintética
     <400> 19
      Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
10
     <210> 20
     <211> 11
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
15
     <220>
     <223> Construcción sintética
     <400> 20
      Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
                          5
       1
                                                 10
20
     <210> 21
     <211> 7
     <212> PRT
25
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
30
     <400> 21
     Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
     <210> 22
     <211>9
     <212> PRT
35
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
40
     <400> 22
     Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
                          5
      1
     <210> 23
45
     <211> 118
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <220>
50
     <223> Construcción sintética
     <400> 23
      Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
                                                  10
      Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
                                             25
      Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35
                                        40
                                                                45
```

```
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                           55
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
                      70
                                            75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                                       90
                  85
                                                             95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
             100
                                   105
Leu Val Thr Val Ser Ala
         115
<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 24
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1
                  5
                                       10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
             20
                                   25
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                                                    45
                              40
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                          55
                                                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
             100
                                   105
<210> 25
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 25
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
              20
<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 26
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1
                   5
                                        10
<210> 27
```

5

10

15

20

25

30

35

```
<211> 32
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
 5
     <223> Construcción sintética
     <400> 27
      Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
                                                  10
      Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
                     20
10
     <210> 28
     <211> 11
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
15
     <220>
     <223> Construcción sintética
     <400> 28
      Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
20
     <210> 29
     <211> 23
     <212> PRT
25
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
30
     <400> 29
     Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
                                                                          15
     Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
                    20
     <210> 30
     <211> 15
     <212> PRT
35
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
40
      Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
                          5
                                                 10
                                                                         15
     <210> 31
45
     <211> 32
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <220>
50
     <223> Construcción sintética
     <400> 31
```

```
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
       1
                           5
                                                  10
      Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
                     20
                                             25
                                                                     30
     <210> 32
     <211> 11
 5
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <223> Construcción sintética
10
      Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                           5
     <210> 33
15
     <211> 10
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <220>
20
     <223> Construcción sintética
     <221> VARIANTE
     <222> 6
25
     <223> Xaa = Asp o Gly
     <400> 33
      Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His
     <210> 34
30
     <211> 18
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <220>
35
     <223> Construcción sintética
     <220>
     <221> VARIANTE
40
     <222> 4
     <223> Xaa = Ser o Leu
     <220>
     <221> VARIANTE
45
     <222> 10
     <223> Xaa = Thr o Ser
     <400> 34
      Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                          5
                                                 10
                                                                          15
     Lys Gly
50
     <210> 35
     <211> 11
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
55
     <220>
```

```
<223> Construcción sintética
      <220>
      <221> VARIANTE
 5
      <222> 5
      <223> Xaa = Asp o Val
      <220>
     <221> VARIANTE
10
      <222> 6
      <223> Xaa = Val o lle
      <220>
      <221> VARIANTE
15
      <222> 7
      <223> Xaa = Ser o Asn
      <220>
      <221> VARIANTE
20
      <222> 9
      <223> Xaa = Ala o Phe
     <220>
     <221> VARIANTE
25
      <222> 10
      <223> Xaa = Val o Leu
      <400> 35
      Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala
       1
                            5
                                                     10
30
      <210> 36
      <211> 7
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
35
      <220>
      <223> Construcción sintética
     <220>
40
     <221> VARIANTE
      <222> 4
      <223> Xaa = Phe o Thr
      <220>
      <221> VARIANTE
45
      <222> 6
      <223> Xaa = Tyr o Ala
      <400> 36
      Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
                            5
50
      <210> 37
      <211> 9
      <212> PRT
55
     <213> Secuencia artificial
      <220>
      <223> Construcción sintética
60
     <220>
      <221> VARIANTE
      <222> 3
```

```
<223> Xaa = Tyr, Gly, Phe o Ser
     <220>
     <221> VARIANTE
5
     <222> 4
     <223> Xaa = Leu, Tyr, Phe o Trp
     <220>
     <221> VARIANTE
10
     <222> 5
     <223> Xaa = Tyr, Asn, Ala, Thr, Gly, Phe o lle
     <220>
     <221> VARIANTE
15
     <222> 6
     <223> Xaa = His, Val, Pro, Thr o lle
     <220>
     <221> VARIANTE
20
     <222> 8
     <223> Xaa = Ala, Trp, Arg, Pro o Thr
     Gln Gln Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
                       5
25
     <210> 38
     <211> 336
     <212> ADN
30
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
35
     <400> 38
     gatgttgtgt tgactcaaac tccactctcc ctgtctgtca gctttggaga tcaagtttct 60
     atetettgea ggtetagtea gagtettgta aacagttatg ggaacacett tttgtettgg 120
     tacctgcaca agcctggcca gtctccacag ctcctcatct ttgggatttc caacagattt 180
     tetggggtge cagacaggtt cagtggcagt ggttcaggga cagatttcac actcaagate 240
     agcacaataa agcctgagga cttgggaatg tattactgct tacaaggtac gcatcagcct 300
     cccacgttcg gtcctgggac caagctggag gtgaaa
                                                                                336
     <210> 39
     <211> 357
40
     <212> ADN
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
45
     gaggtccage tgcaacagte tggacetgag etggtgaage etggaactte aatgaagata 60
     tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggccatctta tgaactgggt gaagcagagc 120
     catggaaaga accttgagtg gattggactt attattcctt acaatggtgg tacaagctat 180
     aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240
     atggagetee teagtetgae ttetgatgae tetgeagtet atttetgtte aagaggeett 300
     aggggettet atgetatgga etaetggggt caaggaacet cagteacegt etectea
     <210> 40
50
     <211> 122
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
```

```
<220>
     <223> Construcción sintética
     <400> 40
     Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
                                            10
     Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
                  20
                                       25
     Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
     Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                              55
     Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
     Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
     Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                  100
                                       105
     Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
             115
                                   120
5
     <210> 41
     <211> 118
     <212> PRT
10
     <213> Secuencia artificial
    <220>
    <223> Construcción sintética
15
     <400> 41
     Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
     Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
     Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
     Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
     Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
                          70
     Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                                            90
     Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                  100
                                       105
     Leu Val Thr Val Ser Ser
             115
     <210> 42
     <211> 11
20
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
    <220>
     <223> Construcción sintética
25
     <400> 42
     Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                       5
    <210> 43
30
     <211> 30
     <212> PRT
```

```
<213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
 5
     <400> 43
     Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
                          5
                                                  10
      Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
                    20
                                             25
                                                                      30
     <210> 44
10
     <211> 14
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <220>
15
     <223> Construcción sintética
     <400> 44
      Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
20
     <210> 45
     <211> 11
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
25
     <220>
     <223> Construcción sintética
     <400> 45
      Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                          5
                                                 10
30
     <210> 46
     <211> 10
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
35
     <220>
     <223> Construcción sintética
     <400> 46
      Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
       1
                          5
40
     <210> 47
     <211> 15
     <212> PRT
45
     <213> Secuencia artificial
     <220>
     <223> Construcción sintética
50
     <400> 47
      Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
     <210> 48
     <211> 447
55
     <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
```

```
<220>
   <223> Construcción sintética
   <400> 48
   Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
    Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
                                    25
    Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                                40
   Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                            55
    Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
                        70
                                            75
   Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
5
    Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
               100
                                    105
    Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
                                120
    Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
                           135
    Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
                       150
                                            155
    Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                    165
                                        170
    Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
                180
                                    185
    Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
            195
                                200
    Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
                            215
                                                220
    His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
                        230
                                            235
    Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                                        250
    Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
                                    265
    Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
            275
                                280
    Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
                            295
                                                300
    Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
                                            315
                        310
    Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                    325
                                        330
    Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                                    345
    Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
                                360
    Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
                            375
                                                380
    Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
                        390
                                            395
    Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                    405
                                        410
    Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                                    425
               420
    Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
```

440

435

```
<210> 49
    <211> 214
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial
5
    <220>
    <223> Construcción sintética
    <400> 49
     Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
                                         10
                     5
     Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
                                      25
     Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                                 40
                                                      45
     Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
10
                             55
     Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
                         70
                                              75
     Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
                     85
                                          90
     Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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
                                 120
                                                      125
     Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
                             135
                                                  140
    Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
                         150
     Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                     165
                                         170
     Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
                                     185
                180
                                                          190
    Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
                                 200
    Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        210
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso como medicamento.

5

10

20

25

35

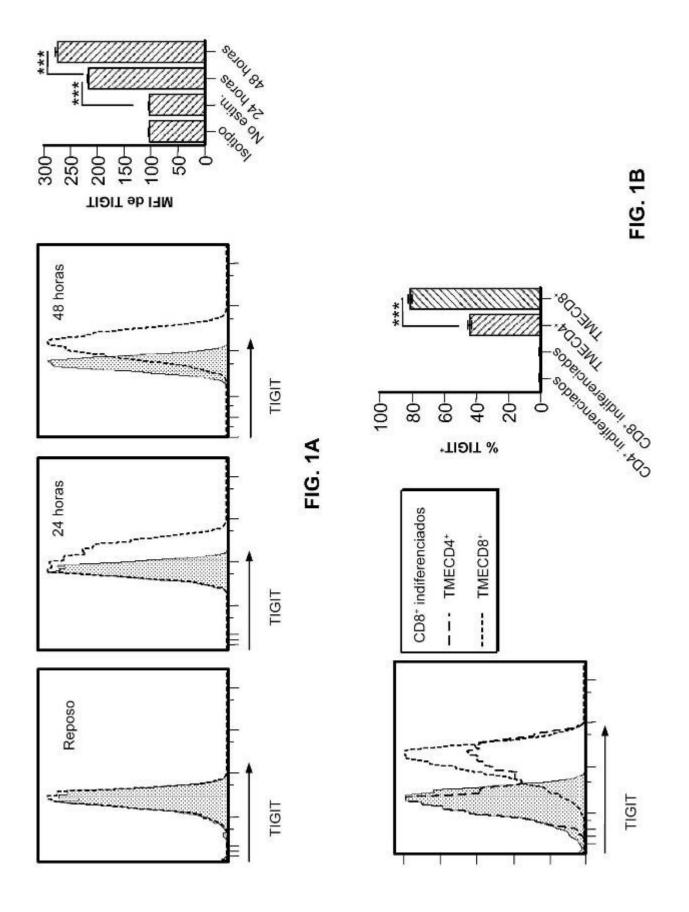
40

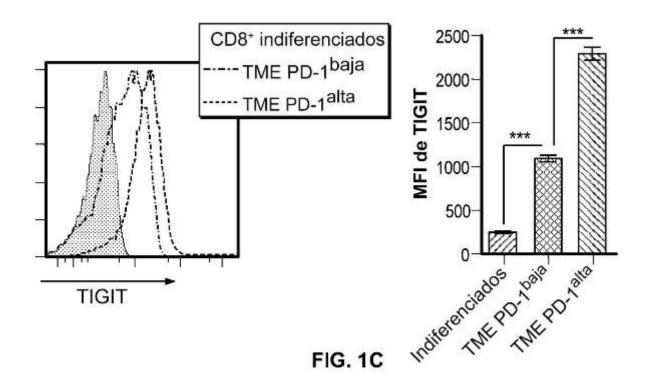
60

65

- 2. El anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso como medicamento de la reivindicación 1, en los que el medicamento es para tratar o retrasar la progresión del cáncer, reducir o inhibir la recidiva del cáncer o el cáncer, tratar o retrasar la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, o reducir o inhibir la progresión de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un individuo, en los que la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario es una infección aguda no resuelta, infección crónica o inmunidad tumoral.
- 3. El anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso como medicamento de la reivindicación 1 o 2, en los que el medicamento es para su administración combinada con al menos un agente quimioterápico.
 - 4. El anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso como medicamento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en los que el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo heteroconjugado o una inmunotoxina.
 - 5. El anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso como medicamento de la reivindicación 4, en los que el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la unión de PD-L1 a PD-1, inhibe la unión de PD-L1 a B7-1 o inhibe la unión de PD-L1 tanto a PD-1 como a B7-1.
- 6. El anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso como medicamento de la reivindicación 5, en los que el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia HVR-H1 de GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 17), una secuencia HVR-H2 de AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18) y una secuencia HVR-H3 de RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 19); y una cadena ligera que comprende una secuencia HVR-L1 de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 20), una secuencia HVR-L2 de SASFLYS (SEQ ID NO: 21) y una secuencia HVR-L3 de QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 22).
 - 7. El anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso como medicamento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en los que el cáncer es un carcinoma de pulmón no microcítico, un cáncer de células renales, un cáncer colorrectal, un cáncer de ovario, un cáncer de mama, un cáncer de páncreas, un carcinoma gástrico, un cáncer de vejiga, un cáncer de esófago, un mesotelioma, un melanoma, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de tiroides, un sarcoma, un cáncer de próstata, un glioblastoma, un cáncer de cuello uterino, un carcinoma tímico, una leucemia, un linfoma, un mieloma, micosis fungoide, cáncer de células de Merkel o una neoplasia hematológica.
- 45 8. El anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso como medicamento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en los que el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra de forma continua o intermitente.
- 9. El anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso como medicamento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en los que el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra antes del anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, simultáneamente con el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, o después del anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo.
 - 10. Un kit que comprende un anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo y un prospecto que comprende instrucciones para usar el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo para tratar o retrasar la progresión del cáncer en un individuo que tiene cáncer.
 - 11. El kit de la reivindicación 10, en el que el anticuerpo antagonista anti-TIGIT o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo heteroconjugado o una inmunotoxina.

12. El kit de la reivindicación 10 u 11, en el que el anticuerpo antagonista anti-PD-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de HVR-H1 de GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 17), una secuencia HVR-H2 de AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18) y una secuencia HVR-H3 de RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 19); y una cadena ligera que comprende una secuencia HVR-L1 de RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 20), una secuencia HVR-L2 de SASFLYS (SEQ ID NO: 21) y una secuencia HVR-L3 de QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 22).





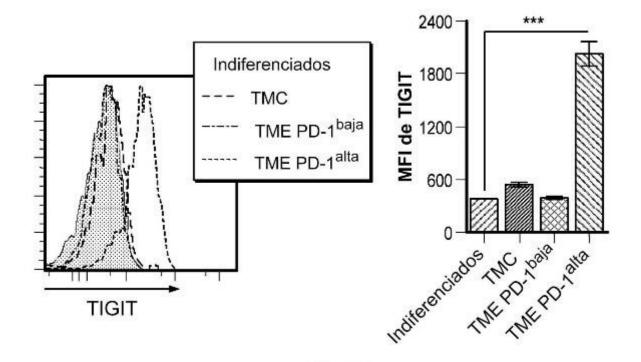
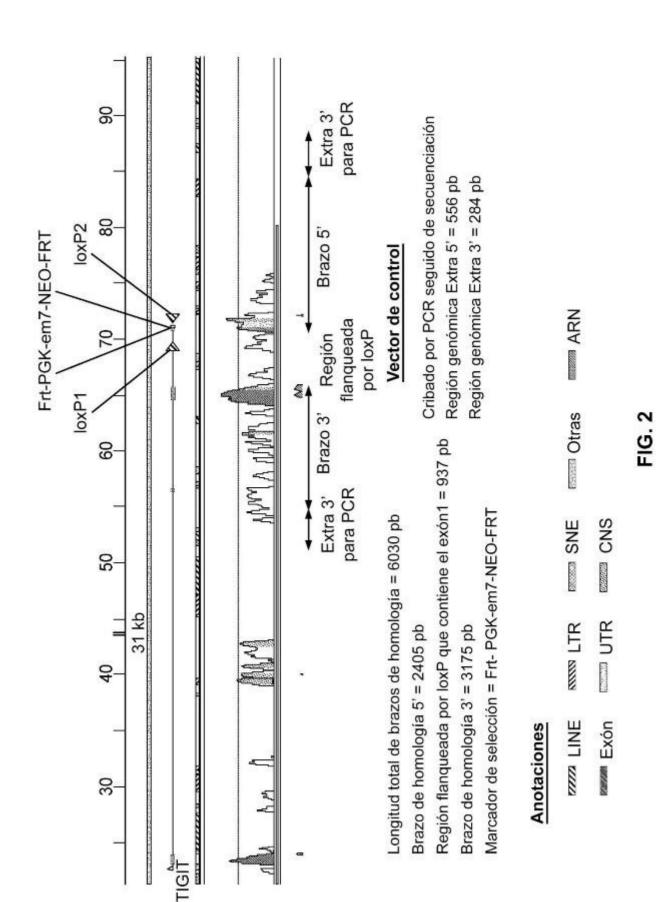
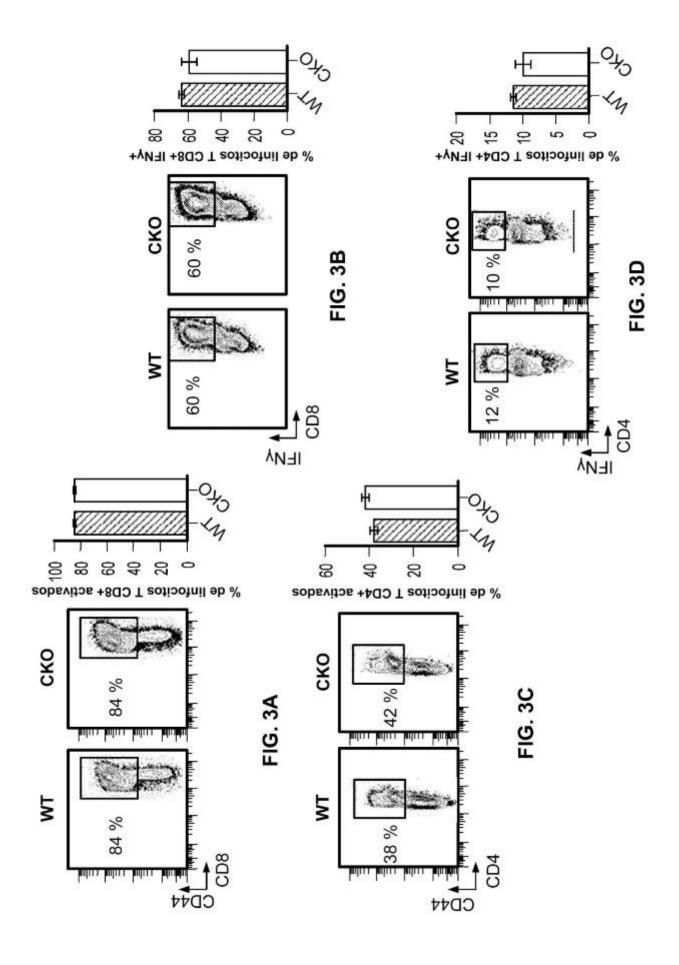
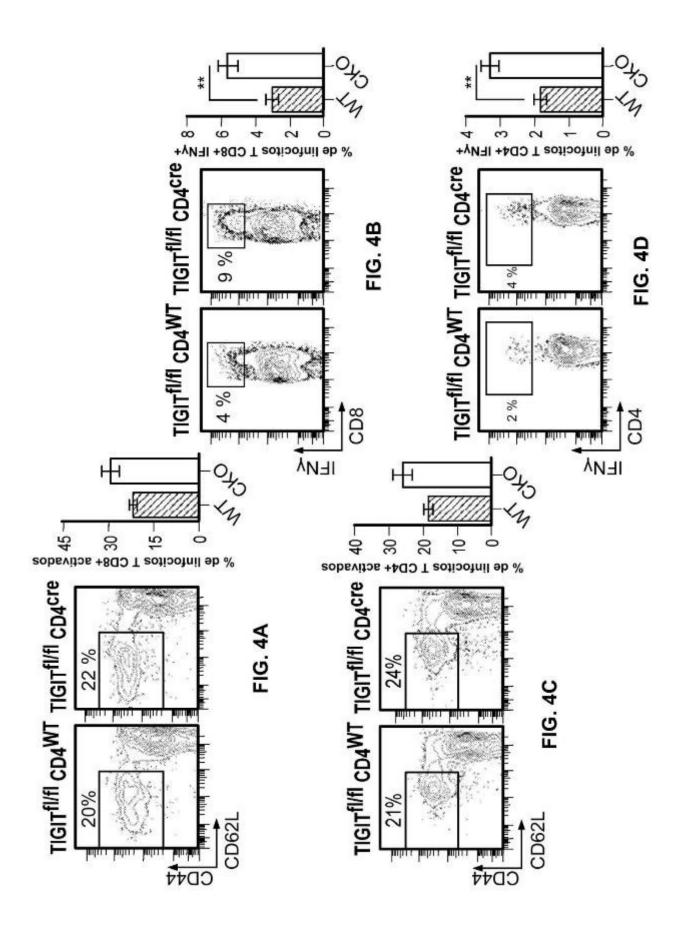


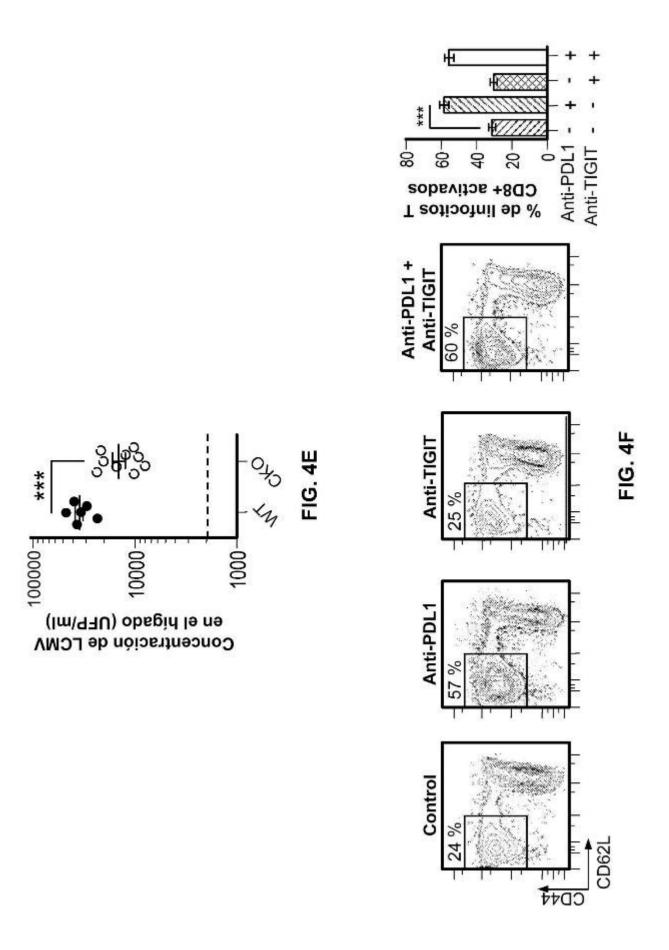
FIG. 1D

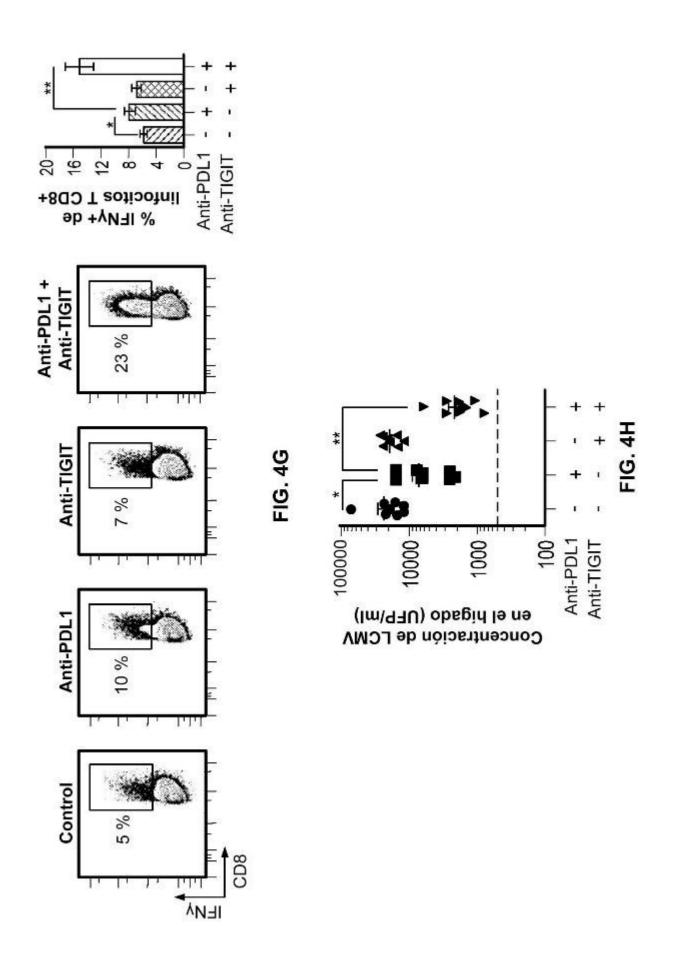


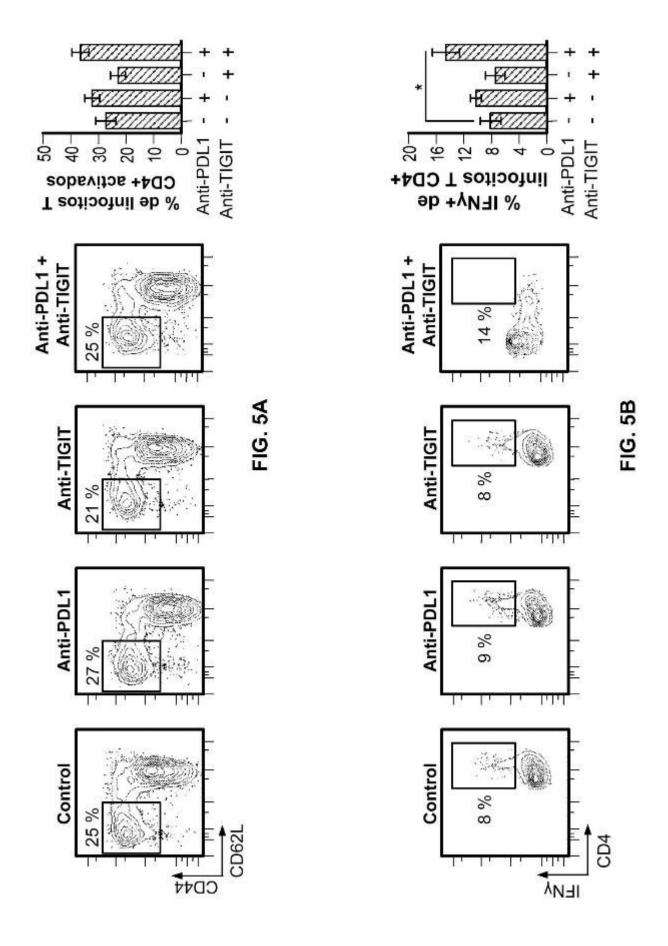
86

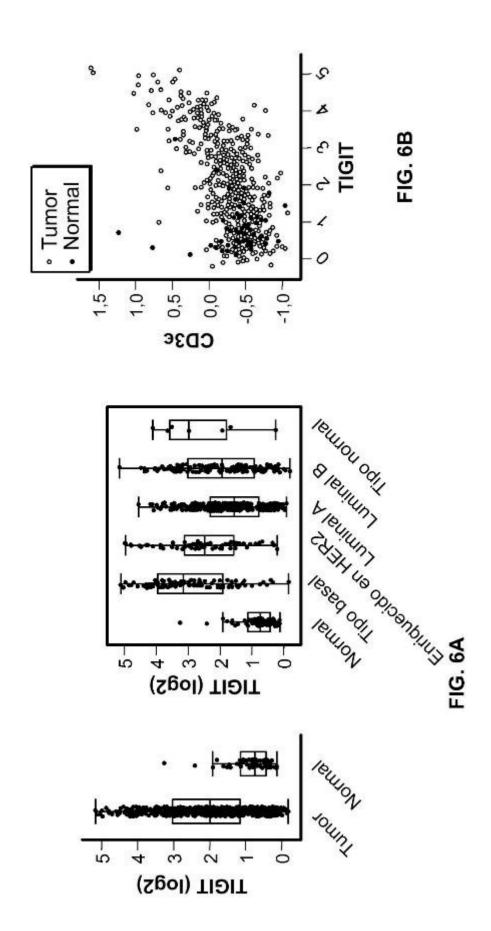


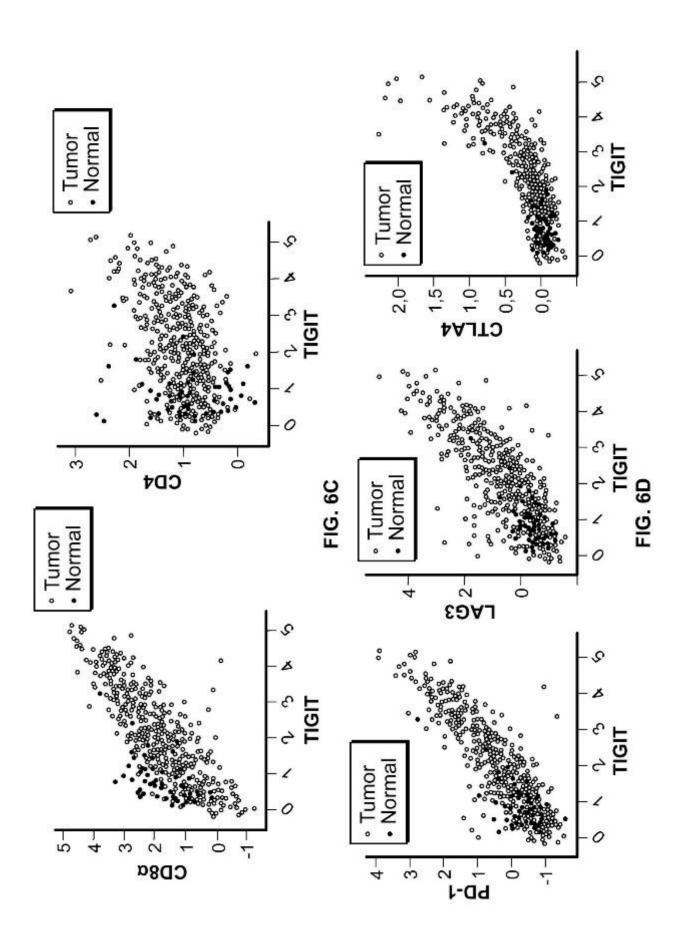


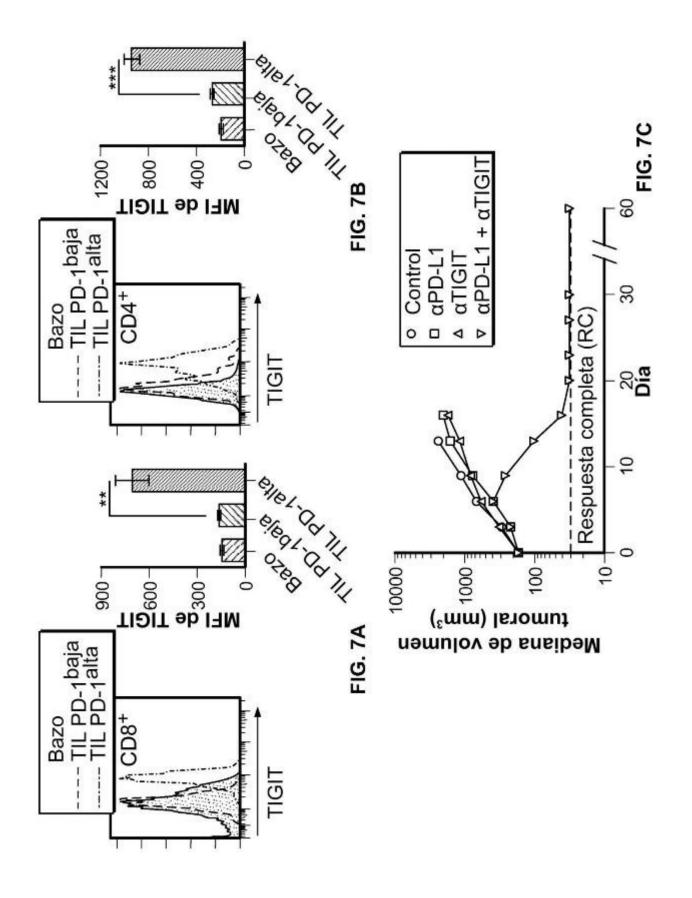


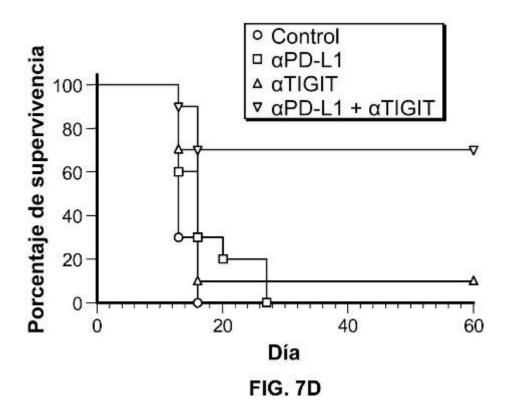


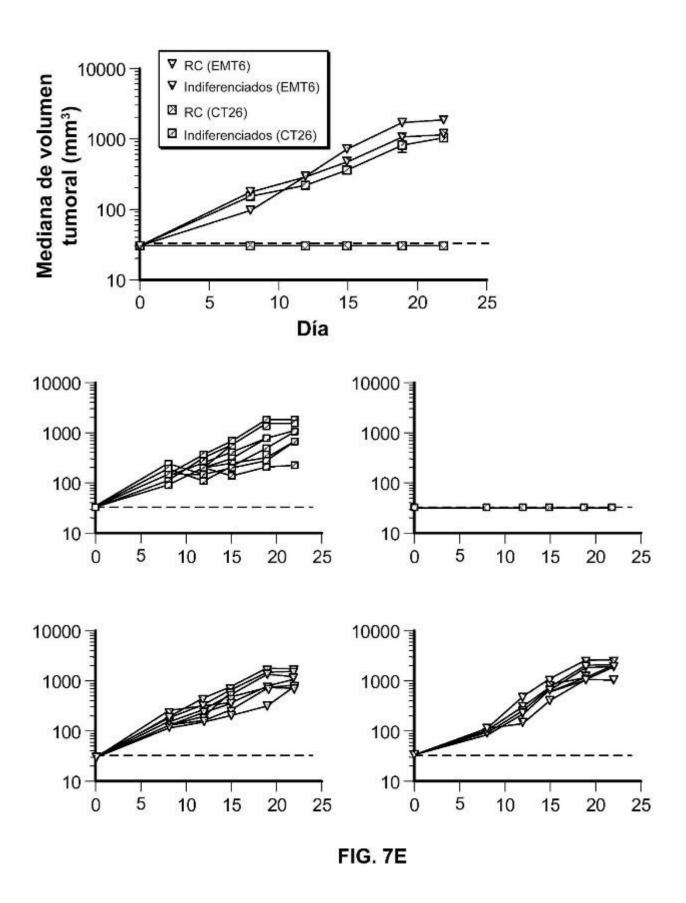


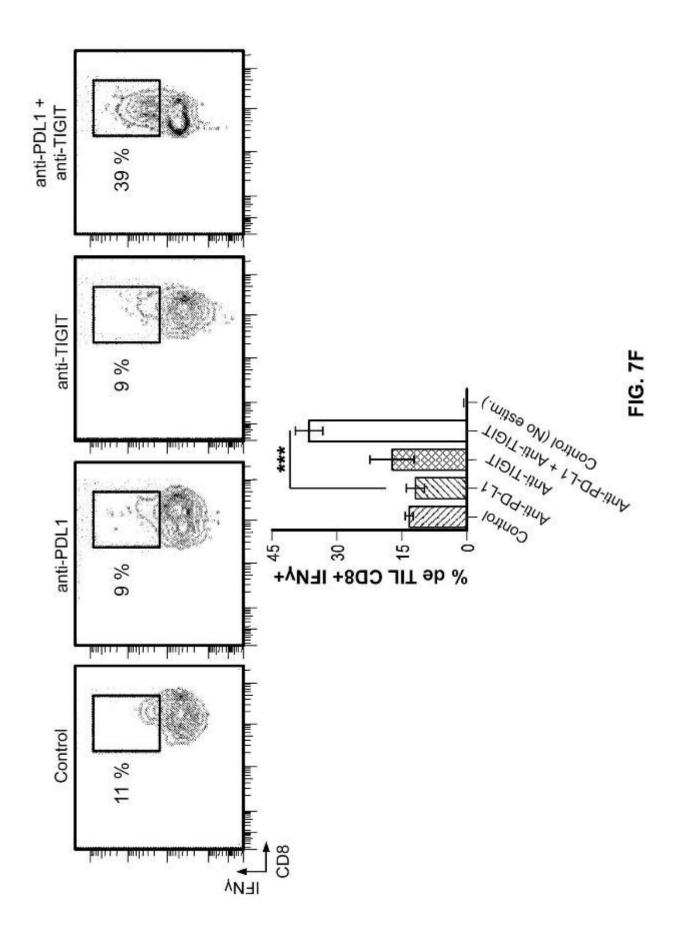


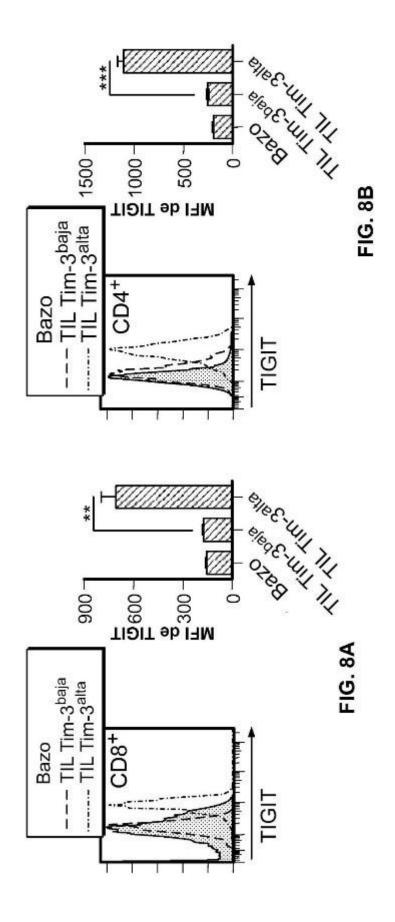












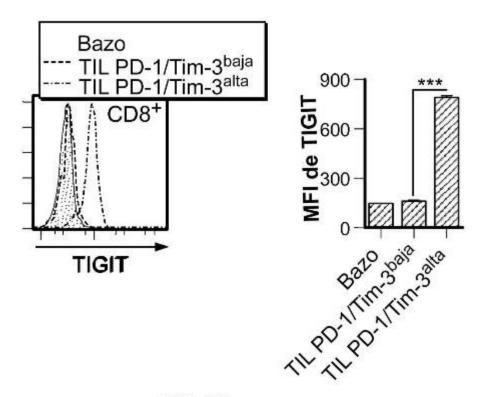


FIG. 9A

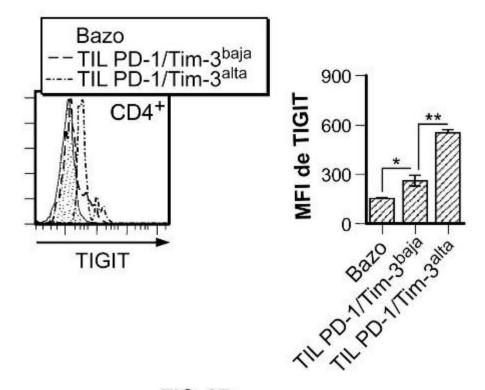
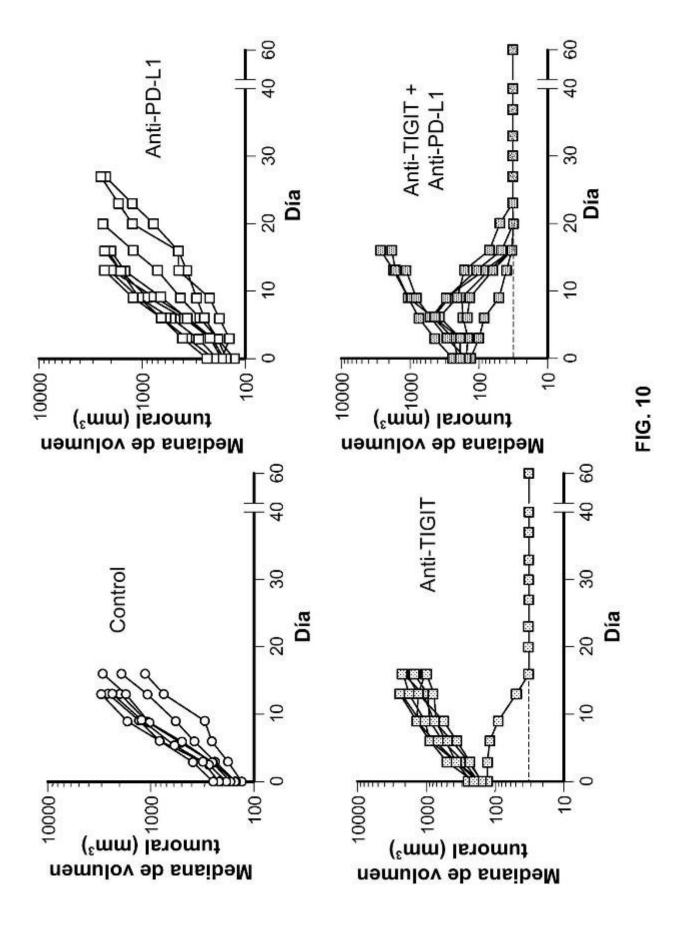
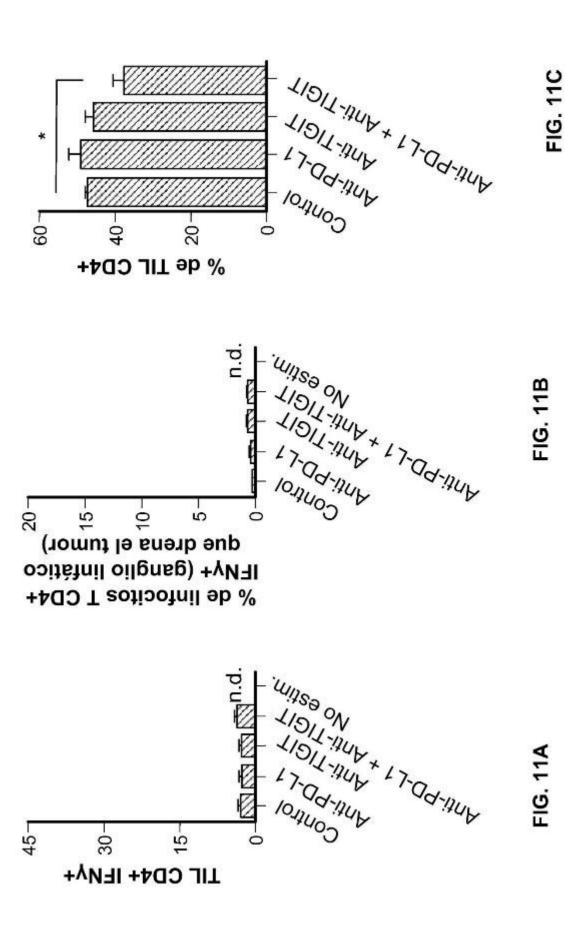


FIG. 9B

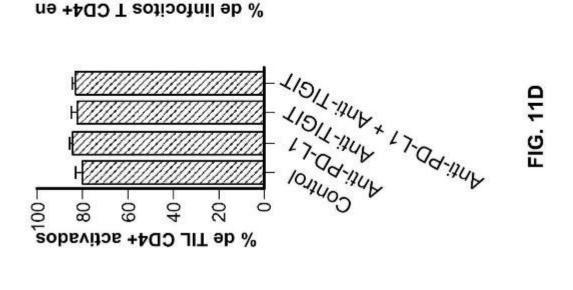




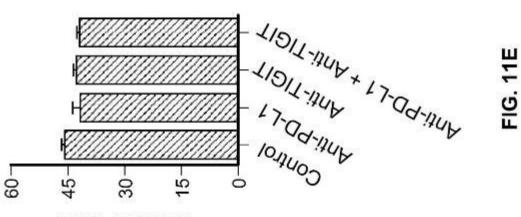
457

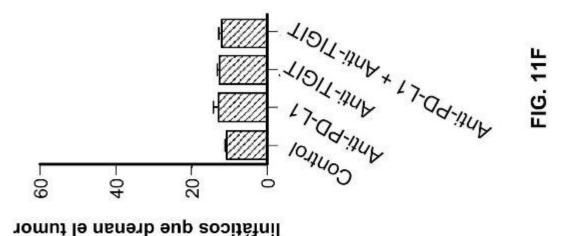
5

TIL CD4+ IFNY+

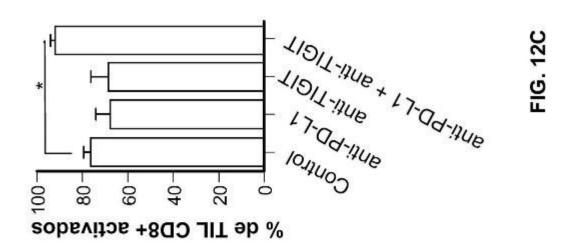


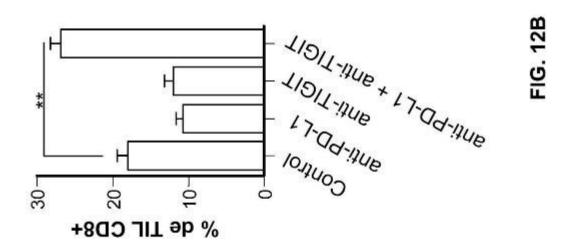
L09 45 30 5 drenan el tumor ganglios linfáticos que

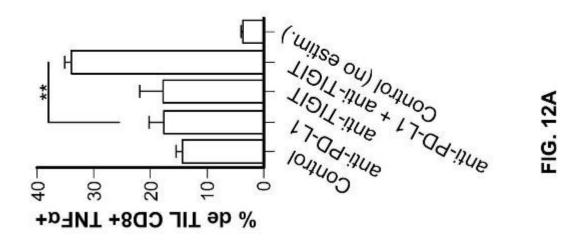


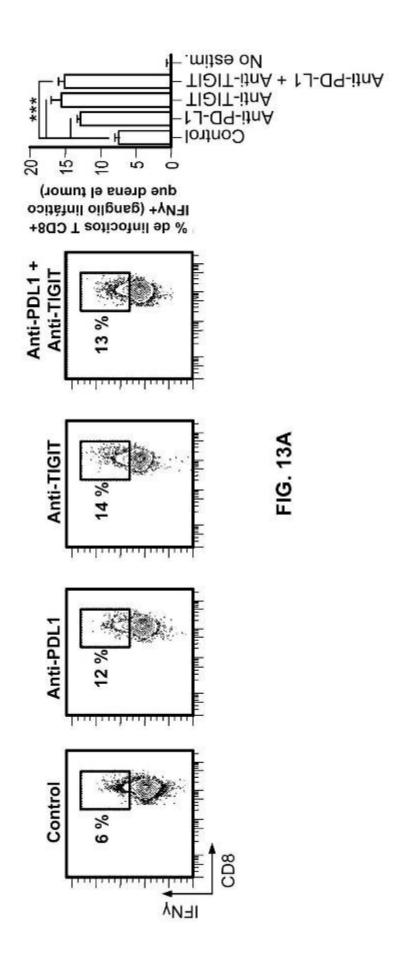


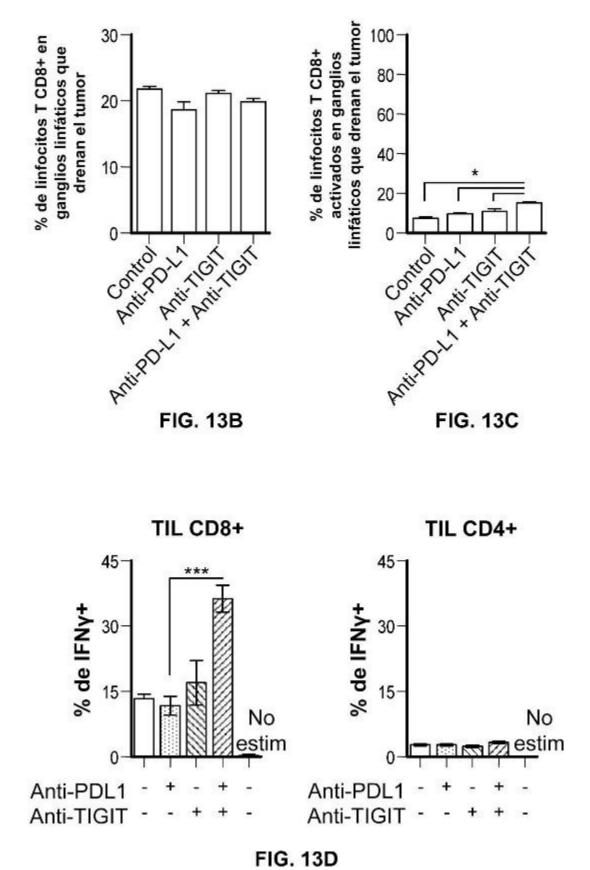
activados en ganglios % de linfocitos T CD4+



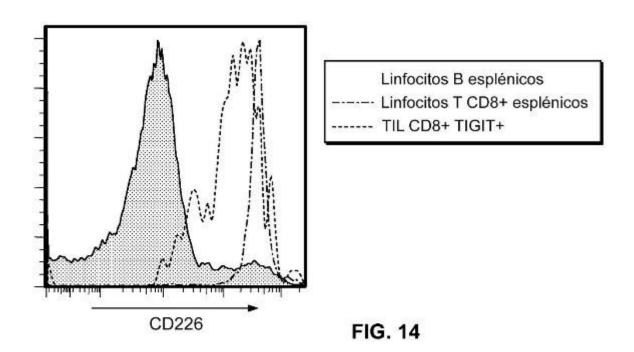


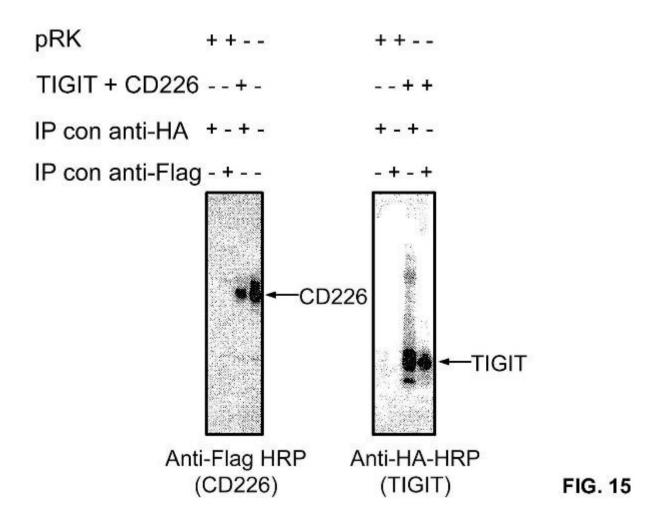






.





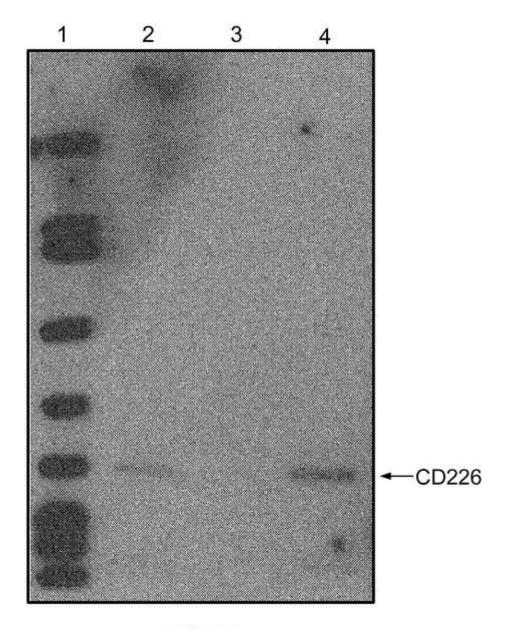
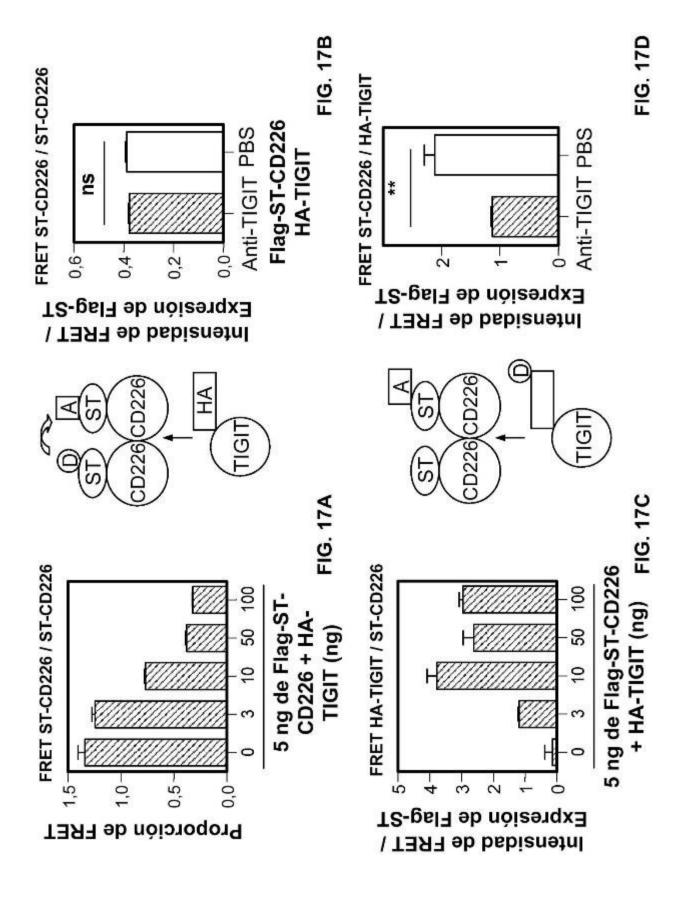
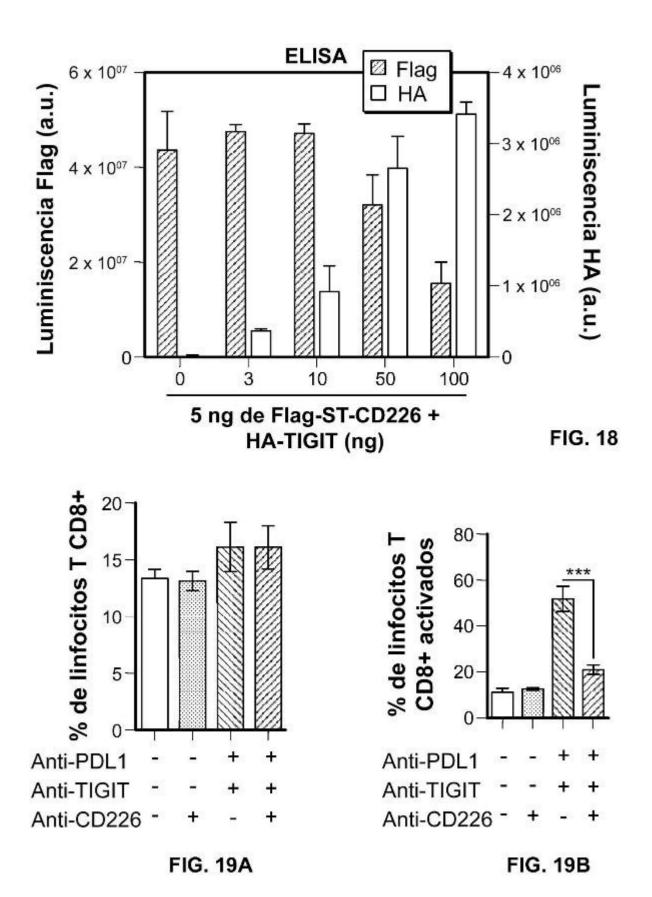
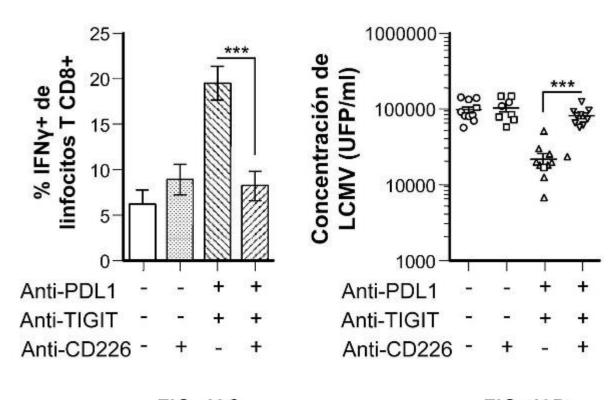


FIG. 16









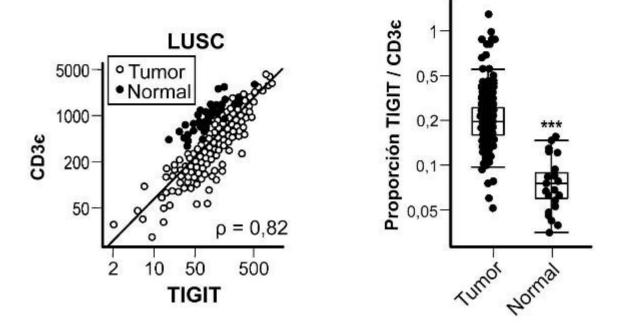
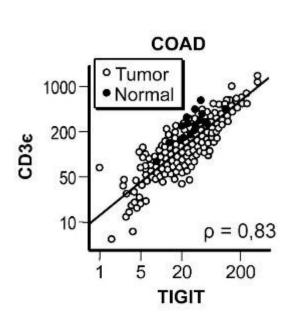


FIG. 20A



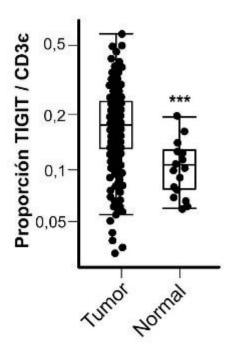
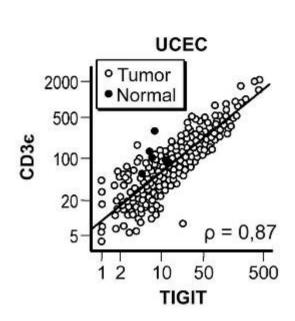


FIG. 20B



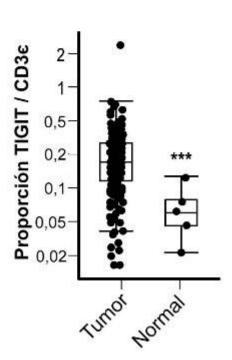
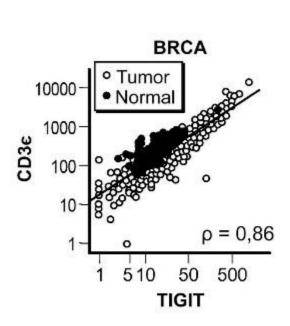


FIG. 20C



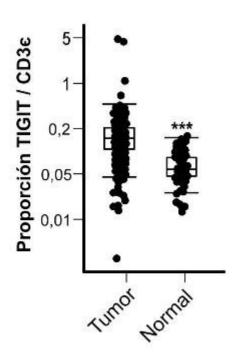
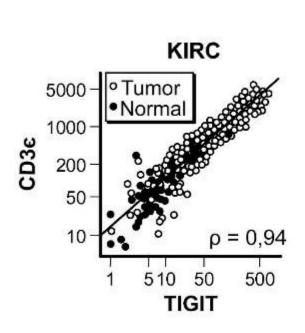


FIG. 20D



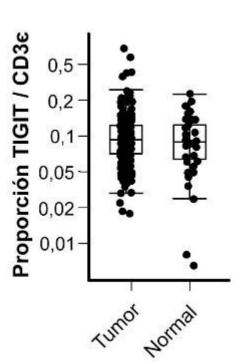


FIG. 20E

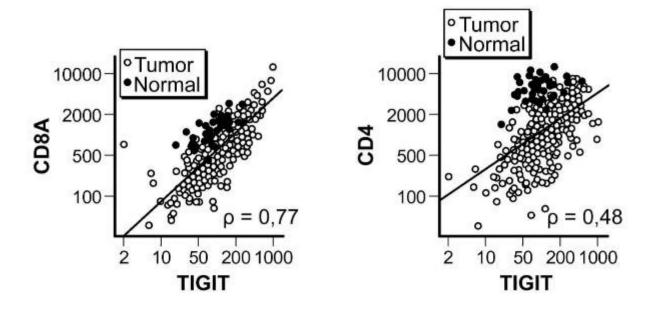
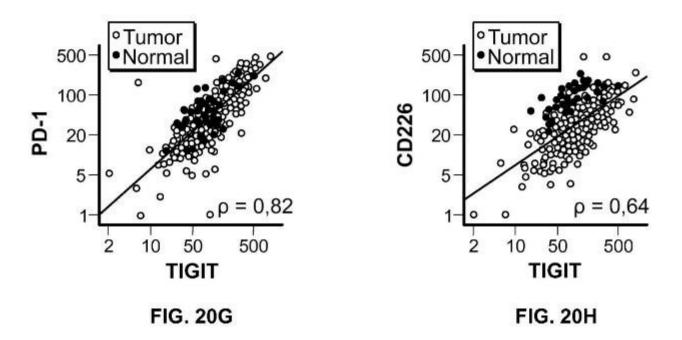


FIG. 20F



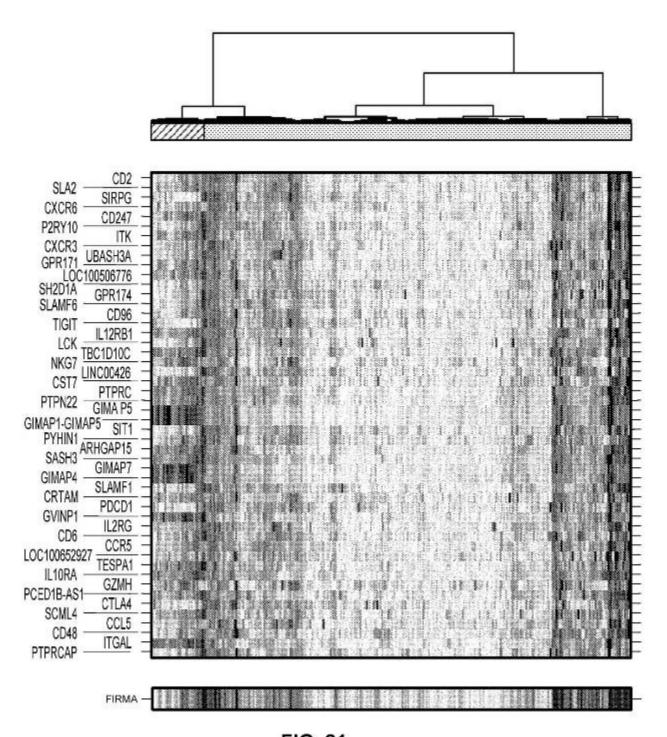
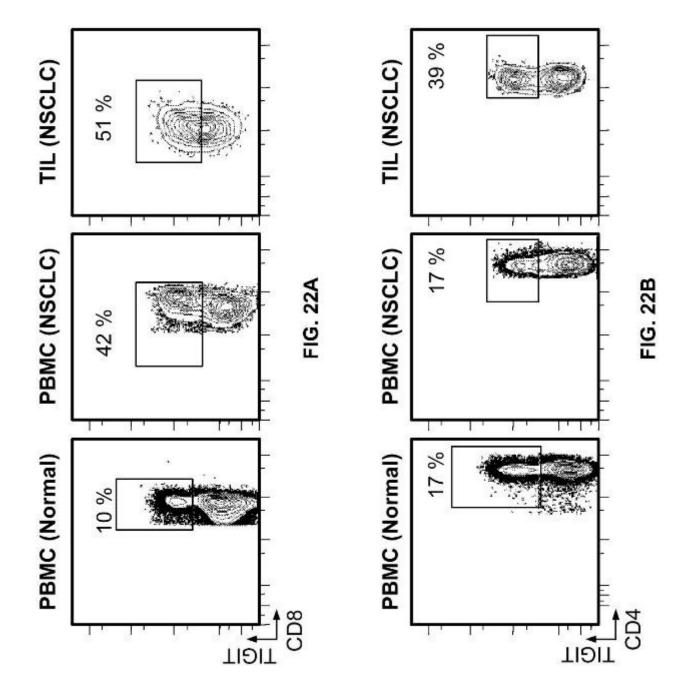
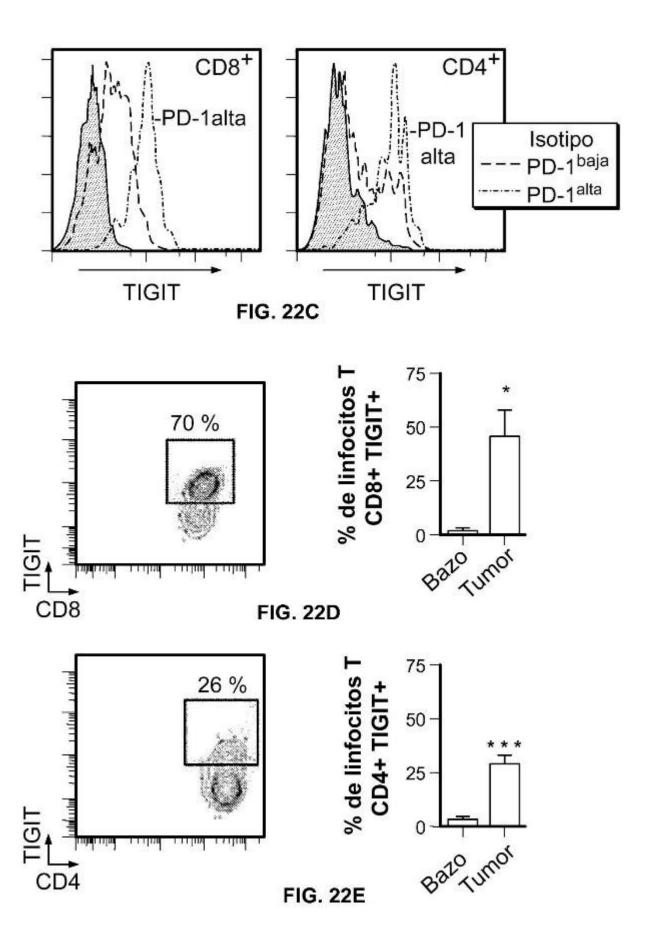
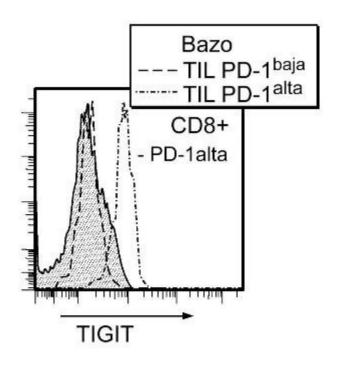


FIG. 21







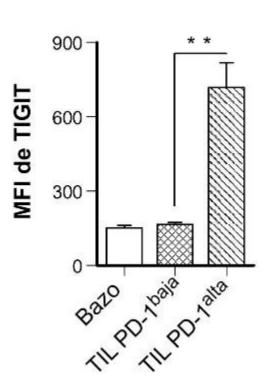


FIG. 22F

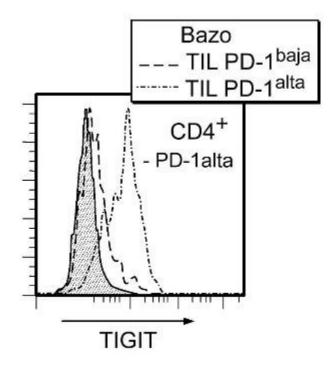
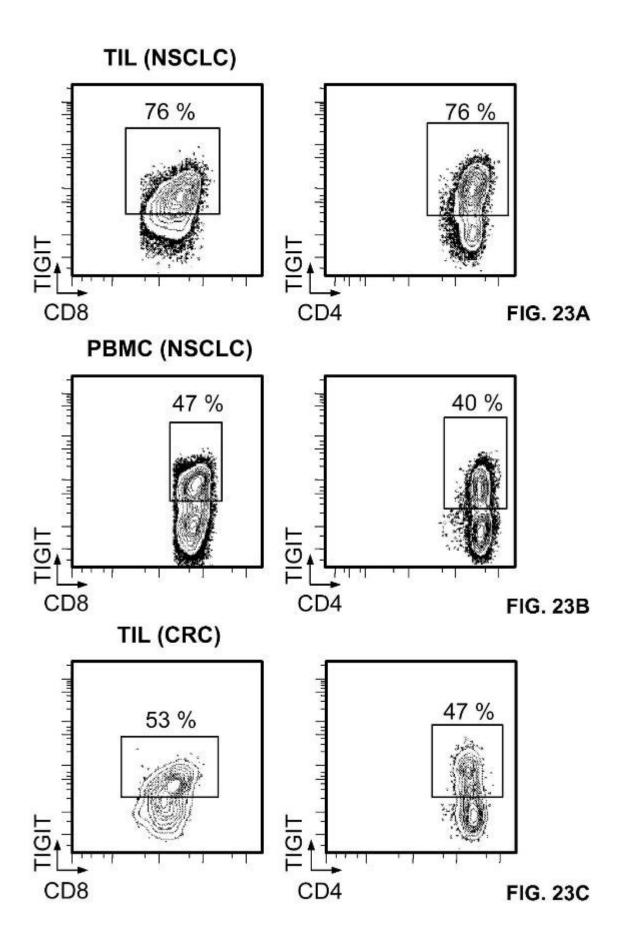
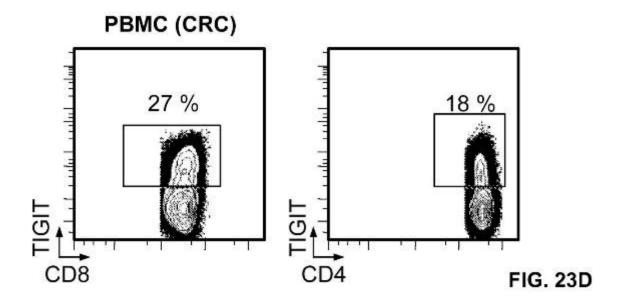
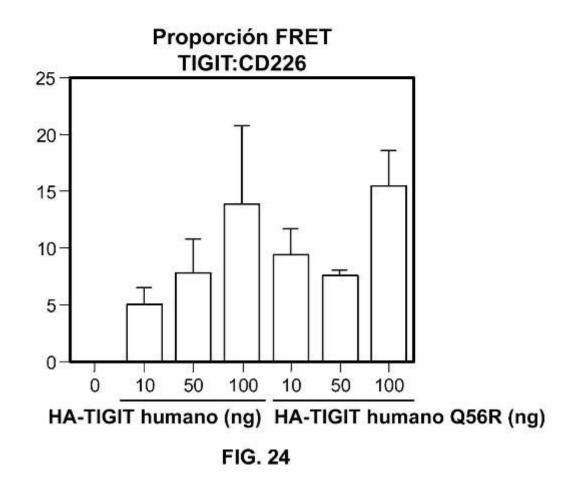
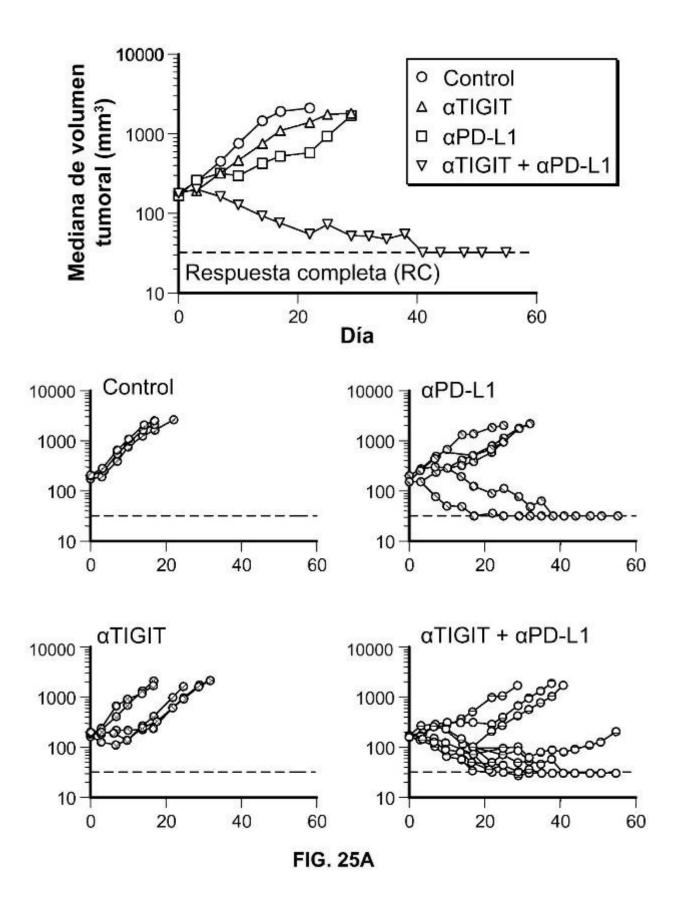


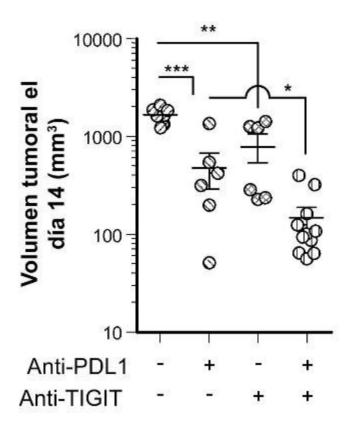
FIG. 22G

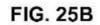


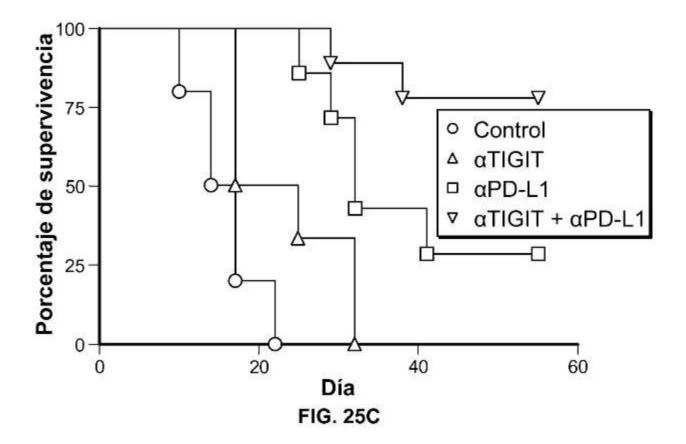


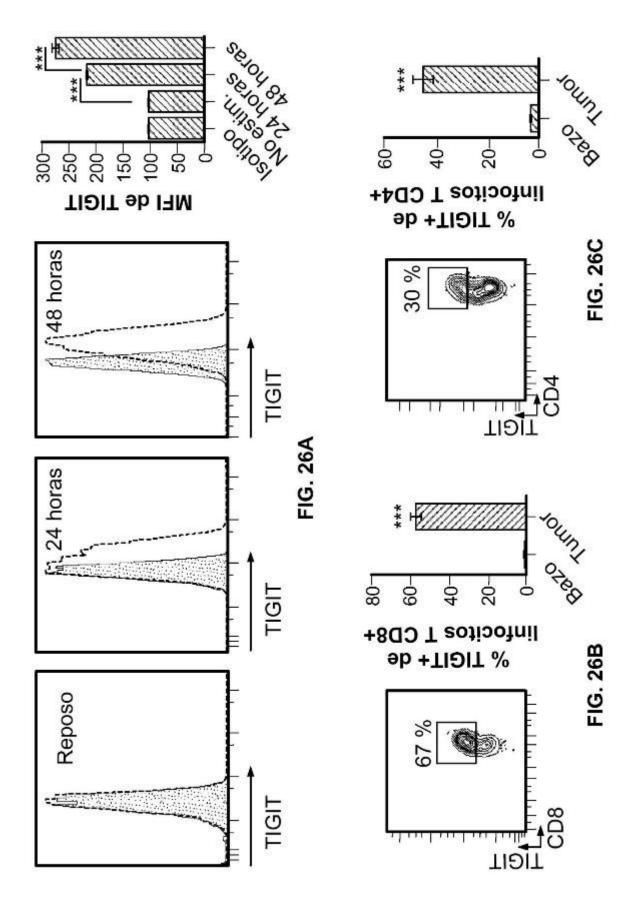


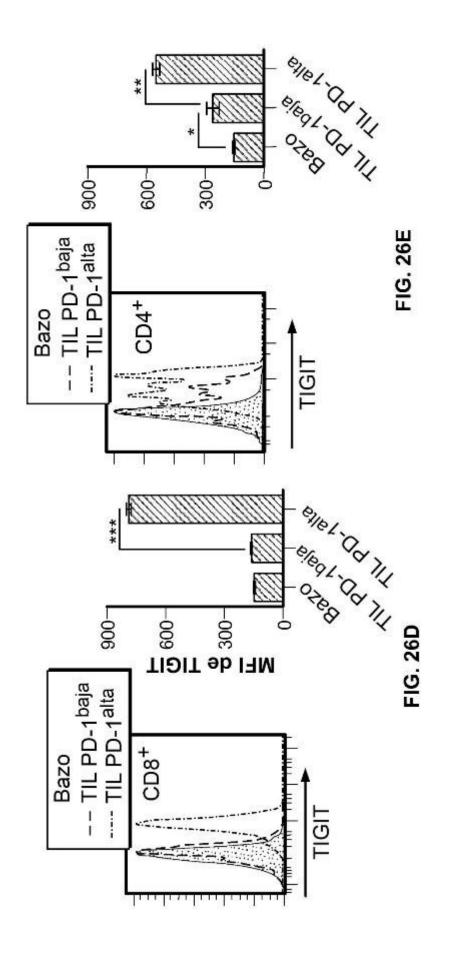


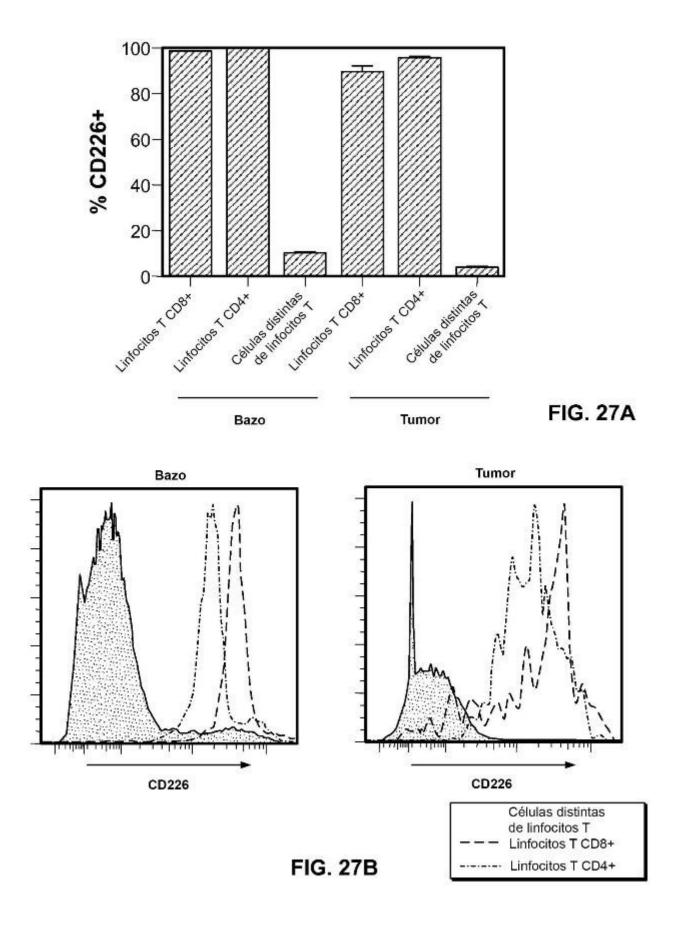


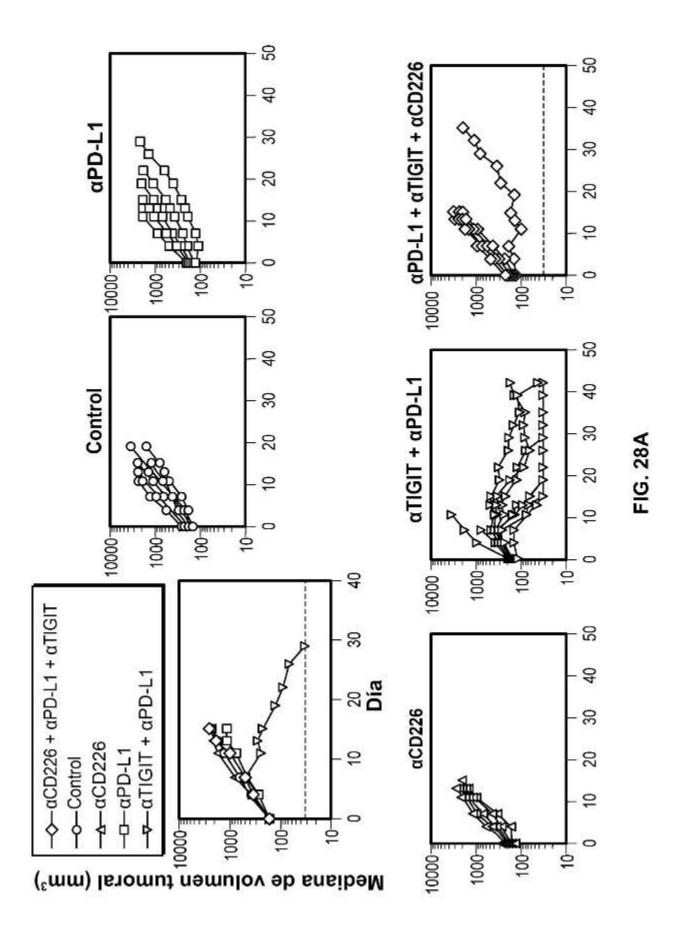


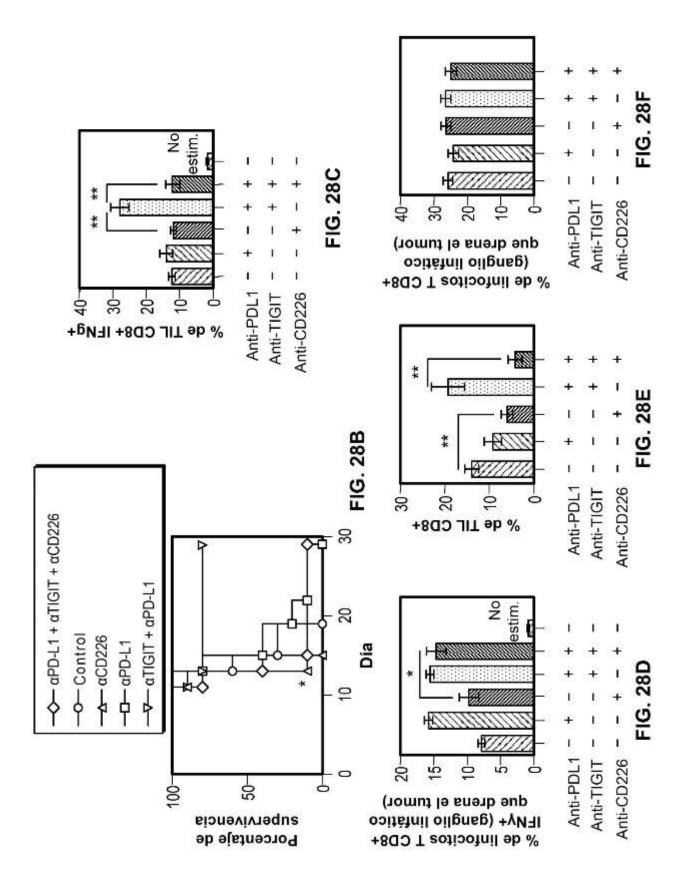












Linfocitos T CD8⁺ murinos

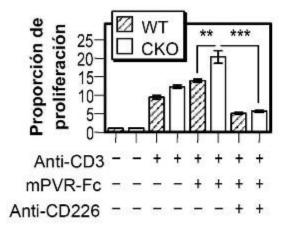


FIG. 29A

Linfocitos T CD8⁺ murinos

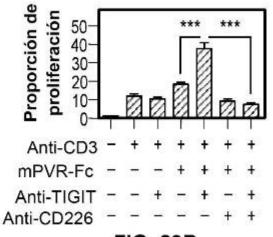


FIG. 29B

Linfocitos T CD8⁺ humanos

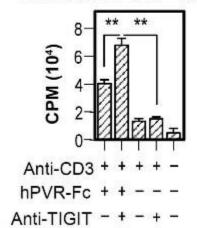


FIG. 29C

CD226 humano

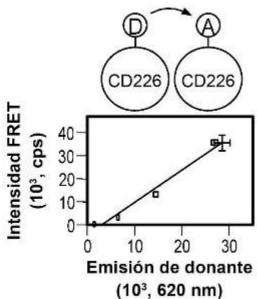
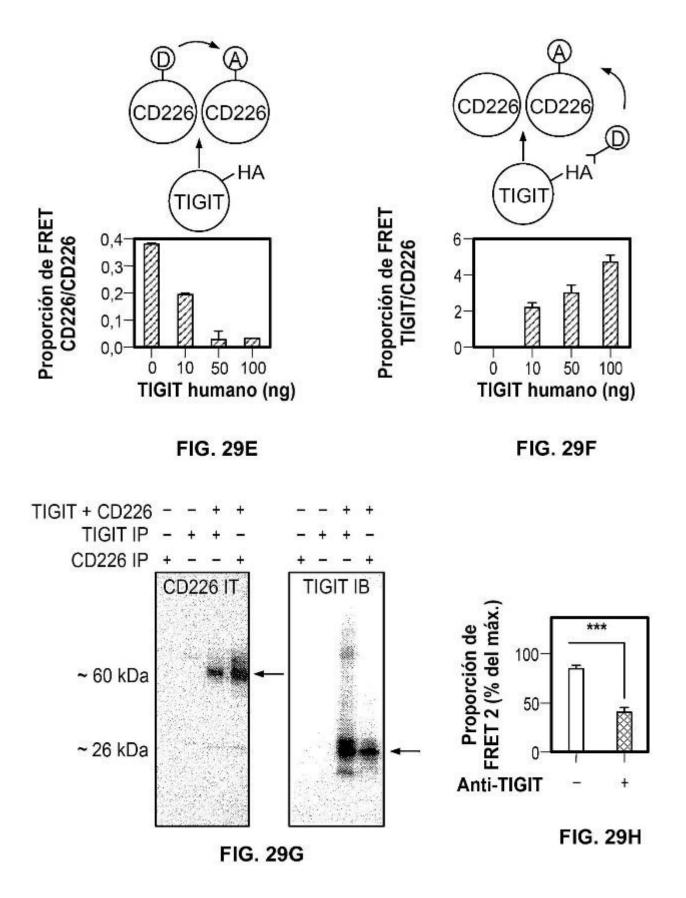
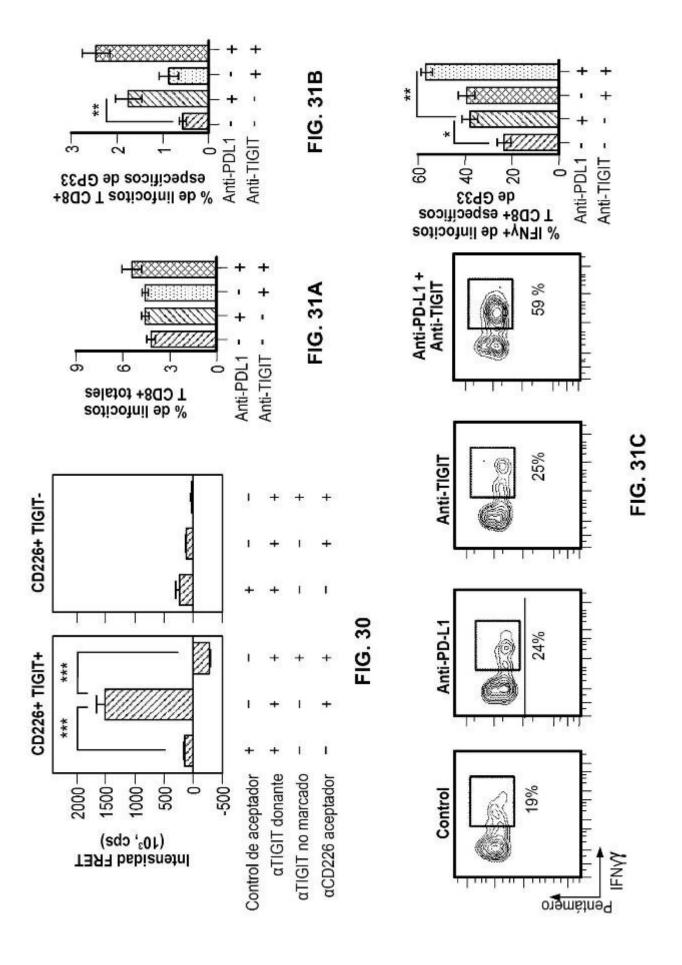
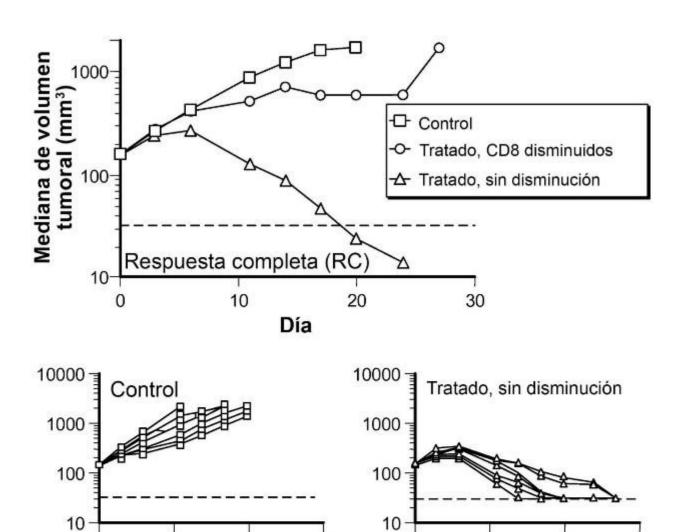
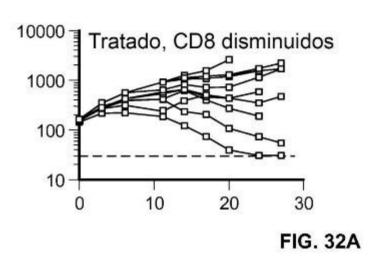


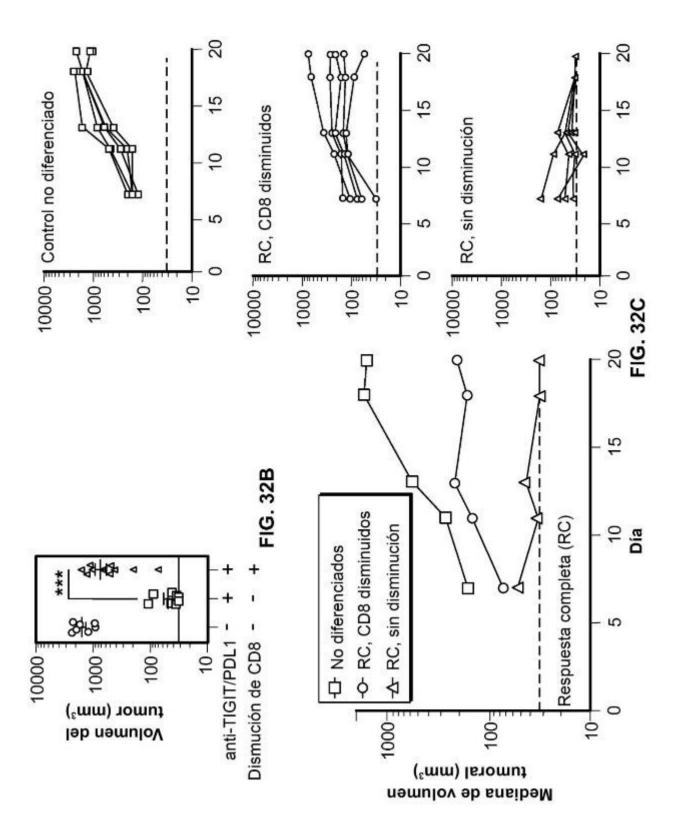
FIG. 29D

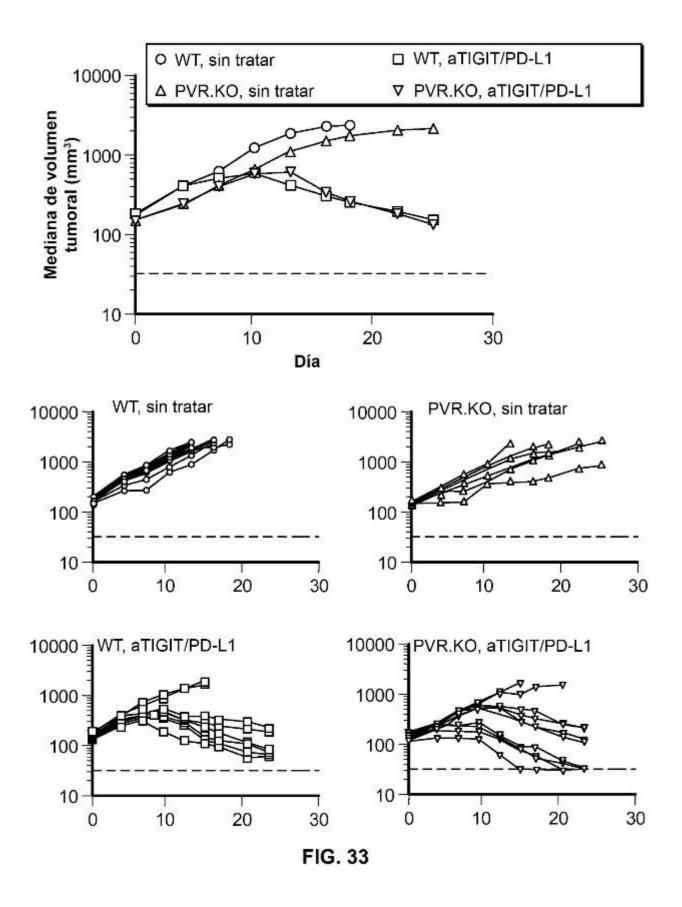


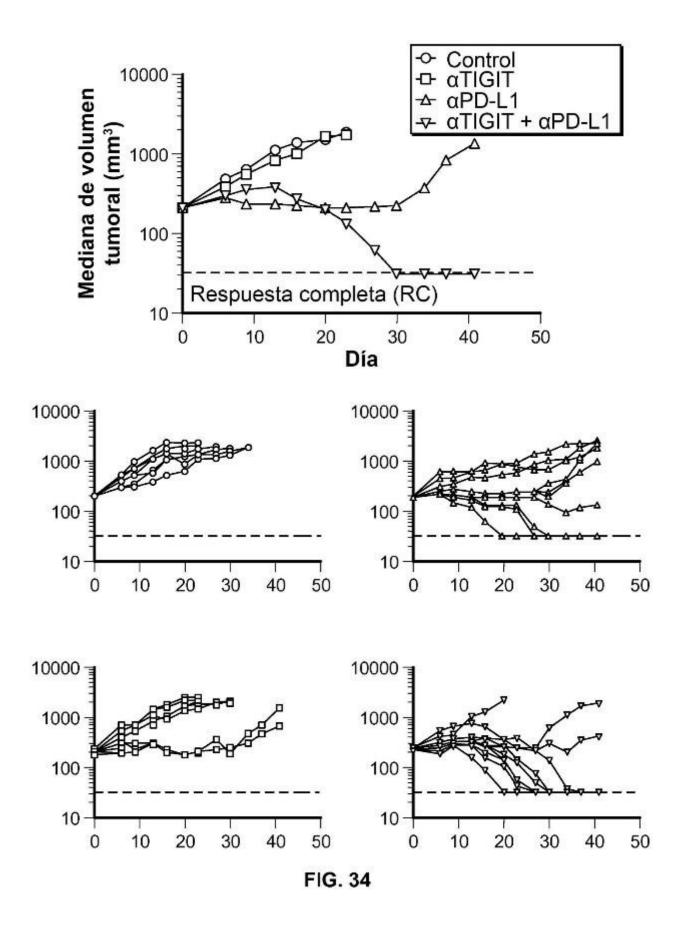












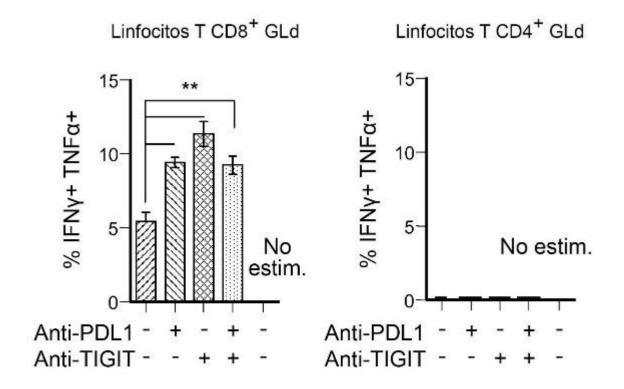


FIG. 35A

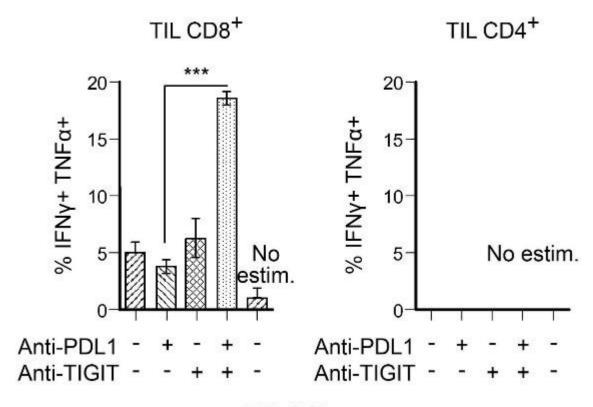
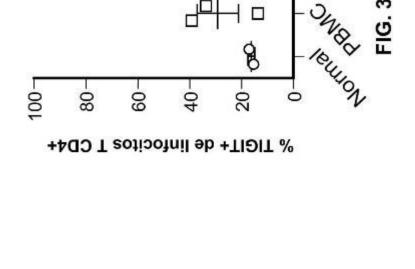


FIG. 35B



% TIGIT+ de linfocitos T CD8+

