

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201990743 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(22) Дата подачи заявки
2017.11.01

(51) Int. Cl. *G01N 33/574* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ БЕЛКА-3, СОДЕРЖАЩЕГО Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИН И МУЦИН (TIM-3)

(31) 62/416,131; 62/427,775

(32) 2016.11.01; 2016.11.29

(33) US

(86) PCT/US2017/059619

(87) WO 2018/085469 2018.05.11

(88) 2018.07.26

(71) Заявитель:
АНАПТИСБИО, ИНК.; ТЕСАРО,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Кинг Дэвид Дж., Кери Мэрилин, Гхош
Сримойи, Хуан Баочуань (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены средства на основе антитела, которые связываются с белком-3, содержащим Т-клеточный иммуноглобулин и муцин (TIM-3). В явной форме предусмотрены конкретные последовательности полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептида легкой цепи иммуноглобулина. Также представлены связанные с ними нуклеиновые кислоты, векторы, композиции и способы применения средства на основе антитела к TIM-3 для лечения нарушения или заболевания, которое реагирует на ингибирование TIM-3, такого как рак, инфекционное заболевание или аутоиммунное заболевание.

A1

201990743

201990743

A1

АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ БЕЛКА-3, СОДЕРЖАЩЕГО Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИН И МУЦИН (TIM-3)

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительным заявкам на патент США с порядковыми №№ 62/416131, поданной 1 ноября 2016 года, и 62/427775, поданной 29 ноября 2016 года, содержание обеих из которых тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Рак представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения, причем ожидается, что около 595690 человек умрут от рака в Соединенных Штатах Америки только в 2016 году по оценкам Американского общества по борьбе с раком, Cancer Facts & Figures 2016 (<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Белок-3, содержащий домен Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), также известный как клеточный рецептор-2 вируса гепатита А (HAVCR2), представляет собой Th1-специфический белок клеточной поверхности, который регулирует активацию макрофагов и повышает тяжесть экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у мышей. TIM-3 характеризуется высоким уровнем экспрессии на поверхности иммунных клеток многих типов, включая, например, Th1 IFN- γ клетки, Th17-клетки, клетки-натуральные киллеры (NK), моноциты и опухолеассоциированные дендритные клетки (DC) (см., например, Clayton et al., *J. Immunol.*, 192(2): 782–791 (2014); Jones et al., *J. Exp. Med.*, 205: 2763–2779 (2008); Monney et al., *Nature*, 415: 536–541 (2002); Hastings et al., *Eur. J. Immunol.*, 39: 2492–2501 (2009); Seki et al., *Clin. Immunol.*, 127: 78–88 (2008); Ju et al., *B. J. Hepatol.*, 52: 322–

329 (2010); Anderson et al., *Science*, 318: 1141–1143 (2007); Baitsch et al., *PLoS ONE*, 7: e30852 (2012); Ndhlovu et al., *Blood*, 119: 3734–3743 (2012). TIM-3 также на высоком уровне экспрессируется на «истощенных» или ослабленных CD8⁺ Т-клетках при различных хронических вирусных инфекциях (например, HIV, HCV и HBV) и при некоторых типах рака (см., например, McMahan et al., *J. Clin. Invest.*, 120(12): 4546–4557 (2010); Jin et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(33): 14733–14738 (2010); Golden-Mason et al., *J. Virol.*, 83(18): 9122–9130 (2009); Jones et al., *выше*; Fourcade et al., *J. Exp. Med.*, 207(10): 2175–2186 (2010); Sakuishi et al., *J. Exp. Med.*, 207(10): 2187–2194 (2010); Zhou et al., *Blood*, 117(17): 4501–4510 (2011); Ngiew et al., *Cancer Res.*, 71(10): 3540–3551 (2011)).

[0004] Предполагаемые лиганды TIM-3 включают фосфатидилсерин (Nakayama et al., *Blood*, 113: 3821–3830 (2009)), галектин-9 (Zhu et al., *Nat. Immunol.*, 6: 1245–1252 (2005)), белок-1 из группы белков с высокой подвижностью (HMGB1) (Chiba et al., *Nature Immunology*, 13: 832–842 (2012)) и молекулу-1 клеточной адгезии, родственную раково-эмбриональным антигенам (CEACAM1) (Huang et al., *Nature*, 517(7534): 386–90 (2015)).

[0005] Функции TIM-3 заключаются в регуляции различных аспектов иммунного ответа. Взаимодействие TIM-3 и галектина-9 (Gal-9) индуцирует клеточную гибель, а блокировка этого взаимодействия *in vivo* усиливает аутоиммунитет и подавляет толерантность у экспериментальных моделей, что дает все основания предположить, что TIM-3 представляет собой молекулу негативной регуляции. В отличие от эффекта на Т-клетки взаимодействие TIM-3 и Gal-9 проявляет противомикробные эффекты за счет стимуляции клиренса внутриклеточных патогенов из макрофагов (см., например, Sakuishi et al., *Trends in Immunology*, 32(8): 345–349 (2011)). *In vivo* супрессия TIM-3, как было показано, повышает патологическую тяжесть экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (Monney et al., *выше*; и Anderson, A. C. and Anderson, D. E., *Curr. Opin. Immunol.*, 18: 665–669 (2006)). Исследования также позволяют предположить, что дисрегуляция пути TIM-3-галектин-9 может играть определенную роль в развитии хронических аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз (Anderson and Anderson, *выше*). TIM-3 стимулирует клиренс апоптотических клеток посредством связывания фосфатидилсерина за счет своей уникальной

связывающей щели (см., например, DeKruyff et al., *J. Immunol.*, 184(4):1918–1930 (2010)).

[0006] Подавление активности TIM-3, например, за счет применения моноклональных антител, в настоящее время исследуется в роли средства иммунотерапии опухолей на основании результатов доклинических испытаний (см., например, Ngiow et al., *Cancer Res.*, 71(21): 1–5 (2011); Guo et al., *Journal of Translational Medicine*, 11: 215 (2013); и Ngiow et al., *Cancer Res.*, 71(21): 6567–6571 (2011)).

[0007] Существует потребность в дополнительных антагонистах TIM-3 (например, антителе), которые связывают TIM-3 с высокой аффинностью и эффективно нейтрализуют активность TIM-3.

[0008] В настоящем изобретении предусмотрены средства на основе антител и различные композиции и способы, связанные с ними, включая, например, полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки, а также различные методики и т. д.

[0009] В настоящем изобретении предусмотрены новые антитела, которые связываются с TIM-3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с TIM-3 с высокой аффинностью и эффективно нейтрализуют активность TIM-3. Согласно некоторым вариантам осуществления в явной форме предусмотрены последовательности полипептида тяжелой цепи (SEQ ID NO:1) и полипептида легкой цепи (SEQ ID NO:2) антитела.

[0010] В настоящем изобретении предусмотрен полипептид или выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:1. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен полипептид или выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% совокупной идентичностью с последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:1. Согласно некоторым вариантам осуществления отличия последовательности относительно последовательности, изложенной под SEQ ID NO:1, не находятся в пределах CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит все три CDR из SEQ ID NO:1. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или полипептид тяжелой

цепи иммуноглобулина содержит сигнальный пептид. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит сигнальный пептид, имеет аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:5.

[0011] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой или содержит полипептид IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит полипептидIGHG4*01 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит одну или более мутаций в пределах области тяжелой цепи IgG. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит константную область тяжелой цепи IgG4 с одной или более мутациями в константной области тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит константную область тяжелой цепи IgG4 с одной или более мутациями в шарнирной области. Предполагается, что согласно некоторым вариантам осуществления мутация в шарнирной области IgG4 может предотвращать обмен половиной молекулы с другими молекулами IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более мутаций в шарнирной области IgG4 могут предусматривать стабилизирующую мутацию серина в пролин, которая предотвращает обмен половиной молекулы с другими молекулами IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более мутаций в шарнирной области IgG4 могут предусматривать мутацию S228P. См., например, J. Biol. Chem. 2015; 290(9):5462–5469.

[0012] В настоящем изобретении предусмотрен полипептид или выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:2. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен полипептид или выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% совокупной

идентичностью с последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам осуществления отличия последовательности относительно последовательности, изложенной под SEQ ID NO:2, не находятся в пределах CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит все три CDR из SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид легкой цепи иммуноглобулина представляет собой легкую каппа-цепь. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит полипептид IGKC*01 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит сигнальный пептид. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид или полипептид легкой цепи иммуноглобулина, который содержит сигнальный пептид, имеет аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:6.

[0013] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе антитела к TIM-3, содержащее по меньшей мере одну тяжелую цепь иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:1, и по меньшей мере одну легкую цепь иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 содержит две тяжелых цепи иммуноглобулина, причем каждую с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:1. В качестве альтернативы или дополнения, согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 содержит две легких цепи иммуноглобулина, причем каждую с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 имеет формат канонического антитела.

[0014] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела гликозилировано по одному или более сайтам. Согласно некоторым вариантам осуществления гликан

связан с Fc-областью через атом N. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела гликозилировано по Asn297 (нумерация по Kabat).

[0015] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая одну или более гликоформ средства на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемого в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренная композиция содержит несколько таких гликоформ, присутствующих в указанных абсолютных и/или относительных количествах. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции, которые могут практически не содержать одну или более конкретных гликоформ средства на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемого в данном документе.

[0016] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела имеет структуру, которая содержит одну или более дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более дисульфидных связей представляют собой или предусматривают дисульфидную связь в ожидаемом положении иммуноглобулина IgG4.

[0017] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 вводится одновременно с другим средством на основе антитела, таким как средство, специфическое в отношении гена-3 активации лимфоцитов (LAG-3) или белка-1 программируемой смерти (PD-1).

[0018] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела связывается с TIM-3 и другим антигеном, что дает в результате средство на основе антитела с «двойной реактивностью» (например, биспецифическое антитело). Например, средство на основе антитела может связываться с TIM-3 и с другим негативным регулятором иммунной системы, таким как, например, белок-1 программируемой смерти (PD-1) или белок гена-3 активации лимфоцитов (LAG-3).

[0019] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены выделенные или очищенные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вышеупомянутые полипептиды иммуноглобулина, векторы, содержащие такие последовательности нуклеиновой кислоты, средства на основе антитела к TIM-3, содержащие

вышеупомянутые полипептиды иммуноглобулина, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие такие средства на основе антитела к TIM-3, векторы, содержащие такие последовательности нуклеиновой кислоты, выделенные клетки, содержащие такие векторы, композиции, содержащие такие средства на основе антитела к TIM-3 или такие векторы с фармацевтически приемлемым носителем, а также способы лечения рака, инфекционных заболеваний или аутоиммунных заболеваний у млекопитающих путем введения эффективных количеств таких композиций млекопитающим.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0020] Графические материалы, которые состоят из следующих фигур, включены в данный документ исключительно с целью иллюстрации, а не для ограничения.

[0021] На **фигуре 1** изображена схематическая иллюстрация, не в масштабе, регуляции Т-клеточной активации под действием TIM-3.

[0022] На **фигуре 2** изображены результаты иллюстративной модели *in vitro* истощения Т-клеток. (А) Целевая экспрессия PD-1 и TIM-3 в реагирующих (до стимуляции) клетках и истощенных (после стимуляции) клетках. (В) Количественная оценка выработки IFN- γ в истощенных (после стимуляции) клетках, обработанных средством на основе антитела к TIM-3 (черные столбцы) и изотипическим контролем (незакрашенные столбцы).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0023] В настоящем изобретении предусмотрены средства на основе антител и различные композиции и способы, связанные с ними, включая, например, полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки, а также различные методики и т. д. Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с TIM-3 с высокой аффинностью и эффективно нейтрализуют активность TIM-3. В явной форме предусмотрены последовательности полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина

(SEQ ID NO:1 и 5) и полипептида легкой цепи иммуноглобулина (SEQ ID NO:2 и 6). Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина является выделенным. Используемый в данном документе термин «иммуноглобулин» или «антитело» относится к белку, встречающемуся в крови или других физиологических жидкостях позвоночных, который используется иммунной системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов, таких как бактерии и вирусы. Полноразмерный иммуноглобулин, как правило, состоит из четырех полипептидов: двух идентичных копий полипептида тяжелой (H) цепи и двух идентичных копий полипептида легкой (L) цепи. Каждая тяжелая цепь содержит одну N-концевую переменную (V_H) область и три C-концевых константных (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}) области, а каждая легкая цепь содержит одну N-концевую переменную (V_L) область и одну C-концевую константную (C_L) область. Легкие цепи иммуноглобулина могут принадлежать к одному из двух различных типов, либо каппа (κ), либо лямбда (λ), в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов. В типичном иммуноглобулине каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью дисульфидными связями, и две тяжелых цепи связаны друг с другом дисульфидными связями. Переменная область легкой цепи совпадает с переменной областью тяжелой цепи, а константная область легкой цепи совпадает с первой константной областью тяжелой цепи. Остальные константные области тяжелых цепей совпадают друг с другом.

[0024] Переменные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий сайт антитела. Области V_H и V_L имеют одинаковую общую структуру, при этом каждая область содержит четыре каркасных области (FW или FR), соединенные тремя определяющими комплементарность областями (CDR). Используемый в данном документе термин «каркасная область» относится к относительно консервативным аминокислотным последовательностям в пределах переменной области, которые расположены между гиперпеременными или определяющими комплементарность областями (CDR). В типичном иммуноглобулине в каждом переменном домене имеются четыре каркасных области, обозначаемые FR1, FR2, FR3 и FR4. Каркасные области образуют β -складки, обеспечивающие

структурный каркас вариабельной области (см., например, C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York, NY (2001)).

[0025] В типичном иммуноглобулине в каждом вариабельном домене имеются три определяющих комплементарность области (CDR), обозначаемые CDR1, CDR2 и CDR3. CDR образуют «гипервариабельную область» антитела, которая отвечает за связывание с антигеном. CDR образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях, и содержащие часть β -складчатой структуры, образованной каркасными областями. Хотя константные области легкой и тяжелой цепей не участвуют в непосредственном связывании антитела с антигеном, константные области могут влиять на ориентацию вариабельных областей. Константные области также проявляют различные эффекторные функции, например, участвуют в антитело-зависимом комплемент-опосредуемом лизисе или антитело-зависимой клеточной токсичности за счет взаимодействий с эффекторными молекулами и клетками.

[0026] В настоящем изобретении предусмотрены, по меньшей мере частично, средства на основе антитела, которые связываются с белком-3, содержащим Т-клеточный иммуноглобулин и муцин (TIM-3). Используемый в данном документе термин «средство на основе антитела» относится к средству, которое специфически связывается с конкретным антигеном. Согласно некоторым вариантам осуществления данный термин охватывает любой полипептид или полипептидный комплекс, который содержит структурные элементы иммуноглобулина, достаточные для обеспечения специфического связывания. Иллюстративные средства на основе антитела предусматривают без ограничения моноклональные антитела или поликлональные антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела может содержать одну или более последовательностей константной области, которые характерны для антител мыши, кролика, примата или человека. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела может содержать один или более элементов последовательности, являющихся гуманизированными, приматизированными, химерными и т. д., как известно из уровня техники. Согласно многим вариантам осуществления термин «средство на основе антитела» используется для обозначения одной или более известных из уровня техники или разработанных конструкций или форматов для использования структурных и функциональных

признаков антитела в альтернативном представлении. Например, согласно вариантам осуществления средство на основе антитела, используемое в соответствии с настоящим изобретением, имеет формат, выбранный без ограничения из интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или мультиспецифических антител (например, Zybodies[®] и т. п.); фрагментов антитела, таких как Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fd'-фрагменты, Fd-фрагменты, и выделенных CDR или их наборов; одноцепочечных Fv; слияний полипептид-Fc; однодоменных антител (например, однодоменных антител акулы, таких как IgNAR или их фрагментов); верблюжьих антител; маскированных антител (например, Probody[®]); малых блочных иммунофармацевтических препаратов («SMIPTM»); одноцепочечных или tandemных диател (TandAb[®]); VHH; Anticalin[®]; минител Nanobody[®]; BiTE[®]; белков с анкириновым повтором или DARPIN[®]; Avimer[®]; DART; TCR-подобных антител; Adnectin[®]; Affilin[®]; Trans-body[®]; Affibody[®]; TrimerX[®]; MicroProtein; Fynomer[®], Centyrin[®] и KALBITOR[®]. Согласно некоторым вариантам осуществления у антитела может отсутствовать ковалентная модификация (например, присоединение гликана), которую оно имело бы, если бы вырабатывалось естественным путем. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, полезный груз [например, выявляемый фрагмент, терапевтический фрагмент, каталитический фрагмент и т. д.] или другую боковую группу [например, полиэтиленгликоль и т. д.]). Согласно многим вариантам осуществления средство на основе антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит один или более структурных элементов, известных специалистам в данной области, таких как определяющая комплементарность область (CDR); согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит по меньшей мере одну CDR (например, по меньшей мере одну CDR тяжелой цепи и/или по меньшей мере одну CDR легкой цепи), которая практически идентична таковой, встречающейся в эталонном антителе. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что она либо идентична по последовательности, либо содержит от 1 до 5 аминокислотных замен по сравнению с эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что она

демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что она демонстрирует по меньшей мере 96%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что по меньшей мере одна аминокислота в пределах включенной CDR подвергнута делеции, добавлена или заменена по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична таковой у эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что 1-5 аминокислот в пределах включенной CDR подвергнуты делеции, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что по меньшей мере одна аминокислота в пределах включенной CDR заменена по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична таковой у эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления включенная CDR практически идентична эталонной CDR, в том смысле, что 1-5 аминокислот в пределах включенной CDR подвергнуты делеции, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична эталонной CDR. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит структурные элементы, известные специалистам в данной области как переменный домен иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела представляет собой полипептидный белок со связывающим доменом, который гомологичен или в значительной степени гомологичен связывающему домену иммуноглобулина.

[0027] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и/или

полипептид легкой цепи иммуноглобулина. TIM-3 представляет собой трансмембранный белок 1 типа размером 60 кДа, состоящий из трех доменов: N-концевого домена, подобного варибельному домену Ig (IgV); центрального муцинового домена, обогащенного Ser/Thr, и трансмембранного домена с коротким внутриклеточным хвостом (см., например, Kane, L.P., *Journal of Immunology*, 184(6): 2743–2749 (2010)). Первоначально TIM-3 идентифицировали на Th1-клетках конечной стадии дифференцировки, и обнаружили, что он негативно регулирует Т-клеточный ответ за счет индуцирования апоптоза Т-клеток (см., например, Hastings et al., *Eur. J. Immunol.*, 39(9): 2492–2501 (2009)). TIM-3 также экспрессируется на активированных Th17- и Tc1-клетках, а дисрегуляция экспрессии Tim-3 на CD4+ Т-клетках и CD8+ Т-клетках ассоциирована с некоторыми аутоиммунными заболеваниями, вирусными инфекциями и раком (см., например, Liberal et al., *Hepatology*, 56(2): 677–686 (2012); Wu et al., *Eur. J. Immunol.*, 42(5): 1180–1191 (2012); Anderson, A.C., *Curr. Opin. Immunol.*, 24(2): 213–216 (2012); и Han et al., *Frontiers in Immunology*, 4: 449 (2013)).

[0028] Из уровня техники известны некоторые другие антитела, которые связываются с TIM-3, и их компоненты (см., например, патент США № 8101176; патент США № 8552156 и патент США № 8841418). Некоторые антитела к TIM-3 также коммерчески доступны из таких источников, как, например, Abcam (Кембридж, Массачусетс) и R&D Systems, Inc. (Миннеаполис, Миннесота).

[0029] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела гликозилировано по одному или более сайтам. Используемый в данном документе «гликан» означает компонент гликопротеина в виде сахарного полимера (фрагмента). Термин «гликан» охватывает свободные гликаны, включая гликаны, которые были отщеплены или иным образом высвобождены из гликопротеина. Согласно некоторым вариантам осуществления гликан связан с Fc-областью через атом N. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела гликозилировано по Asn297 (нумерация по Kabat).

[0030] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая одну или более гликоформ средства на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемого в данном документе.

Используемый в данном документе термин «гликоформа» относится к конкретной форме гликопротеина. То есть, если гликопротеин содержит конкретный полипептид, который потенциально может связываться с различными гликанами или наборами гликанов, то каждая отдельная версия гликопротеина (т. е. когда полипептид связан с конкретным гликаном или набором гликанов) обозначается как «гликоформа». Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренная композиция содержит несколько гликоформ одного или более средств на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемых в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренная композиция содержит несколько таких гликоформ, присутствующих в указанных абсолютных и/или относительных количествах. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции, которые могут практически не содержать одну или более конкретных гликоформ средства на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела, описываемого в данном документе.

[0031] Согласно некоторым вариантам осуществления количество гликоформы выражается как «процент». В случае любого заданного параметра «процент» относится к числу молей конкретного гликана (гликана X) относительно общего числа молей гликанов в препарате. Согласно некоторым вариантам осуществления «процент» относится к числу молей гликана X, высвобожденного из Fc под действием PNGазы F, относительно суммарного числа молей выявленных гликанов, высвобожденных из Fc под действием PNGазы F.

[0032] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе тяжелой цепи, легкой цепи и/или антитела имеет структуру, которая содержит одну или более дисульфидных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более дисульфидных связей представляют собой или предусматривают дисульфидную связь в ожидаемом положении иммуноглобулина IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления дисульфидная связь присутствует на одном или более остатках, соответствующих положениям, выбранным из остатка 22, 96, 127, 140, 196, 219, 222, 254, 314, 360 и 418 из SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления дисульфидная связь присутствует на одном или более остатках, соответствующих положениям, выбранным из остатка 23, 88, 134, 194

и 214 из SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе антитела к TIM-3 содержит одну или более дисульфидных связей, где первый цистеин выбран из остатка 22, 96, 127, 140, 196, 219, 222, 254, 314, 360 и 418 из SEQ ID NO: 1, а второй цистеин выбран из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе антитела к TIM-3 содержит одну или более дисульфидных связей, где первый цистеин выбран из остатка 22, 96, 127, 140, 196, 219, 222, 254, 314, 360 и 418 из SEQ ID NO: 1, а второй цистеин выбран из остатка 22, 96, 127, 140, 196, 219, 222, 254, 314, 360 и 418 из SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе антитела к TIM-3 содержит одну или более дисульфидных связей, где первый цистеин выбран из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2, а второй цистеин выбран из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2.

[0033] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе антитела к TIM-3 содержит одну или более дисульфидных связей, где одна или более дисульфидных связей образованы первым цистеином и вторым цистеином, выбранными из: (a) первого остатка, являющегося остатком 23 из SEQ ID NO: 2, и второго остатка, являющегося остатком 88 из SEQ ID NO: 2; (b) первого остатка, являющегося остатком 134 из SEQ ID NO: 2, и второго остатка, являющегося остатком 194 из SEQ ID NO: 2; (c) первого остатка, являющегося остатком 214 из SEQ ID NO: 2, и второго остатка, являющегося остатком 127 из SEQ ID NO: 1; (d) первого остатка, являющегося остатком 22 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 97 из SEQ ID NO: 1; (e) первого остатка, являющегося остатком 140 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 196 из SEQ ID NO: 1; (f) первого остатка, являющегося остатком 219 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 222 из SEQ ID NO: 1; (g) первого остатка, являющегося остатком 254 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 314 из SEQ ID NO: 1; и (h) первого остатка, являющегося остатком 360 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 418 из SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренное средство на основе антитела к TIM-3 содержит дисульфидную связь, образованную первым цистеином и вторым цистеином, где средство на основе антитела содержит дисульфидную связь при каждом из: (a) первого остатка,

являющегося остатком 23 из SEQ ID NO: 2, и второго остатка, являющегося остатком 88 из SEQ ID NO: 2; (b) первого остатка, являющегося остатком 134 из SEQ ID NO: 2, и второго остатка, являющегося остатком 194 из SEQ ID NO: 2; (c) первого остатка, являющегося остатком 214 из SEQ ID NO: 2, и второго остатка, являющегося остатком 127 из SEQ ID NO: 1; (d) первого остатка, являющегося остатком 22 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 97 из SEQ ID NO: 1; (e) первого остатка, являющегося остатком 140 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 196 из SEQ ID NO: 1; (f) первого остатка, являющегося остатком 219 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 222 из SEQ ID NO: 1; (g) первого остатка, являющегося остатком 254 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 314 из SEQ ID NO: 1; и (h) первого остатка, являющегося остатком 360 из SEQ ID NO: 1, и второго остатка, являющегося остатком 418 из SEQ ID NO: 1.

[0034] Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична (например, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 1 или 5.

[0035] Согласно некоторым вариантам осуществления выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична (например, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или 100% идентична) SEQ ID NO: 2 или 6.

[0036] «Идентичность» последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, описываемая в данном документе, может быть определена путем сравнения представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью. Процент идентичности представляет собой число нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (т. е. которые

являются идентичными) у представляющей интерес последовательности и эталонной последовательности, деленное на длину наиболее длинной последовательности (т. е. на длину либо представляющей интерес последовательности, либо эталонной последовательности, в зависимости от того, какая является более длинной). Известен целый ряд математических алгоритмов для получения оптимального выравнивания и вычисления идентичности между двумя или более последовательностями, и они внедрены в общедоступные компьютерные программы. Примеры таких программ включают CLUSTAL-W, T-Coffee и ALIGN (для выравнивания последовательностей нуклеиновой кислоты и аминокислотных последовательностей), программы BLAST (например, BLAST 2.1, BL2SEQ и их более поздние версии) и программы FASTA (например, FASTA3х, FASTM и SSEARCH) (для выравнивания последовательностей и поиска сходства последовательностей). Алгоритмы выравнивания последовательностей также раскрыты, например, в Altschul et al., *J. Molecular Biol.*, 215(3): 403–410 (1990), Beigert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(10): 3770–3775 (2009), Durbin et al., eds., *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009), Soding, *Bioinformatics*, 21(7): 951–960 (2005), Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389–3402 (1997), и Gusfield, *Algorithms on Strings, Trees and Sequences*, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997)).

[0037] Одна или более аминокислот вышеупомянутых полипептидов тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина могут быть замещены или заменены другой аминокислотой. «Замещение» или «замена» аминокислот означает замещение одной аминокислоты в заданном положении или остатке другой аминокислотой в том же положении или остатке последовательности полипептида.

[0038] В широком смысле аминокислоты делятся на «ароматические» или «алифатические». Ароматическая аминокислота содержит ароматическое кольцо. Примеры «ароматических» аминокислот включают гистидин (H или His), фенилаланин (F или Phe), тирозин (Y или Tyr) и триптофан (W или Trp). В широком смысле неароматические аминокислоты принадлежат к группе «алифатических». Примеры «алифатических» аминокислот включают глицин (G или Gly), аланин (A или Ala), валин (V или Val), лейцин (L или Leu), изолейцин (I или Ile), метионин (M или Met),

серин (S или Ser), треонин (T или Thr), цистеин (C или Cys), пролин (P или Pro), глутаминовую кислоту (E или Glu), аспарагиновую кислоту (D или Asp), аспарагин (N или Asn), глутамин (Q или Gin), лизин (K или Lys) и аргинин (R или Arg).

[0039] Алифатические аминокислоты можно подразделить на четыре подгруппы. «Подгруппа неполярных больших алифатических аминокислот» состоит из валина, лейцина и изолейцина. «Подгруппа слабополярных алифатических аминокислот» состоит из метионина, серина, треонина и цистеина. «Подгруппа полярных/заряженных алифатических аминокислот» состоит из глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, аспарагина, глутамина, лизина и аргинина. «Подгруппа аминокислот с небольшими остатками» состоит из глицина и аланина. Группу заряженных/полярных аминокислот можно подразделить на три подгруппы: «подгруппу положительно заряженных аминокислот», состоящую из лизина и аргинина, «подгруппу отрицательно заряженных аминокислот», состоящую из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и «подгруппу полярных аминокислот», состоящую из аспарагина и глутамина.

[0040] Ароматические аминокислоты можно подразделить на две подгруппы: «подгруппу аминокислот с азотсодержащим кольцом», состоящую из гистидина и триптофана, и «подгруппу аминокислот с фенильным кольцом», состоящую из фенилаланина и тирозина.

[0041] Замещение или замена аминокислот могут быть консервативными, полуконсервативными или неконсервативными. Фраза «консервативная аминокислотная замена» или «консервативная мутация» относится к замещению одной аминокислоты другой аминокислотой с общими свойствами. Функциональным способом определения общих свойств индивидуальных аминокислот является анализ нормализованных частот изменений аминокислот в соответствующих белках гомологичных организмов (Schulz and Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)). На основании таких анализов можно определять группы аминокислот, где аминокислоты в пределах группы преимущественно заменяются друг другом, а поэтому они наибольшим образом похожи друг на друга с точки зрения влияния на общую структуру белка (Schulz and Schirmer, выше).

[0042] Примеры консервативных аминокислотных замен включают замены аминокислот в пределах вышеописанных подгрупп, например, лизином аргинина и наоборот, вследствие чего может сохраняться положительный заряд; глутаминовой кислотой аспарагиновую кислоту и наоборот, вследствие чего может сохраняться отрицательный заряд; серином треонина, вследствие чего может сохраняться свободный -ОН, и глутамином аспарагина, вследствие чего может сохраняться свободный -NH₂.

[0043] «Полуконсервативные мутации» включают аминокислотные замены из аминокислот в пределах одних и те же групп, перечисленных выше, но не в пределах одной и той же подгруппы. Например, замена аспарагиновой кислотой аспарагина или аспарагином лизина, предусматривает аминокислоты в пределах в одной и той же группы, но различных подгрупп. «Неконсервативные мутации» предусматривают замены аминокислот, входящих в различные группы, например, лизином триптофана или фенилаланином серина и т. д.

[0044] В настоящем изобретении предусмотрено, по меньшей мере частично, выделенное средство на основе антитела к TIM-3, содержащее выделенные аминокислотные последовательности по настоящему изобретению, описываемые в данном документе, состоящее фактически из них или состоящее из них. Используемый в данном документе термин «выделенный» (или «очищенный») относится к последовательности нуклеиновой кислоты (например, полинуклеотиду) или аминокислотной последовательности (например, полипептиду), которая удалена или отделена от других компонентов, присутствующих в ее естественном окружении. Например, выделенный полипептид представляет собой полипептид, который отделен от остальных компонентов клетки, в которой он вырабатывался (например, эндоплазматического ретикулума или цитоплазматических белков и РНК). Выделенный полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, который отделен от остальных компонентов ядра (например, гистонов) и/или от последовательностей нуклеиновой кислоты, расположенных в направлении против хода транскрипции или по ходу транскрипции. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность может быть на по меньшей мере 60%, или на по меньшей мере 75%, или на по меньшей мере 90%, или на по меньшей мере 95%, или на

по меньшей мере 98%, или на по меньшей мере 99% очищена от остальных компонентов, присутствующих в естественном окружении указанной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности.

[0045] «Средство на основе антитела к TIM-3» означает молекулу, предпочтительно белковую молекулу, которая специфически связывается с белком TIM-3. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее TIM-3 средство представляет собой средство на основе антитела к TIM-3. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное средство на основе антитела к TIM-3 содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина (например, SEQ ID NO:1) и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина (например, SEQ ID NO:2), состоит фактически из них или состоит из них. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное средство на основе антитела к TIM-3 содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, последовательность которого содержит SEQ ID NO:1, и полипептид легкой цепи иммуноглобулина, последовательность которого содержит SEQ ID NO:2, состоит фактически из них или состоит из них.

[0046] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи состоит фактически из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5 и, кроме того, может содержать дополнительные компоненты, которые не воздействуют существенно на полипептид, например, воздействуя на аффинность полипептида тяжелой цепи по настоящему изобретению в отношении TIM-3. Примеры таких компонентов включают, например, белковые фрагменты, такие как биотин, который облегчает очистку или выделение, мутации-пассажиры, последовательности, не содержащие проблемных сайтов, включая свободные цистеины, дополнительные сайты гликозилирования и сайты с высокой вероятностью дезамидирования или изомеризации.

[0047] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный полипептид или полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5 и не содержит никаких дополнительных компонентов (т. е. компонентов, которые не являются эндогенными по отношению к полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению).

[0048] Согласно некоторым вариантам осуществления средства на основе антитела к TIM-3 предусматривают варианты, в которых одна или более аминокислот в полипептиде тяжелой цепи иммуноглобулина и/или полипептиде легкой цепи иммуноглобулина замещены другим аминокислотным остатком или могут быть подвергнуты делеции или вставке в любой комбинации, при условии, что биологическая активность средства на основе антитела к TIM-3 существенно не снижается (например, усиливается или улучшается) в результате аминокислотных замен, вставок и/или делеций. «Биологическая активность» связывающего TIM-3 средства, например, относится к аффинности связывания конкретного эпитопа TIM-3, нейтрализации или ингибированию связывания TIM-3 с его рецептором(ами), нейтрализации или ингибированию активности TIM-3 *in vivo* (например, IC₅₀), фармакокинетическим показателям и перекрестной реактивности (например, с гомологами или ортологами белка TIM-3, не являющимися человеческими, или с другими белками или тканями). Другие биологические свойства или характеристики антигенсвязывающего средства, признаваемые в уровне техники, например, включают avidность, селективность, растворимость, сворачивание, иммунотоксичность, экспрессию и возможность приготовления состава. Вышеупомянутые свойства или характеристики можно наблюдать, измерять и/или оценивать с применением стандартных методик, включая без ограничения ELISA, конкурентный ELISA, анализ поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) или анализ кинетического исключения (KINEXA™), *in vitro* или *in vivo* анализы нейтрализации, анализы связывания рецептора с лигандом, анализы выработки и/или секреции цитокинов или факторов роста, а также анализ сигнальной трансдукции и иммуногистохимические анализы.

[0049] Термины «ингибировать» или «нейтрализовать», используемые в данном документе в отношении активности средства на основе антитела к TIM-3, относятся к способности в значительной степени противодействовать, препятствовать, предупреждать, ограничивать, замедлять, нарушать, менять, исключать, останавливать или обращать, например, биологическую активность TIM-3 или прогрессирование или тяжесть заболевания или состояния, связанного с TIM-3. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 ингибирует или нейтрализует активность TIM-3 на по меньшей мере приблизительно 20%,

приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, приблизительно 100% или на значение в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений (например, 20% - 100%, 40% - 100% или 60% - 95% и т. д.).

[0050] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 представляет собой полноразмерное антитело или его фрагмент (например, фрагмент антитела). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент антитела содержат константную область тяжелой цепи, которая основана на антителах IgG1, IgG2 или IgG4 дикого типа или их вариантах. Следует принимать во внимание, что каждый класс или изотип антител принимает участие в определенном наборе эффекторных механизмов для удаления или нейтрализации антигена после его распознавания. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления, если средство на основе антитела к TIM-3 представляет собой антитело, то оно может проявлять одну или более эффекторных функций, таких как участие в антитело-зависимом комплемент-опосредованном лизисе или антитело-зависимой клеточной токсичности путем взаимодействий с эффекторными молекулами и клетками (например, активацию системы комплемента).

[0051] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 содержит константную область тяжелой цепи IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 содержит одну или более мутаций в пределах области тяжелой цепи IgG. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 содержит константную область тяжелой цепи IgG4 с одну или более мутациями в константной области тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 содержит константную область тяжелой цепи IgG4 с одной или более мутациями в шарнирной области. Предполагается, что согласно некоторым вариантам осуществления мутация в шарнирной области IgG4 может предотвращать обмен половиной молекулы с другими молекулами IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или более мутаций в шарнирной области IgG4 могут предусматривать мутацию S228P или стабилизирующую мутацию серина в пролин,

которая предотвращает обмен половиной молекулы с другими молекулами IgG4. См., например, J. Biol. Chem. 2015; 290(9):5462–5469.

[0052] Средство на основе антитела к TIM-3 также может представлять собой конъюгат антитела. При этом средство на основе антитела к TIM-3 может представлять собой конъюгат (1) антитела к TIM-3 и (2) белкового или небелкового фрагмента. Например, средство на основе антитела к TIM-3 может представлять собой антитело, конъюгированное с пептидом, флуоресцентной молекулой или химиотерапевтическим средством.

[0053] Средство на основе антитела к TIM-3 может представлять собой человеческое антитело, не являющееся человеческим антителом или химерное антитело или может быть получено из них. «Химерное» означает антитело или его фрагмент, содержащие не только человеческие области, но и не являющиеся человеческими области. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 представляет собой гуманизированное антитело. «Гуманизированное» антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее остов человеческого антитела и по меньшей мере одну CDR, полученную или происходящую от не являющегося человеческим антитела. Не являющиеся человеческими антитела предусматривают антитела, выделенные из любого животного, не являющегося человеком, такого как, например, грызун (например, мыши или крысы). Гуманизированное антитело может содержать одну, две или три CDR, полученные или происходящие от не являющегося человеческим антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления CDRH3 связывающего TIM-3 средства по настоящему изобретению получена из мышинового моноклонального антитела или происходит от него, тогда как остальные переменные области и константная область средства на основе антитела к TIM-3 получены из человеческого моноклонального антитела или происходят от него.

[0054] Человеческое антитело, не являющееся человеческим антителом, химерное антитело или гуманизированное антитело могут быть получены с помощью любых средств, в том числе из *in vitro* источников (например, гибридомы или линии клеток, вырабатывающей рекомбинантное антитело) и *in vivo* источников (например, грызунов). Способы создания антител известны из уровня техники и описаны,

например, в Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511–519 (1976); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988); и Janeway et al. (eds.), *Immunobiology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York, NY (2001)). Согласно некоторым вариантам осуществления человеческое антитело или химерное антитело могут быть созданы с применением трансгенного животного (например, мыши), где один или более эндогенных генов иммуноглобулина замещены одним или более человеческими генами иммуноглобулина. Примеры трансгенных мышей, у которых эндогенные гены антител эффективно замещены человеческими генами антител, включают без ограничения Medarex HUMAB-MOUSE™, Kirin TC MOUSE™ и Kyowa Kirin KM-MOUSE™ (см., например, Lonberg, *Nat. Biotechnol.*, 23(9): 1117-25 (2005), и Lonberg, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 181: 69–97 (2008)). Гуманизированное антитело может быть создано с применением любого подходящего способа, известного из уровня техники (см., например, An, Z. (ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009)), включая, например, прививание не являющихся человеческими CDR на каркас человеческого антитела (см., например, Kashmiri et al., *Methods*, 36(1): 25–34 (2005); и Hou et al., *J. Biochem.*, 144(1): 115–120 (2008)). Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизированное антитело может быть получено с применением способов, описанных, например, в публикации заявки на патент США № 2011/0287485 A1.

[0055] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 связывает эпитоп TIM-3, что блокирует связывание TIM-3 с любым из его предполагаемых лигандов (например, фосфатидилсерином, галектином-9, белком-1 из группы белков с высокой подвижностью (HMGB1) и молекулой-1 клеточной адгезии, родственной раково-эмбриональным антигенам (CEACAM1)), и ингибирует TIM-3-опосредуемую передачу сигнала. В настоящем изобретении также предусмотрен выделенный или очищенный эпитоп TIM-3, который блокирует связывание TIM-3 с любым из его предполагаемых лигандов по непрямому или аллостерическому механизму. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 связывает эпитоп TIM-3, что блокирует связывание TIM-3 с одним, двумя или более из его предполагаемых лигандов.

[0056] В настоящем изобретении также предусмотрены одна или более выделенных или очищенных последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению и/или средство на основе антитела к TIM-3 по настоящему изобретению.

[0057] Подразумевается, что термин «последовательность нуклеиновой кислоты» охватывает полимер ДНК или РНК, т. е. полинуклеотид, который может быть однонитевым или двухнитевым, и который может содержать неприродные или измененные нуклеотиды. Используемые в данном документе термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» относятся к полимерной форме нуклеотидов, имеющей любую длину и содержащей либо рибонуклеотиды (РНК), либо дезоксирибонуклеотиды (ДНК). Эти термины относятся к первичной структуре молекулы и, таким образом, предусматривают двухнитевую и однонитевую ДНК, а также двухнитевую и однонитевую РНК. Эти термины предусматривают в качестве эквивалентов аналоги РНК или ДНК, полученные из аналогов нуклеотидов, и модифицированные полинуклеотиды, такие как без ограничения метилированные и/или кэпированные полинуклеотиды. Нуклеиновые кислоты обычно связаны фосфатными связями с образованием последовательностей нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов, хотя из уровня техники известно множество других связей (например, фосфотиоаты, боранофосфаты и т. п.). Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, содержат, например, SEQ ID NO: 3. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, содержат, например, SEQ ID NO: 4.

[0058] В настоящем изобретении также предусмотрен вектор, содержащий одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению и/или средство на основе антитела к TIM-3 по настоящему изобретению. Вектором может быть, например, плазида, эписома, космида, вирусный вектор (например, ретровирусный или аденовирусный) или фаг. Подходящие векторы и способы получения векторов хорошо известны из

уровня техники (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd edition*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)).

[0059] Помимо последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по настоящему изобретению, полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению и/или средство на основе антитела к TIM-3 по настоящему изобретению, вектор может содержать последовательности регуляции экспрессии, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы транскрипции, сигнальные пептиды (например, сигнальный пептид остеонектина), сайты внутренней посадки рибосомы (IRES) и т. п., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. Иллюстративные последовательности регуляции экспрессии известны из уровня техники и описаны, например, в Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

[0060] Из уровня техники хорошо известно большое число промоторов, включая конститутивные, индуцибельные и репрессируемые промоторы, происходящие из целого ряда различных источников. Типичные источники промоторов включают, например, гены вирусов, млекопитающих, насекомых, растений, дрожжей и бактерий, и подходящие промоторы из этих источников легкодоступны или могут быть получены синтетическим путем на основании общедоступных последовательностей, доступных, например, в депозитариях, таких как ATCC, а также из других коммерческих или индивидуальных источников. Промоторы могут быть однонаправленными (т. е. инициируют транскрипцию в одном направлении) или двунаправленными (т. е. инициируют транскрипцию в 3'- или 5'-направлении). Неограничивающие примеры промоторов включают, например, бактериальную систему экспрессии T7, бактериальную систему экспрессии pBAD (agaA), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV. Индуцибельные промоторы включают, например, систему Tet (патенты США №№ 5464758 и 5814618), индуцибельную систему экдизона (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 3346-3351 (1996)), систему T-REXTM (Invitrogen,

Карлсбад, Калифорния), систему LACSWITCH™ (Stratagene, Сан-Диего, Калифорния) и индуцибельную систему тамоксифен-рекомбиназы Cre-ERT (Indra et al., *Nuc. Acid. Res.*, 27: 4324–4327 (1999); *Nuc. Acid. Res.*, 28: e99 (2000); патент США № 7112715; и Kramer & Fussenegger, *Methods Mol. Biol.*, 308: 123–144 (2005)).

[0061] Используемый в данном документе термин «энхансер» относится к последовательности ДНК, которая усиливает транскрипцию, например, последовательности нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана.

[0062] Энхансеры могут быть расположены на расстоянии нескольких тысяч пар оснований от кодирующей области последовательности нуклеиновой кислоты и могут опосредовать связывание регуляторных факторов, паттерны метилирования ДНК или изменения в структуре ДНК. Из уровня техники хорошо известно большое число энхансеров, происходящих из целого ряда различных источников, и они доступны в качестве клонированных полинуклеотидов или присутствуют внутри них (например, из депозитариев, таких как АТСС, а также в других коммерческих или индивидуальных источниках). Ряд полинуклеотидов, содержащих промоторы (такие как широко используемый промотор CMV), также содержат энхансерные последовательности. Энхансеры могут быть расположены в направлении против хода транскрипции кодирующих последовательностей, внутри этих последовательностей или в направлении по ходу транскрипции.

[0063] Вектор также может содержать «селективный маркерный ген». Используемый в данном документе термин «селективный маркерный ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает возможность специфического позитивного или негативного отбора клеток, экспрессирующих последовательность нуклеиновой кислоты, по наличию соответствующего селективного средства. Подходящие селективные маркерные гены известны из уровня техники и описаны например, в публикациях международных заявок на патент WO 1992/008796 и WO 1994/028143; Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3567–3570 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1527–1531 (1981); Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2072–2076 (1981); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150: 1–14 (1981); Santerre et al., *Gene*, 30: 147–156 (1984); Kent et al., *Science*, 237: 901–903 (1987); Wigler et al., *Cell*, 11: 223–232 (1977); Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 48: 2026–2034 (1962); Lowy et al., *Cell*, 22: 817–823 (1980); и в патентах США №№ 5122464 и 5770359.

[0064] Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой «эписомный вектор экспрессии» или «эписому», которые могут реплицироваться в клетке-хозяине и сохраняться внутри клетки-хозяина в виде внехромосомного сегмента ДНК при наличии соответствующего давления отбора (см., например, Conese et al., *Gene Therapy*, 11: 1735-1742 (2004)). Типичные коммерчески доступные эписомные векторы экспрессии включают без ограничения эписомные плазмиды, которые используют ядерный антиген-1 вируса Эпштейна-Барр (EBNA1) и точку начала репликации (oriP) вируса Эпштейна-Барр (EBV). Векторы pREP4, pCER4, pREP7 и pcDNA3.1 от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) и pBK-CMV от Stratagene (Ла-Хойя, Калифорния) представляют неограничивающие примеры эписомного вектора, в котором вместо EBNA1 и oriP используются Т-антиген и точка начала репликации SV40.

[0065] Другие подходящие векторы предусматривают интегрирующиеся векторы экспрессии, которые могут случайным образом интегрироваться в ДНК клетки-хозяина, или они могут содержать сайт рекомбинации, обеспечивающий специфическую рекомбинацию между вектором экспрессии и хромосомой клетки-хозяина. Такие интегрирующиеся векторы экспрессии могут использовать эндогенные последовательности регуляции экспрессии хромосом клеток-хозяев для осуществления экспрессии требуемого белка. Примеры векторов, которые интегрируются сайт-специфическим образом, включают, например, компоненты системы flp-in от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) (например, pcDNATM5/FRT) или системы cre-lox, которые могут встречаться в коровых векторах pExchange-6 от Stratagene (Ла-Хойя, Калифорния). Примеры векторов, которые случайным образом интегрируются в хромосомы клетки-хозяина, включают, например, pcDNA3.1 (при введении в отсутствие Т-антигена) от Life Technologies (Карлсбад, Калифорния), UCOE от Millipore (Биллерика, Массачусетс) и pCI или pFN10A (ACT) FLEXITM от Promega (Мэдисон, Висконсин).

[0066] Также могут применяться вирусные векторы. Типичные коммерчески доступные вирусные векторы экспрессии предусматривают без ограничения систему

на основе аденовируса Рег.С6 от Crucell, Inc. (Лейден, Нидерланды), систему на основе лентивируса pLP1 от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния) и ретровирусные векторы pFB-ERV и pCFB-EGSH от Stratagene (Ла-Хойя, Калифорния).

[0067] Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности по настоящему изобретению, могут вводиться в клетку на одном и том же векторе (т. е. в *цис*-положении). Однонаправленный промотор может применяться для регуляции экспрессии каждой последовательности нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления для регуляции экспрессии нескольких последовательностей нуклеиновой кислоты может применяться комбинация двунаправленных и однонаправленных промоторов. В качестве альтернативы, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности по настоящему изобретению, могут вводиться в популяцию клеток на отдельных векторах (т. е. в *транс*-положении). Каждая из последовательностей нуклеиновой кислоты в каждом из отдельных векторов может содержать одинаковые или различные последовательности регуляции экспрессии. Отдельные векторы могут вводиться в клетки одновременно или последовательно.

[0068] Вектор(ы), содержащий нуклеиновую кислоту(ы), кодирующую аминокислотные последовательности по настоящему изобретению, может быть введен в клетку-хозяина, способную экспрессировать кодируемые этими нуклеиновыми кислотами полипептиды, включая любую подходящую прокариотическую или эукариотическую клетку. В связи с этим в настоящем изобретении предусмотрена выделенная клетка, содержащая вектор по настоящему изобретению. Клетки-хозяева предусматривают клетки, которые можно легко и надежно выращивать, которые характеризуются высокой скоростью роста, имеют хорошо охарактеризованные системы экспрессии и могут легко и эффективно подвергаться трансформации или трансфекции.

[0069] Примеры подходящих прокариотических клеток включают без ограничения клетки из рода *Bacillus* (такие как *Bacillus subtilis* и *Bacillus brevis*), *Escherichia* (такие как *E. coli*), *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Salmonella* и *Erwinia*. Применимые прокариотические клетки предусматривают, например, различные

штаммы *Escherichia coli* (например, K12, HB101 (№ в ATCC 33694), DH5 α , DH10, MC1061 (№ в ATCC 53338) и CC102).

[0070] Согласно некоторым вариантам осуществления вектор по настоящему изобретению вводится в эукариотическую клетку. Подходящие эукариотические клетки известны из уровня техники и предусматривают, например, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Примеры подходящих клеток дрожжей включают клетки из рода *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhinosporidium*, *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*. Клетки дрожжей предусматривают, например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

[0071] Подходящие клетки насекомых описаны, например, в Kitts et al., *Biotechniques*, 14: 810–817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 564–572 (1993); и Lucklow et al., *J. Virol.*, 67: 4566–4579 (1993). Клетки насекомых предусматривают, например, Sf-9 и HI5 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния).

[0072] Согласно некоторым вариантам осуществления используются клетки млекопитающих. Из уровня техники известен ряд подходящих клеток-хозяев, представляющих собой клетки млекопитающих, и многие из них доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Виргиния). Примеры подходящих клеток млекопитающих включают без ограничения клетки яичника китайского хомячка (CHO) (№ в ATCC CCL61), клетки CHO DHFR (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4216-4220 (1980)), клетки эмбриональной почки человека (HEK) 293 или клетки 293T (№ в ATCC CRL1573) и клетки 3T3 (№ в ATCC CCL92). Другими подходящими линиями клеток млекопитающих являются линии клеток обезьяны COS-1 (№ в ATCC CRL1650) и линии клеток COS-7 (№ в ATCC CRL1651), а также линия клеток CV-1 (№ в ATCC CCL70). Дополнительные иллюстративные клетки-хозяева, представляющие собой клетки млекопитающих, включают линии клеток приматов и линии клеток грызунов, в том числе линии трансформированных клеток. Подходящими являются также нормальные диплоидные клетки, штаммы клеток, происходящие от *in vitro* культуры первичной ткани, а также первичные эксплантаты. Другие подходящие линии клеток млекопитающих включают без ограничения клетки нейробластомы мыши N2A, HeLa, клетки мыши L-929 и линии клеток хомячка ВНК или НаК, все из которых доступны от ATCC. Способы отбора

подходящих клеток-хозяев, представляющих собой клетки млекопитающих, и способы трансформации, культивирования, амплификации, скрининга и очистки клеток известны из уровня техники.

[0073] Согласно некоторым вариантам осуществления клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. Например, клеткой млекопитающего может быть линия лимфоидных клеток человека или линия клеток, происходящих от лимфоидных клеток, такая как линия клеток, происходящая от пре-В-лимфоцитов. Примеры линий лимфоидных клеток человека включают без ограничения клетки RAMOS (CRL-1596), Daudi (CCL-213), EB-3 (CCL-85), DT40 (CRL-2111), 18-81 (Jack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 1581-1585 (1988)), клетки Raji (CCL-86), клетки PER.C6 (Crucell Holland B.V., Лейден, Нидерланды) и их производные.

[0074] Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность по настоящему изобретению, может вводиться в клетку за счет «трансфекции», «трансформации» или «трансдукции». Используемые в данном документе «трансфекция», «трансформация» или «трансдукция» относятся к введению одного или более экзогенных полинуклеотидов в клетку-хозяина с применением физических или химических способов. Из уровня техники известно множество методик трансфекции, и они предусматривают, например, соосаждение ДНК и фосфата кальция (см., например, Murray E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)); DEAE-декстран; электропорацию; трансфекцию, опосредуемую катионными липосомами; бомбардировку микрочастицами с применением частиц вольфрама (Johnston, *Nature*, 346: 776–777 (1990)); и соосаждение ДНК и фосфата стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031–2034 (1987)). Фаговые или вирусные векторы могут вводиться в клетки-хозяева после выращивания инфекционных частиц в подходящих упаковывающих клетках, многие из которых являются коммерчески доступными.

[0075] В настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая эффективное количество полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептида легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, связывающего TIM-3 средства по настоящему изобретению, последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирующей

любое из вышеупомянутого, или вектора по настоящему изобретению, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция представляет собой фармацевтически приемлемую (например, физиологически приемлемую) композицию, которая содержит носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый (например, физиологически приемлемый) носитель, и аминокислотные последовательности, антигенсвязывающее средство или вектор по настоящему изобретению. В контексте настоящего изобретения может быть использован любой подходящий носитель, и такие носители хорошо известны из уровня техники. Выбор носителя частично будет определяться конкретным участком, в который может быть введена композиция, и конкретным способом введения композиции. Необязательно композиция может быть стерильной. Композиция может быть заморожена или лиофилизована для ее хранения и разводиться подходящим стерильным носителем перед применением. Композиции можно получать согласно стандартным методикам, описанными, например, в Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001).

[0076] В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения любого заболевания или нарушения, при котором экспрессия, неадекватная экспрессия (например, сверхэкспрессия) или повышенная активность белка TIM-3 вызывает или вносит вклад в патологические эффекты этого заболевания, или снижение уровней или активности белка TIM-3 обеспечивает терапевтический эффект у млекопитающих, таких как человек. Млекопитающие включают, например, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, коров, лошадей, отличных от человека приматов и человека.

[0077] TIM-3 является негативным регулятором иммунного ответа и, поэтому, является мишенью для терапии (**фигура 1**). Следовательно в настоящем изобретении, кроме того, предусмотрены способы лечения нарушения, которое реагирует на ингибирование или нейтрализацию TIM-3, у млекопитающего. Способ предусматривает введение вышеупомянутой композиции млекопитающему, имеющему нарушение, которое реагирует на ингибирование или нейтрализацию TIM-3, за счет чего осуществляется лечение нарушения у млекопитающего. Нарушение, которое «реагирует на ингибирование TIM-3» или «реагирует на нейтрализацию TIM-

3» относится к любому заболеванию или нарушению, при котором снижение уровней или активности TIM-3 приводит к терапевтической пользе у млекопитающих, например человека, или неадекватная экспрессия (например, сверхэкспрессия) или повышенная активность TIM-3 вызывает или вносит вклад в патологические эффекты заболевания или нарушения. Нарушения, которые реагируют на ингибирование TIM-3, включают, например, рак, инфекционные заболевания и аутоиммунные заболевания.

[0078] Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены способы усиления иммунного ответа или повышения активности иммунной клетки у млекопитающего, имеющего нарушение, которое реагирует на ингибирование TIM-3. Согласно некоторым вариантам осуществления такие способы предусматривают введение эффективного количества любого связывающего TIM-3 средства или средства на основе антитела, описываемых в данном документе. Согласно некоторым вариантам осуществления введение связывающего TIM-3 средства усиливает или повышает иммунную ответ или активность иммунных клеток у млекопитающего или в его ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ представляет собой гуморальный или опосредованный клетками иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ представляет собой CD4 или CD8 Т-клеточный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ представляет собой В-клеточный ответ.

[0079] Способы по настоящему изобретению можно применять для лечения любого типа рака, известного из уровня техники, такого как, например, меланома, почечноклеточная карцинома, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак гортани, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак слюнных желез, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, аденокарцинома (например, аденокарцинома легкого) или карцинома из клеток Меркеля (см., например, Bhatia et al., *Curr. Oncol. Rep.*, 13(6): 488–497 (2011)). Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой рак эндометрия, рак молочной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак фаллопиевых труб, рак яичка, первичный рак брюшины, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак тонкого кишечника, плоскоклеточную карциному аногенитальной области, меланому, почечноклеточную карциному, рак легкого,

немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак печени, рак щитовидной железы, рак гортани, рак слюнных желез, рак пищевода, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному головы и шеи, аденокарциному, аденокарциному легкого, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, мезотелиому, карциному из клеток Меркеля, саркому, глиобластому или гематологический рак (например, множественную миелому, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина/первичную медиастинальную В-клеточную лимфому или хронический миелогенный лейкоз). Согласно некоторым вариантам осуществления рак, подлежащий лечению посредством способов и/или композиций по настоящему изобретению, описываемых в данном документе, характеризуется микросателлитной нестабильностью или ее отсутствием. Микросателлитная нестабильность («MSI») представляет собой или предусматривает изменение в ДНК определенных клеток (таких как опухолевые клетки), при котором число повторов микросателлитов (коротких повторяющихся последовательностей ДНК) отличается от числа повторов, которые содержались в ДНК, из которой она произошла. Микросателлитная нестабильность возникает вследствие неспособности исправить ошибки, связанные с репликацией, из-за дефектной системы репарации ошибочного спаривания (MMR) ДНК. Такая неспособность обеспечивает возможность сохранения мутаций ошибочного спаривания по всему геному, но особенно в областях повторяющейся ДНК, известных как микросателлиты, что приводит к увеличению мутационной нагрузки. Было продемонстрировано, что по меньшей мере некоторые опухоли, для которых характерна MSI-H, проявляют улучшенные ответы на определенные средства к PD-1 (Le et al., (2015) *N. Engl. J. Med.* 372(26):2509–2520; Westdorp et al., (2016) *Cancer Immunol. Immunother.* 65(10):1249–1259).

[0080] Согласно некоторым вариантам осуществления статус микросателлитной нестабильности рака предусматривает высокую микросателлитную нестабильность (например, статус MSI-H). Согласно некоторым вариантам осуществления статус микросателлитной нестабильности рака предусматривает низкую микросателлитную нестабильность (например, статус MSI-L). Согласно некоторым вариантам осуществления статус микросателлитной нестабильности рака предусматривает стабильный по микросателлитам (например, статус MSS). Согласно некоторым

вариантам осуществления статус микросателлитной нестабильности оценивают с помощью анализа на основе секвенирования нового поколения (NGS), анализа на основе иммуногистохимии (ИHC) и/или анализа на основе PCR. Согласно некоторым вариантам осуществления микросателлитную нестабильность выявляют с помощью NGS. Согласно некоторым вариантам осуществления микросателлитную нестабильность выявляют с помощью ИHC. Согласно некоторым вариантам осуществления микросателлитную нестабильность выявляют с помощью PCR.

[0081] Согласно вариантам осуществления рак ассоциирован с высокой мутационной нагрузкой опухоли (TMB). Согласно некоторым вариантам осуществления рак ассоциирован с высокой TMB и MSI-H. Согласно некоторым вариантам осуществления рак ассоциирован с высокой TMB и MSI-L или MSS. Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой рак эндометрия, ассоциированный с высокой TMB. Согласно некоторым родственным вариантам осуществления рак эндометрия ассоциирован с высокой TMB и MSI-H. Согласно некоторым родственным вариантам осуществления рак эндометрия ассоциирован с высокой TMB и MSI-L или MSS.

[0082] Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой рак с недостаточной репарацией ошибочного спаривания. Микросателлитная нестабильность может возникать вследствие неспособности исправить ошибки, связанные с репликацией, из-за дефектной системы репарации ошибочного спаривания (MMR) ДНК. Такая неспособность обеспечивает возможность сохранения мутаций ошибочного спаривания по всему геному, но особенно в областях повторяющейся ДНК, известных как микросателлиты, что приводит к увеличению мутационной нагрузки, что может улучшить ответ на определенные средства к PD-1. Там же. Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой гипермутированный рак. Согласно некоторым вариантам осуществления рак несет мутацию в полимеразе эILON (POLE).

[0083] Способы по настоящему изобретению можно применять для любого типа лечения инфекционного заболевания (т. е. заболевания или нарушения, вызываемого бактерией, вирусом, грибом или паразитом). Примеры инфекционных заболеваний, которые можно лечить посредством способа по настоящему изобретению, включают

без ограничения заболевания, вызываемые вирусом иммунодефицита человека (HIV), респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), вирусом гриппа, вирусом денге, вирусом гепатита В (HBV) или вирусом гепатита С (HCV).

[0084] Способы по настоящему изобретению можно применять для лечения любого типа аутоиммунного заболевания (т. е. заболевания или нарушения, вызываемого гиперактивностью иммунной системы, при которой организм атакует и повреждает свои собственные ткани), такого как заболевания, описанные, например, в MacKay I.R. and Rose N.R., eds., *The Autoimmune Diseases, Fifth Edition*, Academic Press, Waltham, MA (2014). Примеры аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить посредством способа по настоящему изобретению, включают без ограничения рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, ревматоидный артрит, склеродермию, болезнь Крона, псориаз, системную красную волчанку (SLE) и язвенный колит.

[0085] Введение композиции, содержащей полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, связывающее TIM-3 средство по настоящему изобретению, последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирующую любое из вышеупомянутого, или вектор по настоящему изобретению, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, индуцирует иммунный ответ против рака или инфекционного заболевания у млекопитающего. Млекопитающие включают, например, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, коров, лошадей, отличных от человека приматов и человека. «Иммунный ответ» может подразумевать, например, выработку антител и/или активацию иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток).

[0086] Используемые в данном документе термины «лечение», «осуществление лечения» и т. п. относятся к достижению требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Согласно некоторым вариантам осуществления эффект представляет собой терапевтический эффект, т. е. эффектом является частичное или полное излечение заболевания и/или негативного симптома, присущего заболеванию. В связи с этим, способ по настоящему изобретению предусматривает введение «терапевтически эффективного количества» средства на основе антитела к TIM-3. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое при

дозировках и в течение необходимых периодов времени эффективно в достижении требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность средства на основе антитела к TIM-3 вызывать требуемый ответ у индивидуума. Например, терапевтически эффективное количество средства на основе антитела к TIM-3 представляет собой количество, снижающее биоактивность TIM-3 у человека.

[0087] В качестве дополнения или альтернативы фармакологический и/или физиологический эффект может быть профилактическим, т. е. эффект полностью или частично предупреждает заболевание или его симптом. При этом способ по настоящему изобретению предусматривает введение «профилактически эффективного количества» средства на основе антитела к TIM-3. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, которое при дозировках и в течение необходимых периодов времени эффективно в достижении требуемого профилактического результата (например, предупреждения начала развития заболевания).

[0088] Типичная доза может находиться, например, в диапазоне от 1 пг/кг до 20 мг/кг массы тела животного или человека; однако дозы выше или ниже данного иллюстративного диапазона попадают в объем настоящего изобретения. Ежесуточная парентеральная доза может составлять от приблизительно 0,00001 мкг/кг до приблизительно 20 мг/кг общей массы тела (например, приблизительно 0,001 мкг/кг, приблизительно 0,1 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 5 мкг/кг, приблизительно 10 мкг/кг, приблизительно 100 мкг/кг, приблизительно 500 мкг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления доза составляет от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг общей массы тела (например, приблизительно 0,5 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 50 мкг/кг, приблизительно 150 мкг/кг, приблизительно 300 мкг/кг, приблизительно 750 мкг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления доза составляет от приблизительно 1 мкг/кг до 5 мг/кг общей массы тела (например,

приблизительно 3 мкг/кг, приблизительно 15 мкг/кг, приблизительно 75 мкг/кг, приблизительно 300 мкг/кг, приблизительно 900 мкг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления доза составляет от приблизительно 0,5 до 15 мг/кг массы тела в сутки (например, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 11 мг/кг, приблизительно 13 мг/кг, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Терапевтическую или профилактическую эффективность можно отслеживать путем проведения периодической оценки получающих лечение пациентов. В случае повторных введений в течение нескольких суток или более в зависимости от состояния лечение можно повторять до проявления требуемого подавления симптомов заболевания, или в качестве альтернативы лечение может продолжаться в течение всей жизни пациента. Однако могут быть применимы и другие схемы введения доз, и эти схемы попадают в объем настоящего изобретения. Требуемая дозировка может доставляться за счет однократного болюсного введения композиции, нескольких болюсных введений композиции или непрерывного инфузионного введения композиции.

[0089] Композиция(и), содержащая эффективное количество полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, полипептида легкой цепи иммуноглобулина по настоящему изобретению, связывающего TIM-3 средства по настоящему изобретению, последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирующей любое из вышеупомянутого, или вектор по настоящему изобретению, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, может вводиться млекопитающему с применением стандартных методик введения, включая пероральное, глазное, парентеральное, внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное, легочное, бронхиальное, буккальное, интрадермальное, внутрикожное, трансдермальное, местное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, подъязычное, энтеральное, внутриартериальное, внутрижелудочное, внутрь конкретного органа (например, внутripеченочное), ректальное, подкожное, подъязычное, трахеальное, вагинальное, витреальное, интрамедуллярное, интратекальное, интравентрикулярное, чресслизистое введение

или введение с помощью суппозитория. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция подходит для парентерального введения. Используемый в данном документе термин «парентеральное» предусматривает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию вводят млекопитающему с применением периферической системной доставки за счет внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции. Млекопитающие включают, например, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, коров, лошадей, отличных от человека приматов и человека.

[0090] После введения млекопитающему (например, человеку) биологическую активность средства на основе антитела к TIM-3 можно измерять любым подходящим способом, известным из уровня техники. Например, биологическую активность можно оценить посредством определения стабильности конкретного связывающего TIM-3 средства. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 (например, антитело) характеризуется *in vivo* временем полувыведения от приблизительно 30 минут до 45 суток (например, приблизительно 30 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 6 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 1 сутки, приблизительно 5 суток, приблизительно 10 суток, приблизительно 15 суток, приблизительно 25 суток, приблизительно 35 суток, приблизительно 40 суток, приблизительно 45 суток, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 характеризуется *in vivo* временем полувыведения от приблизительно 2 часов до 20 суток (например, приблизительно 5 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 2 суток, приблизительно 3 суток, приблизительно 7 суток, приблизительно 12 суток, приблизительно 14 суток, приблизительно 17 суток, приблизительно 19 суток, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 характеризуется *in vivo* временем полувыведения от приблизительно 10 суток до приблизительно 40 суток (например, приблизительно 10 суток, приблизительно 13 суток, приблизительно 16

суток, приблизительно 18 суток, приблизительно 20 суток, приблизительно 23 суток, приблизительно 26 суток, приблизительно 29 суток, приблизительно 30 суток, приблизительно 33 суток, приблизительно 37 суток, приблизительно 38 суток, приблизительно 39 суток, приблизительно 40 суток, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений).

[0091] Стабильность средства на основе антитела к TIM-3 можно измерить с применением любого другого подходящего анализа, известного из уровня техники, такого как, например, измерение времени полувыведения из сыворотки, дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC), анализы на тепловой сдвиг и анализы вытеснения метки. Другие способы измерения стабильности белка *in vivo* и *in vitro*, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, описаны, например, в *Protein Stability and Folding*, B.A. Shirley (ed.), Human Press, Totowa, New Jersey (1995); *Protein Structure, Stability, and Interactions (Methods in Molecular Biology)*, Shiver J.W. (ed.), Humana Press, New York, NY (2010); и Ignatova, *Microb. Cell Fact.*, 4: 23 (2005).

[0092] Стабильность средства на основе антитела к TIM-3 можно измерить по величине средней точки перехода (T_m), представляющей собой температуру, при которой 50% аминокислотной последовательности присутствует в своей нативной конформации, а остальные 50% денатурированы. В целом, чем выше T_m , тем более стабильным является белок. Согласно некоторым вариантам осуществления значение средней точки перехода (T_m) *in vitro* для связывающего TIM-3 средства по настоящему изобретению составляет приблизительно 60-100°C. Например, $T_{min\ vitro}$ средства на основе антитела к TIM-3 может составлять приблизительно 65-80°C (например, 66°C, 68°C, 70°C, 71°C, 75°C или 79°C), приблизительно 80-90°C (например, приблизительно 81°C, 85°C или 89°C) или приблизительно 90-100°C (например, приблизительно 91°C, приблизительно 95°C или приблизительно 99°C).

[0093] Биологическую активность конкретного связывающего TIM-3 средства на основе антитела также можно оценить путем определения аффинности его связывания с TIM-3 или его эпитопом. Термин «аффинность» относится к константе равновесия для обратимого связывания двух средств и выражается как константа диссоциации (K_D). Аффинность связывания средства с лигандом, такая как аффинность связывания

антитела с эпитопом, может быть, например, от приблизительно 1 пикомоль/л (пМ) до приблизительно 100 микромоль/л (мкМ) (например, от приблизительно 1 пикомоль/л (пМ) до приблизительно 1 наномоль/л (нМ), от приблизительно 1 нМ до приблизительно 1 микромоль/л (мкМ) или от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 100 мкМ). Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 может связываться с белком TIM-3 с K_D , равной 1 наномоль/л или меньше (например, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ, 0,025 нМ, 0,01 нМ, 0,001 нМ, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 может связываться с TIM-3 с K_D , равной 200 пМ или меньше (например, 190 пМ, 175 пМ, 150 пМ, 125 пМ, 110 пМ, 100 пМ, 90 пМ, 80 пМ, 75 пМ, 60 пМ, 50 пМ, 40 пМ, 30 пМ, 25 пМ, 20 пМ, 15 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ, или находится в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеупомянутых значений). Аффинность иммуноглобулина в отношении представляющего интерес антигена или эпитопа можно оценить с помощью любого принятого в данной области анализа. Такие способы предусматривают, например, сортировку клеток с активацией флуоресценции (FACS), отделяемые гранулы (например, магнитные гранулы), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), конкурентное связывание в жидкой фазе (KINEXA™), пэннинг антигена, анализы конкурентного связывания и/или ELISA (см., например, Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th ed., Garland Publishing, New York, NY, 2001).

[1] Средство на основе антитела к TIM-3 можно вводить отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами. Например, средство на основе антитела к TIM-3 можно вводить в комбинации с другими средствами для лечения или предотвращения заболеваний, раскрываемых в данном документе, чтобы средства, которые являются цитотоксичными для раковых клеток, модулировали иммуногенность раковых клеток или стимулировали иммунные ответы на раковые клетки. При этом, например, средство на основе антитела к TIM-3 можно применять в комбинации с по меньшей мере одним другим противораковым средством, включая, например, любое химиотерапевтическое средство, известное из уровня техники; ионизирующее излучение; низкомолекулярные противораковые средства; противораковые вакцины; биологические терапевтические средства (например, другие

моноклональные антитела, противораковые вирусы, средства генной терапии и адоптивный перенос Т-клеток) и/или хирургическую операцию. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта (например, млекопитающего, например, человека), подлежащего лечению средством на основе антитела к TIM-3, лечили или будут лечить химиотерапией (например, химиотерапией на основе платины). Согласно некоторым вариантам осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой актиномицин, полностью транс-ретиноевую кислоту, азациитидин, азатиоприн, блеомицин, бортезомиб, карбоплатин, капецитабин, цисплатин, хлорамбуцил, циклофосфамид, цитарабин, даунорубицин, доцетаксел, доксифлуридин, доксорубицин, эпирубицин, эпотилон, этопозид, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, идарубицин, иматиниб, иринотекан, мехлорэтамин, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел, пеметрексед, тенипозид, тиогуанин, топотекан, валрубицин, вемурафениб, вибластин, винкристин, виндезин или винорелбин. Согласно некоторым таким вариантам осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство на основе платины, такое как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, недаплатин, триплатина тетранитрат, фенантриплатин, пикоплатин или сатраплатин. Согласно некоторым таким вариантам осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой фолатный антиметаболит, такой как пеметрексед. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта (например, млекопитающего, например, человека), подлежащего лечению средством на основе антитела к TIM-3, лечили или будут лечить антиангиогенным средством, например, бевацизумабом, итраконазолом, карбоксиамидотриазолом, TNP-470, фумагиллином, CM101, IL-12, тромбоцитарным фактором-4, сурамином, SU5416, тромбоспондином, ангиостатическими стероидами, гепарином, хрящевым фактором, ингибирующим ангиогенез (например, пептидом тропонин I и хондромодулин I), ингибитором матричной металлопротеиназы, ангиостатином, эндостатином, 2-метоксиэстрадиолом, текогаланом, тетратиомолибдатом, тромбоспондином, талидомидом, пролактином, ингибитором $\alpha V\beta 3$, леналидомидом, линомидом, рамуцирумабом, тасквинимодом, ранибизумабом, сорафенибом, сунитинибом, пазопанибом, эверолимусом, тканевыми ингибиторами металлопротеаз (TIMP1 и TIMP2), растворимым рецептором bFGF, трансформирующим фактором роста бета, интерфероном альфа, интерфероном бета,

растворимыми рецепторами KDR и FLT-1, белком, родственным плацентарному пролиферину, пазопанибом, сунитинибом, сорафенибом, акситинибом, понатинибом, кабозантинибом, регорафенибом, вандетанибом, ленватинибом, семаксанибом, SU6668, ваталанибом, тивозанибом, цедиранибом, протамином, гепарином, стероидами, эфирами аскорбиновой кислоты, сульфатированным полисахаридом DS 4152, фумагиллином, AGM 12470, неовастатом, RO4929097, MRK-003, MK-0752, PF03084014, MEDI0639, куркумином, 3,3'-дииндолилметаном (DIM), ресвератролом, 3,5-бис(2,4-дифторбензилиден)-4-пиперидоном (DiFiD) и эпигаллокатехин-3-галлатом (EGCG), хонокиолом, Flt2-11, CBO-P11, Je-11, V1 и любой их комбинацией. Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 можно применять в комбинации с противовоспалительным средством, включая, например, кортикостероиды (например, преднизон и флутиказон) и нестероидные противовоспалительные средства (NSAID) (например, аспирин, ибупрофен и напроксен).

[0094] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 применяют для лечения инфекционного заболевания. Если способ по настоящему изобретению применяют для лечения инфекционного заболевания, то средство на основе антитела к TIM-3 можно вводить в комбинации с по меньшей мере одним противобактериальным средством или по меньшей мере одним противовирусным средством. При этом противобактериальным средством может быть любой подходящий антибиотик, известный из уровня техники. Противовирусным средством может быть любая вакцина любого подходящего типа, которая специфически нацеливается на конкретный вирус (например, живые аттенуированные вакцины, субъединичные вакцины, рекомбинантные векторные вакцины) и низкомолекулярные противовирусные терапевтические средства (например, ингибиторы вирусной репликации и аналоги нуклеозидов).

[0095] Согласно некоторым вариантам осуществления средство на основе антитела к TIM-3 применяют для лечения аутоиммунного заболевания. Если способ по настоящему изобретению применяют для лечения аутоиммунного заболевания, то средство на основе антитела к TIM-3 можно применять в комбинации с противовоспалительным средством, включая, например, кортикостероиды (например,

преднизон и флутиказон) и нестероидные противовоспалительные средства (NSAID) (например, аспирин, ибупрофен и напроксен).

[0096] Согласно некоторым вариантам осуществления если средство на основе антитела к TIM-3 применяют для лечения рака или инфекционного заболевания, то связывающее TIM-3 средство может быть введено в комбинации с другими средствами, которые ингибируют пути контрольных точек иммунного ответа. Например, средство на основе антитела к TIM-3 может быть введено в комбинации со средствами, которые ингибируют или антагонизируют пути белка-1 программируемой смерти (PD-1), белка гена-3 активации лимфоцитов (LAG-3) и/или белка-4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4). Было продемонстрировано, что виды комбинированной терапии, одновременно нацеливающиеся на два или более таких путей контрольных точек иммунного ответа, повышают противоопухолевую активность и потенциально действуют синергически с ней (см., например, Sakuishi et al., *J. Exp. Med.*, 207: 2187-2194 (2010); Ngiew et al., *Cancer Res.*, 71: 3540-3551 (2011); и Woo et al., *Cancer Res.*, 72: 917-927 (2012)). Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее TIM-3 средство по настоящему изобретению вводят в комбинации со средством, которое ингибирует передачу сигнала LAG-3, и/или со средством, которое ингибирует передачу сигнала PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее TIM-3 средство по настоящему изобретению вводят субъекту, которому ввели или будут вводить средство, которое ингибирует передачу сигнала LAG-3, вследствие чего субъект получает лечение обоими средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее TIM-3 средство по настоящему изобретению вводят субъекту, которому ввели или будут вводить средство, которое ингибирует передачу сигнала PD-1, вследствие чего субъект получает лечение обоими средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающее, которое получает лечение средством против TIM-3 по настоящему изобретению, получало или будет получать лечение средством, которое ингибирует PD-1, и средством, которое ингибирует LAG-3, вследствие чего млекопитающее получает все три средства.

[0097] Согласно некоторым вариантам осуществления связывающее TIM-3 средство по настоящему изобретению вводят в комбинации с антителом, которое

связывается с LAG-3, и/или с антителом, которое связывается с PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антителом к PD-1 является антитело, выбранное из группы, состоящей из BGB-A317, BI 754091, IBI308, INCSHR-1210, JNJ-63723283, JS-001, MEDI-0680, MGA-012, ниволумаба, PDR001, пембролизумаба, PF-06801591, REGN-2810, TSR-042 и их производных. Согласно некоторым вариантам осуществления средством, которое ингибирует PD-1, является средство, связывающее PD-L1/L2. Согласно некоторым вариантам осуществления средством, связывающим PD-L1/L2, является антитело к PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления средством на основе антитела к PD-L1 является атезолизумаб, авелумаб, CX-072, дурвалумаб, FAZ053, LY3300054, милламолекула PD-L1 или их производные.

[0098] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект получает или будет получать один или более дополнительных видов терапии в комбинации со связывающим TIM-3 средством. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное средство терапии представляет собой ингибитор PARP. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор PARP представляет собой ABT-767, AZD 2461, BGB-290, BGP 15, CEP 8983, CEP 9722, DR 2313, E7016, E7449, флузопариб (SHR 3162), IMP 4297, INO1001, JPI 289, JPI 547, конъюгат моноклональное антитело B3-LysPE40, MP 124, нирапариб (ZEJULA) (МК-4827), NU 1025, NU 1064, NU 1076, NU1085, олапариб (AZD2281), ONO2231, PD 128763, R 503, R554, рукапариб (RUBRACA) (AG-014699, PF-01367338), SBP 101, SC 101914, симмипариб, талазопариб (BMN-673), велипариб (ABT-888), WW 46, 2-(4-(трифторметил)фенил)-7,8-дигидро-5Н-тиопирано[4,3-d]пиримидин-4-ол и их соли или производные. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор PARP представляет собой нирапириб, олапариб, рукапариб, талазопариб и велипариб. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительные виды терапии предусматривают лечение композицией, которая доставляет средство, ингибирующее PD-1, и лечение ингибитором PARP, вследствие чего субъект получает лечение всеми тремя средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительные виды терапии предусматривают лечение композицией, которая доставляет средство, ингибирующее PD-1, лечение композицией, которая доставляет средство, ингибирующее LAG-3, и лечение ингибитором PARP, вследствие чего субъект получает лечение всеми четырьмя средствами.

[0099] При этом способ лечения нарушения, которое реагирует на ингибирование TIM-3 (например, рак или инфекционное заболевание), у млекопитающего может дополнительно предусматривать введение млекопитающему композиции, содержащей (i) антитело, которое связывается с белком TIM-3, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель, или композиции, содержащей (i) антитело, которое связывается с белком PD-1, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель. Млекопитающие включают, например, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, коров, лошадей, отличных от человека приматов и человека.

[00100] Кроме терапевтических путей применения средство на основе антитела к TIM-3, описываемое в данном документе, может применяться в диагностике или исследованиях. При этом средство на основе антитела к TIM-3 можно применять в способе диагностики нарушения или заболевания, при которых неадекватная экспрессия (например, сверхэкспрессия) или повышенная активность TIM-3 вызывает или вносит вклад в патологические эффекты заболевания или нарушения. Аналогичным образом, средство на основе антитела к TIM-3 можно применять в анализе для отслеживания уровней белка TIM-3 у субъекта, тестируемого на предмет наличия заболевания или нарушения, которое реагирует на ингибирование TIM-3. Исследовательские применения предусматривают, например, способы, в которых используется средство на основе антитела к TIM-3 и метка для выявления белка TIM-3 в образце, например, в физиологической жидкости человека или в экстракте клеток или тканей. Средство на основе антитела к TIM-3 можно применять в немодифицированном или модифицированном виде, например, при ковалентном или нековалентном мечении выявляемым фрагментом. Например, выявляемым фрагментом может быть радиоизотоп (например, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I), флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение (например, флуоресцеин-изотиоцианат, родамин или люциферин), фермент (например, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена) или простетические группы. В контексте настоящего изобретения может быть применен любой известный из уровня техники способ отдельного конъюгирования антигенсвязывающего средства (например, антитела) с выявляемым фрагментом (см., например, Hunter et al., *Nature*, 194: 495–496 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014–1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40: 219–230 (1981); и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407–412 (1982)).

[00101]Уровни белка TIM-3 могут быть измерены с применением связывающего TIM-3 средства по настоящему изобретению любым подходящим способом, известным из уровня техники. Такие способы предусматривают, например, радиоиммуноанализ (RIA) и FACS. Нормальные или стандартные значения экспрессии TIM-3 можно получить с применением любой подходящей методики, например, путем объединения образца, содержащего или предположительно содержащего TIM-3, и антитела, специфического к TIM-3, в условиях, подходящих для образования комплекса антиген-антитело. Антитело прямо или опосредованно метят выявляемым веществом для облегчения выявления связавшегося или несвязавшегося антитела. Подходящие выявляемые вещества включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)). Количество полипептида TIM-3, экспрессируемого в образце, затем сравнивают со стандартным значением.

[00102]Средство на основе антитела к TIM-3 может обеспечиваться в наборе, например, упакованной комбинации реагентов в предварительно определенных количествах с инструкциями по осуществлению диагностического анализа. Если средство на основе антитела к TIM-3 помечено ферментом, то набор предпочтительно содержит субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, субстратный предшественник, который приводит к выявляемому хромофору или флуорофору). Кроме того, в набор могут быть включены и другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или буфер для лизиса) и т. п. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться для обеспечения в растворе концентраций реагентов, которые значительно оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут обеспечиваться в виде сухих порошков (обычно лиофилизированных), и наборы включают вспомогательные средства, которые после растворения будут обеспечивать раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию.

[00103]Другие признаки настоящего изобретения станут очевидными на протяжении следующего описания иллюстративных вариантов осуществления,

которые приведены в качестве иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для его ограничения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Описание определенных иллюстративных антител к TIM-3

[00104] В данном примере описаны конкретные последовательности полипептида тяжелой цепи и полипептида легкой цепи антитела к TIM-3, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие их.

Полипептид тяжелой цепи антитела к TIM-3 (SEQ ID NO:1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVSTISGG
GTYYTYYQDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASMDYWGQGTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

Полипептид легкой цепи антитела к TIM-3 (SEQ ID NO:2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRRYLNWYHQKPGKAPKLLIYGASTLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQSHSAPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Полипептид тяжелой цепи антитела к TIM-3 с сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:5)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFTFSSYDMSW
VRQAPGKGLDWVSTISGGGTYYTYYQDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCASMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNT
KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE

DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSLGK

Полипептид легкой цепи антитела к TIM-3 с сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:6)

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRRYLN
WYHQKPGKAPKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQS
HSAPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид тяжелой цепи антитела к TIM-3 (SEQ ID NO: 3)

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC
TAT GAC ATG TCT TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAC TGG
GTC TCA ACC ATT AGT GGT GGT GGT ACT TAC ACC TAC TAT CAA GAC AGT
GTG AAG GGG CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG
TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC
TGT GCG TCC ATG GAC TAC TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC
TCA GCA TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCG CTA GCA CCC TGC TCC
AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC
TAC TTC CCC GAA CCA GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC
AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC
TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG
ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC
AAG AGA GTT GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA TGC CCA GCA
CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC
AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG
GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG
GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG

CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC
AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG
CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG
ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC
CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG
AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC
TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG
AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC
ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид легкой цепи антитела к TIM-3 (SEQ ID NO: 4)

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGG AGG TAT
TTA AAT TGG TAT CAC CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
TAT GGT GCA TCC ACC TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGT
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAA CAG AGT CAC AGT GCC CCC CTC
ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA
CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAA TTG AAA TCT GGA
ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC
AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG
GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC
AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA
GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTC AGC TCG CCC GTC ACA
AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT

[00105]Вышеприведенные последовательности описывают иллюстративное гуманизированное моноклональное антитело к TIM-3, в котором в качестве каркасных последовательностей использован ген тяжелой цепи IGHG4*01 человека и ген легкой каппа-цепи IGKC*01 человека. Имеется одиночная точковая мутация Ser в Про в шарнирной области тяжелой цепи IgG4. Данная мутация находится в каноническом

положении S228, соответствующем остатку 240 из SEQ ID NO: 5, которая содержит сигнальную последовательность. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что данная точковая мутация служит для стабилизации шарнирной области тяжелой цепи антитела.

[00106] Кроме того, в примере описано определение биофизических и биохимических характеристик данного иллюстративного гуманизированного моноклонального антитела к TIM-3. Пептиды, расщепленные под действием Lys-C и трипсина, с легкостью отделяли и выявляли с помощью анализа LC-MS в режиме реального времени. Дисульфидные связи подтверждали путем сравнения общих ионных хроматограмм в невозстанавливающих (NR) условиях и восстанавливающих условиях. Дисульфидные связи соответствовали ожидаемому паттерну дисульфидных связей у молекулы IgG4. Остатки, вовлеченные в ожидаемые меж- и внутрицепочечные дисульфидные связи, приведены в таблице ниже (таблицы 1, 2 и 3).

Таблица 1. Ожидаемые остатки, вовлеченные в дисульфидные связи, из тяжелой цепи иллюстративного средства на основе антитела к TIM-3 с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 1.

ID цистеинового остатка	Остаток HC mAb к TIM-3 (положение в SEQ ID NO: 1)
I	22
II	96
III	127
IV	140
V	196
VI	219
VII	222
VIII	254
IX	314
X	360
XI	418

Таблица 2. Ожидаемые остатки, вовлеченные в дисульфидные связи, из легкой цепи иллюстративного средства на основе антитела к TIM-3 с аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 2.

ID цистеинового остатка	Остаток LC mAb к TIM-3 (положение в SEQ ID NO: 2)
-------------------------	--

I	23
II	88
III	134
IV	194
V	214

[00107] Таблица 3. Иллюстративное расположение дисульфидных связей в антителе к TIM-3

№ дисульфидной связи	Пептиды, содержащие дисульфидные связи	Сайт связи в HC (положение в SEQ ID NO:1)	Сайт связи в LC (положение в SEQ ID NO:2)
DS1	VTITCR=FSGSGSGTDFLTISLQPEDF AVYYCQQSHSAPLTFGGGTK		23 88
DS2	SGTASVVCLLNNFYPR=VYACEVTHQGL SSPVTK		134 194
DS3	SFNRGEC=GPSVFPLAPCSR GEC=GPSVFPLAPCSR	127	214
DS4	LSCAAASGFTFSSYDMSWVR=AEDTA VYYCASMDYWGGQTTVTVSSASTK	22 97	
DS5	STSESTAALGCLVK=TYTCNVDHK STSESTAALGCLVK=TYTCNVDHKPSNTK	140 196	
DS6	YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK=YGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK=YGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK	219 222	
DS7	TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAK=CK	254 314	
DS8	NQVSLTCLVK=WQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQK	360 418	

LC: легкая цепь; HC: тяжелая цепь

[00108] В данном иллюстративном антителе к TIM-3 присутствует занятый сайт N-гликозилирования по остатку аспарагина 290 в домене CH2 каждой тяжелой цепи в последовательности зрелого белка (SEQ ID NO: 1). Полученное в ходе экспрессии N-гликозилирование по этому сайту представляет собой смесь разновидностей олигосахаридов, как правило, наблюдаемых на IgG, экспрессируемых в культуре клеток млекопитающих, например, ниже показана относительная представленность разновидностей гликанов из препарата данного иллюстративного антитела к TIM-3, культивируемого в клетках яичника китайского хомячка (CHO) (таблица 4).

Таблица 4. Анализ гликанов связывающего средства на основе антитела к TIM-3

Разновидности	Представленность (% от общего числа олигосахаридов)	Описание гликана
G0F	20,1%	Олигосахарид типа агалактозилированного двухантенного комплекса с коровым фукозилированием
G1F	41,9%	Олигосахарид типа моногалактозилированного двухантенного комплекса с коровым фукозилированием
G2F	29,0%	Олигосахарид типа галактозилированного двухантенного комплекса с коровым фукозилированием
G2FS1	3,2%	Олигосахарид типа моносиалированного галактозилированного двухантенного комплекса с коровым фукозилированием
G2FS2	1,2%	Олигосахарид типа дисиалированного галактозилированного двухантенного комплекса с коровым фукозилированием
M5	0,4%	Олигоманнозный N-связанный олигосахарид, Man ₅ GlcNAc ₂

ПРИМЕР 2. Связывание иллюстративного антитела к TIM-3 с рекомбинантным TIM-3

[00109]В данном примере описано связывание иллюстративного антитела к TIM-3 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) с рекомбинантными полипептидами TIM-3. В частности, в данном примере продемонстрировано высокоаффинное связывание иллюстративного антитела с растворимыми слияниями TIM-3 и экспрессируемым клеткой рекомбинантным TIM-3, определяемое с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и проточной цитометрии, соответственно.

[00110]Анализы SPR выполняли с применением Biacore T200, а кинетические константы определяли с применением программного обеспечения для оценки Biacore T200. Экспериментальные параметры выбирали таким образом, что насыщение достигалось при наивысших концентрациях антигена, и значения R_{max} поддерживали ниже 50 единиц ответа (RU). Антитело к IgG мыши (Fc-специфическое) от GE иммобилизовали на чипе CM5 от Biacore с применением химии иммобилизации по аминогруппе через активированный EDC. Затем димерный растворимый TIM-3

человека-mIgG2a-Fc захватывали на этой поверхности с целевым уровнем захвата ~70 RU или меньше. Затем иллюстративное антитело к TIM-3 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) пропускали над поверхностью с захваченным антигеном (слияние TIM-3). Захват и связывание анализатора проводили в буфере HBS-EP+. Захваченный антиген и антитела удаляли между каждым циклом, чтобы обеспечить свежую поверхность связывания для каждой концентрации антигена. Полученные сенсограммы подвергали глобальной аппроксимации с применением модели связывания 1:1 для расчета скорости ассоциации и диссоциации (кассоц. и кдиссоц., соответственно) и констант диссоциации как меры общей аффинности (K_D). Результаты SPR показали, что иллюстративное антитело к TIM-3 с высокой аффинностью связывалось с TIM-3 человека и яванского макака с оценками K_D 7 и 17 пМ, соответственно (таблица 4). В дальнейших анализах связывания определили, что иллюстративное антитело к TIM-3 практически не связывается с полипептидом TIM-1 человека или полипептидом PD-1 человека (данные не показаны).

[00111]Исследования с применением проточной цитометрии проводили на клонах линии клеток CHO-K1, в которые был стабильно трансфицирован нативный TIM-3 человека или яванского макака. Иллюстративное антитело к TIM-3 (с тяжелой и легкой цепями, изложенными под SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно) разводили в виде 3-кратных разведений. Разведения иллюстративного антитела добавляли к клеткам CHO-K1 экспрессирующим TIM-3 человека или яванского макака (клеткам $1E5$), и инкубировали на льду. Клетки дважды промывали и инкубировали на льду с антителом козы к IgG4 человека, конъюгированным с PE, для выявления связывания антитела. Клетки промывали и ресуспендировали в присутствии пропидия йодида для исключения мертвых клеток и фиксировали перед анализом флуоресценции на BD FACSAarray (BD Biosciences). Данные анализировали в отношении средней интенсивности флуоресценции, наносили на график и кривые аппроксимировали для расчета значения EC_{50} с помощью GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) с применением анализа нелинейной (сигмоидной) регрессии. Обнаружили, что данное иллюстративное антитело к TIM-3 связывается с TIM-3 человека и яванского макака на клеточной поверхности с EC_{50} 0,17 и 0,27 нМ, соответственно (таблица 5).

Таблица 5. Связывание иллюстративного антитела к TIM-3 с TIM-3 по результатам поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и анализа с применением клеток CHO-K1, экспрессирующих TIM-3

Вид	Кинетические параметры (SPR)			Клетки CHO-K1, экспрессирующие TIM-3
	$K_{\text{ассоц.}} (\text{Mc})^{-1}$	$K_{\text{диссоц.}} (\text{с}^{-1})$	K_D (пМ)	
Человек	$1,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^{-4}$	7	0,17
Яванский макак	$1,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^{-4}$	17	0,27

$K_{\text{ассоц.}}$ = константа скорости ассоциации; $K_{\text{диссоц.}}$ = константа скорости диссоциации; K_D = константа диссоциации.

[00112]В данном примере продемонстрировано, что антитела к TIM-3, охватываемые объемом настоящего изобретения, могут специфически связываться с полипептидами TIM-3 с высокой аффинностью.

ПРИМЕР 3. Блокирование TIM-3 усиливает активацию Т-клеток в истощенных иммунных клетках

[00113]В данном примере описано определение характеристик иллюстративного средства на основе антитела к TIM-3 на *in vitro* модели истощения Т-клеток, характеризующейся повышенной экспрессией PD-1 и TIM-3 (фигура 2А). В частности, у мышей MBP-Tracker удаляли селезенку и обрабатывали для получения суспензии спленоцитов в виде отдельных клеток. Клетки ресуспендировали из расчета $3 \times 10^6/\text{мл}$ и стимулировали с помощью WT-MBP или APL-MBP в течение 72 часов. После стимуляции Т-клетки очищали с помощью градиента плотности фиколла, а затем повторно выращивали из расчета $2 \times 10^6/\text{мл}$ с 20 ед. IL-2/мл в течение четырех суток. Через 4 суток клетки собирали, ресуспендировали ($4 \times 10^5/\text{мл}$, конечная концентрация 2×10^4 на лунку) и повторно стимулировали с применением облученных APC (от мышей B10PLxC57BL/6, $4 \times 10^6/\text{мл}$, конечная концентрация 2×10^5 на лунку), одной дозы пептида APL-MBP, а также тестируемого или эталонного вещества или соответствующих контролей в течение 72 часов. Культуральные супернатанты собирали и хранили замороженными для последующего проведения оценки.

[00114]Оценка выработки цитокина с помощью ELISA показала, что блокирование TIM-3 значительно усиливало выработку IFN- γ в данной системе (фигура

2B). Следовательно, данный пример демонстрирует, что антитела к TIM-3 могут активировать истощенные иммунные клетки.

[00115] Таким образом, после описания по меньшей мере некоторых аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения, должно быть понятно, что различные изменения, модификации и улучшения будут очевидны для специалистов в данной области. Подразумевается, что такие изменения, модификации и улучшения являются частью настоящего раскрытия, и подразумевается, что они находятся в пределах сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно, вышеприведенное описание приведено исключительно в качестве примера, а настоящее изобретение подробно описано в нижеследующей формуле изобретения.

[00116] Все цитируемые в данном документе литературные источники, включая публикации, патентные заявки и патенты, тем самым включены в данный документ посредством ссылки, в равной мере, как если бы было указано, что каждый литературный источник индивидуально и специально включен посредством ссылки и изложен во всей своей полноте в данном документе.

Использование терминов в единственном числе и во множественном числе, а также фраз «по меньшей мере один» и подобных референтов в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) следует рассматривать, как охватывающее не только форму единственного числа, но и форму множественного числа, если в данном документе не указано иное, или если это явно не противоречит контексту. Использование термина «по меньшей мере один», за которой следует перечисление одного или более элементов (например, «по меньшей мере один из А и В»), следует рассматривать, как означающее один элемент, выбранный из перечисленных элементов (А или В) или любую комбинацию двух или более перечисленных элементов (А и В), если в данном документе не указано иное, или если это явно не противоречит контексту. Термины «состоящий», «имеющий», «включающий» и «содержащий» следует рассматривать как неограничивающие термины (т. е. означающие «включающий без ограничения»), если не указано иное. Предусматривается, что указание диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве сокращенного способа указания каждого отдельного значения в пределах диапазона, если в данном документе не указано иное,

и каждое отдельное значение включено в описание так, как если бы оно указывалось в данном документе индивидуально. Все способы, описываемые в данном документе, могут быть осуществлены в любом удобном порядке, если в данном документе не указано иное, или если это явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров или типичных фраз (например, «такой как»), представленных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения, а не для ограничения объема настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одна фраза в описании не должна рассматриваться как указание того, что какой-либо незаявленный элемент является необходимым для осуществления настоящего изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> АНАПТИСБИО, ИНК.
ТЕСАРО, ИНК.

<120> АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ БЕЛКА-3, СОДЕРЖАЩЕГО
Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИН И МУЦИН (TIM-3)

<130> TSR-015WO

<140> PCT/US17/59619

<141> 2017-11-01

<150> 62/427775

<151> 2016-11-29

<150> 62/416131

<151> 2016-11-01

<160> 6

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 440

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
полипептид

<400> 1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
20 25 30

Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp
35 40 45

Val Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Gln Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Arg	Arg	Tyr
		20						25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35						40					45			
Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Ser	Ala	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	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
		115					120					125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
		180						185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
		195					200					205			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210														

<210> 3

<211> 1320

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 3

gaggtgcagc	tggttgagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgagactc	60
tctgtgtcag	cagcctctgg	attcactttc	agtagctatg	acatgtcttg	ggtcgccagc	120
gctccaggga	aggggctgga	ctgggtctca	accattagt	gtggtggtac	ttacacctac	180
tatcaagaca	gtgtgaagg	gcggttcacc	atctccagag	acaattccaa	gaacacgctg	240
tatctgcaaa	tgaacagcct	gagagccgag	gacacggccg	tatattactg	tgcgctccatg	300
gactactggg	ggcaagggac	cacgggtcacc	gtctcctcag	catccacca	gggcccctcg	360
gtcttccgc	tagcaccctg	ctccaggagc	acctccgaga	gcacagccgc	cctgggctgc	420
ctgggtcaagg	actacttccc	cgaaccagt	acgggtgtcgt	ggaactcagg	cgccctgacc	480
agcggcgtgc	acaccttccc	ggctgtccta	cagtcctcag	gactctactc	cctcagcagc	540
gtggtgaccg	tgccctccag	cagcttgggc	acgaagacct	acacctgcaa	cgtagatcac	600
aagcccagca	acaccaaggt	ggacaagaga	gttgagtcca	aatatgggtcc	cccatgccca	660

c	c	c	c	c	c	720
a	a	a	a	a	a	780
c	c	c	c	c	c	840
a	a	a	a	a	a	900
g	g	g	g	g	g	960
c	c	c	c	c	c	1020
g	g	g	g	g	g	1080
t	t	t	t	t	t	1140
g	g	g	g	g	g	1200
a	a	a	a	a	a	1260
a	a	a	a	a	a	1320

<210> 4
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

g	t	t	c	t	c	60
a	t	c	a	c	t	120
g	g	g	a	a	g	180
a	g	g	t	t	c	240
g	a	a	t	t	t	300
g	g	g	a	c	a	360
t	c	t	g	a	t	420
c	c	c	a	g	a	480
g	a	g	a	t	g	540
c	t	g	a	c	a	600
c	t	c	a	g	c	642

<210> 5
 <211> 459
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly
1				5					10					15	
Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
			20					25					30		
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr
			35				40					45			
Phe	Ser	Ser	Tyr	Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
			50			55				60					
Leu	Asp	Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr
65					70				75					80	
Gln	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys
				85					90					95	

Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala		
			100						105					110			
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val		
			115					120					125				
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala		
							135					140					
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu		
						150				155					160		
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly		
				165					170					175			
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser		
				180				185					190				
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu		
			195				200					205					
Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr		
						215					220						
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro		
					230					235					240		
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro		
				245					250					255			
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr		
				260				265					270				
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn		
				275			280					285					
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg		
						295					300						
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val		
						310				315					320		
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser		
				325					330					335			
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys		
				340				345					350				
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu		
				355			360					365					
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe		
						375					380						
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu		
					390					395					400		
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe		
				405					410					415			
Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly		
				420				425					430				
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr		

435

440

445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455

<210> 6

<211> 236

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид

<400> 6

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Ser Ile Arg Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ser His Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, который способен связывать белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и муцин (TIM-3), где полипептид содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

2. Полипептид тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

3. Полипептид тяжелой цепи по п. 2, где полипептид связывает белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и муцин (TIM-3).

4. Полипептид, который способен связывать белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и муцин (TIM-3), где полипептид содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2.

5. Полипептид легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2.

6. Полипептид легкой цепи по п. 5, где полипептид связывает белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и муцин (TIM-3).

7. Полипептид, содержащий полипептид по любому из пп. 1—3 и/или полипептид по любому из пп. 4—6, где полипептид содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь, образованную первым цистеином и вторым цистеином, и где

i) первый цистеин выбран из остатка 22, 96, 127, 140, 196, 219, 222, 254, 314, 360 и 418 из SEQ ID NO: 1, а второй цистеин выбран из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2;

ii) первый цистеин выбран из остатка 22, 96, 127, 140, 196, 219, 222, 254, 314, 360 и 418 из SEQ ID NO: 1, а второй цистеин выбран из остатка 22, 96, 127, 140, 196, 219, 222, 254, 314, 360 и 418 из SEQ ID NO: 1;

- iii) первый цистеин выбран из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2, а второй цистеин выбран из остатка 23, 88, 134, 194 и 214 из SEQ ID NO: 2;
- iv) первый остаток является остатком 23 из SEQ ID NO: 2, и второй остаток является остатком 88 из SEQ ID NO: 2;
- v) первый остаток является остатком 134 из SEQ ID NO: 2, и второй остаток является остатком 194 из SEQ ID NO: 2;
- vi) первый остаток является остатком 214 из SEQ ID NO: 2, и второй остаток является остатком 127 из SEQ ID NO: 1;
- vii) первый остаток является остатком 22 из SEQ ID NO: 1, и второй остаток является остатком 97 из SEQ ID NO: 1;
- viii) первый остаток является остатком 140 из SEQ ID NO: 1, и второй остаток является остатком 196 из SEQ ID NO: 1;
- ix) первый остаток является остатком 219 из SEQ ID NO: 1, и второй остаток является остатком 222 из SEQ ID NO: 1;
- x) первый остаток является остатком 254 из SEQ ID NO: 1, и второй остаток является остатком 314 из SEQ ID NO: 1; или
- xi) первый остаток является остатком 360 из SEQ ID NO: 1, и второй остаток является остатком 418 из SEQ ID NO: 1.

8. Полипептид по любому из пп. 1—7, где полипептид содержит по меньшей мере один аспарагин, который является гликозилированным.

9. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

10. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

11. Выделенная нуклеиновая кислота, последовательность которой содержит SEQ ID NO:3.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, последовательность которой содержит SEQ ID NO:4.

13. Вектор, содержащий выделенную последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12.
14. Выделенная клетка, содержащая вектор по п. 13.
15. Средство на основе антитела, содержащее полипептид по любому из пп. 1—8.
16. Средство на основе антитела по п. 15, где средство на основе антитела содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит SEQ ID NO: 1, и полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит SEQ ID NO: 2.
17. Средство на основе антитела по п. 15 или п. 16, где средство на основе антитела связывает TIM-3.
18. Средство на основе антитела по любому из пп. 15—17, где средство на основе антитела связывается с TIM-3 с K_D от приблизительно 1 пикомоль/л (пМ) до приблизительно 100 микромоль/л (мкМ).
19. Композиция, содержащая (a) полипептид по любому из пп. 1—8, (b) выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 9—12, (c) вектор по п. 13, (d) выделенную клетку по п. 14 или (e) средство на основе антитела по любому из пп. 15—18.
20. Композиция по п. 19, где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.
21. Способ лечения нарушения, которое реагирует на ингибирование TIM-3, у млекопитающего, при этом способ предусматривает введение эффективного количества полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14, средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 или композиции по п. 19 или п. 20 млекопитающему, имеющему нарушение, которое реагирует на ингибирование TIM-3, за счет чего осуществляется лечение нарушения у млекопитающего.
22. Способ индуцирования иммунного ответа у млекопитающего, имеющего нарушение, которое реагирует на ингибирование TIM-3, предусматривающий

введение указанному млекопитающему эффективного количества средства против TIM-3, выбранного из группы, состоящей из полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14, средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 или композиции по п. 19 или п. 20, с индуцированием тем самым иммунного ответа у млекопитающего.

23. Способ усиления иммунного ответа или повышения активности иммунной клетки у млекопитающего, имеющего нарушение, которое реагирует на ингибирование TIM-3, предусматривающий введение указанному млекопитающему эффективного количества средства против TIM-3, выбранного из группы, состоящей из полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14, средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 или композиции по п. 19 или п. 20, с усилением или повышением тем самым иммунного ответа или активности иммунной клетки у млекопитающего.

24. Способ по п. 22 или п. 23, где иммунный ответ представляет собой гуморальный или опосредованный клетками иммунный ответ.

25. Способ по п. 24, где иммунный ответ представляет собой CD4 или CD8 T-клеточный ответ.

26. Способ по п. 24, где иммунный ответ представляет собой B-клеточный ответ.

27. Способ по любому из пп. 21—26, где нарушение представляет собой рак.

28. Способ по п. 27, где рак представляет собой:

- i) рак, ассоциированный с высокой мутационной нагрузкой опухоли (TMB);
- ii) рак, который является стабильным по микросателлитам (MSS),
- iii) рак, который характеризуется микросателлитной нестабильностью,
- iv) рак, который имеет статус высокой микросателлитной нестабильности (MSI-H),

- v) рак, который имеет статус низкой микросателлитной нестабильности (MSI-L),
- vi) рак, ассоциированный с высокой TMB и MSI-H,
- vii) рак, ассоциированный с высокой TMB и MSI-L или MSS,
- viii) рак, который имеет дефектную систему репарации ошибочного спаривания ДНК,
- ix) рак, который имеет дефект в гене репарации ошибочного спаривания ДНК,
- x) гипермутированный рак,
- xi) рак, содержащий мутацию в полимеразе эpsilon (POLE),
- xii) аденокарциному, рак эндометрия, рак молочной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак фаллопиевых труб, рак яичка, первичный рак брюшины, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак тонкого кишечника, плоскоклеточную карциному аногенитальной области, меланому, почечноклеточную карциному, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак печени, рак щитовидной железы, рак гортани, рак слюнных желез, рак пищевода, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, мезотелиому, карциному из клеток Меркеля, саркому, глиобластому, гематологический рак, множественную миелому, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина/первичную медиастинальную В-клеточную лимфому или хронический миелогенный лейкоз, или
- xiii) рак из xii), где рак представляет собой рак с MSS или MSI-L, характеризуется микросателлитной нестабильностью, представляет собой рак с MSI-H, имеет высокую TMB, имеет высокую TMB и представляет собой рак с MSS или MSI-L, имеет высокую TMB и представляет собой рак с MSI-H, имеет дефектную систему репарации ошибочного спаривания ДНК, имеет дефект в гене репарации ошибочного спаривания ДНК, представляет собой гипермутированный рак или содержит мутацию в полимеразе эpsilon (POLE).

29. Способ по любому из пп. 21—26, где нарушение представляет собой инфекционное заболевание.

30. Способ по п. 29, где инфекционное заболевание вызвано вирусом или бактерией.

31. Способ по п. 30, где вирус представляет собой вирус иммунодефицита человека (HIV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирус гриппа, вирус денге или вирус гепатита В (HBV).

32. Способ по любому из пп. 21—26, где нарушение представляет собой аутоиммунное заболевание.

33. Способ по п. 32, где аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, ревматоидный артрит, склеродермию, болезнь Крона, псориаз, системную красную волчанку (SLE) или язвенный колит.

34. Способ по любому из пп. 21—33, где млекопитающему вводили или будут вводить средство, которое ингибирует PD-1, вследствие чего млекопитающее получает оба средства.

35. Способ по п. 34, где средство, которое ингибирует PD-1, представляет собой связывающее PD-1 средство.

36. Способ по п. 35, где связывающее PD-1 средство представляет собой антитело, конъюгат антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

37. Способ по п. 36, где антитело к PD-1 представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из BGB-A317, BI 754091, IBI308, INCSHR-1210, JNJ-63723283, JS-001, MEDI-0680, MGA-012, ниволумаба, PDR001, пембролизумаба, PF-06801591, REGN-2810, TSR-042 и их производных.

38. Способ по п. 34, где средство, которое ингибирует PD-1, представляет собой средство, связывающее PD-L1/L2.

39. Способ по п. 38, где средство, связывающее PD-L1/L2, представляет собой антитело к PD-L1.

40. Способ по п. 39, где средство на основе антитела к PD-L1 представляет собой атезолизумаб, авелумаб, CX-072, дурвалумаб, FAZ053, LY3300054, милламолекулу PD-L1 или их производные.

41. Способ по любому из пп. 21—40, где млекопитающему вводили или будут вводить средство, которое ингибирует LAG-3, вследствие чего млекопитающее получает оба средства.

42. Способ по п. 41, где средство, которое ингибирует LAG-3, представляет собой связывающее LAG-3 средство.

43. Способ по п. 42, где связывающее LAG-3 средство представляет собой антитело, конъюгат антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

44. Способ по любому из пп. 41—43, где млекопитающее получало или будет получать лечение каждым из средства, которое ингибирует TIM-3, средства, которое ингибирует PD-1, и средства, которое ингибирует LAG-3, вследствие чего млекопитающее получает все три средства.

45. Способ по любому из пп. 21—44, где млекопитающему вводили или будут вводить средство, которое ингибирует PARP, вследствие чего млекопитающее получает оба средства.

46. Способ по п. 45, где средство, которое ингибирует PARP, представляет собой малую молекулу, нуклеиновую кислоту, полипептид (например, антитело), углевод, липид, металл или токсин.

47. Способ по п. 45 или п. 46, где средство, которое ингибирует PARP, выбрано из группы, состоящей из ABT-767, AZD 2461, BGB-290, BGP 15, CEP 8983, CEP 9722, DR 2313, E7016, E7449, флузопариба (SHR 3162), IMP 4297, INO1001, JPI 289, JPI 547, конъюгата моноклональное антитело B3-LysPE40, MP 124, нирапариба (ZEJULA) (MK-4827), NU 1025, NU 1064, NU 1076, NU1085, олапариба (AZD2281), ONO2231, PD 128763, R 503, R554, рукапариба (RUBRACA) (AG-014699, PF-01367338), SBP 101, SC 101914, симмипариба, талазопариба (BMN-673), велипариба (ABT-888), WW 46, 2-(4-(трифторметил)фенил)-7,8-дигидро-5Н-тиопирано[4,3-d]пиримидин-4-ола и их солей или производных.

48. Способ по любому из пп. 45—47, где млекопитающее получает лечение каждым из средства против TIM-3, средства, которое ингибирует PD-1, и средства, которое ингибирует PARP, вследствие чего млекопитающее получает все три средства.

49. Способ по п. 48, где способ дополнительно предусматривает получение млекопитающим лечения средством, которое ингибирует LAG-3, вследствие чего млекопитающее получает все четыре средства.

50. Способ по любому из пп. 21—49, где млекопитающее не поддается лечению средством, которое ингибирует PD-1.

51. Способ по любому из пп. 21—50, где млекопитающее плохо поддается лечению средством, которое ингибирует PD-1.

52. Способ по любому из пп. 21—51, где способ повышает чувствительность млекопитающего к лечению средством, которое ингибирует PD-1.

53. Способ по любому из пп. 50—52, где млекопитающее содержит истощенную иммунную клетку.

54. Способ по п. 53, где истощенная иммунная клетка представляет собой истощенную Т-клетку.

55. Способ по любому из пп. 21—54, где млекопитающее представляет собой человека.

56. Способ по любому из пп. 21—55, где млекопитающее ранее получало лечение одним или более разными способами лечения рака.

57. Способ по п. 56, где млекопитающее ранее получало лечение одним или более из хирургической операции, радиотерапии, химиотерапии или иммунотерапии.

58. Способ по п. 56 или п. 57, где млекопитающее ранее получало лечение цитотоксической терапией.

59. Способ по любому из пп. 21—58, где способ дополнительно предусматривает применение другого терапевтического средства или лечения.

60. Способ по п. 59, где способ дополнительно предусматривает применение одного или более из хирургической операции, радиотерапии, химиотерапии,

иммунотерапии, противоангиогенного средства или противовоспалительного средства.

61. Способ получения полипептида по любому из пп. 1—8 посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в культуре клетки-хозяина.

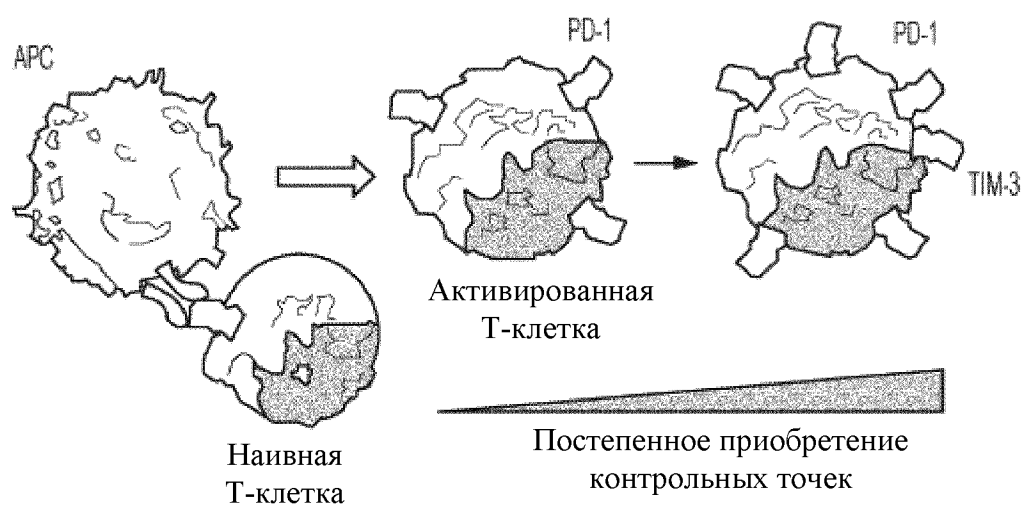
62. Способ получения средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 посредством экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей средство на основе антитела, в культуре клетки-хозяина.

63. Способ получения композиции по п. 19 или п. 20 посредством объединения полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14 или средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 с фармацевтически приемлемым носителем и получения состава для введения субъекту.

64. Способ по п. 63, где стадия получения состава для введения предусматривает получение состава для парентеральной доставки.

65. Способ получения полипептида по любому из пп. 1—8, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9—12, вектора по п. 13, выделенной клетки по п. 14, средства на основе антитела по любому из пп. 15—18 или композиции по п. 19 или п. 20 для применения в одном из способов по любому из пп. 21—60.

Фигура 1



Фигура 2

