

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039020**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.11.23**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201892294**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.04.11**

---

(54) **АНТИТЕЛА И КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ ТИМ-3**

---

(31) **62/321,476**

(32) **2016.04.12**

(33) **US**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/EP2017/058696**

(87) **WO 2017/178493 2017.10.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**СИМФОГЕН А/С (DK)**

(72) Изобретатель:  
**Линдстед Трине, Геттинг Торбен,  
Галлер Гюнтер Роланд, Гад Моника,  
Грандал Майкл Монрад, Кофод Клаус,  
Крагх Михаэль (DK), Хорек Иван  
Дэвид (US), Букен Томас, Педерсен  
Миккель Вандаль (DK)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) EP-A1-2581113  
WO-A2-2013006490  
YOSHIKANE KIKUSHIGE ET AL: "TIM-3  
as a novel therapeutic target for eradicating  
acute myelogenous leukemia stem cells",  
INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY,  
vol. 98, no. 6, 18 September 2013  
(2013-09-18), pages 627-633, XP055181432, ISSN:  
0925-5710, DOI:10.1007/S12185-013-1433-6, the  
whole document  
WO-A2-2016144803

---

(57) Изобретение относится к антителам против ТИМ-3 и композициям антител и их применению для усиления иммунитета у пациента, например, для лечения злокачественных опухолей.

---

**B1**

**039020**

**039020**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на связанную заявку**

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет патентной заявки США № 62/321476, поданной 12 апреля 2016 г., раскрытие которой в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки.

### **Список последовательностей**

Изобретение содержит список последовательностей, который подан в электронном виде в формате ASCII и включен, таким образом, посредством ссылки в полном объеме. Указанная ASCII копия, созданная 26 сентября 2018 г. имеет название "Список последовательностей.txt" и размер 156742 Б.

### **Предпосылки изобретения**

TIM-3 (содержащий домен иммуноглобулина T-клеток и муцина 3), также известный как HAVCR2 (клеточный рецептор 2 вируса гепатита А) или CD366, является элементом семейства белков с доменом иммуноглобулина T-клеток и муцина. У человека ген HAVCR2 кодирует TIM-3, который представляет собой 33 кДа гликопротеин I типа с мембранным дистальным доменом IgV и мембранным проксимальным доменом муцина. Во внутриклеточном домене он содержит консервативную область из пяти остатков Туг, фосфорилирование которых происходит при связывании лиганда. TIM-3 экспрессирует определенный спектр различных клеток, относящихся к адаптивному и врожденному звеньям иммунной системы, включая T-клетки, дендритные клетки, макрофаги и естественные киллерные (NK) клетки. На наивных T-клетках экспрессия TIM-3 снижена, но значительно возрастает при активации T-клеток. В отличие от T-клеток врожденные клетки, такие как дендритные клетки, NK клетки и моноциты, имеют высокую базовую экспрессию TIM-3. TIM-3 связан с несколькими, главным образом разнородными, лигандами, в том числе галектином-9, фосфатидилсерином, CEACAM-1 и HMGB-1, но точные роли этих лигандов в настоящее время не известны.

Несмотря на предположение о том, что TIM-3 является ингибитором контрольной точки, существует относительно мало доказательств, подтверждающих идею о том, что TIM-3 напрямую опосредует супрессию активации T-клеток или секрецию цитокинов таким образом, которые схожи, например, с PD-1. Кроме того, и в отличие от PD-1 TIM-3, похоже, играет роль в регуляции клеток врожденной системы и, в частности, дендритных клеток. Большинство функциональных данных, относящихся к TIM-3 и его роли в иммунологии опухолей, поступает из исследований *in vivo* с использованием различных антител. В большинстве этих исследований из-за плохой валидации антител не ясно, опосредованы ли эффекты антител к TIM-3 через ингибирование связывания лигандов или через агонистический эффект, оказываемый на мишень.

Ввиду свойств регуляции иммунного ответа у TIM-3 его исследовали в качестве потенциальной мишени для иммунотерапии, в том числе для лечения злокачественной опухоли и аутоиммунных заболеваний. Одно антитело против TIM-3 в настоящее время находится на клинических испытаниях, но в настоящее время больше нет одобренных антител против TIM-3.

Ввиду решающей роли TIM-3 в качестве иммунного модулятора существует необходимость в новой и усовершенствованной иммунной терапии, которая направлена на TIM-3, чтобы лечить злокачественные опухоли и определенные нарушения иммунной системы.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение направлено на новые рекомбинантные антитела, нацеленные на TIM-3, а также фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько этих антител, например антитело против TIM-3, которое через активность на TIM-3 активирует различные клетки иммунной системы, такие как профессиональные антигенпредставляющие клетки (например, дендритные клетки и макрофаги) и T-клетки (например, хелперные T-клетки и цитотоксические T-клетки). Настоящее изобретение также направлено на применение антител и фармацевтических композиций для усиления иммунитета у пациента и для лечения злокачественных опухолей, берущих начало в таких тканях, как кожа, легкое, кишечник, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопэтическая система, голова и шея, печень, мочевого пузыря, грудь, желудок, матка и поджелудочная железа. По сравнению с лечением, доступным в настоящее время для таких злокачественных опухолей, в том числе лечение антителами, предусмотрено, что антитела по изобретению могут обеспечивать превосходный клинический ответ отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством для злокачественной опухоли, таким как антитело, направленное на белок другой иммунной контрольной точки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающую часть, где антитело против TIM-3 представляет собой антитело, обозначаемое в настоящем описании как антитело 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144, 20131, 20293, 15105, 15107, 15109, 15174, 15175, 15260, 15284, 15299, 15353, 15354, 17244, 17245, 19324, 19416, 19568, 20185, 20300, 20362 или 20621 или вариант любого из них, где вариант, например, может содержать определенные минимальные аминокислотные изменения относительно указанного антитела (например, изменения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, которые могут иметь место, например, в каркасных областях), не теряя антигенсвязывающей специфичности антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 конкурирует за связывание с TIM-3 человека или связывается с тем же эпитопом TIM-3 человека, что и любое одно из антител 15086.15086,

15086.16837, 15086.17145, 15086.17144, 20131, 20293, 15105, 15107, 15109, 15174, 15175, 15260, 15284, 15299, 15353, 15354, 17244, 17245, 19324, 19416, 19568, 20185, 20300, 20362 и 20621.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 содержит H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность H-CDR3 из SEQ ID NO: 9, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92102112, 122132142, 152162172, 182192202, 212, 222 или 232.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 содержит H-CDR1-3, содержащую последовательности H-CDR1-3, соответственно, из SEQ ID NO: 7-9, 30-32, 40-42, 50-52, 60-62, 70-72, 80-82, 90-92, 100-102, 110-112, 120-122, 130-132, 140-142, 150-152, 160-162, 170-172, 180-182, 190-192, 200-202, 210-212, 220-222 или 230-232.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентичен по аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 3, 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет VH, которая содержит SEQ ID NO: 3, 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет тяжелую цепь (HC), которая содержит аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 3, 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228 и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи (CH) из SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 23, 24 или 25.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 содержит L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность L-CDR3 из SEQ ID NO: 12, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225 или 235.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 содержит L-CDR1-3, содержащую последовательности L-CDR1-3, соответственно, из SEQ ID NO: 10-12, 33-35, 43-45, 53-55, 63-65, 73-75, 83-85, 93-95, 103-105, 113-115, 123-125, 133-135, 143-145, 153-155, 163-165, 173-175, 183-185, 193-195, 203-205, 213-215, 223-225 или 233-235.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет вариабельный домен легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью VL из SEQ ID NO: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219 или 229.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет VL, которая содержит аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219 или 229.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет легкую цепь (LC), которая содержит аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219 или 229 и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 содержит любую из вышеуказанных последовательностей тяжелой цепи и любую из вышеуказанных последовательностей легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 содержит H-CDR3 и L-CDR3, содержащие аминокислотные последовательности H-CDR3 и L-CDR3 соответственно из SEQ ID NO: 9 и 12, 32 и 35, 42 45, 52 55, 62 и 65, 72 и 75. 82 и 85, 92 и 95. 102 и 105, 112 и 115, 122 и 125. 132 и 135, 142 и 145, 152 и 155. 162 и 165, 172 и 175, 182 и 185, 192 и 195, 202 и 205, 212 и 215, 222 и 225, а также 232 и 235.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 содержит H-CDR1-3 и L-CDR1-3, содержащие последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 соответственно из SEQ ID NO: 7-12, 30-35. 40-45, 50-55, 60-65, 70-75, 80-85, 90-95, 100-105, 110-115, 120-125, 130-135, 140-145, 150-155, 160-165, 170-175, 180-185, 190-195, 200-205, 210-215, 220-225 или 230-235.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет VH, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере 99%) идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228, и VL, которая по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219 или 229.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет VH, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228, и VL, которая содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219 или 229.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет LC, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219 или 229 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и HC, которая содержит (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, 24 или 25.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть по изобретению содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 из:

- a) SEQ ID NO: 7-12 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 30-35 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 40-45 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 50-55 соответственно;
- e) SEQ ID NO: 60-65 соответственно;
- f) SEQ ID NO: 70-75 соответственно;
- g) SEQ ID NO: 80-85 соответственно;
- h) SEQ ID NO: 90-95 соответственно;
- i) SEQ ID NO: 100-105 соответственно;
- j) SEQ ID NO: 110-115 соответственно;
- k) SEQ ID NO: 120-125 соответственно;
- l) SEQ ID NO: 130-135 соответственно;
- m) SEQ ID NO: 140-145 соответственно;
- n) SEQ ID NO: 150-155 соответственно;
- o) SEQ ID NO: 160-165 соответственно;
- p) SEQ ID NO: 170-175 соответственно;
- q) SEQ ID NO: 180-185 соответственно;
- r) SEQ ID NO: 190-195 соответственно;
- s) SEQ ID NO: 200-205 соответственно;
- t) SEQ ID NO: 210-215 соответственно;
- u) SEQ ID NO: 220-225 соответственно или
- v) SEQ ID NO: 230-235 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть по изобретению конкурирует за связывание с TIM-3 человека или связывается с тем же эпитопом TIM-3 человека, что и антитело, вариабельные домены тяжелых и легких цепей которого содержат аминокислотные последовательности из:

- a) SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 15 и 4 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 28 и 29 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 38 и 39 соответственно;
- e) SEQ ID NO: 48 и 49 соответственно;
- f) SEQ ID NO: 58 и 59 соответственно;
- g) SEQ ID NO: 68 и 69 соответственно;
- h) SEQ ID NO: 78 и 79 соответственно;
- i) SEQ ID NO: 88 и 89 соответственно;
- j) SEQ ID NO: 98 и 99 соответственно;
- k) SEQ ID NO: 108 и 109 соответственно;
- l) SEQ ID NO: 118 и 119 соответственно;
- m) SEQ ID NO: 128 и 129 соответственно;
- n) SEQ ID NO: 138 и 139 соответственно;
- o) SEQ ID NO: 148 и 149 соответственно;
- p) SEQ ID NO: 158 и 159 соответственно;
- q) SEQ ID NO: 168 и 169 соответственно;
- r) SEQ ID NO: 178 и 179 соответственно;
- s) SEQ ID NO: 188 и 189 соответственно;
- t) SEQ ID NO: 198 и 199 соответственно;
- u) SEQ ID NO: 208 и 209 соответственно;
- v) SEQ ID NO: 218 и 219 соответственно или
- w) SEQ ID NO: 228 и 229 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть по

изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи с аминокислотными последовательностями, по меньшей мере на 90% идентичными аминокислотными последовательностями:

- a) SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 15 и 4 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 28 и 29 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 38 и 39 соответственно;
- e) SEQ ID NO: 48 и 49 соответственно;
- f) SEQ ID NO: 58 и 59 соответственно;
- g) SEQ ID NO: 68 и 69 соответственно;
- h) SEQ ID NO: 78 и 79 соответственно;
- i) SEQ ID NO: 88 и 89 соответственно;
- j) SEQ ID NO: 98 и 99 соответственно;
- k) SEQ ID NO: 108 и 109 соответственно;
- l) SEQ ID NO: 118 и 119 соответственно;
- m) SEQ ID NO: 128 и 129 соответственно;
- n) SEQ ID NO: 138 и 139 соответственно;
- o) SEQ ID NO: 148 и 149 соответственно;
- p) SEQ ID NO: 158 и 159 соответственно;
- q) SEQ ID NO: 168 и 169 соответственно;
- r) SEQ ID NO: 178 и 179 соответственно;
- s) SEQ ID NO: 188 и 189 соответственно;
- t) SEQ ID NO: 198 и 199 соответственно;
- u) SEQ ID NO: 208 и 209 соответственно;
- v) SEQ ID NO: 218 и 219 соответственно или
- w) SEQ ID NO: 228 и 229 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть по изобретению содержит тяжелую цепь и легкую цепь, переменные домены которых имеют аминокислотные последовательности:

- a) SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 15 и 4 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 28 и 29 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 38 и 39 соответственно;
- e) SEQ ID NO: 48 и 49 соответственно;
- f) SEQ ID NO: 58 и 59 соответственно;
- g) SEQ ID NO: 68 и 69 соответственно;
- h) SEQ ID NO: 78 и 79 соответственно;
- i) SEQ ID NO: 88 и 89 соответственно;
- j) SEQ ID NO: 98 и 99 соответственно;
- k) SEQ ID NO: 108 и 109 соответственно;
- l) SEQ ID NO: 118 и 119 соответственно;
- m) SEQ ID NO: 128 и 129 соответственно;
- n) SEQ ID NO: 138 и 139 соответственно;
- o) SEQ ID NO: 148 и 149 соответственно;
- p) SEQ ID NO: 158 и 159 соответственно;
- q) SEQ ID NO: 168 и 169 соответственно;
- r) SEQ ID NO: 178 и 179 соответственно;
- s) SEQ ID NO: 188 и 189 соответственно;
- t) SEQ ID NO: 198 и 199 соответственно;
- u) SEQ ID NO: 208 и 209 соответственно;
- v) SEQ ID NO: 218 и 219 соответственно или
- w) SEQ ID NO: 228 и 229 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 по изобретению содержит:

- a) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 5, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 6;
- b) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28 и 5, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29 и 6;
- c) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38 и 5, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 39 и 6;
- d) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48 и 5, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 49 и 6;
- e) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58 и 5, и LC, содержащую





аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 229 и 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 по изобретению содержит:

- a) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 6;
- b) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29 и 6;
- c) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 39 и 6;
- d) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 49 и 6;
- e) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 59 и 6;
- f) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 69 и 6;
- g) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 78 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 79 и 6;
- h) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 88 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 89 и 6;
- i) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 98 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 99 и 6;
- j) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 108 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 109 и 6;
- k) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 118 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 119 и 6;
- l) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 128 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 129 и 6;
- m) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 138 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 139 и 6;
- n) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 148 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 149 и 6;
- o) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 158 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 159 и 6;
- p) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 168 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 169 и 6;
- q) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 178 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 179 и 6;
- r) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 188 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 189 и 6;
- s) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 198 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 199 и 6;
- t) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 208 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 209 и 6;
- u) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 218 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 219 и 6; или
- v) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 228 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 229 и 6.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу против TIM-3 или его антигенсвязывающей части, где указанное антитело содержит H-CDR1-3 и L-CDR1-3, содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 7-12 соответственно.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителу против TIM-3 или его антигенсвязывающей части, где указанное антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к антителу против TIM-3, которое содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 25, и легкую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 6.

Изобретение также относится к антителу против TIM-3 или его антигенсвязывающей части, которые связываются с эпитопом из TIM-3, содержащим аминокислотные остатки F61 и I117 из SEQ ID NO: 236 (например, антитело 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144, 20293 или 20131). В некоторых вариантах осуществления эпитоп дополнительно содержит аминокислотный остаток R69 (например, антитело 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144 или 20293). В других вариантах осуществления эпитоп дополнительно содержит P50, E62, M118 и D120 (например, антитело 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144 или 20131) и может дополнительно содержать ами-

нокислотные остатки R69, V60 и G64 (например, антитело 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 или 15086.17144).

В конкретных вариантах осуществления антитело или часть связываются с эпитопом из TIM-3, содержащим аминокислотные остатки P50, V60, F61, E62, G64, R69, I117, M118 и D120 из SEQ ID NO: 236 (например, антитело 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 или 15086.17144), аминокислотные остатки F61, R69 и I117 из SEQ ID NO: 236 (например, антитело 20293) или аминокислотные остатки P50, F61, E62, I117, M118 и D120 из SEQ ID NO: 236 (например, антитело 20131).

Изобретение также относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, которые связываются с эпитопом из TIM-3, содержащим аминокислотные остатки 62-67 из SEQ ID NO: 236 (например, антитело 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144 или 20293). Кроме того, изобретение относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, которые связываются с эпитопом из TIM-3, содержащим аминокислотные остатки 114-117 из SEQ ID NO: 236 (например, антитело 20131).

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 представляет собой антитело IgG, например антитело IgG человека. В определенных вариантах осуществления антитело содержит по меньшей мере одну мутацию в области FC. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит мутацию в одном или нескольких из аминокислотных положений тяжелой цепи 228, 233, 234 и 235, которые пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT. Например, один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 можно мутировать в Ala и/или аминокислотный остаток в положении 228 можно мутировать в Pro.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть по изобретению имеют по меньшей мере одно из следующих свойств:

- a) связывается с TIM-3 человека с  $K_D$  23 нМ или меньше, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса;
- b) связывается с TIM-3 яванского макака с  $K_D$  22 нМ или меньше, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса;
- c) связывается с TIM-3 человека с  $EC_{50}$  1,2 нМ или меньше, как измеряют посредством ELISA;
- d) связывается с TIM-3 яванского макака с  $EC_{50}$  46 нМ или меньше, как измеряют посредством ELISA;
- e) увеличивает секрецию IFN- $\gamma$  в однонаправленном анализе реакции в смешанной культуре лимфоцитов;
- f) увеличивает секрецию IFN- $\gamma$  в двунаправленном анализе реакции в смешанной культуре лимфоцитов;
- g) увеличивает секрецию TNF- $\alpha$  в однонаправленном анализе реакции в смешанной культуре лимфоцитов;
- h) увеличивает секрецию TNF- $\alpha$  дендритными клетками и
- i) ингибирует взаимодействие TIM-3 с фосфатидилсеринном.

Примеры такого антитела включают, без ограничения, антитело 15086.15086 (имеющее по меньшей мере свойства (a), (c)-(e), (g) и (h)); антитело 15086.17145 (имеющее по меньшей мере свойства (a), (c)-(e), (g), (h) и (i)), антитело 15086.16837 или 15086.17144 (имеющее по меньшей мере свойства (a), (c) и (d)), антитело 20293 или 20131 (имеющее по меньшей мере свойства (a)-(f) и (h)), антитело 20362 (имеющее по меньшей мере свойства (c), (e), (f) и (h)) и антитело 19324, 19416, 19568, 20185, 20300 или 20621 (имеющее по меньшей мере свойства (c), (d), (e), (f) и (h)). В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть по изобретению имеет все указанные свойства. В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть имеет по меньшей мере свойства (a), (c)-(e), (g) и (n). В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть имеет по меньшей мере свойства (a), (c)-(e), (g), (h) и (i). В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть имеет по меньшей мере свойства (a), (c) и (d). В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть имеет по меньшей мере свойства (a)-(f) и (n). В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть имеет по меньшей мере свойства (c), (e), (f) и (n). В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть имеет по меньшей мере свойства (c)-(f) и (n).

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть по изобретению увеличивает активность NK клеток. В некоторых вариантах осуществления эта активность может опосредовать ADCC.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть по изобретению не конкурируют за связывание с TIM-3 с АВТМ3 (из PCT публикации WO 2015/117002) и/или mAb15 (из PCT публикации WO 2016/111947). В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть по изобретению не связываются с тем же эпитопом, что и АВТМ3 и/или mAb15; например антитело или часть по изобретению связывается с одним или несколь-

кими остатками на TIM-3, с которыми не связываются АВТИМ3 и/или mAb15.

В других аспектах настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающую часть, как раскрыто в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент, необязательно с дополнительным терапевтическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, антинеопластическое средство, антиангиогенное средство, ингибитор тирозинкиназы или ингибитор пути TIM-3.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и то и другое, из антитела против TIM-3 или антигенсвязывающей части, как раскрыто в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим такую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, где указанный вектор необязательно дополнительно содержит управляющую экспрессией последовательность.

Настоящее изобретение также предусматривает клетки-хозяева, содержащие нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и то и другое, из антитела против TIM-3, как раскрыто в настоящем описании.

Настоящее изобретение также относится к способу получения антитела против TIM-3 или его антигенсвязывающей части, как раскрыто в настоящем описании, который включает предоставление клетки-хозяина, которая содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть из антитела против TIM-3 или антигенсвязывающей части, как раскрыто в настоящем описании, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или части, и выделение получаемого антитела или части.

Настоящее изобретение также относится к полиспецифической (например, биспецифической) связывающей молекуле, имеющей антигенсвязывающую часть антитела против TIM-3, описанную в настоящем документе, и антигенсвязывающую часть другого, отличного антитела, такого как другое антитело против TIM-3 (например, другое антитело против TIM-3, описанное в настоящем документе) или антитело, которое направлено на другой белок, такой как другой белок иммунной контрольной точки, антиген злокачественной опухоли или другая молекула клеточной поверхности, активность которой опосредует патологическое состояние, такое как злокачественная опухоль.

Настоящее изобретение также относится к способу усиления иммунитета у пациента (например, пациента-человека), который включает введение указанному пациенту антитела против TIM-3 или его антигенсвязывающей части или полиспецифической (например, биспецифической) связывающей молекулы, как раскрыто в настоящем описании.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ направленного воздействия на злокачественную опухоль у пациента (например, пациента-человека), который включает введение указанному пациенту антитела против TIM-3 или его антигенсвязывающей части или полиспецифической (например, биспецифической) связывающей молекулы, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль берет начало в ткани, выбранной из группы, состоящей из: кожа, легкое, кишечник, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопозитическая система, голова и шея, печень, мочевого пузыря, грудь, желудок, матка и поджелудочная железа. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет лейкоз (например, острый миелолейкоз), лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет солидную опухоль (например, запущенную или метастазирующую солидную опухоль). В некоторых вариантах осуществления пациент страдает меланомой, немелкоклеточным раком легких, раком толстой кишки или почечноклеточной карциномой. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение химиотерапевтического средства, антинеопластического средства, антиангиогенного средства, ингибитора тирозинкиназы и/или ингибитора пути TIM-3.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает антитела против TIM-3 или антигенсвязывающие части или полиспецифические (например, биспецифические) связывающие молекулы, как раскрыто в настоящем описании, для применения в указанном выше лечении; для применения указанных антител, антигенсвязывающих частей или полиспецифических связывающих молекул в качестве лекарственных средств для указанного выше лечения и применения указанных антител, антигенсвязывающих частей или полиспецифических связывающих молекул для получения лекарственных средств для указанного выше лечения, т.е. лечения пациента-человека, нуждающегося в этом, чтобы усилить его/ее иммунную систему, и лечения пациента-человека со злокачественной опухолью, такой как одна из указанных выше злокачественных опухолей. Настоящее изобретение также предусматривает промышленные изделия, содержащие антитела против TIM-3 или антигенсвязывающие части или полиспецифические (например, биспецифические) связывающие молекулы, описанные в настоящем документе, а также способы получения указанных промышленных изделий.

### Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены кривые доза-эффект антител 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144 для продуцирования IFN- $\gamma$  в однонаправленном анализе реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR).

На фиг. 2 представлены кривые доза-эффект антител 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144 для продуцирования TNF- $\alpha$  в однонаправленном MLR анализе.

На фиг. 3 представлен эффект, оказываемый на субпопуляции очищенных дендритных клеток антителами 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144, который измеряли в виде уровней TNF- $\alpha$ , с использованием анализа электрохемилюминесценции цитокинов Meso Scale.

На фиг. 4 представлено связывание TIM-3-Fc с положительными по фосфатидилсерину (PtdS) (апоптозными) клетками в присутствии антитела против TIM-3 по изобретению, а также положительного контроля антитела против TIM-3 и двух отрицательных контролей антител. А: антитело против TIM-3 по изобретению [15086.17145]; В: отрицательное контрольное не блокирующее антитело против TIM-3 [15338.15338]; С: эталонное антитело против TIM-3 [18571.18571]; D: отрицательное контрольное антитело против PD-1 Keytruda® (пембролизумаб).

На фиг. 5 представлены кривые доза-эффект для 9 антител против TIM-3 и продуцирования IFN- $\gamma$  в однонаправленном MLR анализе.

На фиг. 6 представлены кривые доза-эффект для 10 антител против TIM-3 и продуцирования IFN- $\gamma$  в двунаправленном MLR анализе. Антитело 15086.17145 представлено как "15086".

На фиг. 7 представлены кривые доза-эффект для 9 антител против TIM-3 и продуцирования TNF- $\alpha$  в полученных из моноцитов дендритных клетках от двух независимых доноров.

На фиг. 8 представлен обзор групп эпитопов (категорий эпитопов), идентифицированных с помощью анализа конкурентного связывания для панели из 18 антител против TIM-3. Обведенные кругом антитела, соединенные черными линиями, обозначают перекрестную блокирующую активность в обеих ориентациях. Обведенные квадратом антитела обозначают однонаправленное блокирование, когда антитело тестируют только в растворе. Штриховые линии показывают однонаправленное блокирование, когда антитела только иммобилизуют. Антитела группируют в соответствии с паттернами конкуренции с другими антителами против TIM-3. Антитело 15086.17145 представлено как "15086".

На фиг. 9 представлены местоположения эпитопов антител на структуре домена IgV TIM-3 человека (PDB 5F71). Схематическое изображение домена IgV TIM-3 человека представлено в трех различных ориентациях, и показано местоположение сайта связывания фосфатидилсерина. Местоположения картированных эпитопов представлены темным цветом на пространственной модели TIM-3 для каждого антитела. Fab фрагмент 15086 представлен как "15086", и Fab фрагмент 20293 представлен как "20293".

### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает новые антитела против TIM-3 человека, которые можно использовать для усиления иммунной системы у пациента-человека, такого как пациент со злокачественной опухолью. Если не указано иное, как используют в настоящем описании, "TIM-3" относится к TIM-3 человека. Полипептидная последовательность TIM-3 человека доступна под номером доступа Uniprot Q8TDQ0 (HAVR2\_HUMAN), которая представлена здесь в виде SEQ ID NO: 236.

Термин "антитело" (Ab) или "иммуноглобулин" (Ig), как используют в настоящем описании, относится к тетрамеру, содержащему две тяжелые (H) цепи (приблизительно 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (приблизительно 25 кДа), связанные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного домена тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из переменного домена легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Домены VH и VL можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые "определяющими комплементарность областями" (CDR), расположенные между областями, которые более консервативны, которые называют "каркасными областями" (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR (H-CDR в настоящем описании обозначает CDR из тяжелой цепи; и L-CDR в настоящем описании обозначает CDR из легкой цепи) и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Присвоение номеров аминокислот в тяжелой или легкой цепи может находиться в соответствии с определениями IMGT® (Lefranc et al., Dev Comp Immunol 27(1):55-77 (2003)); или определениями Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)); Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) или Chothia et al., Nature, 342:878-883 (1989).

Термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, которое экспрессирует клетка или клеточная линия, содержащая нуклеотидную последовательность(и), которая кодирует антитело, где указанная нуклеотидная последовательность(и) в природе не связана с клеткой.

Термин "выделенный белок", "выделенный полипептид" или "выделенное антитело" относится к белку, полипептиду или антителу, который по своему происхождению или источнику получения (1) не связан с естественно связанными компонентами, которые сопровождают его в его нативном состоянии, (2) не содержит другие белки от тех же видов, (3) экспрессирует клетка от другого вида и/или

(4) не встречается в природе. Таким образом, полипептид, который синтезируют химически или синтезируют в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он естественно происходит, будет "выделенным" из его естественно связанных компонентов. Белок также можно делать по существу не содержащим естественно связанные компоненты посредством выделения, используя способы очистки белков, хорошо известные в данной области.

Как используют в настоящем описании, термин "зародышевая линия" относится к нуклеотидным и аминокислотным последовательностям генов антител и сегментов генов, как они переходят от родителей к потомку через половые клетки. Последовательности зародышевой линии отличаются от нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела в зрелых В-клетках, которые изменены посредством событий рекомбинации и гипермутации во время хода созревания В-клеток. Антитело, в котором используют конкретную последовательность зародышевой линии, имеет нуклеотидную или аминокислотную последовательность, которая выравнивается с этой нуклеотидной последовательностью зародышевой линии или с аминокислотной последовательностью, которая ее определяет, более близко, чем с любой другой нуклеотидной или аминокислотной последовательностью зародышевой линии.

Термин "аффинность" относится к мере притяжения между антигеном и антителом. Собственную притягательность антитела для антигена обычно выражают как равновесную константу аффинности связывания ( $K_D$ ) для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Говорят, что антитело специфично связывается с антигеном, когда  $K_D$  составляет  $\leq 1$  мМ, предпочтительно  $\leq 100$  нМ. Константу аффинности связывания  $K_D$  можно измерять, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) или интерферометрии бислоев, например, с использованием системы ProteOn™ XPR36 SPR из Bio-Rad или системы Octet™.

Термин " $k_{off}$ " относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Константу скорости диссоциации  $k_{off}$  можно измерять посредством интерферометрии бислоев, например, с использованием системы Octet™.

Термин "эпитоп", как используют в настоящем описании, относится к части (детерминанте) антигена, которая специфически связывается с антителом или родственной молекулой, такой как биспецифическая связывающая молекула. Эпитопные детерминанты в целом состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи углеводов или сахаров, и в целом имеют конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть "линейным" или "конформационным". В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком (например, антигеном) и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) идут линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе точки взаимодействия находятся среди аминокислотных остатков на белке, которые отделены друг от друга в первичной аминокислотной последовательности. Когда на антигене определяют желаемый эпитоп, можно создавать антитела к этому эпитопу с использованием способов, хорошо известных в данной области. Например, антитело к линейному эпитопу можно создавать, например, посредством иммунизации животного пептидом, имеющим аминокислотные остатки линейного эпитопа. Антитело к конформационному эпитопу можно создавать, например, посредством иммунизации животного с использованием мини-домена, содержащего релевантные аминокислотные остатки конформационного эпитопа. Антитело к конкретному эпитопу также можно создавать, например, посредством иммунизации животного целевой молекулой, представляющей интерес, или ее релевантной частью (например, ECD из TIM-3) и последующего скрининга на связывание с эпитопом.

Можно определять, связывается ли антитело с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с антителом против TIM-3 по изобретению с использованием известных в данной области способов, в том числе, без ограничения, конкурентного анализа, связывания эпитопов и сканирования аланином. В некоторых вариантах осуществления тестовое антитело и антитело против TIM-3 по изобретению связывается по меньшей мере с одним общим остатком (например, по меньшей мере двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью или девятью общими остатками) на TIM-3. В дополнительных вариантах осуществления контактирующие остатки на TIM-3 полностью идентичны между тестовым антителом и антителом против TIM-3 по изобретению. В одном из вариантов осуществления антителу против TIM-3 по изобретению позволяют связываться с TIM-3 при насыщающих условиях и затем измеряют способность тестового антитела связываться с TIM-3. Если тестовое антитело способно связываться с TIM-3 одновременно с эталонным антителом против TIM-3, то тестовое антитело связывается с другим эпитопом, нежели эталонное антитело против TIM-3. Однако если тестовое антитело не способно связываться с TIM-3 одновременно, то тестовое антитело связывается с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или эпитопом, который находится в непосредственной близости от эпитопа, связываемого антителом против TIM-3 по изобретению. Этот эксперимент можно осуществлять с использованием, например, ELISA, RIA, BIACORE™, интерферометрии бислоев или проточной цитометрии. Для того чтобы тестировать, имеет ли антитело против TIM-3 перекрестную конкуренцию с другим антителом против TIM-3, можно использовать конкурентный способ, описанный выше, в двух направлениях, т.е. определять, если

известное антитело блокирует тестовое антитело, и наоборот. Такие эксперименты по перекрестной конкуренции можно осуществлять, например, с использованием прибора IBIS MX96 SPR или системы Octet™.

В определенных случаях может быть желательно изменять один или несколько аминокислотных остатков CDR для того, чтобы повышать аффинность связывания с целевым эпитопом. Это известно как "созревание аффинности". В данной области известны различные способы созревания аффинности, например способ сканирующего насыщающего мутагенеза *in vitro*, описанный в Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:412-417 (1997), и способ пошагового созревания аффинности *in vitro* из Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6037-6042 (1998).

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "часть антитела"), как используют в настоящем описании, относится к одной или нескольким частям или фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном (например, ТИМ-3 человека или его частью). Показано, что определенные фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять антигенсвязывающую функцию антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть", включают (i) Fab фрагмент: одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub> фрагмент: двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент, который состоит из домена VH; и (vi) выделенную определяющую комплементарную область (CDR), способную специфично связываться с антигеном. Кроме того, несмотря на то, что два домена Fv фрагмента, VL и VH, соединены с помощью отдельных генов, их можно соединять, используя рекомбинантные способы, с помощью синтетического линкера, который позволяет делать их в виде одной белковой цепи, в которой домены VL и VH образуют пары для того, чтобы формировать одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv)). Также в изобретение входят антигенсвязывающие молекулы, содержащие VH и/или VL. В случае VH молекула также может содержать одно или несколько из области CH1, шарнира, CH2 или CH3. Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин "антигенсвязывающая часть" антитела. Также включены другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессированы в одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который слишком короток для того, чтобы сделать возможным образование пар между двумя доменами на одной и той же цепи, тем самым принуждая домены образовывать пары с комплементарными доменами другой цепи и создавая два антигенсвязывающих участка.

Части антител, такие как фрагменты Fab и F(ab')<sub>2</sub>, можно получать из целых антител с использованием общепринятых способов, таких как расщепление целых антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК, например, как раскрыто в настоящем описании.

Класс (изотип) и подкласс антител против ТИМ-3 можно определять любым известным в данной области способом. В целом, класс и подкласс антитела можно определять с использованием антител, которые обладают специфичностью к конкретному классу и подклассу антител. Такие антитела доступны коммерчески. Класс и подкласс можно определять посредством ELISA, вестерн-блоттинга, а также других способов. Альтернативно, класс и подкласс можно определять посредством секвенирования целиком или частично константных областей тяжелых и/или легких цепей антител, сравнения их аминокислотных последовательностей с известными аминокислотными последовательностями различных классов и подклассов иммуноглобулинов и определения класса и подкласса антител.

При упоминании конкретных аминокислотных остатков в заданном положении последовательности антитела, указание, например, "35S" относится к положению и остатку, т.е. в этом случае указано, что остаток серина (S) присутствует в положении 35 последовательности. Аналогичным образом, указание, например, "13Q+35S" относится к двум остаткам в соответствующих положениях.

Если не указано иное, все номера аминокислотных остатков антител, упоминаемые в этом раскрытии, относятся к схеме нумерации IMGT®.

Антитела против ТИМ-3.

Настоящее изобретение предусматривает антитела, направленные против ТИМ-3, и их антигенсвязывающие части. В конкретном варианте осуществления антитела, раскрытые в настоящем описании, представляют собой антитела человека, создаваемые у трансгенных крыс, которые способны создавать антитела с идиотипами человека.

Преимущество новых антител против ТИМ-3 по изобретению состоит в том, что они могут сильно активировать дендритные клетки (см., например, пример 4). Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, полагают, что антитела против ТИМ-3 по изобретению способны стимулировать Т-клетки (например, опухолеспецифичные Т-клетки) через активацию дендритных клеток. Кроме того, в настоящем документе впервые продемонстрировано, что антитела против ТИМ-3 изотипа IgG1 или IgG2 имеют высокие уровни активности, тогда как антитела изотипа IgG4 или IgG1-LALA не функциональны

или слабо функциональны (см., например, примеры 3 и 4). Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, данные авторов изобретения подсказывают, что антитело против TIM-3, которое может сшивать TIM-3 через Fc рецепторы, представляет собой особенно сильный активатор иммунной системы. Например, антитело IgG2 против TIM-3 по изобретению может связываться с FcγR2A, встречающимся на дендритных клетках, и полагают, что оно активирует дендритные клетки посредством сшивки молекул TIM-3 на них.

Антитела против TIM-3, раскрытые в настоящем описании, можно обозначать с помощью 5-цифрового номера, например "20131", или с помощью 10-цифрового номера, например "15086.16837". 10-цифровые номера с пятью первыми одинаковыми цифрами получают из одного и того же родительского антитела, как в случае антител 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144. Полагают, что такие антитела, которые имеют одни и те же шесть CDR, имеют одинаковые или по существу одинаковые свойства связывания мишени. Как видно по последовательностям белков и ДНК, предоставленным в настоящем описании, варианты 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144 имеют только различие в одну аминокислоту в последовательности VH по сравнению с родительским антителом 15086 ("15086.15086"), а именно E вместо Q в положении 6, тогда как аминокислотные последовательности VL идентичны. Также видно, что эти варианты различаются в первую очередь по их формату/подклассу антитела, т.е. 15086.15086: IgG1 15086.16837: IgG1 LALA 15086.17145: IgG2 15086.17144: IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 выбирают из группы, состоящей из:

- a) антитела, H-CDR1-3 которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-соответственно;
- b) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи (VH) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3;
- c) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
- d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 5;
- e) антитела, L-CDR1-3 которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10-12 соответственно;
- f) антитела, вариабельный домен легкой цепи (VL) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;
- g) антитела, VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- h) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 6;
- i) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-12 соответственно;
- j) антитела, VH которого по меньшей мере на 90% идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 и VL которого по меньшей мере на 90% идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;
- k) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и
- l) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 5 и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 выбирают из группы, состоящей из:

- a) антитела, H-CDR1-3 которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-9 соответственно;
- b) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи (VH) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15;
- c) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и 25;
- e) антитела, L-CDR1-3 которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10-12 соответственно;
- f) антитела, вариабельный домен легкой цепи (VL) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;
- g) антитела, VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- h) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 6;
- i) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-12 соответственно;
- j) антитела, VH которого по меньшей мере на 90% идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 и VL которого по меньшей мере на 90% идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;
- k) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и VL ко-

















ной последовательности SEQ ID NO: 208, и VL которого по меньшей мере на 90% идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 209;

к) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208 и VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209; и

л) антитела, HC которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 23, 24 или 25 и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 209 и 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела, H-CDR1-3 которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 220-222 соответственно;

б) антитела, переменный домен тяжелой цепи (VH) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 218;

с) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218;

д) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 5, 23, 24 или 25;

е) антитела, L-CDR1-3 которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 223-225 соответственно;

ф) антитела, переменный домен легкой цепи (VL) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219;

г) антитела, VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219;

h) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 219 и 6;

и) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 220-225 соответственно;

ж) антитела, VH которого по меньшей мере на 90% идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218 и VL которого по меньшей мере на 90% идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219;

к) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 и VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219; и

л) антитела, HC которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 23, 24 или 25 и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 219 и 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела, H-CDR1-3 которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 230-232 соответственно;

б) антитела, переменный домен тяжелой цепи (VH) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 228;

с) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228;

д) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 228 и SEQ ID NO: 5, 23, 24 или 25;

е) антитела, L-CDR1-3 которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 233-235 соответственно;

ф) антитела, переменный домен легкой цепи (VL) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 229;

г) антитела, VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229;

h) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 229 и 6;

и) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 230-235 соответственно;

ж) антитела, VH которого по меньшей мере на 90% идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 228 и VL которого по меньшей мере на 90% идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 229;

к) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228 и VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229; и

л) антитела, HC которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 23, 24 или 25 и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 229 и 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающая часть конкурирует за связывание с TIM-3 еловека с или связывается с тем же эпитопом TIM-3 человека что и антитело 15086.15086, имеющее формат IgG1, антитело 15086.16837, имеющее формат IgG1 LALA, антитело 15086.17145, имеющее формат IgG2, или антитело 15086.17144, имеющее формат IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению представляет собой IgG. В некоторых вариантах

осуществления антитело по изобретению имеет формат IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающая часть конкурирует за связывание с TIM-3 человека или связывается с тем же эпитопом TIM-3 человека, что и антитело 20131, 20293, 15105, 15107, 15109, 15174, 15175, 15260, 15284, 15299, 15353, 15354, 17244, 17245, 19324, 19416, 19568, 20185, 20300, 20362 или 20621. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению имеет формат IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 по изобретению или его антигенсвязывающая часть не конкурирует за связывание с TIM-3 человека или не связывается с тем же эпитопом TIM-3 человека, что и любые или все из антител из категории 1 (эталонное антитело mAb15), категории 2 (например, антитела 15105 и 15107) и категории 8 (например, антитела 15174 и 15175) эпитопов, как определено далее в примере 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 по изобретению или его антигенсвязывающая часть не конкурирует за связывание с TIM-3 человека или не связывается с тем эпитопом TIM-3 человека, что и любые или все из антител из категории 2 (например, антитела 15105 и 15107) и категории 8 (например, антитела 15174 и 15175) эпитопов, как определено далее в примере 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 по изобретению или его антигенсвязывающая часть не конкурирует за связывание с TIM-3 человека или не связывается с тем же эпитопом TIM-3 человека, что и любые или все антитела из категории 2 (например, антитела 15105 и 15107) эпитопов, как определено далее в примере 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 конкурирует за связывание с TIM-3 человека или связывается с тем же эпитопом TIM-3 человека, что антитело, CDR1-3 тяжелых цепей (H) и CDR1-3 легких цепей (L) которого содержат соответственно SEQ ID NO: 7-9, 30-35, 40-45, 50-55, 60-65, 70-75, 80-85, 90-95, 100-105, 110-115, 120-125, 130-135, 140-145, 150-155, 160-165, 170-175, 180-185, 190-195, 200-205, 210-215, 220-225 или 230-235.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 или антигенсвязывающая часть имеет переменный домен тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с SEQ ID NO: 3, 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228, например, по меньшей мере на 95% идентичен, например, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен указанной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет переменный домен тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с SEQ ID NO: 3, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228, например, по меньшей мере на 95% идентичен, например, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен указанной последовательности; и константную область тяжелой цепи (CH), которая по меньшей мере на 90% идентична по последовательности с SEQ ID NO: 5, например, по меньшей мере на 95% идентична, например, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет тяжелую цепь (HC), которая содержит аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 3, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228 и аминокислотную последовательность CH из SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет переменный домен тяжелой цепи (VH), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с SEQ ID NO: 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228, например, по меньшей мере на 95% идентичен, например, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен указанной последовательности; и константную область тяжелой цепи (CH), которая по меньшей мере на 90% идентична по последовательности с SEQ ID NO: 23, 24 или 25, например, по меньшей мере на 95% идентична, например, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 23, 24 или 25. В конкретных вариантах осуществления CH по меньшей мере на 90% идентична по последовательности с SEQ ID NO: 25, например, по меньшей мере на 95% идентична, например, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет тяжелую цепь (HC), которая содержит аминокислотную последовательность VH из SEQ ID NO: 15, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 158, 168, 178, 188, 198, 208, 218 или 228 и аминокислотную последовательность CH из SEQ ID NO: 23, 24 или 25. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность CH из SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет переменный домен легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью VL из SEQ ID NO: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169,

179, 189, 199, 209, 219 или 229, например, по меньшей мере на 95% идентичен, например, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен указанной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет переменный домен легкой цепи (VL), который по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности с аминокислотной последовательностью VL из SEQ ID NO: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219 или 229, например, по меньшей мере на 95% идентичен, например, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен с указанной последовательностью; и константную область легкой цепи (CL), которая по меньшей мере на 90% идентична по последовательности с SEQ ID NO: 6, например, по меньшей мере на 95% идентична, например, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 имеет легкую цепь (LC), которая содержит аминокислотную последовательность VL из SEQ ID NO: 4, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219 или 229, и аминокислотную последовательность CL из SEQ ID NO: 6.

В определенных вариантах осуществления антитело против TIM-3 содержит любую одну из описанных выше тяжелых цепей и любую одну из описанных выше легких цепей.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TIM-3 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем документе, может ингибировать связывание лигандов, таких как галектин-9, CEACAM1, HMGB-1 и фосфатидилсерин, с TIM-3.

В одном из вариантов осуществления введение антитела против TIM-3 по изобретению или его антигенсвязывающей части может активировать дендритные клетки, обуславливая их созревание и, тем самым, их способность стимулировать Т-клетки. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, полагают, что антитела против TIM-3 по изобретению выполняют функцию активаторов TIM-3 дендритных клеток, в соответствии с чем их эффект, оказываемый на дендритные клетки, служит для того, чтобы стимулировать Т-клетки. В обстановке, связанной с опухолью, антитела против TIM-3, таким образом, будут вызывать созревание и активацию дендритных клеток, ассоциированных с опухолью, что ведет к активации опухолеспецифических Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TIM-3 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем документе, может связываться с TIM-3 человека с  $K_D$  по меньшей мере 100, по меньшей мере 50, по меньшей мере 40, по меньшей мере 30, по меньшей мере 25, по меньшей мере 20, по меньшей мере 15, по меньшей мере 10, по меньшей мере 9, по меньшей мере 8, по меньшей мере 7 или по меньшей мере 6 нМ. В определенных вариантах осуществления  $K_D$  определяют с использованием поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TIM-3 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем документе, может связываться с TIM-3 яванского макака с  $K_D$  по меньшей мере 100, по меньшей мере 50, по меньшей мере 40, по меньшей мере 30, по меньшей мере 25, по меньшей мере 24, по меньшей мере 23, по меньшей мере 22, по меньшей мере 21 или по меньшей мере 20 нМ. В определенных вариантах осуществления  $K_D$  определяют с использованием поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TIM-3 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем документе, может иметь avidность к TIM-3 человека с  $EC_{50} \leq 2, 1,5, 1, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$  или  $0,15$  нМ. В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TIM-3 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящем документе, может иметь avidность к TIM-3 яванского макака с  $EC_{50} \leq 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1,5, 1, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2$  или  $0,15$  нМ.

В одном из вариантов осуществления введение антитела против TIM-3 по изобретению или его антигенсвязывающей части непосредственно может активировать Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 по изобретению или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом из TIM-3, который содержит по меньшей мере один (например, по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь или по меньшей мере девять) из следующих остатков из SEQ ID NO: 236: P50, V60, F61, E62, G64, R69, I117, M118 и D120. Предусмотрен эпитоп с любой комбинацией вышеуказанных остатков.

В некоторых вариантах осуществления антитело против TIM-3 по изобретению или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом из TIM-3, который содержит остатки 62-67 и/или 114-117 из SEQ ID NO: 236. В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связывается с остатками 62-67 (или их фрагментом, таким как фрагмент из одного, двух, трех, четырех или пяти остатков) из SEQ ID NO: 236 (например, антитела 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145, 15086.17144 и 20293). В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связывается с остатками 114-117 (или их фрагментом, таким как фрагмент из одного, двух или трех остатков) из SEQ ID NO: 236 (например, антитело

20131). Также предусмотрен эпитоп с любой комбинацией вышеуказанных остатков.

Класс антитела против TIM-3, получаемого с помощью способов, описанных в настоящем документе, можно изменять или переключать на другой класс или подкласс. В одном из аспектов изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VL или VH, выделяют с использованием способов, общеизвестных в данной области, так, что она не содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CL или CH. Затем молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие VL или VH, функционально связывают с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CL или CH соответственно, из молекулы иммуноглобулина другого класса. Этого можно достигать с использованием вектора или молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат цепь CL или CH, как описано выше. Например, антитело против TIM-3, которое исходно представляло собой IgM, может представлять собой класс, переключенный на IgG. Кроме того, переключение классов можно использовать для того, чтобы превращать один подкласс IgG в другой, например из IgG1 в IgG2. Константную область легкой цепи можно менять на константную область легкой цепи  $\lambda$ . Предпочтительный способ получения антитела по изобретению с желаемым изотипом Ig включает стадии выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела против TIM-3, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела против TIM-3, получения вариабельного домена тяжелой цепи, лигирования вариабельного домена тяжелой цепи с константной областью тяжелой цепи желаемого изотипа, экспрессии легкой цепи и лигированной тяжелой цепи в клетке и сбора антитела против TIM-3 с желаемым изотипом.

Антитело против TIM-3 по изобретению может представлять собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD, но обычно представляет собой изотип IgG, например подкласс IgG IgG1, IgG2a или IgG2b, IgG3 или IgG4. В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой IgG1. В другом варианте осуществления антитело представляет собой IgG2.

В одном из вариантов осуществления антитело против TIM-3 может содержать по меньшей мере одну мутацию в Fc-области. Известно множество различных мутаций Fc, где эти мутации обеспечивают измененную эффекторную функцию. Например, во многих случаях желательно снижать или устранять эффекторную функцию, например, когда нежелательными являются взаимодействия лиганд/рецептор или в случае конъюгатов антитело-лекарственное средство. Аминокислотные положения в Fc-области, которые могут быть полезны для мутаций, чтобы снижать эффекторную функцию, включают одно или несколько из положений 228, 233, 234 и 235, где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT®.

В одном из вариантов осуществления можно мутировать один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235, например, из Leu в Ala (L234A/L235A). Эти мутации снижают эффекторную функцию Fc-области антител IgG1. Дополнительно или альтернативно, аминокислотный остаток в положении 228 можно мутировать, например, в Pro. В другом варианте осуществления аминокислотный остаток в положении 233 можно мутировать, например, в Pro, аминокислотный остаток в положении 234 можно мутировать, например, в Val и/или аминокислотный остаток в положении 235 можно мутировать, например, в Ala. Аминокислотные положения пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT®.

В другом варианте осуществления, где антитело относится к подклассу IgG4, оно может содержать мутацию S228P, т.е. имеет пролин в положении 228, где аминокислотное положение пронумеровано в соответствии со схемой нумерации Eu IMGT®. Известно, что эта мутация снижает нежелательный обмен плечами Fab (Angal et al., *Mol. Immunol.* 30:105-8 (1993)).

В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть по изобретению может представлять собой часть более крупной молекулы иммуноадгезии, сформированной посредством ковалентного или нековалентного ассоциирования антитела или части антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование область сердцевины стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kirpryanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas*, 6:93-101 (1995)) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки для получения двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kirpryanov et al., *Mol. Immunol.* 31:1047-1058 (1994)). Другие примеры включают встраивание одной или нескольких CDR антитела в молекулу ковалентно или нековалентно для создания из нее иммуноадгезина, который специфически связывается с антигеном, представляющим интерес. В таких вариантах осуществления CDR (одну или несколько) можно встраивать в качестве части более крупной полипептидной цепи, можно ковалентно связывать с другой полипептидной цепью или можно встраивать нековалентно.

В другом варианте осуществления можно создавать слитое антитело или иммуноадгезин, которые содержат целиком или частично антитело против TIM-3 по изобретению, связанное с другим полипептидом. В определенных вариантах осуществления только вариабельные домены антитела против TIM-3 связывают с полипептидом. В определенных вариантах осуществления домен VH антитела против TIM-3 связывают с первым полипептидом, тогда как домен VL антитела против TIM-3 связывают со вторым полипептидом, который ассоциирован с первым полипептидом таим образом, что домены VH и VL мо-

гут взаимодействовать друг с другом для того, чтобы формировать антигенсвязывающий участок. В другом предпочтительном варианте осуществления домены VH отделяют от домена VL линкером так, что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом (например, одноцепочечные антитела). Затем антитело VH-линкер-VL связывают с полипептидом, представляющим интерес. Кроме того, можно создавать слитые антитела, в которых два (или больше) одноцепочечных антител связывают друг с другом. Это можно использовать, если хотят создавать двухвалентное или поливалентное антитело в одной полипептидной цепи или если хотят создавать биспецифическое антитело.

Для того чтобы создавать одноцепочечное антитело (scFv), VH- и VL-кодирующие фрагменты ДНК функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 240), так что последовательности VH и VL можно экспрессировать в виде непрерывного одноцепочечного белка с доменами VL и VH, соединенными гибким линкером. См., например, Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988) и McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если только используют одну VH и VL; двухвалентным, если используют две VH и VL; или поливалентным, если используют больше чем две VH и VL. Можно создавать биспецифические или поливалентные антитела, которые специфично связываются, например, с TIM-3 человека и другой молекулой.

В других вариантах осуществления другие модифицированные антитела можно получать с использованием молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитела против TIM-3. Например, "каппа-тела" (Ill et al., *Protein Eng.* 10:949-57 (1997)), "мини-антитела" (Martin et al., *EMBO J.* 13:5303-9 (1994)), "диатела" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)) или "янусины" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) и Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992)) можно получать с использованием стандартных молекулярно-биологических способов, придерживаясь положений описания.

Можно получать производное антитела против TIM-3 или антигенсвязывающей части по изобретению или связывать их с другой молекулой (например, другим пептидом или белком). В целом, производные антител или их частей получают так, что на связывание TIM-3 не оказывают нежелательного влияния посредством получения производных или мечения. Соответственно, предусмотрено, что антитела и части антител по изобретению включают как интактные, так и модифицированные формы антител человека против TIM-3, которые описаны в настоящем документе. Например, антитело или часть антитела по изобретению можно функционально связывать (посредством химической связи, генетического слияния, нековалентного ассоциирования или иным образом) с одной или несколькими другими молекулярными частицами, таким как другое антитело (например, биспецифическое антитело или диател), средство обнаружения, фармацевтическое средство и/или белок или пептид, которые могут опосредовать ассоциирование антитела или части антитела с другой молекулой (такой как область сердцевины стрептавидина или полигистидиновая метка).

Производное антитела одного типа получают посредством сшивки двух или больше антител (одного и того же или различных типов, например, чтобы создавать биспецифические антитела). Подходящие сшиватели включают те, которые являются гетеробифункциональными, имеют две различные реакционноспособные группы, разделенные подходящим спейсером (например, сложный м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидовый эфир) или гомобифункциональными (например, дисукцинимидилсуберат). Такие линкеры доступны, например, в Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Также производное антитела против TIM-3 можно получать с использованием химической группы, такой как полиэтиленгликоль (PEG), метильная или этильная группа или углеводная группа. Эти группы можно использовать для усовершенствования биологических характеристик антитела, например для увеличения времени полужизни в сыворотке.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением также можно метить. Как используют в настоящем описании, термины "метка" или "меченый" относятся к встраиванию другой молекулы в антитело. В одном из вариантов осуществления метка представляет собой поддающийся обнаружению маркер, например встраивание радиоактивно меченой аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинированных фрагментов, которые можно обнаруживать с помощью маркерного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или ферментативная активность, которую можно обнаруживать оптическими или колориметрическими способами). В другом варианте осуществления метка или маркер могут быть терапевтическими, например конъюгат лекарственного средства или токсин. В данной области известны различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов, которые можно использовать. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваясь этим, следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, β-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные маркеры, группы биотинила, предварительно определяемые эпитопы полипептидов, распознаваемые вторичным репортером (например, пара последовательностей лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки), магнитные средства, такие как хе-

латы гадолиния, токсины, такие как токсин коклюша, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомин, эпопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацинон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления метки прикрепляют с помощью спейсерных плеч различной длины, чтобы снизить потенциальное стерическое затруднение.

В определенных вариантах осуществления антитела по изобретению могут присутствовать в нейтральной форме (включая цвиттер-ионные формы) или в виде положительно или отрицательно заряженных частиц. В некоторых вариантах осуществления антитела могут образовывать комплексы с противоионом для того, чтобы формировать фармацевтически приемлемую соль.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к комплексу, содержащему одно или несколько антител и один или несколько противоионов, где противоионы получают из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований.

Биспецифические связывающие молекулы.

В дополнительном аспекте изобретение относится к биспецифической связывающей молекуле, обладающей специфичностью связывания антитела против ТИМ-3, описанного в настоящем документе, и специфичностью связывания другого антитела против ТИМ-3 (например, другого антитела против ТИМ-3, описанного в настоящем документе) или антитела, которое направлено на другой белок, такой как другой белок иммунной контрольной точки, антиген злокачественной опухоли или другая молекула клеточной поверхности, активность которой опосредует патологическое состояние, такое как злокачественная опухоль. Такие биспецифические связывающие молекулы известны в данной области, и примеры биспецифических связывающих молекул различных типов приведены в другом месте в настоящем описании.

Молекулы нуклеиновой кислоты и векторы.

Настоящее изобретение также относится к молекулам и последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела против ТИМ-3 или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления различные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют аминокислотные последовательности тяжелых цепей и легких цепей антитела против ТИМ-3 или его антигенсвязывающей части. В других вариантах осуществления одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотные последовательности тяжелых цепей и легких цепей антитела против ТИМ-3 или его антигенсвязывающей части.

Упоминание о нуклеотидной последовательности охватывает ее комплемент, если не указано иное. Таким образом, упоминание о нуклеиновой кислоте, имеющей конкретную последовательность, следует понимать как охватывающее ее комплементарную нить, с ее комплементарной последовательностью. Термин "полинуклеотид", как упоминают в настоящем описании, обозначает полимерную форму нуклеотидов по меньшей мере 10 оснований в длину, рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов или модифицированной формы нуклеотида любого типа. Термин включает одно- и двухцепочечные формы.

Изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, которые по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичны одной или нескольким нуклеотидными последовательностями, указанным в настоящем описании, например, нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 7-12, 15, 28-35, 38-45, 48-55, 58-65, 68-75, 78-83, 88-95, 98-105, 108-115, 118-125, 128-135, 138-145, 148-155, 158-165, 168-175, 178-185, 188-195, 198-205, 208-215 и 228-235.

Термин "процент идентичности последовательностей" в контексте последовательностей нуклеиновой кислоты относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании с максимальным соответствием. Длина сравнения идентичности последовательностей может превышать отрезок по меньшей мере из приблизительно 9 нуклеотидов, обычно по меньшей мере приблизительно 18 нуклеотидов, более обычно по меньшей мере приблизительно 24 нуклеотида, обычно по меньшей мере приблизительно 28 нуклеотидов, более обычно по меньшей мере приблизительно 32 нуклеотида и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 36, 48 или больше нуклеотидов. Существует множество различных алгоритмов, известных в данной области, которые можно использовать для того, чтобы измерять идентичность последовательностей нуклеотидов. Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с использованием FASTA, Gap или Bestfit, которые представляют собой программы в Wisconsin Package версии 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, которая включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, предоставляет выравнивания и процент идентичности последовательностей для областей наилучшего перекрытия между запрашиваемыми и искомыми последовательностями (см., например, Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996) и Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); включенные в настоящее описание посредством ссылки). Если не указано иное, используют параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательностей между последовательностями нуклеиновой кислоты можно определять с использованием FASTA с ее параметрами по умолчанию (размер слова 6 и коэффициент NORAM для матрицы замен) или с использованием Gap с ее параметрами по умолчанию, как предостав-

лено в GCG версии 6.1, включенной в настоящее описание посредством ссылки.

В одном из аспектов, изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 13, 14, 26, 27, 36, 37, 46, 47, 56, 57, 66, 67, 76, 77, 86, 87, 96, 97, 106, 107, 116, 117, 126, 127, 136, 137, 146, 147, 156, 157, 166, 167, 176, 177, 186, 187, 196, 197, 206, 207, 216, 217, 226 и 227.

Изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичны любой из указанных нуклеотидных последовательностей.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления молекулы нуклеиновой кислоты можно выделять. Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую и/или легкую цепь антитела против ТИМ-3 или его антигенсвязывающей части по изобретению, можно выделять из любого источника, который продуцирует такое антитело или часть. В различных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты выделяют из В-клеток, которые экспрессируют антитело против ТИМ-3, выделенное у животного, которое иммунизировали антигеном ТИМ-3 человека, или из иммортализованной клетки, полученной из такой В-клетки. Способы выделения нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, общеизвестны в данной области. мРНК можно выделять и использовать для получения кДНК для использования в полимеразной цепной реакции (ПЦР) или клонировании кДНК генов антител. В определенных вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению можно синтезировать, а не выделять.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VH из антитела против ТИМ-3 или антигенсвязывающей части по изобретению, соединенную с сохранением рамки считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область тяжелой цепи из любого источника. Аналогичным образом, молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VL из антитела против ТИМ-3 или антигенсвязывающую часть по изобретению, которая соединена с сохранением рамки считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область легкой цепи из любого источника.

В дополнительном аспекте по изобретению молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие переменный домен тяжелой (VH) и/или легкой (VL) цепей, можно "превращать" в полноразмерные гены антител. В одном из вариантов осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH или VL, превращают в полноразмерные гены антител посредством вставки в экспрессирующий вектор, уже кодирующий константные домены тяжелой цепи (CH) или константные домены легкой цепи (CL) соответственно, так что сегмент VH функционально связывают с сегментом(ами) CH в векторе и/или сегмент VL функционально связывают с сегментом CL в векторе. В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH и/или VL, превращают в полноразмерные гены антител посредством связывания, например лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домены VH и/или VL, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей домен CH и/или CL, используя стандартные молекулярно-биологические способы. Затем молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи, можно экспрессировать в клетке, в которую их вводили, и выделять антитело против ТИМ-3.

Молекулы нуклеиновой кислоты можно использовать для рекомбинантной экспрессии больших количеств антител против ТИМ-3. Молекулы нуклеиновой кислоты также можно использовать для получения, например, химерных антител, биспецифических антител, одноцепочечных антител, иммуноадгезинов, диател, мутантных антител и производных антител, как раскрыто в настоящем описании.

В другом варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению используют в качестве зонда или ПЦР праймера для последовательности специфического антитела. Например, нуклеиновую кислоту можно использовать в качестве зонда в диагностических способах или в качестве ПЦР праймера для того, чтобы амплифицировать области ДНК, которые можно использовать, *inter alia*, для выделения дополнительных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих переменные домены антител против ТИМ-3. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды происходят из высоковариабельных доменов тяжелых и легких цепей антитела, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды кодируют целиком или частично одну или несколько CDR антител против ТИМ-3 или их антигенсвязывающих частей по изобретению, как раскрыто в настоящем описании.

В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты и векторы можно использовать для создания мутантных антител против ТИМ-3. Мутации можно вводить в переменные домены тяжелых и/или легких цепей антител, например, чтобы изменять связывающее свойство антитела. Например, мутацию можно создавать в одной или нескольких из CDR для увеличения или уменьшения  $K_D$  антитела против ТИМ-3, для увеличения или уменьшения  $k_{off}$  или для изменения специфичности связывания антитела. В другом варианте осуществления одну или несколько мутаций выполняют в аминокислотном остатке, который, как известно, изменен по сравнению с зародышевой линией в моноклональном антителе по изобретению. Мутации можно создавать в CDR или каркасной области переменного домена или в

константной области. В предпочтительном варианте осуществления мутации выполняют в вариабельном домене. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько мутаций выполняют в аминокислотном остатке, который, как известно, изменен по сравнению с зародышевой линией в CDR или каркасной области вариабельного домена антитела или его антигенсвязывающей части по изобретению.

В другом варианте осуществления мутацию в каркасную область(и) вводят с тем, чтобы получаемая каркасная область(и) имела аминокислотную последовательность соответствующего гена зародышевой линии. Мутацию можно создавать в каркасной области или константной области для увеличения времени полужизни антитела против ТИМ-3. См., например, РСТ публикацию WO 00/09560. Мутацию в каркасной области или константной области также можно создавать для того, чтобы изменять иммуногенность антитела и/или предоставлять участок для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой. В соответствии с изобретением одно антитело может иметь мутации в любой одной или нескольких из CDR или каркасных областей вариабельного домена или в константной области.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает вектор, подходящий для экспрессии одной или обеих из цепей антитела против ТИМ-3 или его антигенсвязывающей части, как раскрыто в настоящем описании. Термин "вектор", как используют в настоящем описании, обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду, т.е. круглый двухцепочечный фрагмент ДНК, в который можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные ДНК сегменты можно лигировать в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный участок начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления векторы (например, не эписомные векторы млекопитающих) можно встраивать в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и тем самым реплицировать вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначают в настоящем описании как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы").

Изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют тяжелую цепь антитела против ТИМ-3 по изобретению или его антигенсвязывающей части, легкую цепь антитела против ТИМ-3 по изобретению или его антигенсвязывающей части или и тяжелые и легкие цепи антитела против ТИМ-3 по изобретению или его антигенсвязывающей части. Изобретение дополнительно предусматривает векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и их зонды.

В некоторых вариантах осуществления антитела против ТИМ-3 по изобретению или их антигенсвязывающие части экспрессируют посредством встраивания ДНК, кодирующей частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, получаемые, как описано выше, в экспрессирующие векторы так, что гены функционально связывают с необходимыми управляющими экспрессией последовательностями, такими как транскрипционные и трансляционные управляющие последовательности. Экспрессирующие векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, космиды, YAC, эписомы, полученные из EBV, и т.п. Кодировшую последовательность антитела можно лигировать в вектор так, что транскрипционные и трансляционные управляющие последовательности в векторе служат своей предполагаемой функции регуляции транскрипции и трансляции кодирующей последовательности антитела. Экспрессирующий вектор и управляющие экспрессией последовательности можно выбирать так, чтобы они были совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Кодировшую последовательность легкой цепи антитела и кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела можно вставлять в отдельные векторы и можно функционально связывать с одними и теми же или различными управляющими экспрессией последовательностями (например, промоторами). В одном из вариантов осуществления обе кодирующие последовательности вставляют в один и тот же экспрессирующий вектор, и их можно функционально связывать с одними и теми же управляющими экспрессией последовательностями (например, общий промотор), с отдельными идентичными управляющими экспрессией последовательностями (например, промоторами) или с различными управляющими экспрессией последовательностями (например, промоторам). Кодировские последовательности антитела можно вставлять в экспрессирующий вектор с помощью стандартных способов (например, лигирование комплементарных участков рестрикции на фрагменте гена антитела и векторе или лигирование тупых концов, если участки рестрикции отсутствуют).

Удобным вектором является тот, который кодирует функционально полную последовательность СН или СL иммуноглобулина человека, с подходящими участками рестрикции, сконструированными с тем, чтобы любую последовательность VH или VL можно было легко вставлять и экспрессировать, как описано выше. HC- и LC-кодирующие гены в таких векторах могут содержать последовательности интронов, которые будут вести к увеличенному общему выходу белка антитела посредством стабилизации родственной мРНК. Последовательности интронов фланкируют донорными и акцепторными сайтами

сплайсинга, которые определяют, где будет происходить сплайсинг РНК. Местоположение последовательностей интронов может быть в переменных или константных областях цепей антитела или как в переменных, так и в константных областях, когда используют несколько интронов. Полиаденилирование и терминация транскрипции могут происходить в нативных хромосомных участках ниже по направлению считывания от кодирующих областей. Рекомбинантный экспрессирующий вектор также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела клеткой-хозяином. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор так, что сигнальный пептид связывают с сохранением рамки считывания с аминоконцом цепи иммуноглобулина. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из не иммуноглобулинового белка).

В дополнение к генам цепей антител, рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению могут нести регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией генов цепей антител в клетке-хозяине. Специалисты в данной области примут во внимание, что конструкция экспрессирующего вектора, в том числе выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, желаемый уровень экспрессии белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих включают вирусные элементы, которые задают высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусных LTR, цитомегаловируса (CMV) (такие как промотор/энхансер CMV), вируса обезьян 40 (SV40) (такие как промотор/энхансер SV40), аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)), вируса полиомы и мощные промоторы млекопитающих, такие как нативные промоторы иммуноглобулинов и актина. Дополнительное описание вирусных регуляторных элементов и их последовательностей см., например, в патентах США № 5168062, 4510245 и 4968615. В данной области известны способы экспрессии антител у растений, в том числе описание промоторов и векторов, а также трансформации растений. См., например, патент США № 6517529. Также в данной области хорошо известны способы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или грибковых клетках, например клетках дрожжей.

В дополнение к генам цепей антител и регуляторным последовательностям, рекомбинантные экспрессирующие векторы по изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, участки начала репликации), и гены селективных маркеров. Ген селективного маркера облегчает отбор клеток-хозяев, в которые введен вектор (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017). Например, обычно ген селективного маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гидромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую введен вектор. Например, гены селективных маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-клетках-хозяевах с метотрексатным отбором/амплификацией), ген нео (для G418 отбора) и ген глутаматсинтетазы.

Термин "управляющая экспрессией последовательность", как используют в настоящем описании, обозначает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми их лигируют. Управляющие экспрессией последовательности включают подходящие последовательности инициации транскрипции, терминации, промоторов и энхансеров; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые увеличивают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, когда желательно, последовательности, которые увеличивают секрецию белка. Свойства таких управляющих последовательностей различаются в зависимости от организма-хозяина; у прокариот такие управляющие последовательности в целом включают промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции; у эукариот, в целом, такие управляющие последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин "управляющие последовательности" предназначен для того, чтобы включать как минимум все компоненты, присутствие которых обязательно для экспрессии и процессинга, а также может включать дополнительные компоненты, присутствие которых является благоприятным, например, лидерные последовательности и последовательности партнера слияния.

Клетки-хозяева и способы получения антитела и композиции антитела.

Дополнительный аспект по изобретению относится к способам получения композиций антител и антител и их антигенсвязывающих частей по изобретению. Один из вариантов осуществления по этому аспекту изобретения относится к способу получения антитела, как определено в настоящем описании, который включает предоставление рекомбинантной клетки-хозяина, способной экспрессировать антитело, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и выделение получаемого антитела. Антитела, получаемые посредством такой экспрессии в таких рекомбинантных клетках-хозяевах, обозначают в настоящем описании как "рекомбинантные антитела". Изобретение также относится к клеткам потомства таких клеток-хозяев и антителам, продуцируемым ими.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин"), как используют в настоящем описании, обозначает клетку, в которую введен рекомбинантный экспрессирующий вектор. изобре-

тение относится к клеткам-хозяевам, которые могут содержать, например, вектор в соответствии с изобретением, описанный выше. Изобретение также относится к клеткам-хозяевам, которые содержат, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и то и другое из антитела против ТИМ-3 или его антигенсвязывающей части по изобретению. Следует понимать, что "рекомбинантная клетка-хозяин" и "клетка-хозяин" обозначает не только конкретную рассматриваемую клетку, но также потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут встречаться в последующих поколениях из-за влияния мутаций или окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но все еще входит в объем термина "клетка-хозяин", как используют в настоящем описании.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против ТИМ-3, и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, можно использовать для трансфекции подходящих клеток-хозяев млекопитающих, растений, бактерий или дрожжей. Трансформацию можно опосредовать любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают декстранопосредованную трансфекцию, преципитацию с фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в данной области. См., например, патенты США № 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455. Способы трансформации клеток растения хорошо известны в данной области, в том числе, например, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, биолистическая трансформация, прямая инъекция, электропорация и вирусная трансформация. Способы трансформации бактериальных и дрожжевых клеток также хорошо известны в данной области.

Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают многие иммортализованные клеточные линии, доступные в American Type Culture Collection (ATCC). Они включают, *inter alia*, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки NS0, клетки SP2, клетки HEK-293T, клетки 293 Freestyle (Invitrogen), клетки NIH-3T3, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки почки африканской зеленой мартышки (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549 и множество других клеточных линий. Конкретные предпочитаемые клеточные линии выбирают, определяя, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии. Другие клеточные линии, которые можно использовать, представляют собой клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf9 или Sf21. Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие гены антител, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела продуцируют посредством культивирования клеток-хозяев в течение определенного периода времени, достаточного для того, чтобы сделать возможной экспрессию антитела в клетках-хозяевах или более предпочтительно секрецию антитела в среду для культивирования, в которой растут клетки-хозяева. Антитела можно извлекать из среды для культивирования с использованием стандартных способов очистки белка. Клетки-хозяева растений включают, например, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ясню, кукурузу, пшеницу, картофель и т.д. Бактериальные клетки-хозяева включают *E. coli* и виды *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того, экспрессию антител по изобретению или их антигенсвязывающих частей в продуцирующих клеточных линиях можно усиливать с использованием множества известных способов. Например, система экспрессии гена глутаминсинтетазы (система GS) представляет собой общий подход для усиления экспрессии при определенных условиях. Система GS рассмотрена в целом и частично в связи с патентами EP 0216846, 0256055, 0323997 и 0338841.

Вероятно антитела, экспрессируемые различными клеточными линиями или трансгенными животными, будут иметь паттерны гликозилирования, отличные друг от друга. Однако все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты, предусмотренными в настоящем описании, или содержащие аминокислотные последовательности, предусмотренные в настоящем описании, являются частью настоящего изобретения, независимо от состояния гликозилирования антител и в более общем смысле независимо от присутствия или отсутствия посттрансляционной модификации(й).

Фармацевтические композиции.

Другой аспект изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую в качестве активного ингредиента (или в качестве единственного активного ингредиента) антитело против ТИМ-3 или его антигенсвязывающую часть, биспецифическую связывающую молекулу или композицию антитела против ТИМ-3 по изобретению. Фармацевтическая композиция может содержать любую композицию антитела против ТИМ-3, биспецифическую связывающую молекулу или антитело или его антигенсвязывающую часть, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для улучшения, предотвращения и/или лечения связанного с ТИМ-3 нарушения (например, нарушения, отличающегося сверхэкспрессией или сверхактивностью ТИМ-3 или любого из его лигандов) и/или злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления композиции пред-

назначены для активации иммунной системы. В определенных вариантах осуществления композиции предназначены для улучшения, предотвращения и/или лечения злокачественной опухоли, происходящей из таких тканей, как кожа, легкое, кишечник, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопозитическая система, голова и шея, печень, мочевого пузыря, грудь, желудок, матка и поджелудочная железа.

В целом, антитела по изобретению или их антигенсвязывающие части или биспецифические связывающие молекулы по изобретению подходят для введения в виде состава в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, например, как описано ниже.

Фармацевтические композиции по изобретению содержат одно или несколько антител против ТИМ-3 или связывающие части или биспецифические связывающие молекулы по изобретению, например одно или два антитела против ТИМ-3 или связывающих части или биспецифических связывающих молекулы. В одном из вариантов осуществления композиция содержит одно антитело против ТИМ-3 по изобретению или его связывающую часть.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере одно антитело против ТИМ-3 или его антигенсвязывающую часть, например одно антитело против ТИМ-3 или часть, или одну биспецифическую связывающую молекулу и одно или несколько дополнительных антител, которые направлены на один или несколько релевантных рецепторов клеточной поверхности, например один или несколько релевантных рецепторов злокачественной опухоли.

Термин "эксципиент" используют в настоящем описании для того, чтобы описывать любой ингредиент, отличный от соединения(й) по изобретению. Выбор эксципиента(ов) в значительной степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, эффект эксципиента, оказываемый на растворимость и стабильность, и свойства дозированной формы. Как используют в настоящем описании, "фармацевтически приемлемый эксципиент" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие абсорбцию средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Некоторые примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов представляют собой воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также их сочетания. Во многих случаях они предпочтительно включают изотонические средства, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия в композиции. Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых веществ представляют собой смачивающие средства или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антитела.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их получения без труда видны специалистам в данной области. Получение таких композиций и способов можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19-е изд. (Mack Publishing Company, 1995). Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в соответствии с условиями GMP (Good Manufacturing Practice).

Фармацевтическую композицию по изобретению можно получать, упаковывать или продавать большими партиями, в виде отдельно стандартной дозы или в виде множества отдельных стандартных доз. Как используют в настоящем описании, "стандартная доза" представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащее предварительно определяемое количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента в целом равно дозе активного ингредиента, которую следует вводить субъекту, или удобной доле такой дозы, например, такой как половина или одна треть от такой дозы.

Любой способ введения пептидов, белков или антител, принятый в данной области, можно подходящим образом использовать для антител и антигенсвязывающих частей по изобретению.

Фармацевтические композиции по изобретению обычно подходят для парентерального введения. Как используют в настоящем описании, "парентеральное введение" фармацевтической композиции включает любой путь введения, отличающийся физическим преодолением ткани субъекта и введением фармацевтической композиции через отверстие в ткани, что таким образом в целом ведет к прямому введению в кровоток, мышцу или внутренний орган. Парентеральное введение, таким образом, включает, но не ограничиваясь этим, введение фармацевтической композиции посредством инъекции композиции, посредством внесения композиции через хирургический разрез, посредством внесения композиции через не хирургическую рану, проникающую в ткань, и т.п. В частности, предусмотрено, что парентеральное введение включает, но не ограничиваясь этим, подкожную, интраперитонеальную, внутримышечную, интратермальную, внутривенную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутриуретральную, внутричерепную и интрасиновиальную инъекцию или инфузии и способы инфузии при диализе почек. Также предусмотрена регионарная перфузия. Конкретные варианты осуществления включают внутривенный и подкожный пути.

Составы фармацевтической композиции, подходящей для парентерального введения, обычно содержат активный ингредиент в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический физиологический раствор. Такие составы можно получать,

упаковывать или продавать в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъецируемые составы можно получать, упаковывать или продавать в стандартной дозированной форме, например в ампулах или в контейнерах с несколькими дозами, которые содержат консервант. Составы для парентерального введения включают, но не ограничиваясь этим, суспензии, растворы, эмульсии в маслянистых или водных носителях, пасты и т.п. Такие составы дополнительно могут содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая в качестве неограничивающих примеров суспендирующее, стабилизирующее или диспергирующее средство. В одном из вариантов осуществления состава для парентерального введения активный ингредиент предоставляют в сухой (т.е. порошковой или гранулярной) форме для восстановления с использованием подходящего носителя (например, стерильной апиrogenной воды) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Парентеральные составы также включают водные растворы, которые могут содержать эксципиенты, такие как соли, углеводы и буферные средства (предпочтительно с рН от 3 до 9), но для некоторых применений их можно более подходящим образом формулировать в виде стерильного неводного раствора или в виде высушенной формы, подлежащей использованию в сочетании с подходящим носителем, таким как стерильная апиrogenная вода. Образцовые формы для парентерального введения включают растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например водные растворы пропиленгликоля или декстрозы. При желании, такие дозированные формы можно подходящим образом забуферивать. Другие парентерально вводимые составы, которые можно использовать, включают те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме или в липосомном препарате. Составы для парентерального введения можно формулировать для незамедлительного и/или модифицированного высвобождения. Составы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, прерывистое, контролируемое, нацеленное и запрограммированное высвобождение.

Например, в одном из аспектов стерильные инъецируемые растворы можно получать посредством внедрения антитела против ТИМ-3 или его антигенсвязывающей части, биспецифической связывающей молекулы или композиции антитела против ТИМ-3 в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, после чего следует стерилизация фильтрованием. В целом, дисперсии получают посредством внедрения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъецируемых растворов, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, которая дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, который предварительно стерильно фильтровали. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частицы в случае дисперсии и с помощью поверхностно-активных средств. Пролонгированную абсорбцию инъецируемых композиций можно осуществлять посредством включения в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например моностеаратных солей и желатина, и/или с использованием покрытий с модифицированным высвобождением (например, покрытий с медленным высвобождением).

Антитела по изобретению также можно вводить интраназально или посредством ингаляции, обычно в форме сухого порошка (отдельно, в виде смеси или в виде частицы из смешанных компонентов, например смешанных с подходящим фармацевтически приемлемым эксципиентом), из ингалятора сухого порошка, в виде распыляемого аэрозоля из контейнера под давлением, насоса, спрея, атоизатора (предпочтительно атоизатора, использующего электрогидродинамику для получения мелкодисперсного тумана) или небулайзера с использованием или без использования подходящего пропеллента или в виде назальных капель.

Контейнер под давлением, насос, спрей, атоизатор или небулайзер в целом содержат раствор или суспензию антитела по изобретению, которые содержат, например, подходящее средство для диспергирования, солюбилизации или продления высвобождения активного средства, пропеллент(ы) в качестве растворителя.

Перед использованием в сухом порошковом или суспензионном составе лекарственный продукт обычно микронизируют до размера, подходящего для доставки посредством ингаляции (обычно меньше 5 мкм). Этого можно достигать любым подходящим способом измельчения, таким как размол на спиральной струйной мельнице, размол на струйной мельнице в псевдооживленном слое, обработка сверхкритическим текучим веществом для формирования наночастиц, гомогенизация высокого давления или распылительная сушка.

Можно формулировать капсулы, блистеры и картриджи для использования в ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошковую смесь соединения по изобретению, подходящей порошковой основы и модификатора эффективности.

Подходящий состав раствора для использования в атоизаторе с использованием электрогидродинамики для получения мелкодисперсного тумана может содержать подходящую дозу антитела по изобретению на одно приведение в действие, и объем приведения в действие, например, может варьировать от 1 до 100 мкл.

Подходящие ароматизаторы, такие как ментол и левоментол, или подсластители, такие как сахарин или сахарин натрия, можно добавлять в те составы по изобретению, которые предназначены для ингаляционного/интраназального введения.

Составы для ингаляционного/интраназального введения можно формулировать для незамедлительного и/или модифицированного высвобождения. Составы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, прерывистое, контролируемое, нацеленное и запрограммированное высвобождение.

В случае ингаляторов сухого порошка и аэрозолей единицу дозирования определяют с помощью клапана, который доставляет отмеренное количество. Единицы в соответствии с изобретением обычно устроены для того, чтобы вводить отмеренную дозу или "пшик" антителя по изобретению. Общую суточную дозу обычно вводят в однократной дозе или более обычно в виде разделенных доз на всем протяжении суток.

Антителя и части антители по изобретению также можно формулировать для введения через оральный путь. Оральное введение может включать проглатывание с тем, чтобы соединение попало в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или сублингвальное введение, посредством которого соединение попадает в кровоток непосредственно изо рта.

Составы, подходящие для орального введения, включают твердые, полутвердые и жидкие системы, такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие мульти- или наночастицы, жидкости или порошки; пастилки (в том числе заполненные жидкостью); жвачки; гели; быстродиспергируемые дозированные формы; пленки; капсулы; спреи и буккальные/мукоадгезивные пластыри.

Жидкие составы включают суспензии, растворы, сиропы и крепкие настои. Такие составы можно использовать в качестве наполнителей в мягких или твердых капсулах (выполненных, например, из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), и они обычно содержат носитель, например воду, этанол, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, метилцеллюлозу или подходящее масло, и одно или несколько эмульгирующих средств и/или суспендирующих средств. Жидкие составы также можно получать посредством восстановления твердого вещества, например, из саше.

Терапевтическое использование антители и композиций по изобретению.

В одном из аспектов антителя против TIM-3 и их антигенсвязывающие части, композиции против TIM-3 и биспецифические связывающие молекулы по изобретению используют для усиления или активации иммунной системы у человека, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет состояние, которое отличается сверхэкспрессией или сверхактивностью TIM-3 или любого из его лигандов. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет иммунную супрессию. В определенных вариантах осуществления антители или его антигенсвязывающая часть, композиция или биспецифическая связывающая молекула предназначены для использования в лечении злокачественной опухоли, например злокачественных опухолей, которые берут начало в таких тканях, как кожа, легкое, кишечник, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гематопоэтическая система, голова и шея, печень, мочевого пузыря, грудь, желудок, матка и поджелудочная железа, и любых злокачественных опухолей или других состояний, которые зависят от активности TIM-3 и/или при которых пациент экспрессирует или чрезмерно экспрессирует галектин-9, фосфатидилсерин, CEACAM-1 и/или HMGB-1. Злокачественные опухоли, которые лечат антителями против TIM-3, их антигенсвязывающими частями, композициями антителя против TIM-3 и/или биспецифическими связывающими молекулами по изобретению, могут включать, например, меланому, мелкоклеточный рак легких, рак толстой кишки, почечноклеточную карциному, лейкоз (например, острый миелолейкоз) и солидные опухоли (например, запущенные или метастазирующие солидные опухоли).

В некоторых вариантах осуществления злокачественные опухоли, которые лечат антителями против TIM-3, их антигенсвязывающими частями, композициями против TIM-3 и/или биспецифическими связывающими молекулами по изобретению, могут включать, например, меланому (например, запущенную или метастазирующую меланому), мелкоклеточную злокачественную опухоль легких, плоскоклеточную злокачественную опухоль головы и шеи, почечноклеточную карциному, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, глиобластому, глиому, плоскоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, гепатоцеллюлярную карциному, рак мочевого пузыря, рак верхних мочевых путей, рак пищевода, рак гастроэзофагеального перехода, рак желудка, рак печени, рак ободочной кишки, карциному толстой кишки, множественную миелому, саркому, острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз, миелодиспластический синдром, назофарингеальную злокачественную опухоль, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, рак яичников, рак желудочно-кишечного тракта, первичный перитонеальный рак, рак фаллопиевых труб, уротелиальный рак, HTLV-ассоциированный T-клеточный лейкоз/лимфому, рак предстательной железы, урогенитальный рак, менингиому, аденокарциному, глиосаркому, фибросаркому, рак почки, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак эндометрия, базальноклеточный рак кожи, рак аппендикса, рак желчных путей, рак слюнной железы, запущенный рак из клеток Меркеля, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мезотелиому и солидные опухоли.

В некоторых вариантах осуществления антители или его антигенсвязывающая часть, композиция

или биспецифическая связывающая молекула предназначены для использования в лечении вирусных и/или паразитарных инфекций, например, где патогены ингибируют иммунный ответ хозяина.

"Лечить" и "лечение" относятся к способу облегчения или устранения биологического нарушения и/или по меньшей мере одного из его сопутствующих симптомов. Как используют в настоящем описании, "облегчать" заболевание, нарушение или состояние обозначает снижение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, нарушения или состояния. Кроме того, в настоящем описании упоминания о "лечении" включают упоминания об излечивающем, паллиативном и профилактическом лечении.

"Терапевтически эффективное количество" относится к вводимому количеству терапевтического средства, которое облегчает в определенной степени один или несколько симптомов нарушения, подлежащего лечению. Терапевтически эффективное количество терапевтического средства против злокачественной опухоли, например, может вести к уменьшению опухоли, увеличенной выживаемости, элиминации клеток злокачественной опухоли, снижению прогрессированию заболевания, купированию метастазов или другим клиническим конечным точкам, желаемым работниками здравоохранения.

Композиции антител или антигена или их антигенсвязывающие части по изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами или антителами (или в виде любого их сочетания). Фармацевтические композиции, способы и использование по изобретению, таким образом, также охватывают варианты осуществления комбинаций (совместное введение) с другими активными средствами, как подробно описано далее.

Как используют в настоящем описании, термины "совместное введение", "совместно вводимый" и "в комбинации с", относящиеся к композициям антител, антителам и их антигенсвязывающим частям, а также биспецифическим связывающим молекулам по изобретению с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, предназначены для того, чтобы обозначать и относиться к и включать следующее: одновременное введение такой комбинации из композиции антитела/антитела/антигенсвязывающей части/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и терапевтического средства(в) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты формулируют вместе в одной дозированной форме, которая высвобождает указанные компоненты указанному пациенту по существу в одно и то же время, по существу одновременное введение такой комбинации из композиции антитела/антитела/антигенсвязывающей части/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и терапевтического средства(в) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты формулируют отдельно друг от друга в отдельных дозированных формах, которые указанный пациент принимает по существу в одно и то же время, после чего происходит высвобождение указанных компонентов указанному пациенту по существу в одно и то же время, последовательное введение такой комбинации из композиции антитела/антитела/антигенсвязывающей части/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и терапевтического средства(в) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты формулируют отдельно друг от друга в отдельных дозированных формах, которые указанный пациент принимает в последовательные моменты времени со значимым временным интервалом между каждым введением, после чего происходит высвобождение указанных компонентов указанному пациенту по существу в различные моменты времени; и последовательное введение такой комбинации из композиции антитела/антитела/антигенсвязывающей части/биспецифической связывающей молекулы по изобретению и терапевтического средства(в) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты формулируют вместе в одной дозированной форме, которая высвобождает указанные компоненты контролируемым образом, после чего происходит их параллельное, последовательное и/или перекрывающееся высвобождение указанному пациенту в одни и те же и/или различные моменты времени, где каждую часть можно вводить через один и тот же или другой путь.

Композиции антител, антигена и их антигенсвязывающие части и биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно вводить без дополнительного терапевтического лечения, т.е. в качестве обособленной терапии. Альтернативно, лечение композициями антител и антителами и их антигенсвязывающими частями по изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированное лечение). В некоторых вариантах осуществления композиция антитела или антигена или его антигенсвязывающую часть можно совместно вводить или формулировать с другим лекарством/лекарственным средством для лечения злокачественной опухоли. Дополнительное терапевтическое лечение может содержать, например, химиотерапевтическое, антинеопластическое или антиангиогенное средство, другое антитело против злокачественной опухоли и/или лучевую терапию.

Комбинируя композиции антител, антигена или антигенсвязывающие части или биспецифические связывающие молекулы по изобретению со средствами, о которых известно, что они индуцируют терминальную дифференцировку клеток злокачественной опухоли, можно дополнительно усовершенствовать эффект. Такие соединения, например, можно выбирать из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, трансретиноевых кислот, цис-ретиноевых кислот, фенилбутирата, фактора роста нервов, диметилсульфоксида, активной формы витамина D3, рецептора гамма, активированного пролифератором перокси-сом, 12-O-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата, гексаметилен-бис-ацетамида, трансформирующего фактора роста  $\beta$ , масляной кислоты, циклического АМР и веснаринона. В некоторых вариантах осуществления

соединение выбрано из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, фенилбутирата, полностью транс-ретиноевой кислоты и активной формы витамина D.

Фармацевтические изделия, содержащие композицию антитела против TIM-3, антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающую часть или биспецифическую связывающую молекулу по изобретению и по меньшей мере одно другое средство (например, химиотерапевтическое, антинеопластическое или антиангиогенное средство) можно использовать в качестве комбинированного лечения для одновременного, раздельного или последовательного введения при терапии злокачественной опухоли. Другое средство может представлять собой любое средство, подходящее для лечения конкретной рассматриваемой злокачественной опухоли, например средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, например производных платины, таких как цисплатин, карбоплатин и/или оксалиплатин; растительных алкалоидов, например паклитаксела, доцетаксела и/или иринотекана; противоопухолевых антибиотиков, например доксорубицина (адриамицина), даунорубицина, эпирубицина, идарубицина митоксантрона, дактиномицина, блеомицина, актиномицина, лутеомицина, и/или митомицина; ингибиторов топоизомераз, таких как топотекан; и/или антиметаболитов, например фторурацила и/или других фторпиримидинов.

Антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающую часть, биспецифическую связывающую молекулу или композицию антитела против TIM-3 по изобретению также можно использовать в комбинации с другой терапией против злокачественной опухоли, такой как вакцины, цитокины, ингибиторы ферментов и Т-клеточная терапия. В случае вакцины она может представлять собой, например, белковую, пептидную или ДНК вакцину, содержащую один или несколько антигенов, которые релевантны для злокачественной опухоли, подлежащей лечению, или вакцину, содержащую дендритные клетки вместе с антигеном. Подходящие цитокины включают, например, IL-2, IFN- $\gamma$  и GM-CSF. Примером типа ингибитора фермента, который обладает активностью против злокачественной опухоли, является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), например 1-метил-D-триптофан (1-D-MT). Адоптивная Т-клеточная терапия относится к различным способам иммунотерапии, которые включают размножение или конструирование собственных Т-клеток пациентов, чтобы распознавать и атаковать их опухоли.

Также предусмотрено, что антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающую часть, биспецифическую связывающую молекулу или композицию антитела против TIM-3 по изобретению можно использовать в дополнительной терапии в связи с ингибиторами тирозинкиназ. Существуют синтетические молекулы с низкой молекулярной массой, преимущественно производные хиназолина, которые взаимодействуют с внутриклеточным доменом тирозинкиназ рецепторов и ингибируют индуцируемое лигандами фосфорилирование рецепторов посредством конкуренции за внутриклеточный сайт связывания Mg-АТФ.

В некоторых вариантах осуществления композицию антитела, биспецифическую связывающую молекулу или антитело или его антигенсвязывающую часть можно использовать в комбинации с другим лекарством/лекарственным средством, которое опосредует активацию иммунной системы, включая в качестве неограничивающих примеров, средство, которое опосредует экспрессию или активность A2AR, BLTA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28, CD39, CD40, CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (например, CEACAM-1 и/или CEACAM-5), галектина-9, GTR, HVEM, ICOS, IDO, KIR, LAIR1, LAG-3, NKG2A, OX40, PD-1/PD-L1/PD-L2, TIGIT, TGFR- $\beta$ , TNFR2, VISTA и/или 2B4. В определенных вариантах осуществления средством является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с одной из вышеуказанных молекул.

В определенных аспектах, антитела и антигенсвязывающие части, композиции и биспецифические связывающие молекулы по изобретению можно вводить в комбинации с другим ингибитором пути TIM-3, который может направленно воздействовать на TIM-3 или один или несколько его лигандов. Примеры таких ингибиторов включают другие антитела против TIM-3 и антитела, которые направленно воздействуют на лиганды и/или корецепторы TIM-3, такие как галектин-9, HMGB-1, фосфатидилсериновые липиды, CEACAM1, LILRA1-6 или LILRB1-5.

Понятно, что композиции антител, биспецифические связывающие молекулы и антитела и их антигенсвязывающие части по изобретению можно использовать в способе лечения, как раскрыто в настоящем описании, можно использовать в лечении, как раскрыто в настоящем описании, и/или можно использовать в изготовлении лекарственного средства для лечения, как раскрыто в настоящем описании.

Доза и путь введения.

Композиции антител по изобретению следует вводить в эффективном количестве для лечения рассматриваемого состояния, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Терапевтически эффективное количество может варьировать в соответствии с такими факторами, как конкретное состояние, подлежащее лечению, возраст, пол и масса пациента, и вводят ли антитела в качестве обособленного лечения или в комбинации с одним или несколькими дополнительными лечениями против злокачественных опухолей.

Схемы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа. Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени или

дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать, как указывают потребности терапевтической ситуации. В частности, благоприятно формулировать парентеральные композиции в форме единицы дозирования для простоты введения и однородности дозы. Форма единицы дозирования, как используют в настоящем описании, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, вычисленное для получения желаемого терапевтического эффекта, в связи с необходимым фармацевтическим носителем. Описание для форм единиц дозирования по изобретению в целом продиктовано и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик химиотерапевтического средства и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, которого нужно достигать, и (б) ограничений, присущих области компаундирования такого активного соединения для лечения, чувствительности у индивидуумов.

Таким образом, специалист в данной области примет во внимание, исходя из раскрытия, предоставленного в настоящем описании, что дозу и схему дозирования корректируют в соответствии со способами, общеизвестными в области терапии. То есть, можно легко устанавливать максимальную переносимую дозу, а также можно определять эффективное количество, обеспечивающее подающийся обнаружению терапевтический эффект у пациента, как позволяют временные требования для введения каждого средства обеспечивать для пациента подающийся обнаружению терапевтический эффект. Соответственно, хотя определенная доза и схемы введения приведены в качестве примера в настоящем описании, эти примеры никоим образом не ограничивают дозу и схему введения, которые можно предусматривать для пациента при практическом осуществлении настоящего изобретения.

Следует отметить, что значения доз могут варьировать вместе с типом и тяжестью состояния, подлежащего облегчению, и могут включать однократные или многократные дозы. Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные схемы дозирования следует корректировать с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным суждением человека, осуществляющего введение или инспектирующего введение композиций, и что диапазоны доз, изложенные в настоящем описании, являются только образцовыми и не предназначены для того, чтобы ограничивать объем или практическую реализацию осуществляемой композиции. Кроме того, схема дозирования композиций по данному изобретению может быть основана на различных факторах, в том числе типе заболевания, возрасте, массе, поле, медицинском состоянии пациента, тяжести состояния, пути введения и конкретном используемом антителе. Таким образом, схема дозирования может варьировать широко, но ее можно определять обычным образом с использованием стандартных способов. Например, дозы можно корректировать на основании фармакокинетических или фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты, и/или лабораторных значений. Таким образом, настоящее изобретение относится к индивидуальному повышению дозы, как определяет специалист в данной области. Определение подходящих доз и схем общеизвестно в релевантной области, и следует понимать, что его охватит специалист в данной области после предоставления положений, раскрытых в настоящем описании.

Предусмотрено, что подходящая доза композиции антитела по изобретению находится в диапазоне 0,1-100 мг/кг, таком как приблизительно 0,5-50 мг/кг, например приблизительно 1-20 мг/кг. Композицию антитела, например, можно вводить в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере 0,5 мг/кг, такой как по меньшей мере 1 мг/кг, например, по меньшей мере 1,5 мг/кг, такой как по меньшей мере 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, такой как по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере 5 мг/кг и, например, вплоть до самое большее 50 мг/кг, такой как вплоть до самое большее 30 мг/кг, например, вплоть до самое большее 20 мг/кг, такой как вплоть до самое большее 15 мг/кг. Введение обычно повторяют с подходящими интервалами, например раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели, и до тех пор, пока считает подходящим ответственный врач, который может необязательно повышать или снижать дозу по мере необходимости.

Эффективное количество для терапии опухоли можно измерять по его способности стабилизировать прогрессирование заболевания и/или улучшать симптомы у пациента, и предпочтительно обращать прогрессирование заболевания, например, по уменьшению размера опухоли. Способность антитела, антигенсвязывающей части, биспецифической связывающей молекулы или композиции по изобретению ингибировать злокачественную опухоль можно оценивать с помощью анализов *in vitro*, например, как описано в примерах, а также в подходящих животных моделях, которые позволяют прогнозировать эффект для опухолей человека. Подходящие схемы дозирования следует выбирать для того, чтобы обеспечивать оптимальный терапевтический ответ в каждой конкретной ситуации, например, вводить в виде однократного болюса или в виде непрерывной инфузии, и с возможной корректировкой дозы, как указывают потребности в каждом случае.

Диагностическое применение и композиции.

Антитела и антигенсвязывающие части по настоящему изобретению также можно использовать в диагностических процессах (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, антитела и части можно использовать для того, чтобы обнаруживать и/или измерять уровень TIM-3 в образце от пациента (например, образце ткани или образце текучего вещества организма, таком как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка,

текущее вещество кишечника, слюна или моча). Подходящие способы обнаружения и измерения включают иммунологические способы, такие как проточная цитометрия, твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA), анализ хемилюминесценции, радиоиммунологический анализ и иммуногистология. Изобретение дополнительно охватывает наборы (например, диагностические наборы), содержащие антитела и антигенсвязывающие части, описанные в настоящем документе.

Если не определено иное в настоящем описании, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, в которых их обычно понимают средние специалисты в данной области. Образцовые способы и материалы описаны далее, хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, также можно использовать при практической реализации или тестировании настоящего изобретения. В случае противоречия данное описание, в том числе определения, имеет определяющую роль.

В целом, номенклатура и способы, используемые в связи с культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой, аналитической химией, синтетической органической химией, медицинской и фармацевтической химией, а также химией белков и нуклеиновых кислот и гибридизацией, которые описаны в настоящем документе, являются общеизвестными и широко используемыми в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с описаниями производителей, как обычно выполняют в данной области или как раскрыто в настоящем описании.

Кроме того, пока контекст не требует иного, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. На всем протяжении этого описания и вариантов осуществления следует понимать, что слова "иметь" и "содержать" или вариации, такие как "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", подразумевают включение приведенного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

Все публикации и другие источники, упомянутые в настоящем описании, включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме. Несмотря на то что множество документов цитировано в настоящем описании, это цитирование не составляет допущение о том, что любые из этих документов составляют часть общедоступных знаний в данной области.

Для лучшего понимания этого изобретения приведены следующие примеры. Эти примеры служат только иллюстративным целям, и их не следует толковать в качестве ограничения объема изобретения каким-либо образом.

### Примеры

Пример 1. Клонирование антител против TIM-3 из В-клеток крысы.

В этом примере описан способ, используемый для создания антител против TIM-3 человека по изобретению. ДНК и аминокислотные последовательности антител также предоставлены.

Материалы и способы.

Антитела против TIM-3 по изобретению выделяли из репертуара антител, полученных у крыс OmniRat® (Osborn et al., J. Immunol. 190(4):1481-90 (2013)), штамма крыс из OMT (Open Monoclonal Technology, Inc.), который продуцирует антитела с идиотипами полностью человека. Клонирование генов антител, полученных у крыс, из антителосекретирующих В-клеток (ASC), отсортированных по отдельным клеткам, осуществляли с помощью технологии обнаружения антител Symplex™ (Meijer et al., J. Mol. Biol. 358(3):764-72 (2006)).

Библиотеку антител Symplex™ получали из В-клеток, отсортированных по отдельным клеткам, у иммунизированных OmniRat® крыс, библиотека содержит когнатные пары, кодирующие VH и VL, для каждой отсортированной В-клетки. Конструкции с репертуаром антител, кодирующие полностью иммуноглобулины человека в формате IgG1 или IgG2, трансфицировали в клетки Expi293 и осуществляли скрининг клеточных супернатантов по связывающим свойствам в высокопропускном формате. Успешные результаты скрининга анализировали посредством секвенирования ДНК и извлекали последовательности ДНК, кодирующее антитела. Выбранные клоны антител экспрессировали и тестировали функционально, как описано ниже. В табл. 1 представлены последовательности нуклеиновой кислоты варибельного домена тяжелой и легкой цепей клона антитела 15086.15086. В табл. 2 представлены аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей для указанного клона антитела, и в табл. 4 представлены аминокислотные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей. В табл. 3 представлены аминокислотные последовательности константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи к IgG1.

Из-за использования вырожденных праймеров в Symplex™ клонировании фрагментов кДНК, кодирующих антитела, корректировали множество миссенс-мутаций на аминоконцах тяжелой и легкой цепей в определенных антителах (например, антителах 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144). В табл. 5 представлены последовательности варибельного домена тяжелой и легкой цепей на уровне ДНК из оптимизированного антитела, обозначаемого 15086.16837, 15086.17145 или 15086.17144 (эти три варианта различаются подвидом изотипа, но имеют идентичные последовательности варибельного домена тяже-

лой и легкой цепей). Процесс оптимизации включает согласование аминоконцевой коррекции с зародышевой линией, а также оптимизацию использования кодонов. Целями согласования с последовательностями зародышевой линии человека было IGHV4-31 для переменных доменов тяжелых цепей и IGKV3-11 для переменных доменов легких цепей.

Идентифицировали дополнительные антитела, отличающиеся различными категориями эпитопов. Последовательности переменного домена тяжелой и легкой цепей этих антител представлены в табл. 9 и 10. Идентифицировали дополнительные функциональные антитела, а их последовательности переменного домена тяжелой и легкой цепей представлены в табл. 12 и 13.

Результаты.

В табл. 1 представлены ДНК последовательности, кодирующие Symplex™-клонированное антитело 15086.15086.

Таблица 1  
ДНК последовательности переменных доменов Symplex™-клонированного антитела 15086.15086

	Последовательность (от 5' к 3')
ДНК последовательность (SEQ ID NO: 1)	CAGGTGCAGCTACAGCAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTACTACTGGAGTTGGACCCGTCAGCACCCAGGGATGGCCCTGGAGTGGATTGGATACATCTCTTACAGTGGGAGTATCTATTACACTCCGTCCTCAAGAGTCGACTTACCATATCAGTGGACACGCTCTAAGAACCGTTCCTCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGTTTGATTCCTGGGGATCTAACCGTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT
ДНК последовательность (SEQ ID NO: 2)	GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGTGGAGATTAAG

В табл. 2 представлены выведенные белковые последовательности исходного Symplex™-клонированного антитела 15086.15086. CDR представлены полужирным и курсивным начертанием.

Таблица 2  
Белковые последовательности переменных доменов Symplex™-клонированного антитела 15086.15086

	Последовательность (от N-конца к C-концу)
Белковая последовательность (SEQ ID NO: 3)	QVQLQQSGPGLVKPQSQTLSLTCTVSGGS <b><i>ISSGGYY</i></b> WSWTRQHFGMGLEWIGY <b><i>ISYSGSTY</i></b> YTPSLKSRITISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY <b><i>CASLDSWGSNRDY</i></b> WGQGLTVTVSS
Белковая последовательность (SEQ ID NO: 4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b><i>QSVSSY</i></b> LAWYQQKPGQAPRLLIY <b><i>DASNRATGIPA</i></b> RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYY <b><i>CQQRSNWPLTF</i></b> GGGKVEIK

В табл. 3 представлены константные области тяжелой и легкой цепей.

Таблица 3  
Белковые последовательности константных областей

	Последовательность (от N-конца к C-концу)
Константная область тяжелой цепи IgG1 (SEQ ID NO: 5)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Константная область легкой цепи к (SEQ ID NO: 6)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNGEC

В табл. 4 представлены определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой и легкой цепей, которые содержат антитела 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144. Последовательности CDR в настоящем описании определяли в соответствии с определениями IMGT® для CDR1 и CDR2. Для CDR3 тяжелой и легкой цепей определения в настоящем описании включают один дополнительный аминокислотный остаток выше по направлению считывания от IMGT-CDR3 (Cys) и один дополнительный аминокислотный остаток ниже по направлению считывания (Trp для CDR3 VH, Phe для CDR3 VL).

Таблица 4

Белковые последовательности CDR антител 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144

Область	Последовательность (от N-конца к C-концу)
HCDR1 (SEQ ID NO:7)	GGSISSGGYY
HCDR2 (SEQ ID NO:8)	ISYSGSI
HCDR3 (SEQ ID NO:9)	CASLDSWGSNRDYW
LCDR1 (SEQ ID NO:10)	QSVSSY
LCDR2 (SEQ ID NO:11)	DAS
LCDR3 (SEQ ID NO:12)	CQQRSNWPLTF

В табл. 5 представлены оптимизированные ДНК последовательности, кодирующие переменные домены тяжелых и легких цепей, которые содержат антитела 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144.

Таблица 5

Оптимизированные ДНК последовательности, кодирующие переменные домены антител 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144

	Последовательность (от 5' к 3')
ДНК последовательность VH (SEQ ID NO:13)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGCCCCGGACTGGTCAAGCCTTCACAGACTCTGAGCCTGACCTGCACAGTGTCTGGCGGAAGTATCAGCTCCGGGGTTACTATTGGAGCTGGACCCGACAGCACCCAGGAATGGGTCTGGAATGGATCGGGTACATTTTCATATAGCGGCTCCATCTACTATACACCCCTCACTGAAAAGCAGGCTGACCATTTCCGTGGACACATCTAAGAACCAGTTCAGCCTGAAACTGTCTAGTGTGACAGCCGCTGATACTGCAGTCTACTATTGTGCCTCCCTGGACTCTTGGGCGAGTAATAGAGATTACTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCAACGCTCTCGAGT
ДНК последовательность VL (SEQ ID NO:14)	GAGATCGTGTGACTCAGTCCCCAGCCACCTGTCACTGAGCCAGGAGAACGAGCAACCCTGTCTTGCAGGGCCTCCAGTCTGTGACTCCTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAGCCCGGCAGGCACCTCGACTGCTGATCTACGACGCCAGTAACAGAGTACCAGTATCCCGCCCGCTTCAGTGGTTCAGGCAGCGGAACAGACTTTACCCTGACAATCTCTAGTCTGGAGCCTGAAGATTTCCGCGTGTACTATTGTGACGAGAGTCTAATTGGCCACTGACATTTGGCGGAGGGACTAAGGTCGAGATCAAG

В табл. 6 представлены выведенные белковые последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей, которые содержат антитела 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144. CDR представлены полужирным и курсивным начертанием. Следует отметить, что белковая последовательность VL является такой же, как неоптимизированная белковая последовательность VL.

Таблица 6

Белковые последовательности переменных доменов оптимизированных антител 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144

	Последовательность (от N-конца к C-концу)
Белковая последовательность VH (SEQ ID NO:15)	QVQLQESGFGLVKPSQTLTCTVSGGSISSGGYY <sup>W</sup> SWTRQHPGMGLEWIGY <b>ISYSGSI</b> YYP <sup>L</sup> SLKSR <sup>L</sup> TI <sup>S</sup> VD <sup>T</sup> SK <sup>N</sup> Q <sup>F</sup> SL <sup>K</sup> L <sup>S</sup> SV <sup>T</sup> AAD <sup>T</sup> AV <sup>Y</sup> Y <b>CASLDSWG</b> <b>SNRDYWG</b> QGT <sup>L</sup> TV <sup>S</sup> S
Белковая последовательность VL (SEQ ID NO:4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ <sup>K</sup> PK <sup>Q</sup> AP <sup>R</sup> LLIY <b>DAS</b> NRATGIPARFSGSGSD <sup>T</sup> FT <sup>L</sup> TI <sup>S</sup> SL <sup>E</sup> PE <sup>D</sup> FAV <sup>Y</sup> Y <b>CQQRSNWPLTF</b> GGG <sup>T</sup> KV EIK

В табл. 7 представлены ДНК последовательности, кодирующие константные области антител в различных изотипических форматах.

Таблица 7

**ДНК последовательности, кодирующие константные области антител  
в различных изотипических форматах**

	Описание	Последовательность (от 5' к 3')
Константная область тяжелой цепи IgG1-LALA (SEQ ID NO:16)	Константная область тяжелой цепи IgG1-LALA, за исключением интронов	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCCTGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGAC AAAACTCACACATGCCACCCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTG AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGCTCTCACCGT CCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGCTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGTCAACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTA AA
Константная область тяжелой цепи IgG1-включая	Константная область тяжелой цепи IgG1-включая	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCCTGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAAGGCCAGCACAG

LALA (SEQ ID NO:17)	интроны	GGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCAT CCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCGCTCTGCCTCT TCACCCGGAGGCCTCTGCCCCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTG GCTTTTTCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGC CCTGCACACAAAGGGGAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGGCCATATCC GGGAGGACCTGCCCTGACCTAAGCCACCCAAAGGCCAAACTCTCCACT CCCTCAGCTCGACACCTTCTCCTCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTT CTCTCTGCAGAGCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCC CAGGTAAGCCAGCCAGGCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCC TAGAGTAGCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCAC CTCCATCTCTCCTCAGCACCTGAAgcccgggggaccgtcagtccttctctc TTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGCAAAGCCGGGAGGAG CAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCC AGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTG CGAGGGCCACATGGACAGAGCGGCTCGGCCACCCCTGCCCCTGAGAGTG ACCGTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACGCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGC AATGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTCCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGACCTCTCCCTGTCCCCGGGTA
Констант ная область тяжелой цепи IgG4 (S228P) (SEQ ID NO:18)	Константная область тяжелой цепи IgG4 (S228P), за исключением интронов	GCTTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA CCTCCGAGAGCACAGCCGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCCGCTGTCCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA CAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCC CCATGCCCAcCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGACCATCAGTCTTCC TGTTCCCCCAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC AAC TGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGCAAAGCCGGGGAGG AGCAGTTC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTC CCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAGC CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTACCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGC TGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAG

		CAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACACAGAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
Констант ная область область тяжелой цепи IgG4 (S228P), включая интроны (SEQ ID NO:19)	Константная область тяжелой цепи IgG4 (S228P), включая интроны	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAG GGAGGGAGGGTGTCTGTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCAC CCCAGGCTGTGCAGCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCATCTGTCTCC TCACCCGGAGGCTCTGACCACCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTG GATTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCTACCCAGG CCCTGAGCATAAGGGCAGGTGTCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATC CGGGAGGACCTGCCCTGACCTAAGCCACCCCAAGGCCAAACTCTCCAC TCCCTCAGCTCAGACACCTTCTCTCCTCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCT TCTCTGTGCAGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCAcCATGCCAGGTAAG CCAACCCAGGCTCGCCCTCCAGCTCAAGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAG CCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGTGACGCATCCACCTCCATCT CTTCTCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGACCATCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTCAA CAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCCGTCTCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGCAGGGCC ACATGGACAGAGGTGAGTCCGGCCACCCCTCTGCCCTGGGAGTGACCCTGT GCCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTG CCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAATAACAGACACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTCTACAGCAGGCTCACCCTGGACAAGAGAGGTTGGCAGGAGGGGA ATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
Констант ная область область тяжелой цепи IgG2 (SEQ ID NO:20)	Константная область тяжелой цепи IgG2, за исключением интронов	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAACTTCCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC GAGTGGCCACCGTCCCAGCACCCCTGTGGCAGGACCGTCACTTCTCTCT TCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTAC GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG

		TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGC AGTTCAACAGCACGTTCCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTGTGCACCAGGA CTGGCTGACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACACTCCCATGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
Констант ная область тяжелой цепи IgG2 (SEQ ID NO:21)	Константная область тяжелой цепи IgG2, включая интроны	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAACTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGGTGAGAGGCCAGCTCAG GGAGGGAGGTGTCTGTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCAC CCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCATCTGTCTCC TCACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGCTCTTCTG GCTTTTCCACCAGGCTCCAGGCAGGCACAGGCTGGGTGCCCTACCCAGG CCCTTACACACAGGGGCAGGTGCTTGGCTCAGACCTGCCAAAAGCCATATC CGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCAGCCCAAAGGCCAAACTGTCCAC TCCCTCAGCTCGGACACTTCTCTCCTCCAGATCCGAGTAACCCCAATCT TCTCTGTGCAGAGCGAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGGTAAG CCAGCCCAGGCCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGGGGACAGGTGCCCTAGAGTAG CCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCTGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCT CTTCTCAGACACCCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGT GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGCAAGCCACGGGAGGAGCAGTTC AACAG CACGTTCCGTGTGGTCAAGGCTCCTCACCGTGTGCACAGGACTGGTGAAC GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCAGCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGTGGGACCCGCGGGGTATGAGGGCCACA TGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCC AACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAATGGGAGCC GGAGAACAATAACAAGACCACACTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
Констант ная область легкой цепи к (SEQ ID NO:22)		CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAGAGCTTCAACAGG GGAGAGTGT

В табл. 8 представлены белковые последовательности константных областей антител в различных изотипических форматах.

Таблица 8

**Белковые последовательности константных областей антител  
в различных изотипических форматах**

	Последовательность (от N-конца к C-концу)
Константная область тяжелой цепи IgG1-LALA (SEQ ID NO:23)	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFCSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK
Константная область тяжелой цепи IgG4 (S228P) (SEQ ID NO:24)	ASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQOQGNVFCSCVMHEALHNHHTQKSLSLSLGK
Константная область тяжелой цепи IgG2 (SEQ ID NO:25)	ASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFCSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK

В табл. 9 представлены ДНК последовательности, кодирующие переменные домены тяжелых и легких цепей антител против ТИМ-3, используемых для категоризации эпитопов.

Таблица 9

**ДНК последовательности переменных доменов  
категоризационных антител против ТИМ-3**

Ab	SEQ ID NO:	Последовательность (от 5' к 3')
20131 VH	26	CAGGTGCAGCTACAGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTAAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGC

		ACATACAACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC TGTGCGAAAATTTTTGGGTCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTC ACAGTCTCGAGT
20131 VL	27	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC ACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTAC TTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGACA TCTACCCGGGAATCCGGGTCCCTAACCATTAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGAT TTCACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTGAG CAATATTATAGTGGTCTCCGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA
20293 VH	36	ACGTGACAGGGCGGCCAGGTCCAGCTGCAGGAGAGCGGTCCCGGACTGGTGAAGC CATCCCAGACACTGAGCCTGACTTGTACTGTGAGCGGGGTAGCATCTCCAGCGGCG GCTACTATTGGTCTGGATCAGGCAGCACCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCT ACATCTACTATAGCGCTCTATCTACTATAACCCCTCCCTGAAGAGCCGGGTGACCA TCTCTGTGGACACATCCAAGAATCAGTTCATCTGAAGCTGTCTCCGCTGACCCCG CTGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCTCACTGATGGTCTGGGGGTGATGGGCGATT ACTGGGGCAGGGCACACTGGTCACAGTCTCGAGT
20293 VL	37	GAGATTGTGCTGACCAGTCTCCCGCCACCTGTCTCTGAGTCCCTGGCGAGAGGCC ACCTGAGCTGCAGAGCCTCTCAGTCCGTGTCCAGCTATCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCCCGGCCAGGCTCCCGGCTGCTGATCTACGATGCCTCCAATAGAGCCACCGGC ATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTTACCCTGACCATCTCC AGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGCGGTCCGACTGGCCT CCTACATTTGGCCAAGGCACCAAGGTGGAATCAAG
15105 VH	46	CAGGTCACCTTGAAGGAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAGGCCCTCGGAGACCTGTCC CTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC CAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATAGGGGAAATCAATCATAGTGAAGCACC AACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACGCACCAAGAAA CAATCTCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGATATTGGGAGCTCCCTGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCG AGT
15105 VL	47	GACATCCAGTTGACCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAGCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGG GTCCCATCAAGGTTTACGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCT CCGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAG
15107 VH	56	CAGATGCAGCTGGTGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCC CTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC CAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGAAGCACC AACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTTGACACGTCCAAGCAC CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGATGGTGGGAGCTTCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCG

		AGT
15107 VL	57	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGG GTCCCATCAAGGTTGACGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCG TGGACGTTGCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAG
15109 VH	66	CAGATGCAGCTGGTGAATGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCC CTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC CAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAAATCAATCATAGTGGAGCACC AACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAAC CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGGTTTTACTATGCTCCGAACCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACC GTCTCGAGT
15109 VL	67	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAG AAACCAGGGACAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGCTAGTTTAGAAAGTGGG GTCCCATCAAGGTTGACGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
15174 VH	76	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCC CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAATTACTACTGGGGCTGG ATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTGGG AACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCC AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGACACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGACAGACAGTGGCTGGCCCCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCGAGT
15174 VL	77	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCTAAGGTCTGATCTATAAGGCGCTAGTTTAGAAAGTGGG GTCCCATCAAGGTTGACGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCA TTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAG
15175 VH	86	CAGGTCCAGCTGGTGAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG GTCTCCTGCAAGGCTGTGGATACACCTTAACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGA CAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCTAACAGTGGTGGC TCAAACAATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATC AGCACAGCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTAC TGTGCGAGAGAGGGTCCCCTGTATAGCAGTGGCTGGTACGAGGGTCTTTTGATATC TGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT
15175 VL	87	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGTTGGTTGGCCTGGTATCAGCAG

		AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAAGTGGG GTCCCATCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCT CCGGGGCTCAGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAG
15260 VH	96	CAGATGCAGCTACAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCA CTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTTGGAACTGG ATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCC AAGTGGTATTCTGCTTTTGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGAC ACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCAAGAGAGGGTAGCAGTGGCTGGTACGGATACGTCCACCCTGG GGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT
15260 VL	97	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGTATCTCTGGGAGAAAAGTGC ACCATCGAATGTCGAGCAAGTGAGGACATTTACAATGGTTTAGCATGGTATCAGCAG AAGCCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAAATAGCTTGCATACTGGG GTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACACAGTATTCTCTCAAGATAAAC AGCCTGCAATCTGAAGATGTCGCAAGTATTCTGTCAACAGTATTACGATTATCCT CCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
15284 VH	106	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCC CTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCTTCAGCAGTAGTAGTACTACTGGGGCTGG ATCCGCCAGCCCCCTGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGATCTTCTATTATAGTGGG ACCACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGCACACACGTCC AAGAGCCAGTTCTCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCCCGCAGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGAGGGGGAGAATATTTTGACCGGTTACTCCCCTTTGACTACTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
15284 VL	107	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCATCCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAA AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGAAAAGTGGG GTCCCATCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATAGTTACCCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
15299 VH	116	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTGGTGGTAGTGGTGGTAGC ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCGAAG AACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC TGTGTGAAAGATGGGCAGGAGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC GTCTCGAGT
15299 VL	117	GATATTGTGATGACGCAGTCTTCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTATAAATCATTTAGGCTGGTATCAGCAT AAACCAGGGAAAGCCCCTAATCGCCTAATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAGTGGG GTCCCATCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACGGCATAATAGTTACCCT

		CCGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAG
15353 VH	126	CAGGTGCAGCTACAGCAGTCTGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCCTGTCC CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAACAGTGGTGGTCACTACTGGAGCTGG ATCCGCCAGCACCCAGGGAGGGCCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGG AGCATCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGACTTACCATATCAGTAGACACGTCT AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGGGACACGGCCGTGTAT TACTGTGCGAGTTATTACTATGCCAGTAGTGGTGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAA GGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT
15353 VL	127	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAGGCC ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGC ATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTAGCAACTGGCCT CCGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
15354 VH	136	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAATTATGCCATGAGCTGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTCTGGTGGTAGC ACATTTCTTCGACAGTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAG AGCACGCTGTATCTGCAAACGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC TGTGCGAAAGGGGGCCCGTTGTATAACTGGAACGACGGTGTGGTGTGATATCTGG GGCCAAGGGACACGGTCAAGTCTCGAGT
15354 VL	137	GAAATTTGTGTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAAGGCC ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGT ATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGTATGATAACTGGCCT CCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
17244 VH	146	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTACTACATGACCTGGATCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTATACATTAAGTGGTGGTGGTGGTCC ATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAG AACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTTT TGTGCGAGAGGGAAGTGGGGATCGGGGCTCTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG GTCACGGTCTCGAGT
17244 VL	147	GAAATTTGTGTGACGCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGTCCGGCAGTCAAGGCAATTAACAATATTTAGCCTGGTTTCAGCAG AAACCAGGGAGAGCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGAAGTGGG GTCCCATCGAAGTTCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCT CCAACTCTCGGCCCTGGGACCAACGTGGATATCAAA
17245 VH	156	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGTCCGC
		CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTGGTGGTAGTGGTGGTAGC GCATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAG AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC TGTGTGAAAGATGGGGCAGGAGGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACC GTCTCGAGT
17245 VL	157	GACATCCAGTTGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGGCCGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATCATTTAGCCTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAGCCCTAAGCGCCTAATCTATGCTGCATCCAGTTTGAAGTGGG GTCCCATCAAGTTCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCT CCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAG

В табл. 10 представлены выведенные белковые последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей антител против ТИМ-3, используемых для категоризации эпитопов. CDR представлены полужирным и курсивным начертанием.

Белковые последовательности переменных доменов  
категоризационных антител против Т1М-3

Ab	SEQ ID NO:	Последовательность (от N-конца к C-концу)
20131 VH	28	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS <b>GFTLSSY</b> AMSWVRQAPGKGLEWVSG <b>ISGSGGS</b> <b>T</b> YNADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNLSRAEDTAVYY <b>CAKIFGSIYFDY</b> WGQGLV TVSS
20131 VL	29	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS <b>QSVLYSSNNKNY</b> LAWYQQKPGQPPKLLIY <b>WT</b> <b>S</b> TRESGVENRFRSGSGSDFTLTITSSLQAEDVAVYY <b>CQQYSGPPTF</b> GQGTKVEIK
20293 VH	38	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTV <b>SGSISGGY</b> WSWIRQHPGKLEWIGY <b>IYYSG</b> <b>S</b> TIYNP SLKSRVTISVDTSKNQFYLKLSVTAADTAVYY <b>CASLMVWGMGDY</b> WGQGLV LTVSS
20293 VL	39	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVSSY</b> LAWYQQKPGQAPRLLIY <b>DAS</b> NRATG IPARFSGSGSDFTLTITSSLEPEDFAVYY <b>CQQRSDWPPTF</b> GQGTKVEIK
15105 VH	48	QVTLKEWGAGLLRPSETLSLTCVY <b>GGFSGY</b> WSWIRQPPGKLEWIGE <b>INHSGST</b> NYNP SLKSRVTISVDATKKQFSLKLT SVTAADTAVYY <b>CARYWELPDY</b> WGQGLVTVS S
15105 VL	49	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <b>QGIRND</b> LGWYQQKPGKAPKRLIY <b>AAS</b> SLQSG VPSRFRSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYY <b>CLQHNSYPPTF</b> GQGTKVEIK
15107 VH	58	QMQLVQWGAGLLKPSSETLSLTCVY <b>GGFSGY</b> WSWIRQPPGKLEWIGE <b>INHSGST</b> NYNP SLKSRVTMSVDTSKHQFSLKLSVTAADTAVYY <b>CARWELPDY</b> WGQGLVTVS S
15107 VL	59	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <b>QGIRND</b> LGWYQQKPGKAPKRLIY <b>AAS</b> SLQSG VPSRFRSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYY <b>CLQHNSYPPTF</b> GQGTKVEIK
15109 VH	68	QMQLVQWGAGLLKPSSETLSLTCVY <b>GGFSGY</b> WSWIRQPPGKLEWIGE <b>INHSGST</b> NYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY <b>CARFYAPNFDY</b> WGQGLVTVS

		VSS
15109 VL	69	EIVLTQSPSTLSASVGDRTITCRAS <b>QSISSW</b> LAWYQQKPGTAPKLLIY <b>KASS</b> LESG VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <b>CQYNSYSFTF</b> GGGKVEIK
15174 VH	78	QVQLQQSGPGLVKPSETLSLTCTVS <b>GGSISSN</b> YWGWIRQPPGKLEWIGS <b>IYYSG</b> <b>NTYYN</b> PSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY <b>CARQTVAGPLFDYWG</b> QGT LTVVSS
15174 VL	79	EIVMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS <b>QSISSW</b> LAWYQQKPGKAPKLLIY <b>KASS</b> LESG VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <b>CQYNSYSFTF</b> GGGKVEIK
15175 VH	88	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAG <b>YTLTGYY</b> MHWVRQAPGQGLEWMGR <b>INPN</b> SGG <b>SNNAQ</b> KFKGRVMTTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYY <b>CAREGPLYSSGWYEGAFDI</b> <b>WGQ</b> GMVTVSS
15175 VL	89	EIVMTQSPSTLSASVGDRTITCRAS <b>QSISSW</b> LAWYQQKPGKAPKLLIY <b>KASS</b> LESG VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <b>CQYNSYSPGLTF</b> GGGKVEIK
15260 VH	98	QMQLQQSGPGLVKPQTLTCAIS <b>GDSVSSNSA</b> AWNWRQSPSRGLEWLGRT <b>YYRS</b> <b>KWYSA</b> FAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYY <b>CAREGSSGWYGYVHHW</b> GQGLTVTVSS
15260 VL	99	EIVLTQSPASLSVSLGETVTIECRAS <b>EDIYNG</b> LAWYQQKPGKSPQLLIY <b>NANS</b> LHTG VPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQEDVASVY <b>CFQYYDYPPFTF</b> GQGTVEIK
15284 VH	108	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVS <b>GGSFSSSY</b> WGWIRQPPGKLEWIGI <b>FYYSG</b> <b>TTYYN</b> PSLKSRTVISAHTSKSQFSLKLSVTAADTAVYY <b>CARGEYFDRLLPFDYWG</b> QGLTVTVSS
15284 VL	109	EIVMTQSPSFLSASVGDRTITCRAS <b>QGISSY</b> LAWYQQKPGKAPKLLIY <b>AAS</b> TLESG VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <b>CQQLNSYPTF</b> GGGKVEIK
15299 VH	118	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS <b>GFTFSSYA</b> MSWVRQAPGKLEWVSA <b>IGSGGS</b> <b>TYYAD</b> SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYY <b>CVKDGAGGF</b> DYWGQGLTVT VSS
15299 VL	119	DIVMTQSSSLSASVGDRTITCRAS <b>QGINHL</b> GWYQHKPGKAPNRLIY <b>AAS</b> SLQSG VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLRHNS <b>YPTF</b> GQGTVEIK
15353 VH	128	QVQLQQSGPGLVKPQTLTCTVS <b>GGINSGGH</b> YWSWIRQHPGRGLEWIGY <b>IYYSG</b> <b>SIYYN</b> PSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY <b>CASYYYASSGDAFDI</b> WGQ GTMVTVSS
15353 VL	129	ETTLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVSSY</b> LAWYQQKPGQAPRLIY <b>DAS</b> NRATG IPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYY <b>CQQRSNWPPTF</b> GQGTVEIK
15354 VH	138	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTAS <b>GFTFSNYA</b> MSWVRQAPGKLEWVSA <b>ISGRGGS</b> <b>TFFAD</b> SVKGRFTISRDNKSTLYLQTNLSRAEDTAVYY <b>CAKGGPLYNWN</b> DGDGFDIW GQGTTVTVSS
15354 VL	139	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRAS <b>QSVSSN</b> LAWYQQKPGQAPRLIY <b>GAS</b> TRATG IPARFSGTSGTEFTLTISLQSEDFALYY <b>CQYDNWPPTF</b> GQGTVEIK
17244 VH	148	QVQLQESGGGLVKPQGGSLRLSCTAS <b>GFTFSDYY</b> MTWIRQAPGKLEWIS <b>ISYISGGGGS</b> <b>IYYAD</b> SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYF <b>CARGNWSAALDI</b> WGQGT MVTVSS
17244 VL	149	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <b>QGINNY</b> LAWFQQKPGRAPKSLIY <b>AAS</b> SLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY <b>CQYNSYPTL</b> GGGKVEIK
17245 VH	158	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS <b>GFTFSSYA</b> MSWVRQAPGKLEWVSA <b>IGSGGS</b> <b>AYYAD</b> SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYY <b>CVKDGAGGF</b> DYWGQGLTVT VSS
17245 VL	159	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <b>QGIRNHL</b> GWYQQKPGKAPKRLIY <b>AAS</b> SLQSG VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <b>CLQHNSYPTF</b> GQGTVEIK

В табл. 11 представлены CDR категоризационных антител против TIM-3. SEQ ID NO: для CDR представлены под каждой последовательностью. Последовательности CDR в настоящем описании определяли в соответствии с определениями IMGT® для CDR1 и CDR2. Для CDR3 тяжелой и легкой цепей определения в настоящем описании включают один дополнительный аминокислотный остаток выше по направлению считывания от IMGT-CDR3 (Cys) и один дополнительный аминокислотный остаток ниже по направлению считывания (Trp для CDR3 VH, Phe для CDR3 VL).

Таблица 11

## Белковые последовательности CDR категоризационных антител против TIM-3

Антител o	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR 2	LCDR3
20131	GFTLSSYA	ISGSGGST	CAKIFGSYYFDYW	QSVLYSSNN KNY	WTS	CQQYYSGPPT F
	30	31	32	33	34	35
20293	GGSISSGG YY	IYYSGSI	CASLMVWGMGDYW	QSVSSY	DAS	CQQRSDWPPT F
	40	41	42	43	44	45
15105	GGSFSGYY	INHSGST	CARYWELPDYW	QGIRND	AAS	CLQHNSYPPT F
	50	51	52	53	54	55
15107	GGSFSGYY	INHSGST	CARWELPDYW	QGIRND	AAS	CLQHNSYPWT F
	60	61	62	63	64	65
15109	GGSFSGYY	INHSGST	CARFYAPNF'DYW	QSISSW	KAS	CQQYNSYSTF
	70	71	72	73	74	75
15174	GGSISSN YY	IYYSGNT	CARQTVAGPLFDYW	QSISSW	KAS	CQQYNSYSFT F
	80	81	82	83	84	85
15175	GYTLTGYY	INPNSGGS	CAREGPLYSSGWYEGA FDIW	QSISSW	KAS	CQQYNSYSPG LTF
	90	91	92	93	94	95
15260	GDSVSSNS AA	TYYSKWS	CAREGSSGWYGVVHHW	EDIYNG	NAN	CQQYYDYPPT F
	100	101	102	103	104	105
15284	GGSFSSSS YY	FYYSGTT	CARGGEYFDRLLPFDY W	QGISSY	AAS	CQQLNSYPPT F
	110	111	112	113	114	115
15299	GFTFSSYA	IGGSGGST	CVKDGAGGFDYW	QGIINH	AAS	CLRHNSYPPT F
	120	121	122	123	124	125
15353	GGSINSGG HY	IYYSGSI	CASYYYASSGDAFDIW	QSVSSY	DAS	CQQRSDWPPT F
	130	131	132	133	134	135
15354	GFTFSNYA	ISGRGGST	CAKGGPLYNWNDGDF DIW	QSVSSN	GAS	CQQYDNWFPW TF
	140	141	142	143	144	145
17244	GFTFSDYY	ISGGGSI	CARGNWGSAAALDIW	QGINNY	AAS	CQQYNSYPPT L
	150	151	152	153	154	155
17245	GFTFSSYA	IGGSGGSA	CVKDGAGGFDYW	QGIRNH	AAS	CLQHNSYPPT F
	160	161	162	163	164	165

В табл. 12 представлены ДНК последовательности, кодирующие вариабельные домены тяжелых и легких цепей дополнительных антител против TIM-3, которые идентифицировали в качестве функциональных антител. Последовательности для функциональных антител 20131 и 20293 представлены выше в табл. 9.

**ДНК последовательности переменных доменов  
дополнительных функциональных антител против ТИМ-3**

Ab	SEQ ID NO:	Последовательность (от 5' к 3')
1932 4 VH	166	CAGATGCAGCTACAGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CTAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAATACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGATAGTG GGAGTACCCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACGGTCTCGAGT
1932 4 VL	167	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTATATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGG GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATATAGTGGT CCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAG
1941 6 VH	176	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAACAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGC CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCATCTAC TACAACCCGTCCTCAGGAGTCGACTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGACTCCT TATTACTATGGTTCGGGGAGTTATGGGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACTGTC TCGAGT
1941 6 VL	177	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGGCCACC CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAAACAATACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCTAGCAACTGGCCCATCACCTTCGGCCAA GGGACACGACTGGAGATTAAG
1956 8 VH	186	CAGATGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCTCAGACCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTGTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGTGGTACTACTGGAAGTGGATCCGC CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTTCATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCATCTAC TACAATCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCCGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCCTATATTACTGTGCGAGCGTC GGTATAGTGGGAGCCTCCTACTTTGAGTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACAGTCTCG AGT
1956 8 VL	187	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACC CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCTAGCAACTGGCCTATCACCTTCGGCCAA GGGACACGACTGGAGATCAAG
2018 5 VH	196	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCGGCCTGGGGGTCCCTGAGACTC TCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATAAAC GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT CTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATTTT GGGTCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT
2018 5 VL	197	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTATATACAGCTCCAATAATAAGAACTACTTAGCT TGGTACCAGCAGAAATCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGG GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATATAGTGGT CCACCGAGCTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAA
2030	206	CAGGTCCAGCTACAGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCATCCTGGGGGTCCCTAAGACTC

0 VH		TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCCGTTGACACCTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGCGGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACCTCAAGAACACGCTGTAT CTGCAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCCAAGATAGTG GGAGTTACCCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACGGTCTCGAGT
2036 0 VL	207	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGGTCCAACAATAAGAACTATTTAGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGG GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTGGT CCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAG
2036 2 VH	216	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTCATTACTGGAGCTGGATCCGC CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTCTTACAGTGGGAGCACCTAC TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGACTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGACCCGG TATTACGATATTTGACTGGTTACCCTTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACG GTCTCGAGT
2036 2 VL	217	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGGCCACC CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCGACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACGACGCTAGCAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAA GGGACACGACTGGAGATCAAG
2062 1 VH	226	CAGGTGCAGCTACAGCAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGC CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTCTTATAGTGGGAGTATCTAC TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCACGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGACCCGG TATTACGATCTTTGACTGGTTACCCTTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAAG GTCTCGAGT
2062 1 VL	227	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACGACGCTAGCAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAA GGGACACGACTGGAGATTAAG

В табл. 13 представлены выведенные белковые последовательности переменных доменов тяжелых и легких цепей дополнительных антител против ТИМ-3, которые идентифицировали как функциональные антитела. CDR представлены полужирным и курсивным начертанием. Последовательности функциональных антител 20131 и 20293 представлены выше в табл. 10.

**Белковые последовательности переменных доменов  
дополнительных функциональных антител против TIM-3**

Ab	SEQ ID NO:	Последовательность (от N-конца к C-концу)
19324 VH	168	QMQLQQSGGLVQPGGSLRLSCAAS <b>GFTVSSY</b> AMSWVRQALGKGLEWVSG <b>ISGSGGST</b> YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVY <b>CAKIVGATHFDYWG</b> QGTLVTVSS
19324 VL	169	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS <b>QSVLYSSNNKNY</b> LAWYQQKPGQPPKLLIY <b>WAS</b> TRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVVY <b>CQQYSGPITFG</b> QGTRELEIK
19416 VH	178	QVQLVESGPGLVKPSQTLSTCTVS <b>GGSSINSGGY</b> WSWIRQHPGKGLEWIGY <b>IYSGS</b> <b>IYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVVYCATPYYYGSGSYGDYWG</b> QGT LVTVSS
19416 VL	179	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVNNY</b> LAWYQQKPGQAPRLLIY <b>DASN</b> RATGI PARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVVY <b>CQQRSNWPIITFG</b> QGTRELEIK
19568 VH	188	QMQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS <b>GGSSISVGY</b> WNWIRQHPGKGLEFIGY <b>IYSGS</b> <b>IYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTALYCASVGI</b> VGAS <b>YFEYWG</b> QGT LVTVSS
19568 VL	189	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVSSY</b> LAWYQQKPGQAPRLLIY <b>DASN</b> RATGI PARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVVY <b>CQQRSNWPIITFG</b> QGTRELEIK
20185 VH	198	QVQLVESGGLVVRPGGSLRLSCAVS <b>GFTFSSY</b> AMSWVRQAPGKGLEWVSG <b>ISGSGGST</b> YNADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVY <b>CAKIFGSYFDYWG</b> QGTLVTVSS
20185 VL	199	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS <b>QSVLYSSNNKNY</b> LAWYQQKSGQPPKLLIY <b>WAS</b> TRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVVY <b>CQQYSGPPTFG</b> QGTKEIK
20300 VH	208	QVQLQQSGGLVHPGGSLRLSCAAS <b>GFTVDTY</b> AMTWVRQAPGKGLEWVSG <b>ISGSGGST</b> YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVVY <b>CAKIVGVTHFDYWG</b> QGTLVTVSS
20300 VL	209	EIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS <b>QSVLYRSNNKNY</b> LAWYQQKPGQPPKLLIY <b>WAS</b> TRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVVY <b>CQQYSGPITFG</b> QGTRELEIK
20362 VH	218	QVTLKESGPGLVKPSQTLSTCTVS <b>GGSSISGGHY</b> WSWIRQHPGKGLEWIGY <b>ISYSGS</b> <b>TYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVVYCATAYYDILTGYPFDYWG</b> QGT TLVTVSS
20362 VL	219	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVSSY</b> LAWYQQKPGQAPRLLIY <b>DASN</b> RATGI PARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVVY <b>CQQRSNWPIITFG</b> QGTRELEIK
20621 VH	228	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCTVS <b>GGSSISGGY</b> WSWIRQHPGKGLEWIGY <b>ISYSGS</b> <b>IYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSVTATDTAVVYCATAYYDLLTGYPFDYWG</b> QGT TLVTVSS
20621 _VL	229	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVSSY</b> LAWYQQKPGQAPRLLIY <b>DASN</b> RATGI PARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVVY <b>CQQRSNWPIITFG</b> QGTRELEIK

В табл. 14 представлены CDR дополнительных функциональных антител против TIM-3. SEQ ID NO: для CDR представлены под каждой последовательностью. Последовательности CDR в настоящем описании определяли в соответствии с определениями IMGT® для CDR1 и CDR2. Для CDR3 тяжелой и легкой цепей определения в настоящем описании включают один дополнительный аминокислотный остаток выше по направлению считывания от IMGT-CDR3 (Cys) и один дополнительный аминокислотный остаток ниже по направлению считывания (Trp для CDR3 VH, Phe для CDR3 VL). Последовательности функциональных антител 20131 и 20293 представлены выше в табл. 11.

Белковые последовательности CDR дополнительных функциональных антител против TIM-3

Ab	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1932 4	GFTVSSYA	ISGSGGST	CAKIVGATHFDYW	QSVLYSSNN KNY	WAS	CQQYYSGPI TF
	170	171	172	173	174	175
1941 6	GGSIINSGGY Y	IYYSGSI	CATPYYYGSGSYG DYW	QSVNNY	DAS	CQQRSNWPI TF
	180	181	182	183	184	185
1956 8	GGSISSVGY Y	IYYSGSI	CASVGIVGASYFE YW	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPI TF
	190	191	192	193	194	195
2018 5	GFTFSSYA	ISGSGGST	CAKIFGSYYFDYW	QSVLYSSNN KNY	WAS	CQQYYSGPP TF
	200	201	202	203	204	205
2030 0	GFTVDTYA	ISGSGGST	CAKIVGVTHFDYW	QSVLYRSNN KNY	WAS	CQQYYSGPI TF
	210	211	212	213	214	215
2036 2	GGSISSGGH Y	ISYSGST	CATAYDILTGYP FDYW	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPI TF
	220	221	222	223	224	225
2062 1	GGSISSGGY Y	ISYSGSI	CATAYDILLTGYP FDYW	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPI TF
	230	231	232	233	234	235

Пример 2. Кинетический анализ связывания антител 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144.

Этот пример демонстрирует, что аффинность связывания антител 15086.15086 (IgG1), 15086.16837 (IgG1 LALA), 15086.17145 (IgG2) и 15086.17144 (IgG4 (S228P)) демонстрировала очень схожие аффинности связывания со значениями  $K_D$  приблизительно 19-23 нМ. "IgG1 LALA" относится к присутствию мутаций "LALA" в тяжелой цепи (L234A/L235A, нумерация в соответствии со схемой нумерации Eu (Edelman et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63:78-85 (1969)), которые, как известно, снижают эффекторную функцию Fc-области антител IgG1 (Armour et al., Eur. J. Immunol. 29(8):2613-24 (1999); Hezareh et al., J. Virol. 75(24):12161-68 (2001) и Hessel et al., Nature, 449 7158):101-104 (2007)).

Материалы и способы.

Кинетический анализ связывания осуществляли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US) в комбинации с прибором Ibis MX96 SPR (IBIS Technologies, The Netherlands). Анализ визуализации поверхностного плазмонного резонанса осуществляли на SPR датчиках G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, The Netherlands). Антитела против TIM-3 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144 разводили до 0,15 мкг/мл в PBS-T (1× PBS с 0,05% Tween 20, pH 7,4). Антитела наносили на G-a-hu-IgG Fc SensEye® в течение 15 мин с использованием Continuous Flow Microspotter. После нанесения SensEye® располагали в биологическом датчике IBIS MX96 и осуществляли кинетический анализ посредством применения так называемой кинетической титровальной серии (Karlsson et al., Anal Biochem. 349(1):136-47 (2006)), где мономерный антиген ECD TIM-3 человека (Acro Biosystems) впрыскивали в увеличивающихся концентрациях от 2 до 100 нМ без применения стадий регенерации поверхности после каждого впрыска антигена. Ассоциацию антигена осуществляли в течение 5 мин, а диссоциацию антигена осуществляли в течение 45 мин. Зарегистрированные ответы связывания аппроксимировали к простой модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2 для вычисления констант скорости ассоциации ( $k_{on}$  или  $k_a$ ), скорости диссоциации ( $k_{off}$  или  $K_D$ ) и аффинности ( $K_D$ ).

Результаты.

Кинетические измерения, которые выполняли в системе IBIS, демонстрировали, что антитела 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144 в четырех различных изотипических форматах, все имели очень схожую кинетику связывания со значениями  $K_D$  в диапазоне 19-23 нМ (табл. 15).

Таблица 15

Кинетика связывания антител 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144 с ECD TIM-3 человека, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Формат/Подкласс	kon (M-1 s-1)	kon Error	k <sub>off</sub> (s-1)	k <sub>off</sub> Error	K <sub>D</sub> (нМ)	K <sub>D</sub> Error			
15086.15086	5,06E+05	±	6.E+02	1,17E-02	±	8.E-06	23	±	3,0E-11
15086.16837	5,83E+05	±	4.E+02	1,11E-02	±	4.E-06	19	±	1,0E-11
15086.17145	5,56E+05	±	4.E+02	1,03E-02	±	4.E-06	19	±	1,0E-11
15086.17144	4,96E+05	±	3.E+02	9,85E-03	±	4.E-06	20	±	2,0E-11

Пример 3. Функциональная оценка антитела против TIM-3 *in vitro*.

Панель уникальных mAb подкласса IgG1 клонировали, как описано выше (пример 1), и осуществляли их скрининг по функциональной активности в одной концентрации (25 мкг/мл) в однонаправленном анализе реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR). Наиболее функциональное антитело против TIM-3 (15086.15086) переформатировали в подклассы IgG1 LALA (15086.16837), IgG2 (15086.17145) и IgG4 (15086.17144).

Этот пример демонстрирует функциональную активность *in vitro* для антител против TIM-3 различных подклассов IgG посредством индукции дозозависимой секреции цитокинов в однонаправленном MLR анализе.

Материалы и способы.

В однонаправленном MLR анализе дендритные клетки (DC) и CD4-положительные (CD4<sup>+</sup>) Т-клетки, выделенные у двух различных здоровых доноров, совместно культивируют, чтобы индуцировать реакцию на конкретный аллоантиген, что ведет к продуцированию цитокинов и активации/пролиферации Т-клеток. Дендритные клетки дифференцировали из CD14<sup>+</sup> моноцитов посредством 6 суток культивирования с 20 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и 20 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4) и смешивали в соотношении 1:10 с CD4<sup>+</sup> Т-клетками, выделенными из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из материала здорового донора. После 5 суток культивирования собирали супернатанты и определяли уровни IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  с использованием анализа электрохемилюминесценции цитокинов Meso Scale. В этом анализе используют электрохемилюминесцентные метки (SULFO-TAG), которые конъюгированы с идентифицирующими антителами. Когда на пластинчатые электроды подают ток, метка SULFO-TAG испускает свет, и интенсивность света измеряют для того, чтобы количественно определять цитокины в образцах.

Результаты.

Кривые доза-эффект в однонаправленном MLR анализе для антител 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144 представлены на фиг. 1 и 2. Кривые доза-эффект создавали посредством двукратного титрования антител при начальной концентрации 50 мкг/мл. Каждая точка на графике представляет усредненное для трех повторений, причем величина ошибки представляет SEM.

Антитела 15086.15086 и 15086.17145 (варианты IgG1 и IgG2) демонстрировали схожую функциональность и индуцировали дозозависимое увеличение в IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в однонаправленном MLR анализе. Антитело 15086.17144 (вариант IgG4) индуцировало ответ только в двух наивысших концентрациях, тогда как у антитела 15086.16837 (IgG1 LALA вариант) функциональность не наблюдали.

Пример 4. Эффект антитела против TIM-3, оказываемый на очищенные субпопуляции клеток.

Сначала сообщали, что продуцирующие IFN- $\gamma$  CD4<sup>+</sup> Т-хелперные клетки и CD8<sup>+</sup> (CD8-положительные) Т-цитотоксические клетки избирательно экспрессируют TIM-3, для которого продемонстрировано, что он является негативным регулятором Т-клеточного ответа. Впоследствии обнаружена высокая эндогенная экспрессия TIM-3 в дендритных клетках, моноцитах и естественных киллерных (NK) клетках (Freeman et al., Immunol. Rev. 235:172-89 (2010); Kuchroo et al., Nat. Rev. Immunol. 8:577-580 (2008); Anderson et al., Science, 318:1141-1143 (2007) и Da Silva et al., Cancer Immunol. Res. 2:410-422 (2014)). Этот пример показывает, как связывание TIM-3 антителами против TIM-3 оказывает прямой эффект на дендритные клетки, что ведет к увеличению секреции TNF- $\alpha$ .

Материалы и способы.

PBMC, наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и наивные CD8<sup>+</sup> клетки выделяли из материала здорового донора. Дендритные клетки от трех здоровых индивидуумов-доноров получали, как описано ранее в примере 3. Субпопуляции выделенных клеток инкубировали в течение 5 суток с 10 мкг/мл указанных антител и определяли уровни TNF- $\alpha$  с использованием анализа электрохемилюминесценции цитокинов Meso Scale.

### Результаты.

Прямой эффект антител 15086.15086, 15086.16837, 15086.17145 и 15086.17144, оказываемый на субпопуляции очищенных клеток, представлен на фиг. 3, где каждый столбик представляет усредненное для пяти повторений, и величина ошибки представляет SEM. Результаты демонстрируют, что присутствие IgG1 (15086.15086) или IgG2 (15086.17145) варианта антитела против TIM-3 вело к увеличению секреции TNF- $\alpha$  дендритными клетками ото всех трех доноров. Схожий эффект наблюдали в популяции PBMC, содержащей несколько субпопуляций клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, моноциты и NK-клетки). IgG1 LALA (15086.16837) и IgG4 (1508 6.17144) варианты оказывали только минимальный эффект на секрецию TNF- $\alpha$ . Ни одно из протестированных антител не оказывало эффекта на наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки или наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

Пример 5. Проточный цитометрический анализ антител против TIM-3 на блокирующую фосфатидилсерин активность.

Этот пример иллюстрирует, как антитело против TIM-3 по изобретению [15086.17145] тестировали на блокирующую фосфатидилсерин (PtdS) активность посредством выполнения проточного цитометрического конкурентного анализа с использованием апоптотных клеток с поверхностью, положительной по фосфатидилсерину, и меченого флуорохромом растворимого TIM-3.

### Материалы и способы.

Блокирующую фосфатидилсерин активность изучали в клеточном анализе, в котором Т-клетки Jurkat индуцировали проходить апоптоз посредством обработки ставроспорином (из Streptomyces sp., Sigma-Aldrich, USA). Во время апоптоза происходит транслокация PtdS с цитоплазматической стороны плазматической мембраны на клеточную поверхность, что делает возможным связывание R-PE-меченого химерного белка TIM-3 человека-Fc, подлежащего анализу посредством проточной цитометрии. Коммерчески доступный рекомбинантный химерный белок TIM-3-Fc (R&D Systems, USA) конъюгировали с R-PE с использованием Lightning-Link® R-Phycoerythrin Conjugation Kit (Innova Biosciences, UK). Для каждой концентрации антитела, подлежащей тестированию, 25 мкл разведения TIM-3-PE (соответствует приблизительно 0,33 мкг TIM-3-Fc) смешивали с 25 мкл антитела (начиная с конечных 20 мкг/мл) в буфере для связывания Annexin V (BD Pharmingen™, USA) и инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 20 мин перед добавлением к клеткам. Т-клетки Jurkat культивировали в присутствии 1 мкМ ставроспорина в течение 2 ч, промывали один раз в RT буфере для связывания и для каждого теста 2×10<sup>5</sup> клеток в 50 мкл буфера для связывания комбинировали со смесью антитела/TIM-3-PE. После 15 мин инкубации при RT добавляли 100 мкл буфера для связывания, клетки осаждали посредством центрифугирования и пеллеты ресуспендировали в 100 мкл буфера для связывания для регистрации. Связывание TIM-3-PE с апоптотными клетками количественно определяли посредством проточной цитометрии с обнаружением флуоресценции PE (MFI). Параллельно экспозицию PtdS на поверхностях клеток, обработанных ставроспорином, подтверждали посредством окрашивания Annexin V-PE (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen™).

### Антитело против PD-1.

Keytruda® (пембролизумаб; Merck & Co., Inc.) использовали в качестве отрицательного контроля для связывания TIM-3/блокирования PtdS и эталонное антитело против TIM-3 АВТИМ3 [18571.18571] (WO 2015/117002 A1; Novartis AG) использовали в качестве положительного контроля для связывания TIM-3/блокирования PtdS. Кроме того, другое антитело против TIM-3 [15338.15338], которое ранее идентифицировали как не блокирующее антитело, также использовали в качестве отрицательного контроля для блокирования PtdS.

### Результаты.

Результаты конкурентного эксперимента представлены на фиг. 4. Антитело против TIM-3 [15086.17145] способно ингибировать взаимодействие растворимого TIM-3-Fc с PtdS, представленным на клетках, в зависимости от дозы (фиг. 4А). При 3,125 мкг/мл оно блокирует связывание TIM-3-Fc с PtdS-положительными клетками до 2% связывания, обнаруживаемого в присутствии не блокирующего антитела против TIM-3 [15338.15338] (фиг. 4В). Эталонное антитело против TIM-3 [18571.18571] способно блокировать связывание до 3,2% при той же концентрации (фиг. 4С). Результаты для отрицательного контрольного антитела против PD-1 Keytruda® представлены на фиг. 4D.

### Пример 6. Клонирование аналогов эталонного антитела против TIM-3.

Эталонные аналоги антител против TIM-3 АВТИМ3 и mAb15 используют в нескольких примерах в настоящем описании. Эталонные аналоги создавали, как описано ниже.

Аминокислотные последовательности варибельного домена тяжелой и легкой цепей из АВТИМ3 и mAb15 получали из патентных заявок, приведенных далее в табл. 16. Аминокислотные последовательности фрагментов варибельной тяжелой цепи (VH) и варибельной легкой цепи (VL) подвергали обратной трансляции в ДНК последовательности с использованием кодонов человека. Соответствующие ДНК фрагменты затем синтезировали и клонировали в экспрессирующие векторы, содержащие константные области тяжелых цепей человека (любого одного из четырех различных изотипических форматов: IgG1, IgG1-LALA, IgG2 или IgG4) или константные области легких цепей к человека, что вело к полноразмер-

ным последовательностям тяжелых и легких цепей антител. Для того чтобы предотвращать обмен плечами Fab в варианте IgG4, остаток серина в положении 228 (нумерация EU) заменяли на пролин (Angal et al., Mol. Immunol. 30:105-108 (1993)). Клетки СНО трансфицировали получаемыми экспрессирующими плазмидами с использованием стандартной системы экспрессии белка. После экспрессии антитела, соответствующие антительные супернатанты очищали с использованием стандартной очистки хроматографией на колонке с белком А.

Таблица 16

Синтезированные из генов аналоги антител и соответствующий формат антитела

Антитело	Название аналога	Справочный патентный документ	Номера последовательностей в справочном патентном документе	Различные получаемые изотипические форматы человека
АВТИМ3	18564 АВТИМ3	WO 2015 117002 (A1)	SEQ ID NO:1 (VH) и 2 (VL)	IgG1, IgG1-LALA, IgG2 и IgG4
18571.18571	Гуманизированное АВТИМ3	WO 2015 117002 (A1)	SEQ ID NO:131 (VH) и 132 (VL)	IgG1, IgG1-LALA, IgG2 и IgG4
mAb15	21563 mAb15	WO 2016 111947 (A2)	SEQ ID NO:12 (VH) и 14 (VL)	IgG1, IgG1-LALA, IgG2 и IgG4

Пример 7. Функциональная оценка *in vitro* для дополнительных антител против ТИМ-3 в однонаправленном MLR анализе.

Этот пример демонстрирует функциональную активность *in vitro* для девяти дополнительных антител против ТИМ-3 посредством индукции дозозависимой секреции IFN- $\gamma$  в однонаправленном анализе реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR).

Материалы и способы.

Однонаправленный MLR анализ проводили, как описано выше в примере 3. Вкратце, дендритные клетки (DC) и CD4<sup>+</sup> T-клетки совместно культивировали в течение 5 суток в присутствии указанных антител. После 5 суток культивирования собирали супернатанты и определяли уровни IFN- $\gamma$  с использованием анализа электрохемилюминесценции IFN- $\gamma$  Meso Scale.

Результаты.

Кривые доза-эффект для девяти дополнительных антител против ТИМ-3 представлены на фиг. 5. Все девять антител индуцировали дозозависимое увеличение уровней IFN- $\gamma$  в этом анализе. Стоит отметить, что эффект не наблюдали у эталонных антител АВТИМ3 и mAb15. Кривые доза-эффект создавали посредством двукратного титрования антител с начальной концентрацией 100 мкг/мл. Каждая точка на графике представляет усредненное для трех повторений, и величина ошибки представляет SEM.

Пример 8. Функциональная оценка *in vitro* для дополнительных антител против ТИМ-3 в двунаправленном MLR анализе.

Этот пример демонстрирует функциональную активность *in vitro* для 10 антител против ТИМ-3 посредством индукции дозозависимой секреции IFN- $\gamma$  в анализе двунаправленной реакции смешанных лимфоцитов (MLR).

Материалы и способы.

В двунаправленном MLR анализе мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух различных здоровых доноров совместно культивировали для того, чтобы индуцировать реакцию на конкретный аллоантиген, ведущую к продуцированию цитокинов и активации/пролиферации T-клеток. PBMC от двух различных доноров смешивали в соотношении 1:1. После 5 суток культивирования собирали супернатанты и определяли уровни IFN- $\gamma$  с использованием анализа электрохемилюминесценции цитокинов Meso Scale.

Результаты.

Кривые доза-эффект для 10 антител против ТИМ-3 представлены на фиг. 6 для одной пары доноров. Все антитела против ТИМ-3 индуцировали дозозависимое увеличение уровней IFN- $\gamma$  в этом анализе. Стоит отметить, что не наблюдали эффект эталонных антител АВТИМ3 и mAb15. Кривые доза-эффект создавали посредством двукратного титрования антител с начальной концентрацией 100 мкг/мл. Каждая точка на графике представляет усредненное для трех повторений, и величина ошибки представляет SEM.

Пример 9. Функциональная оценка *in vitro* для дополнительных антител против ТИМ-3 в анализе дендритных клеток.

Этот пример демонстрирует функциональную активность *in vitro* для девяти антител против ТИМ-3

посредством индукции дозозависимой секреции TNF- $\alpha$  дендритными клетками, полученными из моноцитов.

Материалы и способы.

CD14<sup>+</sup> моноциты выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из материала здорового донора. Дендритные клетки (DC) проходили дифференцировку из CD14<sup>+</sup> моноцитов за 6 суток культивирования с 20 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и 20 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4). Полученные из моноцитов дендритные клетки собирали и культивировали в течение 5 суток в присутствии указанных антител. После 5 суток культивирования собирали супернатанты и определяли уровни TNF- $\alpha$  с использованием анализа электрохемилюминесценции TNF- $\alpha$  Meso Scale.

Результаты.

Кривые доза-эффект для девяти дополнительных антител против TIM-3 представлены на фиг. 7. Все девять антител против TIM-3 индуцировали дозозависимое увеличение уровней TNF- $\alpha$  для полученных из моноцитов дендритных клеток у двух независимых доноров. Следует отметить, что не наблюдали эффект эталонных антител АВТМ3 и mAb15. Кривые доза-эффект создавали посредством двукратного титрования антител с начальной концентрацией 100 мкг/мл. Каждая точка на графике представляет усредненное для трех повторений, и величина ошибки представляет SEM.

Пример 10. Измерение аффинностей антител к TIM-3 человека и яванского макака.

Этот пример демонстрирует аффинности связывания Fab фрагментов против TIM-3 с внеклеточными доменами TIM-3 человека и яванского макака, как измеряют посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Материалы и способы.

Кинетический анализ связывания осуществляли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US) в комбинации с прибором IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, The Netherlands).

Fab фрагменты против TIM-3 создавали из вариантов со скорректированной последовательностью для выбранных антител в формате IgG1 LALA с использованием стандартных наборов для ферментативного расщепления (Genovis, Sweden). Fab фрагменты помечают как Fab [номер антитела]. Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, используемая для Fab 15086, представляет собой скорректированную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. TIM-3 кДНК, кодирующую внеклеточный домен TIM-3 человека и яванского макака, синтезировали и клонировали в вектор, содержащий промотор CMV и последовательность Fc IgG1 человека (AA P101-K330), что вело к C-концевому слиянию Fc IgG1 с клонированным ECD TIM-3. Слитые конструкции TIM-3-Fc создавали посредством стандартных способов ПЦР и инженерии и осуществляли временную экспрессию белка в 2 мл культуре с использованием экспрессирующей системы ExpiCHO™. слитые конструкции TIM-3 человека-Fc собирали после 9 суток и супернатанты тестировали на аффинность связывания с Fab фрагментами против TIM-3 посредством SPR. Антигены очищали с использованием стандартных процедур и захватывали на G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, The Netherlands) в течение 15 мин с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US). После нанесения SensEye® располагали в биологическом датчике IBIS MX96, оставшиеся участки захвата блокировали и захваченные белки фиксировали на поверхности с использованием набора FixIT (Ssens BV, The Netherlands). Кинетический анализ осуществляли посредством применения так называемой кинетической титровальной серии (Karlsson R. 2006), где мономерные Fab фрагменты антител по изобретению впрыскивали в увеличивающихся концентрациях от 1 до 100 нМ без применения стадий регенерации поверхности после каждой инъекции Fab. Ассоциацию Fab осуществляли в течение 15 мин и диссоциацию антигена осуществляли в течение 15 мин. Зарегистрированные ответы связывания аппроксимировали к простой модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2 для вычисления констант скорости ассоциации ( $k_{on}$  или  $k_a$ ), скорости диссоциации ( $k_{off}$  или  $K_D$ ) и аффинности ( $K_D$ ).

Результаты.

Результаты измерения аффинности показывают, что Fab 15086, Fab 20293 и Fab 20131 и два эталонных антитела связывают TIM-3 человека и яванского макака с различными аффинностями. Подробная кинетика связывания представлена в табл. 17.

Таблица 17

Кинетика связывания Fab фрагментов против TIM-3 с ECD TIM-3 человека или яванского макака, как измеряют посредством SPR

Fab фрагмент	TIM-3 ECD	$k_{on}$ ( $M^{-1} c^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $c^{-1}$ )	$K_D$ (нМ)
15086	Человек	2,3E+05	5,0E-03	22
15086	Яванский макак	1,3E+04	2,8E-02	2200
20293	Человек	2,9E+05	3,6E-03	13
20293	Яванский макак	1,7E+06	3,5E-03	21
20131	Человек	7,6E+04	4,1E-04	5,5
20131	Яванский макак	4,8E+06	3,9E-04	22
18564 АВТИМЗ	Человек	2,7E+05	2,1E-04	0,77
18564 АВТИМЗ	Яванский макак	1,5E+05	3,9E-03	25
21563 mAb15	Человек	7,9E+05	6,3E-04	0,80
21563 mAb15	Яванский макак	ND	ND	ND

\*ND: не определяли.

Пример 11. ELISA определение связывания антитела с ECD TIM-3 человека и яванского макака.

Этот пример демонстрирует avidности связывания антител против TIM-3 с ECD TIM-3 человека и яванского макака, как измеряют посредством ELISA.

Материалы и способы.

Связывание антитело-антиген измеряли посредством ELISA с нанесенными слитыми антигенами TIM-3-Fc по 1 мкг/мл. Антигены человека и яванского макака получали из Sino Biologicals. Антитела против TIM-3 инкубировали с нанесенными антигенами в различных концентрациях, начиная со 150 мкг/мл (1000 нМ) в двукратных серийных титрованиях. После промывания связанные антитела обнаруживали с помощью вторичных антител, конъюгированных с HRP (пероксидазой хрена).

Результаты.

ELISA демонстрировал, что все оцениваемые антитела способны связываться ECD TIM-3 и человека и яванского макака. Приведена концентрация антител против TIM-3, дающая полумаксимальное связывание ( $EC_{50}$ ). Все тестируемые антитела связывали TIM-3 человека со значениям  $EC_{50}$  приблизительно 1 нМ или ниже, хотя значительно большую вариацию наблюдали при связывании с TIM-3 яванского макака (табл. 18). Некоторые антитела, такие как 20131, 20185, 20293 и АВТИМЗ, демонстрировали идентичное связывание с TIM-3 и человека и яванского макака. Другие антитела, такие как 19324, 19416, 19568 и 20300, демонстрировали промежуточное связывание с TIM-3 яванского макака, тогда как антитела 20362, 20621 и 15086.17145 демонстрировали слабую перекрестную реактивность в отношении TIM-3 яванского макака (больше чем 100-кратное снижение  $EC_{50}$ ). Кривые связывания для антител, которые демонстрировали наименьшую перекрестную реактивность к TIM-3 яванского макака, ясно демонстрировали насыщенное связывание с антигеном при тестировании в наивысшей концентрации при ELISA оценке.

Таблица 18

Авидности связывания ( $EC_{50}$ ) антител против TIM-3 с TIM-3 человека или яванского макака, как измеряют посредством ELISA

Антитело	$EC_{50}$ (нМ)		Соотношение $EC_{50}$ яванского макака/человек а
	TIM-3 человека	TIM-3 яванского макака	
19324	0,73	18,38	25
19416	0,20	9,42	47
19568	0,38	30,20	79
20131	0,13	0,13	1
20185	0,17	0,15	1
20293	0,31	0,32	1
20300	1,13	45,30	40
20362	0,26	124,80	481
20621	0,22	29,70	135
15086.17145	0,125	17,50	134
18564 АВТИМ3	0,07	0,07	1

Пример 12. Категоризация эпитопов антител против TIM-3.

Этот пример иллюстрирует, как антитела против TIM-3 по изобретению можно группировать по категориям эпитопов на основании паттернов парной конкуренции. Антитела, относящиеся к различным категориям эпитопов, распознают различные эпитопы на внеклеточном домене (ECD) TIM-3.

Материалы и способы.

Исследование парной конкуренции антител осуществляли посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM) (Wasatch Microfluidics, US) в комбинации с прибором IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, The Netherlands). Анализ визуализации поверхностного плазмонного резонанса осуществляли на SPR датчике G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, The Netherlands). Всего 16 антител IgG2 против TIM-3 человека и два эталонных антитела IgG4 (АВТИМ3 и mAb15) разводили до 15 мкг/мл в буфере PBS, содержащем 0,05% Tween 20 (PBS-T), pH 7,0. Антитела захватывали на поверхности датчика против Fc посредством нанесения в течение 15 мин с использованием Continuous Flow Microspotter. После нанесения, SensEye® располагали в биологическом датчике IBIS MX96 и оставшиеся участки против Fc блокировали посредством впрыска 30 мкг/мл неспецифического IgG1 человека. Захваченные антитела конъюгировали с поверхностью, используя набор FixIt (Ssens BV, The Netherlands). После подготовки датчика осуществляли конкурентный анализ антител с использованием классического сэндвич-анализа, в котором иммобилизованные антитела связывали 200 нМ растворимого одновалентного антигена TIM-3 (Acro Biosystems, China), после чего следовало исследование связывания с другим антителом против TIM-3. Затем осуществляли индивидуальные впрыски каждого из 18 антител против TIM-3, разведенных до 15 мкг/мл в буфере PBS-T, чтобы устанавливать паттерны конкуренции антител. После каждого цикла конкуренции поверхность датчика регенерировали с использованием 100 мМ буфера  $H_3PO_4$ , pH 3,0.

Результаты.

Паттерн конкуренции 18 антител против TIM-3 представлен на фиг. 8. Антитела mAb15 (категория 1), 15105 и 15107 (категория 2), 15260 и АВТИМ3 (категория 3), 17244 (категория 7) и 15174 и 15175 (категория 8) не демонстрировали функциональной активности в клеточных MLR анализах, описанных в настоящем документе, но включены, поскольку они распознавали различающиеся эпитопы. Антитела категории 8 тестировали только в растворе, поскольку связывание TIM-3 значительно снижено, когда эти антитела захватывают на поверхности датчика (однаправленное блокирование). Таким образом, эти антитела представлены квадратами. Обнаружено, что функциональные антитела против TIM-3 связывают три перекрестно конкурирующих категории эпитопов (категории 4, 5 и 6). Функциональные антитела, относящиеся к категории эпитопов 4, включали антитела 20621, 20293, 19568, 20362, 15086.17145 и 19416. Эти антитела перекрестно блокировали друг друга и антитела из категорий эпитопов 3, 5, 6 и 7. Функциональные антитела, относящиеся к категории эпитопов 5, включали антитела 20131 и 20185. Эти антитела перекрестно блокировали друг друга и антитела из категорий эпитопов 3, 4, 6 и 7. Дополнительно, 20131 и 20185 также предотвращали связывание mAb15, только когда их захватывали на поверхности датчика (однаправленное блокирование, штриховые линии). Наконец, функциональные антитела, относящиеся к категории эпитопов 6, включали антитела 19324 и 20300. Эти антитела перекрестно блокировали друг друга и все другие антитела, за исключением антител из категории 2.

Из результатов, приведенных выше, можно заключить, что функциональные антитела из категорий эпитопов 4, 5 и 6 связывают эпитопы, которые отличаются от эталонных антител АВТМЗ (категория 3) и mAb15 (категория 1) (фиг. 1), поскольку каждая группа категоризации имеет уникальные паттерны конкуренции по сравнению с другими антителами против ТИМ-3 в панели.

Пример 13. Картирование эпитопов антител против ТИМ-3 посредством мутагенеза ТИМ-3.

Эпитопы антител в целом можно охарактеризовать как линейные эпитопы (также называемые непрерывными эпитопами) или конформационные эпитопы (также называемые прерывистыми эпитопами). Хотя линейные эпитопы определяют на основании одной непрерывной аминокислотной последовательности, конформационные эпитопы могут состоять из многих меньших прерывистых линейных последовательностей или отдельных контактных остатков. Совокупность контактных остатков, которые образуют кластер в области межмолекулярного белкового контакта между антителом и антигеном, также называют горячей точкой (Moreira et al., *Proteins*, 68(4):803-12 (2007)). Сейчас общепризнано, что большинство эпитопов В-клеток являются прерывистыми по природе (Sivalingam and Shepherd, *Mol. Immunol.* 51(3-4):304-9 (2012)), Kringelum et al., *Mol. Immunol.* 53(1-2):24-34 (2013)), причем усредненный эпитоп охватывает 15-22 аминокислотных остатка, из которых 2-5 аминокислот вносят наибольший вклад в связывание (Sivalingam and Shepherd, выше).

С помощью ранжирования аффинности связывания с 129 различными мутантами ТИМ-3 этот пример иллюстрирует, как связывание эпитопов для Fab 15086, Fab 20293 и Fab 20131 можно подразделять на линейные эпитопы и горячие точки, которые отличаются от эпитопов, распознаваемых эталонными антителами АВТМЗ и mAb15.

Материалы и способы.

Рецептор ТИМ-3 человека состоит из внеклеточного домена (ECD) из 181 аминокислоты (остатки 22-202), за которым следует трансмембранный домен (остатки 203-223) и цитоплазматический домен (остатки 224-301). ТИМ-3 относится к суперсемейству иммуноглобулинов, и ECD состоит из двух доменов - домена муцина и домена IgV. Домен IgV содержит двуслойный  $\beta$ -сэндвич, выполненный из взаимодействий семи антипараллельных  $\beta$ -тяжей, расположенных в двух  $\beta$ -листах с GFCC'  $\beta$ -тяжами на одной стороне и BED  $\beta$ -тяжами на противоположной стороне. Два  $\beta$ -листа стабилизированы дисульфидной связью между остатками C54-C123. Доступна кристаллическая структура для IgV ТИМ-3 человека (PDB 5F71). Домен IgV ТИМ-3 не имеет тяж А, как другие домены IgV, но обладает двумя дополнительными дисульфидными связями (C58-C63 и C52-C110), которые располагают петли CC' и FG в непосредственной близости, образуя уникальное углубление для связывания лиганда фосфатидилсерина (PS). Существует кристаллическая структура ТИМ-3 мыши в комплексе с лигандом PS (ЗКАА), демонстрирующая при связывании лиганда контакт с петлями CC' и FG.

Идентифицировано несколько лигандов и/или корецепторов для ТИМ-3, в том числе HMGB-1, галектин-9, CEACAM-1 и фосфатидилсерин (Chiba et al., *Nat. Immunology*, 13(9):832-42 (2012), Li et al., *Hepatology*, 56(4):1342-51 (2012), DeKruyff et al., *J Immunology*, 184(4):1918-30 (2010), Das et al., *Immunol Rev.* 276(1):97-111 (2017)).

Белковые последовательности для ТИМ-3 человека и ортологов загружали из UniProt; человек (Q8TDQ0; SEQ ID NO: 236), яванский макак (*Macaca fascicularis*, G7P6Q7; SEQ ID NO: 237), мышь (*Mus musculus*, Q8VIM0; SEQ ID NO: 238) и крыса (*Rattus norvegicus*, P0C0K5; SEQ ID NO: 239). Эти последовательности представлены в табл. 23. Идентичность последовательностей между различными внеклеточными аминокислотными последовательностями ТИМ-3 представлена в табл. 19.

Таблица 19

Аминокислотные различия и идентичность последовательностей во внеклеточном домене ТИМ-3 человека

	Аминокислотные различия	% идентичности последовательностей
ECD ТИМ-3 яванского макака	22	85,3
ECD ТИМ-3 крысы	54	64,0
ECD ТИМ-3 мыши	59	60,7

По кристаллическим структурам и аминокислотным последовательностям идентифицировали аминокислотные остатки, экспонированные на поверхности, и разрабатывали 82 индивидуальные аланиновые замены в ECD ТИМ-3 человека (сканирование аланином).

Для картирования линейных эпитопов в контексте структуры нативного ТИМ-3 человека, создавали 47 химерных белков, где 10 аминокислот в последовательности ECD ТИМ-3 человека последовательно заменяли на последовательность мыши в сегментах, которые перекрывались на 5 аминокислот и добавляли версии от крысы и яванского макака в критических петлях. Замены последовательностей осуществляли во внеклеточном домене ТИМ-3 человека, охватывающем аминокислоты 22-199.

кДНК, кодирующую внеклеточный домен TIM-3 человека, синтезировали и клонировали в вектор, содержащий промотор CMV и последовательность Fc IgG1 человека (AA P101-K330), что давало C-концевое слияние Fc IgG1 с клонированным ECD TIM-3. Мутантные слитые конструкции из TIM-3 человека и Fc создавали с помощью стандартных способов ПЦР и инженерии и осуществляли временно экспрессию белка в 2 мл культуре с использованием экспрессирующей системы ExpiCHO™. Слитые конструкции из TIM-3 человека и Fc собирали, очищали и тестировали на аффинность связывания с Fab фрагментами против TIM-3 посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Слитые белки TIM-3 иммобилизовали на G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, The Netherlands) в течение 15 мин с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US). После нанесения SensEye® располагали в биологическом датчике IBIS MX96 и захваченные белки фиксировали на поверхности с использованием набора FixIT (Ssens BV, The Netherlands). Кинетический анализ осуществляли посредством применения так называемой кинетической титровальной серии (Karlsson R. 2006), где мономерные Fab фрагменты антител по изобретению впрыскивали в увеличивающихся концентрациях от 1 до 100 нМ без применения стадий регенерации поверхности после каждого впрыска Fab. Ассоциацию Fab осуществляли в течение 15 мин и диссоциацию антигена осуществляли в течение 15 мин. Зарегистрированные ответы связывания аппроксимировали к простой модели связывания Ленгмюр 1:1 с использованием программного обеспечения Scrubber 2 для вычисления констант скорости ассоциации ( $k_{on}$  или  $k_a$ ), скорости диссоциации ( $k_{off}$  или  $K_D$ ) и аффинность ( $K_D$ ).

Результаты.

Аффинность связывания Fab против TIM-3 15086, 20293, 20131 и эталонных аналогов АВТИМ3 и mAb15 оценивали в отношении измененного связывания с мутантными конструкциями TIM-3.

Аффинности связывания Fab фрагментов с мутантными конструкциями TIM-3 выражали в виде отношения  $K_D$  мутанта/ $K_D$  дикого типа (нормализованная аффинность связывания). В табл. 20 и 21 представлены химерные белки и аланиновые мутанты, которые давали дифференцирующие результаты. По меньшей мере 5-кратное снижение аффинности использовали в качестве пороговых критериев для обнаружения сниженной аффинности связывания с мутантными конструкциями TIM-3. В некоторых случаях нельзя обнаруживать связывание с конкретными Fab. Эти конструкции перечислены как NB (не связывающие).

Анализ показывал, что связывающие эпитопы для Fab против TIM-3 15086, 20293 и 20131 четко отличались по сравнению с эталонными антителами АВТИМ3 и mAb15. 15086 и 20293 не связывают химерный белок с последовательностью мыши, вставленной в положениях 62-67, близи связывающих лиганд петель CC' и FG, тогда как эталонное АВТИМ3 не связывает (табл. 20). Эпитоп для 15086 на TIM-3 выходил за пределы этого аминокислотного фрагмента, включая P50, V60, F61, E62, G64, R69 и остатки петли FG I117, M118, D120, как свидетельствовало сканирование аланином (табл. 21). Fab 20293 имел эпитоп, очень схожий с 15086, за исключением того, что остатки M118 и D120 влияли на связывание только с 15086, когда их мутировали в аланин. Обнаружено, что Fab 20131 связывал другой эпитоп, присутствующий в петле FG в остатках 114-117, и он был расширен посредством сканирования аланином и в него включены остатки 118, 120, а также остатки CC' F61 и E62. Общей для 15086, 20293 и 20131 была чувствительность к аланиновой мутации в положении F61, к которому ни одно из двух эталонных антител не проявляло чувствительность. Несмотря на то что эталонное антитело mAb15 не связывало мутантную последовательность в положениях 62-67, аналогично 15086 и 20293, эпитоп для mAb15 четко отличался, поскольку это антитело не связывалось с двумя дополнительными конструкциями, где последовательность в положениях 74-85 заменяли на мышиную. Антитело АВТИМ3 четко демонстрировало другой эпитоп, определяемый линейными конструкциями, мутированными в положениях 22-28, 107-144 и 123-128, как свидетельствовала измененная аффинность связывания с этими белками (табл. 20). Сводка по находкам при картировании эпитопов представлена в табл. 22, а молекулярная модель расположения эпитопов на поверхности домена IgV TIM-3 представлена на фиг. 9.

Вкратце, авторы изобретения показали на молекулярном уровне, посредством анализа связывания с панелью из 129 мутантов TIM-3, что три Fab 15086, 20293 и 20131 распознают уникальные, но частично перекрывающиеся эпитопы в верхней части домена IgV TIM-3. Эта находка согласуется с анализом категоризации эпитопов (пример 12), который показывает, что все три антитела связывают перекрывающиеся перекрестно конкурирующие эпитопы, которые вместе образуют функциональную поверхность на домене IgV TIM-3. Эти эпитопы четко перекрываются с сайтом связывания фосфатидилсерина, а также аминокислотой E62, которая важна для связывания HMGB-1 и CEACAM1 (Chiba et al., Nat. Immunology 13(9):832-42 (2012), Das et al., Immunol Rev. 276(1):97-111 (2017)), тогда как два эталонных антитела имеют эпитопы, расположенные больше на средней части домена IgV (mAb15) и на другой стороне домена IgV (АВТИМ3). Результаты согласуются с данными о категоризации эпитопов, которые показывают, что mAb15 и АВТИМ3 могут одновременно связывать TIM-3 (пример 12). На основании местоположения эпитопа для 15086, 20293 и 20131, для каждого антитела предсказана способность блокировать связывание лигандов TIM3 (фосфатидилсерина, CEACAM-1 и HMGB-1).

Таблица 20

Сводка по анализу аффинности связывания для Fab фрагментов, связывающих мутантные конструкции ECD TIM-3 со вставленными сегментами последовательностей мыши, крысы или яванского макака.

Нормализованное связывание выражали в виде  $K_D$  мутанта/ $K_D$  дикого типа

№ химерной конструкции	Сканированная область hu TIM-3	Мутантная область hu TIM-3	Введенные мутации из других видов	15086	20293	20131	18564 (ABTIM3)	mAb15
1	22-31	AA 22-28	S22L; V24N; E25S; R27V; A28F	1,0	1,4	1,0	5,4	ND
2	62-71	AA 62-67	E62Q; G64T; V66E; V67L	NB	NB	1,7	0,7	NB
3	72-81	AA 74-80	D74N; N76T; W78Q; T79K; 79S80	0,6	1,3	1,0	1,9	NB
4	77-85	AA 78-85	W78Q; T79K; 79S80; W83Q; N85K	1,0	1,4	1,0	2,0	NB
5	81-90	AA 83-89	W83Q; N85K; D87N; R89Y	3,0	0,7	2,7	1,7	19,3
6	106-115	AA 107-114	I107T; I114F	0,6	0,6	2,0	17,5	1,2
7	111-120	AA 114-117	I114F; I117L	0,7	3,1	8,4	1,1	2,2
8	121-130	AA 123-128	F123N; L125V; 127V128	0,9	1,2	1,1	31,0	0,8
	Химерные мутанты с < 5-кратным изменением $K_D$							
	Химерные мутанты с > 5-кратным изменением $K_D$							
NB	Связывание химерных мутантов отсутствует							

ND - не определяли.

Таблица 21

Сводка анализа аффинности связывания для Fab антител, связывающих сканированные аланином мутанты ECD TIM-3 человека. Нормализованное связывание выражали как  $K_D$  мутанта/ $K_D$  дикого типа

Мутация	15086	20293	20131	18564 (ABTIM3)	mAb15
P50A	82,7	4,9	53,5	4,2	308,8
V60A	11,3	1,7	1,0	1,6	1,4
F61A	NB	NB	NB	1,0	0,9
E62A	38,0	3,7	6,5	4,4	4,0
G64A	18,5	2,0	0,9	2,1	1,7
R69A	NB	NB	0,7	NB	NB
I114A	1,3	0,8	4,8	1,5	1,3
I117A	75,2	9,3	NB	0,9	1,2
M118A	14,4	0,4	NB	0,9	1,0
D120A	7,1	2,1	23,3	6,5	4,4
E121A	1,1	0,8	2,5	10,6	1,3
	Аланиновые мутанты с < 5-кратным изменением $K_D$				
	Аланиновые мутанты с > 5-кратным изменением $K_D$				
NB	Связывание аланиновых мутантов отсутствовало				

Таблица 22

Сводка по связывающим эпитопам, идентифицированным для тестированных антител против TIM-3

Антитело	Блокирование	Категория эпитопов	Линейный эпитоп	Контактные остатки
	лиганда (PS)			
15086	Да	4	62-67	P50, V60, F61, E62, G64, R69, I117, M118, D120
20293	Да	4	62-67	F61, R69, I117
20131	Да	5	114-117	P50, F61, E62, I117, M118, D120
18654 (ABTIM3)	ND	3	22-28, 107-114, 123-128	R69, D120, E121
21563 (mAb15)	ND	1	62-67, 74-80, 78-85, 83-89	P50, R69

## Белковые последовательности TIM-3

Белок	Аминокислотная последовательность
TIM-3 человека, UniProt Q8TDQ0 (SEQ ID NO:236)	MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAVLPFCFYTPAAPGNLVPVCWKGKACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTS RYWLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIKPAKVTAPATRQRDFTAAPFRMLTTRGHGPA ETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWAYSHEKEIQNLSLI SLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVYVEEPEEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP
TIM-3 яванского макака, UniProt G7P6Q7 (SEQ ID NO:237)	MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYIAEVGQNAVLPSCSYTPAPPGNLVPVCWKGKACPVFDCSNVVLRTDNRDVNDRTS GRYWLKGFHKGDVSLTIENVTLADSGVYCCRIQIPGIMNDEKHNKLVVIKPAKVTAPATLQRDLTSAFPRMLTTGEHG PAETQTPGSLPDVNLTVSNFFCELQIFTLTNELRDSGATIRTAIYIAAGISAGLALALIFGALIFKWAYSHEKKTQNLSL ISLANIPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIEDVYVEEPEEYCYVSSGQQPSQPLGCRVAMP
TIM-3 мыши, UniProt	MFSGLTLNVCVLLLLLQLLARSLNAYVFEVGNKNAVLPSCSYTLSTPGALVPMCWKGKFCPWSQCTNELLRTDERNVTYQKS SRYQLKGLDNKGDVSLIKNVTLDDHGTCCRIQFPGLMNDKLEKLDIKAAKVTPAQTAHGDSTTASPRTLTERNGS
Q8VIM0SEQ ID NO:238	ETQTLVTLHNNNGTKISTWADEIKDSGETIRTAIHIGVGSAGLTLALIIIGVLIKWAYSCKKKLSSLSLITLANLPPGG LANAGAVRIRSEENIYTIENVYEVENSNEYCYVNSQQPS
TIM-3 крысы, UniProt P0COK5 SEQ ID NO:239	MFSWLPFSCALLLQPLPARSLNAYTAEVGNKNAVLPSCSYTVPAAGTLVPICWGKGCPLLCASVVLRTDETNVYTYRKS RRYQLKGNFYKGDMSLTIKNVTLADSGTYCCRIQFPGPMNDEKLEKLSITEPAKVIIPAGTAHGDSTTASPRTLTEGSG SETQTLVTLHDNNGTKISTWADEIKDSGETIRTAHVHIGVGSAGLALALILGVLIKWAYSCKKKLQDLSLITLANSPPG GLVNAGAGRIRSEENIYTIENIYEMENSNEYCYVSSQQPS

Таблица 24

## Последовательности антител против TIM-3

Ab	ДНК		Белок		H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
	VH	VL	VH	VL						
15086.15086	1	2	3	4	7	8	9	10	11	12
15086.16837/ 15086.17145/ 15086.17144	13	14	15							
20131	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
20293	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
15105	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
15107	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
15109	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
15174	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
15175	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
15260	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
15284	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115
15299	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
15353	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
15354	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145
17244	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155
17245	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
19324	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
19416	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185
19568	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
20185	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205
20300	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215
20362	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
20621	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235

Таблица 25

## Последовательности константной области и TIM-3

SEQ ID №	Последовательность
5	Белковая последовательность константной области тяжелой цепи IgG1
6	Белковая последовательность константной области легкой цепи к IgG1
16	ДНК последовательность константной области тяжелой цепи IgG1-LALA, за исключением интронов
17	ДНК последовательность константной области тяжелой цепи IgG1-LALA, включая интроны
18	ДНК последовательность константной области тяжелой цепи IgG4 (S228P), за исключением интронов
19	ДНК последовательность константной области тяжелой цепи IgG4 (S228P), включая интроны
20	ДНК последовательность константной области тяжелой цепи IgG2, за исключением интронов
21	ДНК последовательность константной области тяжелой цепи IgG2, включая интроны
22	ДНК последовательность константной области легкой цепи к
23	Белковая последовательность константной области тяжелой цепи IgG1-LALA
24	Белковая последовательность константной области тяжелой цепи IgG4 (S228P)
25	Белковая последовательность константной области тяжелой цепи IgG2
236	TIM-3 человека
237	TIM-3 яванского макака
238	TIM-3 мыши
239	TIM-3 крысы

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающая часть, где антитело против TIM-3 имеет определяющие комплементарность области 1-3 тяжелой цепи (H-CDR) и определяющие комплементарность области 1-3 легкой цепи (L-CDR), которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-12 соответственно.

2. Антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающая часть по п.1, где указанное антитело содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), переменные домены которых имеют аминокислотные последовательности:

- a) SEQ ID NO: 15 и 4 соответственно или
- b) SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно.

3. Антитело против TIM-3 по п.2, в котором указанная HC и указанная LC дополнительно содержат аминокислотные последовательности:

- i) SEQ ID NO: 5 и 6 соответственно;
- ii) SEQ ID NO: 25 и 6 соответственно.

4. Антитело против TIM-3, которое содержит HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 25, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 6.

5. Антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающая часть по п.1, где указанное антитело связывается с эпитопом на TIM-3 человека, содержащим:

- a) аминокислотные остатки P50, V60, F61, E62, G64, I117M, M118 и D120 или
- b) аминокислотные остатки 62-67.

6. Антитело против TIM-3 по любому из пп.1-5, где антитело представляет собой IgG1 и где один или более аминокислотных остатков находится в аминокислотных положениях 234 и 235 тяжелой цепи, которые пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT, мутированы в Ala.

7. Антитело против TIM-3 или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-6, где антитело или часть имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

- a) связывается с TIM-3 человека с  $K_D$  23 нМ или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;
- b) связывается с TIM-3 яванского макака с  $K_D$  22 нМ или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;
- c) связывается с TIM-3 человека с  $EC_{50}$  1,2 нМ или меньше, как измерено посредством ELISA;
- d) связывается с TIM-3 яванского макака с  $EC_{50}$  46 нМ или меньше, как измерено посредством ELISA;
- e) увеличивает секрецию IFN- $\gamma$  в однонаправленном анализе реакции в смешанной культуре лимфоцитов;
- f) увеличивает секрецию IFN- $\gamma$  в двунаправленном анализе реакции в смешанной культуре лимфоцитов;
- g) увеличивает секрецию TNF- $\alpha$  в однонаправленном анализе реакции в смешанной культуре лимфоцитов;
- h) увеличивает секрецию TNF- $\alpha$  из дендритных клеток и
- i) ингибирует взаимодействие TIM-3 с фосфатидилсеринном.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь и или ее антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела против TIM-3 или антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7.

9. Вектор экспрессии, который содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.8, где указанный вектор дополнительно содержит контрольную последовательность экспрессии.

10. Клетка-хозяин, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, антитела против TIM-3 или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7.

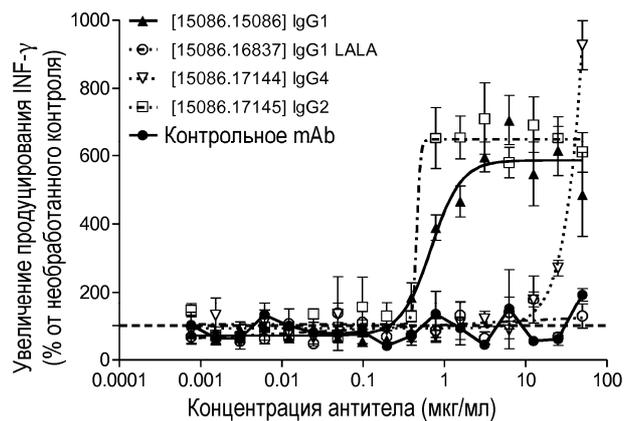
11. Способ получения антитела против TIM-3 или его антигенсвязывающей части, который включает наличие клетки-хозяина по п.10, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или части, и выделение полученного антитела или части.

12. Применение антитела против TIM-3 или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7 для усиления иммунитета у пациента.

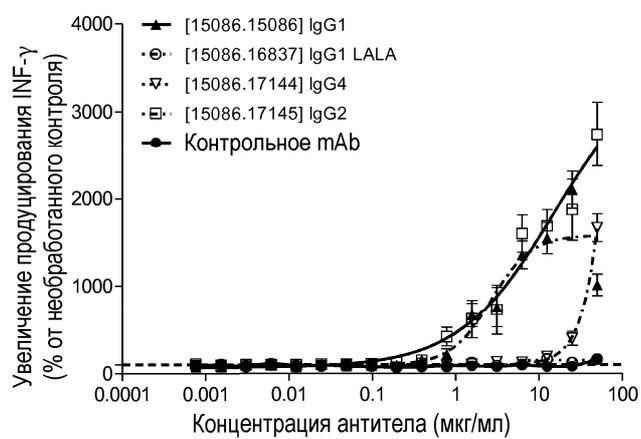
13. Применение антитела против TIM-3 или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7 для лечения злокачественной опухоли у пациента.

14. Применение по п.13, где:

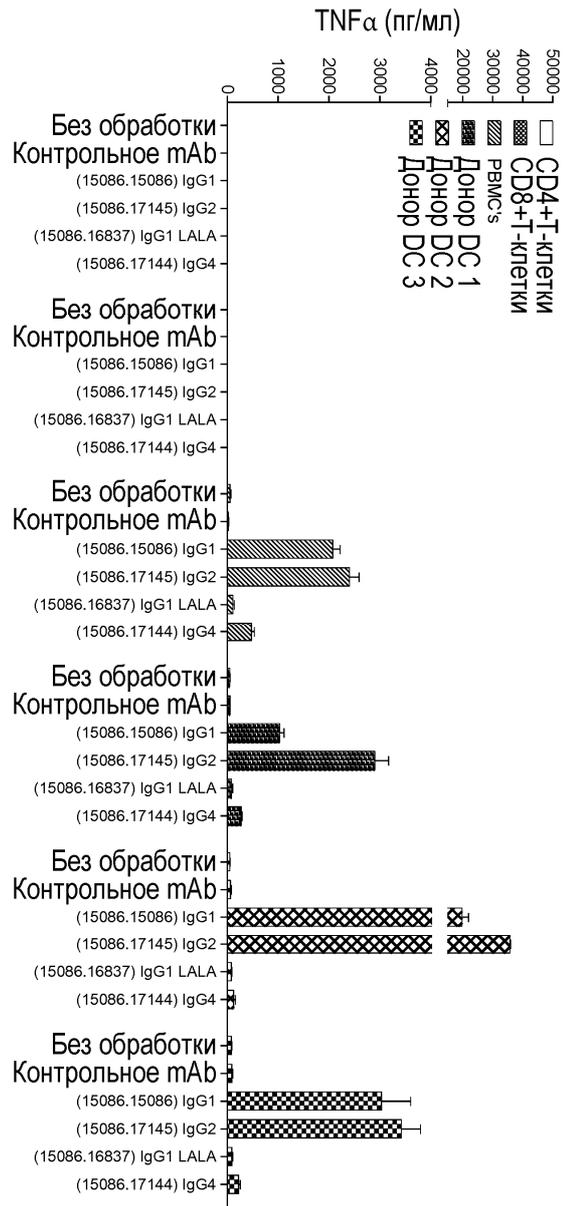
- a) пациент страдает злокачественной опухолью, которая возникает в коже, легком, кишечнике, яичнике, головном мозге, предстательной железе, почке, мягких тканях, гематопозитической системе, голове и шее, печени, мочевом пузыре, груди, желудке, матке или поджелудочной железе;
- b) пациент страдает лейкозом, лимфомой Ходжкина или неходжкинской лимфомой;
- c) у пациента имеется солидная опухоль или
- d) пациент страдает меланомой, немелкоклеточным раком легких, раком толстой кишки или почечно-клеточной карциномой.



Фиг. 1

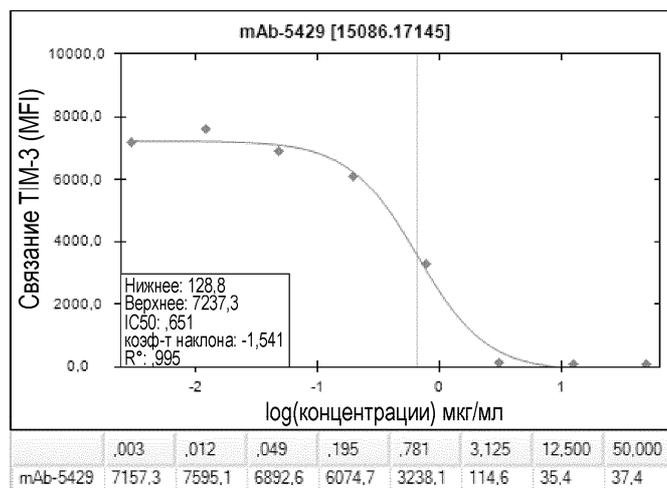


Фиг. 2

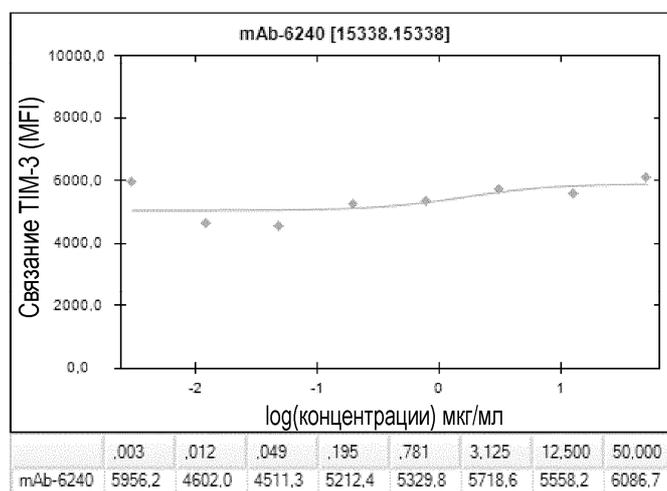


Фиг. 3

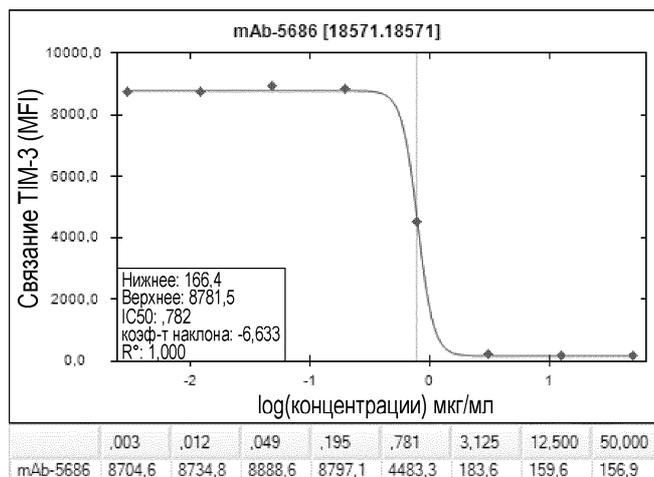
A



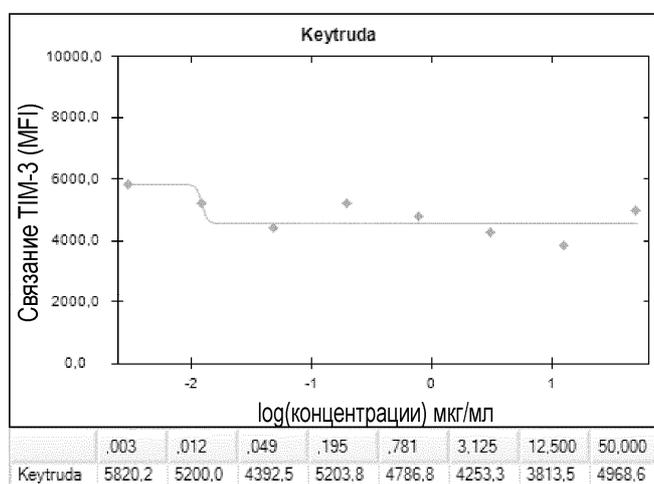
B



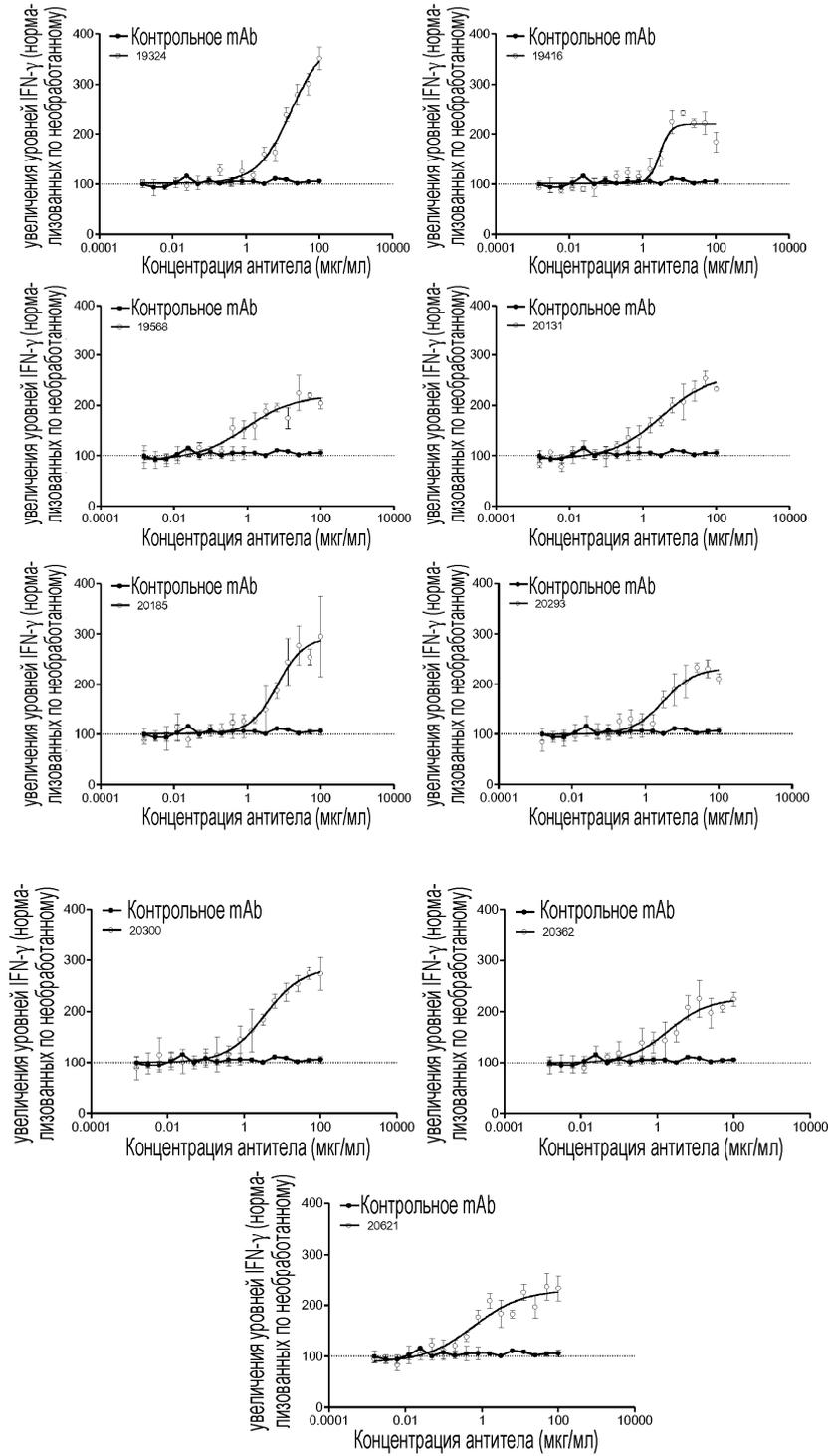
C



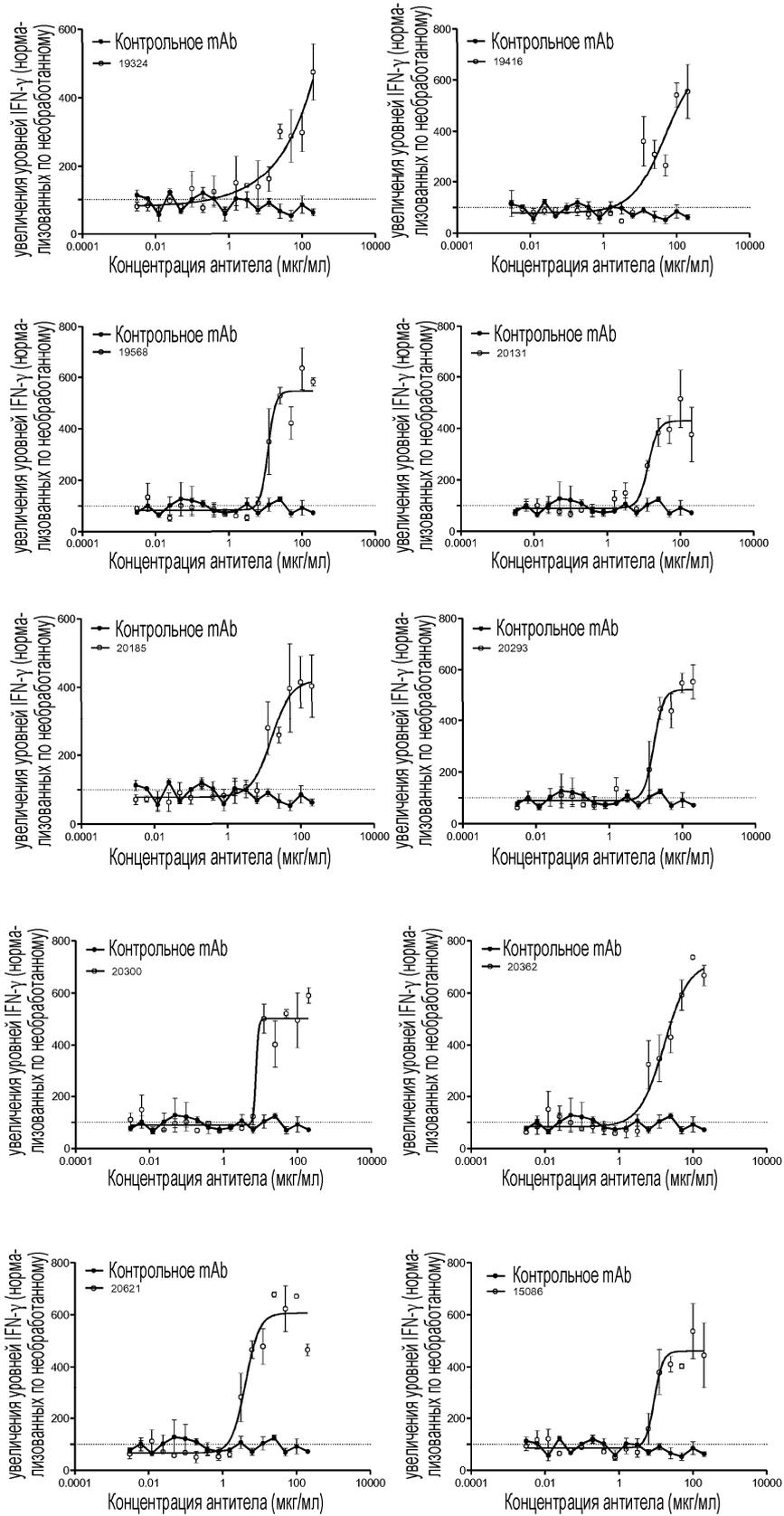
D



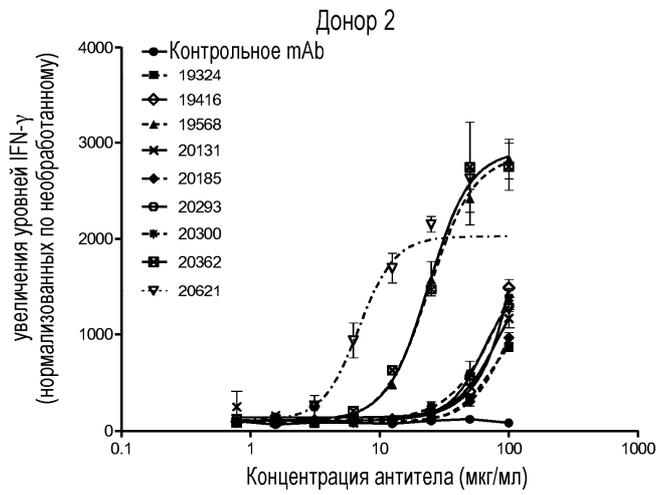
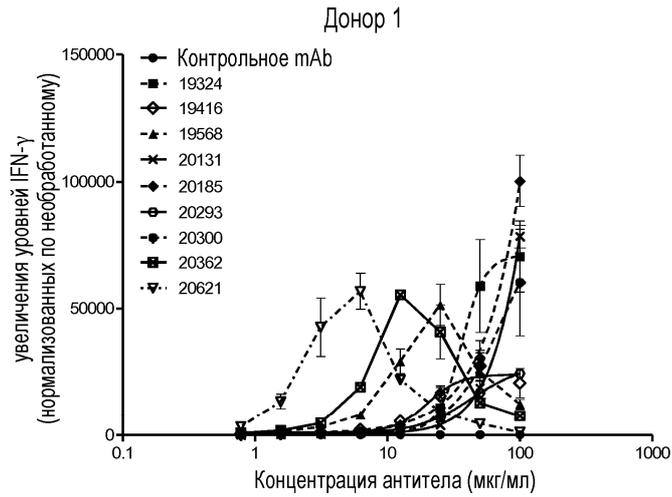
Фиг. 4



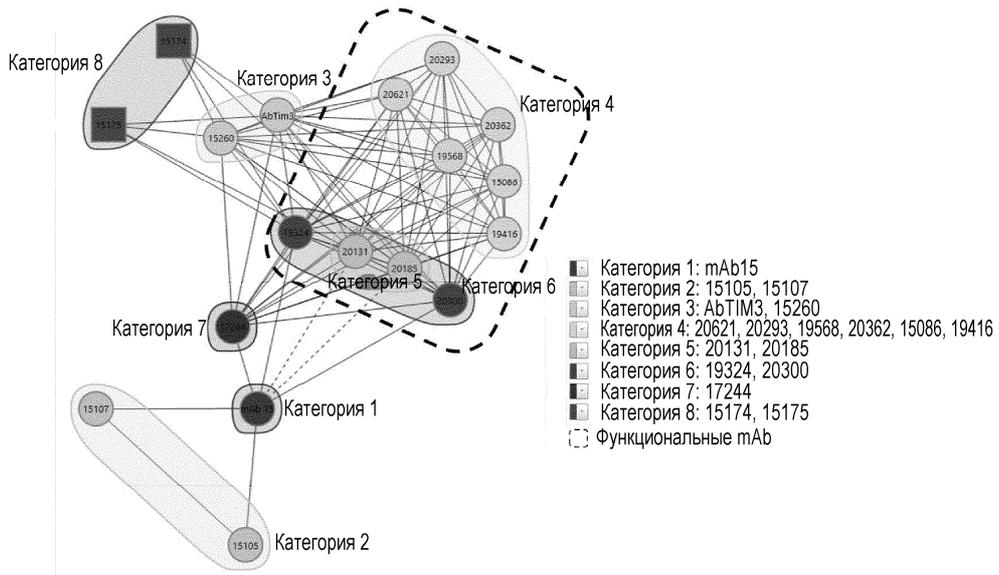
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

