

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040340**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.05.23**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201792184**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.04.01**

---

**(54) АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА И БЕЛКА МУЦИНА-3 (TIM-3)**

---

**(31)** 62/141,353

**(56)** US-A1-20130022623

**(32)** 2015.04.01

WO-A2-2014179664

**(33)** US

US-A1-20130336982

**(43)** 2018.04.30

US-A1-20030103985

**(86)** PCT/US2016/025532

US-A1-20140294834

**(87)** WO 2016/161270 2016.10.06

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АНАПТИСБАЙО, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Кери Мэрилин, Кинг Дэвид Дж., Да  
Сильва Коррея Жан (US)**

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

---

**(57)** Изобретение относится к выделенному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина и к выделенному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, которые связываются с белком, кодируемым генами Т-клеточного иммуноглобулина и белка муцина-3 (TIM-3). Настоящее изобретение относится к TIM-3-связывающему агенту, содержащему вышеупомянутый полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид легкой цепи иммуноглобулина. Настоящее изобретение также относится к родственным векторам, к композициям и к способам применения TIM-3-связывающего агента для лечения расстройства или заболевания, отвечающего на ингибирование TIM-3, такого как рак, инфекционное заболевание или аутоиммунное заболевание.

**B1**

**040340**

**040340**

**B1**

**Материал, поданный в электронном виде и вводимый в настоящее изобретение  
посредством ссылки**

Список нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII, во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки и идентифицирован как один файл 369646 байт (Text) под названием "723697\_ST25.TXT", созданный 31 марта, 2016.

**Предшествующий уровень техники**

Домен-3 белка Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3), также известный как клеточный рецептор 2 вируса гепатита А (HAVCR2), представляет собой Th1-специфический клеточный поверхностный белок, который регулирует активацию макрофагов и повышает тяжесть экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у мышей. TIM-3 в высокой степени экспрессируется на поверхности иммунных клеток многих типов, включая, например, Th1-IFN- $\gamma^+$ -клетки, Tr17-клетки, природные клетки-киллеры (NK), моноциты и опухолеассоциированные дендритные клетки (ДК) (см., например, Clayton et al., *J. Immunol.*, 192(2): 782-791 (2014); Jones et al., *J. Exp. Med.*, 205: 2763-2779 (2008); Monney et al., *Nature*, 415: 536-541 (2002); Hastings et al., *Eur. J. Immunol.*, 39: 2492-2501 (2009); Seki et al., *Clin. Immunol.*, 127: 78-88 (2008); Ju et al., *B. J. Hepatol.*, 52: 322-329 (2010); Anderson et al., *Science*, 318: 1141-1143 (2007); Baitsch et al., *PLoS ONE*, 7: e30852 (2012); Ndhlovu et al., *Blood*, 119: 3734-3743 (2012). TIM-3 также в высокой степени экспрессируется на "истощенных" или поврежденных CD8<sup>+</sup>-Т-клетках при различных хронических вирусных инфекциях (например, ВИЧ, HCV и HBV) и при некоторых раковых заболеваниях (см., например, McMahan et al., *J. Clin. Invest.*, 120(12): 4546-4557 (2010); Jin et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(33): 14733-14738 (2010); Golden-Mason et al., *J. Virol.*, 83(18): 9122-9130 (2009); Jones et al., *supra*; Fourcade et al., *J. Exp. Med.*, 207(10): 2175-2186 (2010); Sakuishi et al., *J. Exp. Med.*, 207(10): 2187-2194 (2010); Zhou et al., *Blood*, 117(17): 4501-4510 (2011); Ngiow et al., *Cancer Res.*, 71(10): 3540-3551 (2011)).

Предполагаемыми лигандами для TIM-3 являются фосфатидилсерин (Nakayama et al., *Blood*, 113: 3821-3830 (2009)), галектин-9 (Zhu et al., *Nat. Immunol.*, 6: 1245-1252 (2005)), белок 1, принадлежащий к группе высокомолекулярных белков (HMGB1) (Chiba et al., *Nature Immunology*, 13: 832-842 (2012)), и молекула 1 карциноэмбрионального антигена, ответственная за клеточную адгезию (CEACAM1) (Huang et al., *Nature*, 517(7534): 386-90 (2015)).

Функции TIM-3 заключаются в регуляции различных аспектов иммунного ответа. Взаимодействие TIM-3 и галектина-9 (Gal-9) индуцирует клеточную гибель, а блокада *in vivo* этого взаимодействия усиливает аутоиммунитет и подавляет толерантность у экспериментальных моделей, что дает все основания предположить, что TIM-3 представляет собой молекулу негативной регуляции. В противоположность его действию на Т-клетки, взаимодействие TIM-3 и Gal-9 оказывает противомикробное действие благодаря стимуляции клиренса внутриклеточных патогенов из макрофагов (см., например, Sakuishi et al., *Trends in Immunology*, 32(8) : 345-349 (2011)). Было показано, что *in vivo*, супрессия TIM-3 повышает патологическую тяжесть экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (Monney et al., *supra*; и Anderson, A. C. and Anderson, D. E., *Curr. Opin. Immunol.*, 18: 665-669 (2006)). Исследования также позволяют предположить, что нарушения регуляции пути "TIM-3 - галектин-9" может играть определенную роль в развитии хронических аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз (Anderson and Anderson, *supra*). TIM-3 стимулирует клиренс апоптотических клеток благодаря связыванию фосфатидилсерина в его уникальном связывающем кармане (см., например, DeKruyff et al., *J. Immunol.*, 184(4):1918-1930 (2010)).

Ингибирование активности TIM-3, например, с использованием моноклональных антител, находится в настоящее время на стадии исследования возможности его применения для иммунотерапии опухоли исходя из результатов преклинических испытаний (см., например, Ngiow et al., *Cancer Res.*, 71(21) : 1-5 (2011); Guo et al., *Journal of Translational Medicine*, 11: 215 (2013); и Ngiow et al., *Cancer Res.*, 71(21): 6567-6571 (2011)). Необходимо получить дополнительные антагонисты TIM-3 (например, антитело), которые связываются с TIM-3 с высокой аффинностью и эффективно нейтрализуют активность TIM-3. Настоящее изобретение относится к таким TIM-3-связывающим агентам. Краткое описание изобретения Настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser  
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Xaa1  
Ala Xaa2 Ser Gly Phe Xaa3 Xaa4 Xaa5 Thr Phe Ser Xaa6 Tyr Xaa7  
Met Xaa8 Trp Val Arg Gln Ala Xaa9 Gly Lys Gly Leu Xaa10 Trp Val  
Ser Xaa11 Ile Ser Xaa12 Gly Gly Xaa13 Tyr Thr Tyr Tyr Gln Asp  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Xaa14 Glu Asp Thr Ala Val  
Tyr Tyr Cys Xaa15 Ser Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Met Asp Tyr Trp  
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala (SEQ ID NO: 1)

где (a) Хаа1 делегирована (то есть, отсутствует) или представляет собой аланин (Ala), (b) Хаа2 представляет собой аланин (Ala), пролин (Pro), аспарагиновую кислоту (Asp), глицин (Gly), треонин (Thr) или валин (Val), (c) подпоследовательность Хаа3 Хаа4 Хаа5 делегирована или представляет собой Thr-Phe-Ile, (d) Хаа6 представляет собой серии (Ser), аспарагин (Asn), аргинин (Arg) или треонин (Thr), (e) Хаа7 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или аланин (Ala), (f) Хаа8 представляет собой серии (Ser) или треонин (Thr), (g) Хаа9 представляет собой пролин (Pro) или лейцин (Leu), (h) Хаа10 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или глутаминовую кислоту (Glu), (i) Хаа11 представляет собой треонин (Thr) или аланин (Ala), (j) Хаа12 представляет собой глицин (Gly) или серии (Ser), (k) Хаа13 представляет собой серии (Ser), треонин (Thr), аспарагиновую кислоту (Asp), глицин (Gly), аспарагин (Asn) или лизин (Lys), (l) Хаа14 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), (m) Хаа15 представляет собой аланин (Ala) или треонин (Thr), и (n) подпоследовательность Хаа16 Хаа17 Хаа18 Хаа19 делегирована или представляет собой Pro-Гуг-Гуг-Ala.

Настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность

```

Asp Ile Gln Met Thr Xaa1 Ser
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
Arg Xaa2 Ser Gln Ser Ile Xaa3 Xaa4 Tyr Leu Asn Trp Tyr Xaa5 Gln
Lys Xaa6 Xaa7 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Xaa8 Tyr Xaa9 Ala Ser
Xaa10 Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
Ala Xaa11 Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Pro Xaa16
Thr Phe Gly Xaa17 Gly Thr Lys Xaa18 Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:
45),

```

где (a) Хаа1 представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (b) Хаа2 представляет собой аланин (Ala) или треонин (Thr), (c) Хаа3 представляет собой серии (Ser), аргинин (Arg), аспарагин (Asn) или треонин (Thr), (d) Хаа4 представляет собой серии (Ser), аргинин (Arg), аспарагиновую кислоту (Asp), треонин (Thr) или глицин (Gly), (e) Хаа5 представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (f) Хаа6 представляет собой пролин (Pro) или аланин (Ala), (g) Хаа7 представляет собой глицин (Gly), лизин (Lys) или аргинин (Arg), (h) Хаа8 представляет собой изолейцин (Ile) или метионин (Met), (i) Хаа9 представляет собой аланин (Ala), глицин (Gly), аспарагиновую кислоту (Asp), треонин (Thr), серии (Ser), валин (Val) или изолейцин (Ile), (j) Хаа10 представляет собой серии (Ser) или треонин (Thr), (k) Хаа11 представляет собой валин (Val), метионин (Met) или аланин (Ala) (l) Хаа12 представляет собой серии (ser) или аргинин (Arg), (m) Хаа13 представляет собой тирозин (Tyr), гистидин (His), фенилаланин (Phe), аспарагиновую кислоту (Asp), серии (Ser) или аспарагин (Asn), (n) Хаа14 представляет собой серии (Ser) или аспарагин (Asn), (o) Хаа15 представляет собой треонин (Thr), серии (Ser), аланин (Ala) или пролин (Pro), (p) Хаа16 представляет собой лейцин (Leu) или гистидин (His), (q) Хаа17 представляет собой глицин (Gly), аргинин (Arg) или глутаминовую кислоту (Glu) и (r) Хаа18 представляет собой валин (Val) или лейцин (Leu).

Настоящее изобретение также относится к выделенному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность

```

Glu Val Gln Xaa1 Leu Xaa2 Xaa3
Xaa4 Xaa5 Ser Gly Gly Xaa6 Leu Xaa7 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
Leu Xaa8 Cys Xaa9 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa10 Xaa11 Ser Tyr
Xaa12 Met Xa13 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val Ser Xaa14 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Xaa15 Thr Tyr Tyr Xaa16
Asp Ser Val Lys Gly Xaa17 Phe Thr Ile Ser Xaa18 Asp Asn Ser
Xaa19 Asn Thr Xaa20 Tyr Leu Gln Met Asn Xaa21 Leu Arg Ala Glu
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa22 Lys Lys Tyr Tyr Xaa23 Xaa24
Pro Ala Asp Tyr Trp Xaa25 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
Gly (SEQ ID NO: 126),

```

где (a) Хаа1 представляет собой лейцин (Leu), валин (Val) или метионин (Met), (b) подпоследовательность Хаа2 Хаа3 Хаа4 делегирована или представляет собой Glu-Ser-Leu, (c) Хаа5 делегирована или представляет собой глутаминовую кислоту (Glu), (d) Хаа6 представляет собой глицин (Gly) или аспарагиновую кислоту (Asp), (e) Хаа7 представляет собой валин (Val) или изолейцин (Ile), (f) Хаа8 представляет собой серии (Ser) или тирозин (Tyr), (g) Хаа9 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), (h) Хаа10 представляет собой серии (Ser), аспарагин (Asn), аргинин (Arg), треонин (Thr), аспарагиновую кислоту (Asp) или глицин (Gly), (i) Хаа11 делегирована или представляет собой глицин (Gly), (j) Хаа12 представляет собой аланин (Ala) или треонин (Thr), (k) Хаа13 представляет собой серии (Ser) или аспарагин (Asn), (l) Хаа14 представляет собой аланин (Ala), глицин (Gly), валин (Val), серии (Ser), фенилала-

нин (Phe), изолейцин (Ile), треонин (Thr) или аспарагиновую кислоту (Asp) (l) Xaa15 представляет собой серии (Ser) или аспарагин (Asn), (m) Xaa16 представляет собой аланин (Ala), валин (Val) или аспарагин (Asn), (n) Xaa17 представляет собой аргинин (Arg) или глутамин (Gln), (o) Xaa18 представляет собой аргинин (Arg) или лизин (Lys), (p) Xaa19 представляет собой лизин (Lys) или аспарагин (Asn), (q) Xaa20 представляет собой лейцин (Leu), валин (Val), треонин (Thr), метионин (Met) или пролин (Pro), (r) Xaa21 представляет собой серии (Ser) или аспарагин (Asn), (s) Xaa22 представляет собой аланин (Ala) или глицин (Gly), (t) Xaa23 представляет собой глицин (Gly), валин (Val), аспарагиновую кислоту (Asp), аланин (Ala), треонин (Thr) или аспарагин (Asn), (u) Xaa24 представляет собой глицин (Gly), серии (Ser), валин (Val), аспарагиновую кислоту (Asp), аспарагин (Asn) или треонин (Thr), и (v) Xaa25 представляет собой глицин (Gly) или аспарагиновую кислоту (Asp).

Настоящее изобретение также относится к выделенному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
Xaa1 Trp Tyr Xaa2 Xaa3 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Xaa4 Gly Val Pro Asp Arg Phe Xaa5
Gly Ser Xaa6 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Xaa7 Ile Xaa8 Ser Leu
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Gln Tyr Tyr Xaa10
Ser Pro Xaa11 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ile Glu Xaa12 Lys (SEQ
ID NO: 260),

```

где (a) Xaa1 представляет собой аланин (Ala) или треонин (Thr), (b) Xaa2 представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (c) Xaa3 представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (d) Xaa4 представляет собой серии (Ser), тирозин (Tyr), аспарагиновую кислоту (Asp), глицин (Gly), треонин (Thr), аспарагин (Asn), лизин (Lys), глутаминовую кислоту (Glu), лейцин (Leu), пролин (Pro) или валин (Val), (e) Xaa5 представляет собой серии (Ser) или аспарагин (Asn), (f) Xaa6 представляет собой глицин (Gly), глутаминовую кислоту (Glu), аланин (Ala), аспарагиновую кислоту (Asp), аспарагин (Asn), серии (Ser), треонин (Thr) или валин (Val), (g) Xaa7 представляет собой треонин (Thr) или изолейцин (Ile), (h) Xaa8 представляет собой серии (Ser) или изолейцин (Ile), (i) Xaa9 представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (j) Xaa10 представляет собой серии (Ser), аспарагин (Asn), аргинин (Arg), глицин (Gly) или треонин (Thr), (k) Xaa11 представляет собой лейцин (Leu) или изолейцин (Ile), и (l) Xaa12 представляет собой лейцин (Leu) или валин (Val).

Кроме того, настоящее изобретение относится к выделенным или очищенным последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим вышеупомянутые полипептиды иммуноглобулина; к векторам, содержащим такие последовательности нуклеиновой кислоты; к ТИМ-3-связывающим агентам, содержащим вышеупомянутые полипептиды иммуноглобулина; к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим такие ТИМ-3-связывающие агенты; к векторам, содержащим такие последовательности нуклеиновой кислоты; к выделенным клеткам, содержащим такие векторы; к композициям, содержащим такие ТИМ-3-связывающие агенты или такие векторы вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и к способам лечения рака, инфекционных заболеваний или аутоиммунных заболеваний у млекопитающих путем введения млекопитающим эффективных количеств таких композиций.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1А представлен график, на котором проиллюстрированы результаты эксперимента, демонстрирующие секрецию ИЛ-2, индуцированную главным анти-ТИМ-3 антителом в смешанной реакции лимфоцитов как описано в примере 2.

На фиг. 1В представлен график, на котором проиллюстрированы результаты эксперимента, демонстрирующие секрецию ИЛ-2, индуцированную главным анти-ТИМ-3 антителом в активированных CD4<sup>+</sup>-Т-клетках как описано в примере 2.

На фиг. 1С представлен график, на котором проиллюстрированы результаты эксперимента, демонстрирующие секрецию ИЛ-2, индуцированную главным анти-ТИМ-3 антителом в комбинации с анти-PD-1 антителом в смешанной реакции лимфоцитов как описано в примере 2.

На фиг. 1D представлен график, на котором проиллюстрированы результаты эксперимента, демонстрирующие секрецию ИЛ-2, индуцированную главным анти-ТИМ-3 антителом в комбинации с анти-PD-1 антителом в активированных CD4<sup>+</sup>-Т-клетках как описано в примере 2.

На фиг. 2А представлен график, на котором проиллюстрированы результаты эксперимента, демонстрирующие влияние PBS-обработки на объем опухоли у модели сингенной опухоли МС38 как описано в примере 3. Стрелками указаны дни введения доз.

На фиг. 2В представлен график, на котором проиллюстрированы результаты эксперимента, демонстрирующие влияние обработки анти-ТИМ-3 антителом на объем опухоли у модели сингенной опухоли МС38 как описано в примере 3. Стрелками указаны дни введения доз.

На фиг. 2С представлен график, на котором проиллюстрированы результаты эксперимента, демонстрирующие влияние обработки анти-PD-1 антителом на объем опухоли у модели сингенной опухоли МС38 как описано в примере 3.

На фиг. 2D представлен график, на котором проиллюстрированы результаты эксперимента, демонстрирующие влияние обработки анти-TIM-3 антителом в комбинации с обработкой анти-PD-1 антителом на объем опухоли у модели сингенной опухоли МС38 как описано в примере 3. Стрелками указаны дни введения доз.

На фиг. 3 представлен график, на котором проиллюстрированы результаты эксперимента, демонстрирующие влияние суррогатных анти-TIM-3 и анти-PD-1 антител различных изоформ на объем опухоли у модели сингенной опухоли МС38 как описано в примере 4. Стрелками указаны дни введения доз.

#### Подробное описание изобретения

Изобретение относится к выделенному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина и/или к выделенному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина или к их фрагменту (например, к антигенсвязывающему фрагменту). Используемый здесь термин "иммуноглобулин" или "антитело" означает белок, который присутствует в крови или в других физиологических жидкостях позвоночных, где указанные жидкости используются иммунной системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов, таких как бактерии и вирусы. Полипептид является "выделенным", то есть, он удален из своего природного окружения. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, иммуноглобулином или антителом является белок, содержащий по меньшей мере одну комплементарность-определяющую область (CDR). CDR образуют "гипервариабельную область" антитела, ответственную за связывание с антигеном (как подробно обсуждается ниже). Полноразмерный иммуноглобулин обычно состоит из четырех полипептидов: двух идентичных копий полипептида тяжелой (H) цепи и двух идентичных копий полипептида легкой (L) цепи. Каждая тяжелая цепь содержит одну N-концевую вариабельную ( $V_H$ ) область и три C-концевых константных ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ ) областей, а каждая легкая цепь содержит одну N-концевую вариабельную ( $V_L$ ) область и одну C-концевую константную ( $C_L$ ) область. Легкие цепи антител могут принадлежать к одному из двух различных типов, либо каппа ( $\kappa$ ), либо лямбда ( $\lambda$ ), в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов. В типичном иммуноглобулине, каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью дисульфидными связями, и две тяжелых цепи связаны друг с другом дисульфидными связями. Вариабельная область легкой цепи находится на одной линии с вариабельной областью тяжелой цепи, а константная область легкой цепи находится на одной линии с первой константной областью тяжелой цепи. Остальные константные области тяжелых цепей находятся на одной линии друг с другом.

Вариабельные области каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий сайт антитела.  $V_H$  и  $V_L$  области имеют одинаковую общую структуру, и каждая область содержит четыре каркасных области (FW или FR). Используемый здесь термин "каркасная область" означает относительно консервативные аминокислотные последовательности в вариабельной области, которые расположены между гипервариабельными или комплементарность-определяющими областями (CDR). В каждом вариабельном домене присутствуют четыре каркасных области, обозначенные FR1, FR2, FR3 и FR4. Каркасные области образуют  $\beta$ -складки, составляющие структурный каркас вариабельной области (см., например, C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)).

Каркасные области соединены тремя гипервариабельными областями (CDR). Как обсуждалось выше, три CDR, известные как CDR1, CDR2 и CDR3, образуют "гипервариабельную область" антитела, ответственную за связывание с антигеном. CDR образуют соединяющие петли, а в некоторых случаях, они содержат часть бета-складчатой структуры, образованной каркасными областями. Константные области легкой и тяжелой цепей не участвуют в непосредственном связывании антитела с антигеном, а константные области могут влиять на ориентацию вариабельных областей. Константные области также обладают различными эффекторными функциями, например, участвуют в антитело-зависимом комплемент-опосредуемом лизисе или в антителозависимой клеточной токсичности в результате взаимодействий с эффекторными молекулами и клетками.

Выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, предпочтительно, связываются с белком Т-клеточного иммуноглобулина и муцина 3 (TIM-3). TIM-3 представляет собой трансмембранный белок размером 60 кДа типа 1, состоящий из трех доменов: N-концевого домена, подобного вариабельному домену Ig ( $IgV$ ); центрального Ser/Thr-богатого домена муцина; и трансмембранного домена с коротким внутриклеточным "хвостом" (см., например, Kane, L.P., Journal of Immunology, 184(6): 2743-2749 (2010)). TIM-3 был впервые идентифицирован на Th1-клетках конечной стадии дифференцировки, и было обнаружено, что он негативно регулирует Т-клеточный ответ посредством индуцирования Т-клеточного апоптоза (см., например, Hastings et al., Eur. J. Immunol., 39(9): 2492-2501 (2009)). TIM-3 также экспрессируется на активированных Th17- и Tc1-клетках, а нарушение регуляции экспрессии TIM-3 на  $CD4^+$ -Т-клетках и  $CD8^+$ -Т-клетках ассоциируется с развитием некоторых аутоиммунных заболеваний, вирусных инфекций и рака (см., например, Liberal et al., Hepatology, 56(2): 677-686 (2012); Wu et al., Eur. J. Immunol., 42(5):

1180-1191 (2012); Anderson, A.C., *Curr. Opin. Immunol.*, 24(2): 213-216 (2012); и Han et al., *Frontiers in Immunology*, 4: 449 (2013)).

Выделенный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению и выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению могут образовывать агент, который связывается с ТИМ-3 и с другим антигеном, в результате чего может быть получен связывающий агент, обладающий способностью "реагировать с двумя молекулами" (например, антитело, реагирующее с двумя молекулами). Так, например, этот агент может связываться с ТИМ-3 и с другим негативным регулятором иммунной системы, таким как, например, белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1) и/или белок гена 3 активации лимфоцитов (LAG-3).

Некоторые другие антитела, которые связываются с ТИМ-3 и с его компонентами, известны специалистам (см., например, патент США 8101176; патент США 8552156; и патент США 8841418). Анти-ТИМ-3 антитела также являются коммерчески доступными и поставляются из таких источников, как, например, Abcam (Cambridge, MA), и R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN).

Настоящее изобретение относится к полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит, состоит или, в основном, состоит из нее, аминокислотную последовательность

Glu

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 Leu Arg Leu Ser Cys Xaa1 Ala Xaa2 Ser Gly Phe Xaa3 Xaa4 Xaa5 Thr  
 Phe Ser Xaa6 Tyr Xaa7 Met Xaa8 Trp Val Arg Gln Ala Xaa9 Gly Lys  
 Gly Leu Xaa10 Trp Val Ser Xaa11 Ile Ser Xaa12 Gly Gly Xaa13 Tyr  
 Thr Tyr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Xaa14  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa15 Ser Xaa16 Xaa17 Xaa18  
 Xaa19 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 Ala (SEQ ID NO: 1),

где (a) Xaa1 делегирована или представляет собой аланин (Ala), (b) Xaa2 представляет собой аланин (Ala), пролин (Pro), аспарагиновую кислоту (Asp), глицин (Gly), треонин (Thr) или валин (Val), (c) подпоследовательность Xaa3 Xaa4 Xaa5 делегирована или представляет собой Thr-Phe-Ile, (d) Xaa6 представляет собой серии (Ser), аспарагин (Asn), аргинин (Arg) или треонин (Thr), (e) Xaa7 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или аланин (Ala), (f) Xaa8 представляет собой серии (Ser) или треонин (Thr), (g) Xaa9 представляет собой пролин (Pro) или лейцин (Leu), (h) Xaa10 представляет собой аспарагиновую кислоту (Asp) или глутаминовую кислоту (Glu), (i) Xaa11 представляет собой треонин (Thr) или аланин (Ala), (j) Xaa12 представляет собой глицин (Gly) или серии (Ser), (k) Xaa13 представляет собой серии (Ser), треонин (Thr), аспарагиновую кислоту (Asp), глицин (Gly), аспарагин (Asn) или лизин (Lys), (l) Xaa14 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), (m) Xaa15 представляет собой аланин (Ala) или треонин (Thr), и (n) подпоследовательность Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 делегирована или представляет собой Pro-Тур-Тур-Ala.

Полипептид тяжелой цепи согласно изобретению может содержать, состоять или, в основном, состоять из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, имеющую любую одну из вышеупомянутых аминокислотных замен и делеций в любой подходящей комбинации. В одном из вариантов осуществления изобретения, полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит, состоит или, в основном, состоит из нее, аминокислотную последовательность любой одной из

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3,  
 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID  
 NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:  
 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16,  
 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ  
 ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID  
 NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO:  
 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33,  
 SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ  
 ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID  
 NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44.

Настоящее изобретение также относится к полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит, состоит или, в основном, состоит из нее, аминокислотную последовательность

Glu

Val Gln Xaa1 Leu Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Ser Gly Gly Xaa6 Leu Xaa7  
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Xaa8 Cys Xaa9 Ala Ser Gly Phe  
 Thr Phe Xaa10 Xaa11 Ser Tyr Xaa12 Met Xaa13 Trp Val Arg Gln Ala  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa14 Ile Ser Gly Ser Gly  
 Gly Xaa15 Thr Tyr Tyr Xaa16 Asp Ser Val Lys Gly Xaa17 Phe Thr

Ile Ser Xaa18 Asp Asn Ser Xaa19 Asn Thr Xaa20 Tyr Leu Gln Met  
 Asn Xaa21 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa22 Lys  
 Lys Tyr Tyr Xaa23 Xaa24 Pro Ala Asp Tyr Trp Xaa25 Gln Gly Thr  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly (SEQ ID NO: 126)

где (a) Xaa1 представляет собой лейцин (Leu), валин (Val) или метионин (Met), (b) подпоследовательность Xaa2 Xaa3 Xaa4 делегирована или представляет собой Glu-Ser-Leu, (c) Xaa5 делегирована или представляет собой глутаминовую кислоту (Glu), (d) Xaa6 представляет собой глицин (Gly) или аспарагиновую кислоту (Asp), (e) Xaa7 представляет собой валин (Val) или изолейцин (Ile), (f) Xaa8 представляет собой серин (Ser) или тирозин (Tyr), (g) Xaa9 представляет собой аланин (Ala) или валин (Val), (h) Xaa10 представляет собой серин (Ser), аспарагин (Asn), аргинин (Arg), треонин (Thr), аспарагиновую кислоту (Asp) или глицин (Gly), (i) Xaa11 делегирована или представляет собой глицин (Gly), (j) Xaa12 представляет собой аланин (Ala) или треонин (Thr), (k) Xaa13 представляет собой серин (Ser) или аспарагин (Asn), (l) Xaa14 представляет собой аланин (Ala), глицин (Gly), валин (Val), серин (Ser), фенилаланин (Phe), изолейцин (Ile), треонин (Thr) или аспарагиновую кислоту (Asp) (l) Xaa15 представляет собой серин (Ser) или аспарагин (Asn), (m) Xaa16 представляет собой аланин (Ala), валин (Val), или аспарагин (Asn), (n) Xaa17 представляет собой аргинин (Arg) или глутамин (Gln), (o) Xaa18 представляет собой аргинин (Arg) или лизин (Lys), (p) Xaa19 представляет собой лизин (Lys) или аспарагин (Asn), (q) Xaa20 представляет собой лейцин (Leu), валин (Val), треонин (Thr), метионин (Met) или пролин (Pro), (r) Xaa21 представляет собой серин (Ser) или аспарагин (Asn), (s) Xaa22 представляет собой аланин (Ala) или глицин (Gly), (t) Xaa23 представляет собой глицин (Gly), валин (Val), аспарагиновую кислоту (Asp), аланин (Ala), треонин (Thr) или аспарагин (Asn), (u) Xaa24 представляет собой глицин (Gly), серин (Ser), валин (Val), аспарагиновую кислоту (Asp), аспарагин (Asn) или треонин (Thr), и (v) Xaa25 представляет собой глицин (Gly) или аспарагиновую кислоту (Asp).

Полипептид тяжелой цепи согласно изобретению может содержать, состоять или, в основном, состоять из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, имеющую любую одну из вышеупомянутых аминокислотных замен и делеций в любой подходящей комбинации. В одном из вариантов осуществления изобретения, полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит, состоит или, в основном, состоит из нее, аминокислотную последовательность любой одной из

SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO:  
 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO:  
 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO:  
 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO:  
 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO:  
 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID  
 NO:148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID  
 NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID  
 NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID  
 NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID  
 NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID  
 NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID  
 NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID  
 NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID  
 NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID  
 NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID  
 NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID  
 NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID  
 NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID  
 NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID  
 NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 207, SEQ ID  
 NO: 208, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 211, SEQ ID  
 NO: 212, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215, SEQ ID  
 NO: 216, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 219, SEQ ID  
 NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223, SEQ ID  
 NO: 224, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227, SEQ ID  
 NO: 228, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 231, SEQ ID  
 NO: 232, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID  
 NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID  
 NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243, SEQ ID  
 NO: 244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID  
 NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID  
 NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID  
 NO: 256, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 и SEQ ID NO: 259.

Если полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, по существу, состоит из аминокислотной последовательности любой одной из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 126 - SEQ ID NO: 259, то в этот полипептид могут быть включены дополнительные компоненты, которые, по существу, не влияют на полипептид, например, не влияют на аффинность полипептида тяжелой цепи согласно изобретению по отношению к ТИМ-3. Примерами таких компонентов являются, например, белковые молекулы, такие как биотин, который облегчает очистку или выделение; мутации типа "пасса-жир"; последовательности, не содержащие нежелательных сайтов, включая свободные цистеины, дополнительные сайты гликозилирования и сайта с высокой вероятностью дезамидирования или изомеризации.

Если полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению состоит из аминокислотной последовательности любой одной из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 126 - SEQ ID NO: 259, то этот полипептид не содержит каких-либо дополнительных компонентов (то есть, компонентов, которые не являются эндогенными для полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению).

Настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащему аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична) любой одной из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 126 - SEQ ID NO: 259. "Идентичность" последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей, описанных в настоящей заявке, может быть определена путем сравнения представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью. Процент идентичности означает число нуклеотидных или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (то есть, идентичными) для представляющей интерес последовательности и эталонной последовательности, деленное на длину самой длинной последовательности (то есть, длину либо представляющей интерес последовательности, либо эталонной последовательности, в зависимости от того, какая последовательность длиннее). Известен ряд математических алгоритмов для достижения оптимального выравнивания и вычисления идентичности между двумя или более последовательностями, и эти алгоритмы входят в число общедоступных компьютерных программ. Примерами таких программ являются CLUSTAL-W, T-Coffee и ALIGN (для выравнивания последовательностей нуклеиновой кислоты и аминокислотных последовательностей), программы BLAST (например, BLAST 2.1, BL2SEQ и их более поздние версии) и программы FASTA (например, FASTA3x, FASTM и SSEARCH) (для выравнивания последовательностей и поиска сходства последовательностей). Алгоритмы выравнивания последовательностей также описаны, например, Altschul et al., J. Molecular Biol., 215(3): 403-410 (1990), Beigert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(10): 3770-3775 (2009), Durbin et al., eds., Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009), Soding, Bioinformatics, 21(1): 951-960 (2005), Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25(11): 3389-3402 (1997), и Gusfield, Algorithms on Strings, Trees and Sequences, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997)).

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, который содержит, состоит или, по существу, состоит из нее, аминокислотную последовательность

```

Asp Ile Gln Met Thr Xaa1 Ser
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
Arg Xaa2 Ser Gln Ser Ile Xaa3 Xaa4 Tyr Leu Asn Trp Tyr Xaa5 Gln
Lys Xaa6 Xaa7 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Xaa8 Tyr Xaa9 Ala Ser
Xaa10 Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
Ala Xaa11 Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Pro Xaa16
Thr Phe Gly Xaa17 Gly Thr Lys Xaa18 Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:
45), где (a) Xaa1

```

представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (b) Xaa2 представляет собой аланин (Ala) или треонин (Thr), (c) Xaa3 представляет собой серин (Ser), аргинин (Arg), аспарагин (Asn) или треонин (Thr), (d) Xaa4 представляет собой серин (Ser), аргинин (Arg), аспарагиновую кислоту (Asp), треонин (Thr) или глицин (Gly), (e) Xaa5 представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (f) Xaa6 представляет собой пролин (Pro) или аланин (Ala), (g) Xaa7 представляет собой глицин (Gly), лизин (Lys) или аргинин (Arg), (h) Xaa8 представляет собой изолейцин (Ile) или метионин (Met), (i) Xaa9 представляет собой аланин (Ala), глицин (Gly), аспарагиновую кислоту (Asp), треонин (Thr), серин (Ser), валин (Val) или изолейцин (Ile), (j) Xaa10 представляет собой серин (Ser) или треонин (Thr), (k) Xaa11 представляет собой валин (Val), метионин (Met) или аланин (Ala) (l) Xaa12 представляет собой серин (Ser) или аргинин (Arg), (m) Xaa13 представляет собой тирозин (Tyr), гистидин (His), фенилаланин (Phe), аспарагино-

вую кислоту (Asp), серии (Ser) или аспарагин (Asn), (n) Xaa14 представляет собой серии (Ser) или аспарагин (Asn), (o) Xaa15 представляет собой треонин (Thr), серии (Ser), аланин (Ala) или пролин (Pro), (p) Xaa16 представляет собой лейцин (Leu) или гистидин (His), (q) Xaa17 представляет собой глицин (Gly), аргинин (Arg) или глутаминовую кислоту (Glu) и (r) Xaa18 представляет собой валин (Val) или лейцин (Leu).

В одном из вариантов осуществления изобретения, выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит, состоит или, по существу, состоит из нее, аминокислотную последовательность любой одной из

SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47,  
 SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ  
 ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID  
 NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO:  
 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64,  
 SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ  
 ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID  
 NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO:  
 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81,  
 SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ  
 ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID  
 NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO:  
 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98,  
 SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102,  
 SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106,  
 SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110,  
 SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114,  
 SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118,  
 SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122,  
 SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125.

Настоящее изобретение также относится к полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, который содержит, состоит или, по существу, состоит из нее, аминокислотную последовательность

Asp  
 Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu  
 Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser  
 Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Xaa1 Trp Tyr Xaa2 Xaa3 Lys Pro Gly Gln  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Xaa4 Gly Val  
 Pro Asp Arg Phe Xaa5 Gly Ser Xaa6 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 Xaa7 Ile Xaa8 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys  
 Xaa Gln Tyr Tyr Xaa10 Ser Pro Xaa11 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 Ile Glu Xaa12 Lys (SEQ ID NO: 260),

где (a) Xaa1 представляет собой аланин (Ala) или треонин (Thr), (b) Xaa2 представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (c) Xaa3 представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (d) Xaa4 представляет собой серии (Ser), тирозин (Tyr), аспарагиновую кислоту (Asp), глицин (Gly), треонин (Thr), аспарагин (Asn), лизин (Lys), глутаминовую кислоту (Glu), лейцин (Leu), пролин (Pro) или валин (Val), (e) Xaa5 представляет собой серии (Ser) или аспарагин (Asn), (f) Xaa6 представляет собой глицин (Gly), глутаминовую кислоту (Glu), аланин (Ala), аспарагиновую кислоту (Asp), аспарагин (Asn), серии (Ser), треонин (Thr) или валин (Val), (g) Xaa7 представляет собой треонин (Thr) или изолейцин (Ile), (h) Xaa8 представляет собой серии (Ser) или изолейцин (Ile), (i) Xaa9 представляет собой глутамин (Gln) или гистидин (His), (j) Xaa10 представляет собой серии (Ser), аспарагин (Asn), аргинин (Arg), глицин (Gly) или треонин (Thr), (k) Xaa11 представляет собой лейцин (Leu) или изолейцин (Ile), и (l) Xaa12 представляет собой лейцин (Leu) или валин (Val).

В одном из вариантов осуществления изобретения, выделенный полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит, состоит или, по существу, состоит из нее, аминокислотную последовательность любой одной из

SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO:  
 262, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO:  
 266, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 268, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO:  
 270, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO:  
 274, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO:  
 278, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO:  
 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO:  
 286, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO:  
 290, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO:  
 294, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO:  
 298, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO:  
 302, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO:  
 306, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO:  
 310, SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO:  
 314, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO:  
 318, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO:  
 322, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO:  
 326, SEQ ID NO: 327 и SEQ ID NO: 328.

Если полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, по существу, состоит из аминокислотной последовательности любой одной из SEQ ID NO: 45 - SEQ ID NO: 125 или SEQ ID NO: 260 - SEQ ID NO: 328, то в этот полипептид могут быть включены дополнительные компоненты, которые, по существу, не влияют на полипептид, как описано в настоящей заявке. Если полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению состоит из аминокислотной последовательности любой одной из SEQ ID NO: 45 - SEQ ID NO: 125 или SEQ ID NO: 260 - SEQ ID NO: 328, то этот полипептид не содержит каких-либо дополнительных компонентов (то есть, компонентов, которые не являются эндогенными для полипептида легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению).

Настоящее изобретение относится к выделенному полипептиду легкой цепи иммуноглобулина, содержащему аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична) любой одной из SEQ ID NO: 45 - SEQ ID NO: 125 and SEQ ID NO: 260 - SEQ ID NO: 328. "Идентичность" последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей может быть определена описанными здесь методами.

Одна или более аминокислот вышеупомянутых полипептидов тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина могут быть заменены или замещены другой аминокислотой. "Замена" или "замещение" аминокислот означает замену одной аминокислоты в данном положении или остатке другой аминокислотой в том же самом положении или остатке полипептидной последовательности.

Аминокислоты широко подразделяются на "ароматические" или "алифатические". Ароматические аминокислоты включают ароматическое кольцо. Примерами "ароматических" аминокислот являются гистидин (H или His), фенилаланин (F или Phe), тирозин (Y или Tyr) и триптофан (W или Trp). Неароматические аминокислоты принадлежат к широкой группе "алифатических" аминокислот. Примерами "алифатических" аминокислот являются глицин (G или Gly), аланин (A или Ala), валин (V или Val), лейцин (L или Leu), изолейцин (I или Ile), метионин (M или Met), серии (S или Ser), треонин (T или Thr), цистеин (C или Cys), пролин (P или Pro), глутаминовая кислота (E или Glu), аспарагиновая кислота (D или Asp), аспарагин (N или Asn), глутамин (Q или Gln), лизин (K или Lys) и аргинин (R или Arg).

Алифатические аминокислоты могут подразделяться на четыре подгруппы. "Большая подгруппа неполярных алифатических аминокислот" состоит из валина, лейцина и изолейцина. "Подгруппа слабополярных алифатических аминокислот" состоит из метионина, серина, треонина и цистеина. "Подгруппа полярных/заряженных алифатических аминокислот" состоит из глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, аспарагина, глутамин, лизина и аргинина. "Подгруппа небольших аминокислотных остатков" состоит из глицина и аланина. Группа заряженных/полярных аминокислот может подразделяться на три подгруппы: "положительно заряженную подгруппу", состоящую из лизина и аргинина, "отрицательно заряженную подгруппу", состоящую из глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и полярную подгруппу, состоящую из аспарагина и глутамин.

Ароматические аминокислоты могут подразделяться на две подгруппы: "подгруппу с азотным кольцом", состоящую из гистидина и триптофана и "подгруппу с фенильным кольцом", состоящую из фенилаланина и тирозина.

Замена или замещение аминокислот могут быть консервативными, полуконсервативными или неконсервативными. Термин "консервативная замена аминокислот" или "консервативная мутация" означает замену одной аминокислоты другой аминокислотой, обладающей такими же свойствами. Функциональный способ определения общих свойств отдельных аминокислот представляет собой анализ нормализованной частоты встречаемости замен аминокислот в соответствующих белках гомологичных орга-

низмов (Schulz and Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)). С помощью таких анализов могут быть определены группы аминокислот, где аминокислоты, входящие в эти группы, преимущественно заменяются друг другом, а поэтому они имеют наибольшее сходство с точки зрения влияния на общую структуру белка (Schulz and Schirmer, supra).

Примерами консервативных аминокислотных замен являются замены аминокислот в вышеописанных подгруппах, например, лизина на аргинин и наоборот, так, чтобы сохранялся положительный заряд; глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту и наоборот, так, чтобы сохранялся отрицательный заряд; серина на треонин так, чтобы сохранялась свободная -ОН, и глутамина на аспарагин, так, чтобы сохранялась свободная -NH<sub>2</sub>.

"Полуконсервативные мутации" включают замены аминокислот, входящих в одни и те же перечисленные выше группы, но не в одну и ту же подгруппу. Так, например, замена аспарагиновой кислоты на аспарагин или аспарагина на лизин, означает замену аминокислот, входящих в одну и ту же группу, но в различные подгруппы. "Неконсервативные мутации" включают замены аминокислот, входящих в различные группы, например, замены лизина на триптофан, или фенилаланина на серин и т.п.

Кроме того, одна или более аминокислот могут быть введены в вышеупомянутые полипептиды тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина. В аминокислотную последовательность полипептида тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина могут быть введены любые подходящие аминокислоты в любом количестве. В соответствии с этим, в аминокислотную последовательность полипептида тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина могут быть введены по меньшей мере одна аминокислота (например, 2 или более, 5 или более или 10 или более аминокислот), но не более, чем 20 аминокислот (например, 18 или менее, 15 или менее или 12 или менее аминокислот). В некоторых вариантах осуществления изобретения, в аминокислотную последовательность полипептида тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина могут быть введены 1-10 аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот). В соответствии с этим, в любой один из вышеупомянутых полипептидов тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина может (могут) быть введена(ы) аминокислота(ы) в любом подходящем положении. Так, например, аминокислота(ы) может (могут) быть введена (ы) в CDR (например, CDR1, CDR2 или CDR3) полипептида тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина.

Выделенные полипептиды тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению не ограничиваются полипептидами, содержащими описанные здесь специфические аминокислотные последовательности. Полипептидом тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина может быть любой полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи, который конкурирует с полипептидом тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина вышеописанных последовательностей за связывание с ТИМ-3. Так, например, полипептидом тяжелой цепи или полипептидом легкой цепи иммуноглобулина может быть любой полипептид тяжелой цепи или полипептид легкой цепи, который связывается с тем же самым эпитопом ТИМ-3, распознаваемым описанными здесь полипептидами тяжелой и легкой цепей. Конкурирование антител может быть оценено с помощью рутинных анализов на конкурентное связывание пептидов, и такими анализами являются ELISA, вестерн-блот-анализ или иммуногистохимический анализ (см., например, патенты США 4828981 и 8568992; и Braitbard et al., Proteome Sci., 4: 12 (2006)).

Настоящее изобретение относится к ТИМ-3-связывающему агенту, включающему, по существу, состоящему, или состоящему из них, одну или более описанных здесь выделенных аминокислотных последовательностей согласно изобретению. Термин "ТИМ-3-связывающий агент" означает молекулу, а предпочтительно, белковую молекулу, которая специфически связывается с белком ТИМ-3. Предпочтительным ТИМ-3-связывающим агентом является антитело или его фрагмент (например, антигенсвязывающий фрагмент). ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению включает, по существу, состоит, или состоит из них, полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретения, ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению включает, по существу, состоит, или состоит из них, полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению или полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению. В другом варианте осуществления изобретения, ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению включает, по существу, состоит, или состоит из них, полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению и полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению.

Любой аминокислотный остаток полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению может быть заменен в любой комбинации другим аминокислотным остатком, либо он может быть делетирован или встроен, при условии, что такие аминокислотные замены, инсерции и/или делеции не будут значительно снижать (например, будут усиливать или повышать) биологическую активность ТИМ-3-связывающего агента. Термин "биологическая активность" ТИМ-3-связывающего агента означает, например,'affинность связывания с конкретным эпитопом ТИМ-3, нейтрализацию или ингибирование связывания ТИМ-3 с его рецептором(ами), нейтрализацию или ингибирование активности ТИМ-3 in vivo (например, IC<sub>50</sub>), фармакокинетику и перекрестную реактивность (например, с не-человеческими гомологами или ортологами белка ТИМ-3 или с другими белками или тканями). Другими биологическими свойствами или характеристика-

ми антигенсвязывающего агента, известного специалистам, являются, например, авидность, селективность, растворимость, укладка, иммунотоксичность, экспрессия и состав. Вышеупомянутые свойства или характеристики могут быть обнаружены, измерены и/или оценены стандартными методами, включая, но не ограничиваясь ими, ELISA, конкурентный ELISA, анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (BIACORE™) или KINEXA™, анализы на нейтрализацию *in vitro* или *in vivo*, анализы на связывание рецептор-лиганд, анализы на продуцирование и/или секрецию цитокинов или факторов роста, анализы на передачу сигнала и иммуногистохимические анализы.

Используемые здесь термины "ингибировать" или "нейтрализовать", если они относятся к активности ТИМ-3-связывающего агента, означают способность, по существу, блокировать, подавлять, предупреждать, ограничивать, замедлять, нарушать, изменять, элиминировать, прекращать или полностью устранять, например, биологическую активность ТИМ-3 или прогрессирование или тяжесть ТИМ-3-ассоциированного заболевания или состояния. ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению, предпочтительно, ингибирует или нейтрализует активность ТИМ-3 по меньшей мере приблизительно на 20%, приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 100% или на величину, находящуюся в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами.

ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению может представлять собой описанное здесь полноразмерное антитело или фрагмент антитела. Используемые здесь термины "часть антитела", "фрагмент антитела", "функциональный фрагмент антитела" и т.п. являются синонимами и означают один или более фрагмент антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (в общих чертах, см., Holliger et al., *Nat. Biotech.*, 23(9): 1126-1129 (2005)). ТИМ-3-связывающий агент может содержать любой ТИМ-3-связывающий фрагмент антитела. Фрагмент антитела, предпочтительно, включает, например, одну или более CDR, вариабельную область (или ее части), константную область (или ее части) или их комбинации. Примерами фрагментов антител являются, но не ограничиваются ими, (i) Fab-фрагмент, который представляет собой одновалентный фрагмент, состоящий из  $V_L$ -,  $V_H$ -,  $C_L$ - и  $CH_1$ -доменов, (ii)  $F(ab')_2$ -фрагмент, который представляет собой двухвалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, (iii) Fv-фрагмент, состоящий из  $V_L$ - и  $V_H$ -доменов одной ветви антитела, (iv) Fab'-фрагмент, образующийся в результате разрыва дисульфидного мостика  $F(ab')_2$ -фрагмента в слабых условиях восстановления, (v) стабилизированный дисульфидом Fv-фрагмент (dsFv) и (vi) доменное антитело (dAb), которое представляет собой полипептид домена одной вариабельной области ( $V_H$  или  $V_L$ ) антитела, который специфически связывается с антигеном.

В вариантах осуществления изобретения, где ТИМ-3-связывающий агент включает фрагмент полипептида тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, такой фрагмент может иметь любой размер, при условии, что он будет связываться с ТИМ-3, и предпочтительно, ингибировать активность ТИМ-3. В соответствии с этим, фрагмент полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина, предпочтительно, содержит приблизительно от 5 до 18 (например, приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или величину, находящуюся в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами) аминокислот. Аналогичным образом, фрагмент полипептида легкой цепи иммуноглобулина, предпочтительно, содержит приблизительно от 5 до 18 (например, приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или величину, находящуюся в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами) аминокислот.

Если ТИМ-3-связывающим агентом является антитело или его фрагмент, то такое антитело или его фрагмент, предпочтительно, включает константную область тяжелой цепи ( $F_c$ ) любого подходящего класса. Предпочтительно, антитело или его фрагмент включает константную область тяжелой цепи, происходящую от антител IgG1, IgG2 или IgG4 дикого типа или их вариантов. Следует отметить, что антитело каждого класса или изотипа включает конкретную серию эффекторных механизмов для удаления или нейтрализации антигена после его распознавания. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, если ТИМ-3-связывающим агентом является антитело или его фрагмент, то они могут обладать одной или более эффекторными функциями, такими как участие в антитело-зависимом комплемент-опосредованном лизисе или антитело-зависимой клеточной токсичности посредством взаимодействий с эффекторными молекулами и клетками (например, активации системы комплемента).

ТИМ-3-связывающий агент также может представлять собой фрагмент одноцепочечного антитела. Примерами фрагментов одноцепочечного антитела являются, но не ограничиваются ими, (i) одноцепочечный Fv (scFv), который представляет собой одновалентную молекулу, состоящую из двух доменов Fv-фрагмента (то есть,  $V_L$  и  $V_H$ ), связанных синтетическим линкером, что обеспечивает синтез двух доменов в виде одной полипептидной цепи (см., например, Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988); и Osbourn et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 778 (1998)) и (ii) диантитело, которое представляет собой димер полипептидных цепей, где каждая полипептидная цепь содержит  $V_H$ , присоединенный к  $V_L$  посредством пептидного линкера, который является слишком коротким для создания пары между  $V_H$ - и  $V_L$ -доменами одной и той же цепи и вынужден спариваться с ком-

плементарными  $V_L$ - и  $V_H$ -доменами других полипептидных цепей с образованием димерной молекулы, имеющей два функциональных антигенсвязывающих сайта. Фрагменты антител известны специалистам и более подробно описаны, например, в публикации заявки на патент США 2009/0093024 A1.

ТИМ-3-связывающим агентом может быть также интраантитело или его фрагмент. Интраантитело представляет собой антитело, которое экспрессируется и функционирует внутри клеток. Интраантитела обычно не содержат дисульфидных связей и способны модулировать экспрессию или активность геномишенной посредством их специфической связывающей активности. Интраантитела включают однодоменные фрагменты, такие как выделенные  $V_H$ - и  $V_L$ -домены и scFvs. Интраантитело может включать субклеточные сигналы транспорта, связанные с N- или C-концом интраантитела, что обеспечивает его экспрессию в высоких концентрациях в субклеточных компартментах, в которых присутствует белок-мишень. После взаимодействия с геном-мишенью, интраантитело модулирует функцию белка-мишени и/или обеспечивает фенотипический/функциональный нокаут по таким механизмам, как ускоренная деградация белка-мишени и секвестрация белка-мишени в нефизиологическом субклеточном компартменте. Другие механизмы инактивации генов, опосредуемой интраантителом, могут зависеть от эпитопа, против которого направлено интраантитело, например, от связывания с каталитическим сайтом на белке-мишени или с эпитопами, которые участвуют во взаимодействиях белок-белок, белок-ДНК или белок-РНК.

ТИМ-3-связывающим агентом может быть также конъюгат антитела. В соответствии с этим, ТИМ-3-связывающим агентом может быть конъюгат (1) антитела, альтернативного каркаса или его фрагментов и (2) белка или небелковой молекулы, содержащей ТИМ-3-связывающий агент. Так, например, ТИМ-3-связывающим агентом может быть полноразмерное антитело или его часть, конъюгированные с пептидом, флуоресцентной молекулой или химиотерапевтическим средством.

ТИМ-3-связывающий агент может представлять собой человеческое антитело, не-человеческое антитело или химерное антитело, либо он может происходить от них. Термин "химерный" означает антитело или его фрагмент, содержащие человеческие и не-человеческие области. Предпочтительным ТИМ-3-связывающим агентом является гуманизованное антитело. "Гуманизованное" антитело представляет собой моноклональное антитело, содержащее остов человеческого антитела и по меньшей мере одну CDR, полученную или происходящую от не-человеческого антитела. Нечеловеческими антителами являются антитела, выделенные у любых животных, не являющихся человеком, таких как, например, грызуны (например, мыши или крысы). Гуманизованное антитело может включать одну, две или три CDR, полученные или происходящие от не-человеческого антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения, CDRH3 ТИМ-3-связывающего агента согласно изобретению была получена из мышинового моноклонального антитела или происходит от этого антитела, а остальные переменные области и константная область ТИМ-3-связывающего агента согласно изобретению были получены из человеческого моноклонального антитела или происходят от этого антитела.

Человеческое антитело, нечеловеческое антитело или гуманизованное антитело могут быть получены любыми методами, включая использование *in vitro*-источников (например, гибридомы или клеточные линии, продуцирующей рекомбинантное антитело) и *in vivo*-источников (например, грызунов). Методы продуцирования антител известны специалистам и описаны, например, Köhler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5: 511-519 (1976); Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988); and Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, человеческое антитело или химерное антитело могут быть продуцированы с использованием трансгенного животного (например, мыши), где один или более эндогенных генов иммуноглобулина заменены одним или более человеческими генами иммуноглобулина. Примерами трансгенных мышей, у которых эндогенные гены антител эффективно заменены человеческими генами антител, являются, но не ограничиваются ими, Medarex HUMAB-MOUSE™, Kirin TC MOUSE™, и Kyowa Kirin KM-MOUSE™ (см., например, Lonberg, Nat. Biotechnol., 23(9): 1117-25 (2005), и Lonberg, Handb. Exp. Pharmacol., 181: 69-97 (2008)). Гуманизованное антитело может быть продуцировано любым подходящим методом, известным специалистам (см., например, An, Z. (ed.), Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009)), включая, например, присоединение не-человеческих CDR к каркасу человеческого антитела (см., например, Kashmiri et al., Methods, 36(1): 25-34 (2005); и Hou et al., J. Biochem., 144(1): 115-120 (2008)). В одном из вариантов осуществления изобретения, гуманизованное антитело может быть получено методами, описанными, например, в публикации заявки на патент США 2011/0287485 A1.

В одном из вариантов осуществления изобретения, CDR (например, CDR1, CDR2 или CDR3) или переменная область описанного здесь полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина могут быть перенесены в другую молекулу (то есть, привиты к другой молекуле), такую как антитело или полипептид, не являющийся антителом, с применением методов химии белков или техники рекомбинантных ДНК. В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к ТИМ-3-связывающему агенту, содержащему по меньшей мере одну CDR описанного здесь полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина и/или полипептида легкой цепи иммуноглобулина. ТИМ-3-связывающий

агент может включать одну, две или три CDR описанной здесь варибельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи иммуноглобулина.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, ТИМ-3-связывающий агент связывается с эпитопом ТИМ-3, который блокирует связывание ТИМ-3 с любыми его предполагаемыми лигандами (например, с фосфатидилсерином, галектином-9, белком 1, принадлежащим к группе высокомолекулярных белков (HMGB1), и молекулой 1 карциноэмбрионального антигена, ответственной за клеточную адгезию (CEACAM1)), и ингибирует ТИМ-3-опосредуемую передачу сигнала. Настоящее изобретение также относится к выделенному или очищенному эпитопу ТИМ-3, который блокирует связывание ТИМ-3 с любыми его предполагаемыми лигандами по непрямому или аллостерическому механизму.

Настоящее изобретение также относится к одной или более выделенным или очищенным последовательностям нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению и ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению.

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты" охватывает полимер ДНК или РНК, то есть, полинуклеотид, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, и который может содержать неприродные или модифицированные нуклеотиды. Используемые здесь термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" означают полимерную форму нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотиды (РНК), либо дезоксирибонуклеотиды (ДНК). Эти термины означают первичную структуру молекулы и, таким образом, включают двухцепочечную и одноцепочечную ДНК и двухцепочечную и одноцепочечную РНК. Эти термины включают, в качестве эквивалентов, аналоги РНК или ДНК, полученные из нуклеотидных аналогов и модифицированных полинуклеотидов, таких как, но не ограничивающихся ими, метилированные и/или эпигенированные полинуклеотиды. Нуклеиновые кислоты обычно связаны фосфатными связями с образованием последовательностей нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов, хотя специалистам известно и множество других связей (например, фосфотиоаты, боранофосфаты и т.п.).

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению и/или ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению. Вектором может быть, например, плазида, эписома, космида, вирусный вектор (например, ретровирусный или аденовирусный вектор) или фаг. Подходящие векторы и методы их получения хорошо известны специалистам (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)).

Вектор, помимо последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению и/или ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению, предпочтительно, содержит последовательности регуляции экспрессии, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы транскрипции, сигнальные пептиды (например, сигнальный пептид остеоонектина), внутренние сайты связывания с рибосомой (IRES) и т.п., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине. Репрезентативные последовательности регуляции экспрессии известны специалистам и описаны, например, Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

Специалистам хорошо известно большое число промоторов, включая конститутивные, индуцибельные и репрессируемые промоторы, происходящие от ряда различных источников. Репрезентативными источниками промоторов являются, например, вирусы, млекопитающие, насекомые, растения, дрожжи и бактерии, и подходящие промоторы от этих источников являются легко доступными, либо они могут быть синтезированы на основе общедоступных последовательностей, имеющихся, например, в депозитариях, таких как ATCC, а также в других коммерческих или индивидуальных источниках. Промоторы могут быть однонаправленными (то есть, инициируют транскрипцию в одном направлении) или двунаправленными (то есть, инициируют транскрипцию в 3'- или 5'-направлении). Неограничивающими примерами промоторов являются, например, бактериальная экспрессионная система T7, бактериальная экспрессионная система pBAD (araA), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV. Индуцибельными промоторами являются, например, система Tet (патенты США 5464758 и 5814618), индуцибельная система Экдизона (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 3346-3351 (1996)), система T-REX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), система LACSWITCH™ (Stratagene, San Diego, CA) и индуцибельная система тамоксифен-рекомбиназы Cre-ERT (Indra et al., *Nuc. Acid. Res.*, 27: 4324-4327 (1999); *Nuc. Acid. Res.*, 28: e99 (2000); патент США 7112715; и Kramer & Fussenegger, *Methods Mol. Biol.*, 308: 123-144 (2005) ).

Используемый здесь термин "энхансер" означает последовательность ДНК, которая усиливает транскрипцию, например, последовательности нуклеиновой кислоты, к которой она функционально присоединена. Энхансеры могут быть расположены на расстоянии многих тысяч пар оснований от коди-

рующей области последовательности нуклеиновой кислоты и могут опосредовать связывание регуляторных факторов, паттерны метилирования ДНК или изменения структуры ДНК. Специалистам хорошо известно большое число энхансеров, происходящих от ряда различных источников, и эти энхансеры являются доступными или присутствуют в клонированных полинуклеотидах (например, имеются в депозитариях, таких как ATCC, а также в других коммерческих или индивидуальных источниках). Ряд полинуклеотидов, содержащих промоторы (такие как общедоступный промотор CMV), также включает энхансерные последовательности. Энхансеры могут быть расположены выше кодирующих последовательностей, внутри этих последовательностей или ниже.

Вектор также может включать "селективный маркерный ген". Используемый здесь термин "селективный маркерный ген" означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает специфический отбор клеток, экспрессирующих последовательность нуклеиновой кислоты, на присутствие или отсутствие соответствующего селективного агента. Подходящие селективные маркерные гены известны специалистам и описаны, например, в публикациях Международных патентных заявок WO 1992/008796 и WO 1994/028143; Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567-3570 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527-1531 (1981); Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072-2076 (1981); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150: 1-14 (1981); Santerre et al., Gene, 30: 147-156 (1984); Kent et al., Science, 237: 901-903 (1987); Wigler et al., Cell, 11: 223-232 (1977); Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026-2034 (1962); Lowy et al., Cell, 22: 817-823 (1980); и в патентах США 5122464 и 5770359.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектором является "эписомный экспрессионный вектор" или "эписома", которые обладают способностью реплицироваться в клетке-хозяине и находиться в клетке-хозяине в виде внехромосомного сегмента ДНК при соответствующем давлении отбора (см., например, Conese et al., Gene Therapy, 11: 1735-1742 (2004)). Репрезентативными коммерчески доступными эписомными экспрессионными векторами являются, но не ограничиваются ими, эписомные плазмиды, которые используют ядерный антиген 1 вируса Эпштейна-Барра (EBNA1) и ориджин репликации (oriP) вируса Эпштейна-Барра (EBV). Векторы pREP4, pCEP4, pREP7 и pcDNA3.1 от Invitrogen (Carlsbad, CA) и pBK-CMV от Stratagene (La Jolla, CA) являются неограничивающими примерами эписомного вектора, который вместо EBNA1 и oriP использует T-антиген и ориджин репликации SV40.

Другими подходящими векторами являются интегрирующие экспрессионные векторы, которые могут произвольно интегрироваться в ДНК клетки-хозяина или включать сайт рекомбинации, обеспечивающий специфическую рекомбинацию между экспрессионным вектором и хромосомой клетки-хозяина. Такие интегрирующие экспрессионные векторы могут использовать эндогенные последовательности регуляции экспрессии хромосом клеток-хозяев для экспрессии нужного белка. Примерами векторов, которые интегрируются по сайт-специфическому механизму, являются, например, компоненты системы flp-in от Invitrogen (Carlsbad, CA) (например, pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT) или системы Cre-lox, которые могут присутствовать в коровых векторах pExchange-6 от Stratagene (La Jolla, CA). Примерами векторов, которые произвольно интегрируются в хромосомы клеток-хозяев, являются, например, pcDNA3.1 (при введении в отсутствие T-антигена) от Life Technologies (Carlsbad, CA), UCOE от Millipore (Billerica, MA) и pCI или pFN10A (ACT) FLEXI<sup>TM</sup> от Promega (Madison, WI).

Могут быть также использованы вирусные векторы. Репрезентативными коммерчески доступными вирусными экспрессионными векторами являются, но не ограничиваются ими, аденовирусная система Per.C6 от Crucell, Inc. (Leiden, The Netherlands), лентивирусная система pLP1 от Invitrogen (Carlsbad, CA), и ретровирусные векторы pFB-ERV плюс pCFB-EGSH от Stratagene (La Jolla, CA).

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности согласно изобретению, могут присутствовать в клетке на одном и том же векторе (то есть, в цисположении). Однонаправленный промотор может быть использован для регуляции экспрессии каждой последовательности нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления изобретения для регуляции экспрессии множества последовательностей нуклеиновой кислоты может быть использована комбинация двунаправленных и однонаправленных промоторов. Альтернативно, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности согласно изобретению, могут присутствовать в популяции клеток на отдельных векторах (то есть, в трансположении). Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в каждом отдельном векторе может содержать одинаковые или различные последовательности регуляции экспрессии. Отдельные векторы могут быть введены в клетки одновременно или последовательно.

Вектор(ы), содержащий(е) нуклеиновую кислоту (нуклеиновые кислоты), кодирующую(ие) аминокислотные последовательности согласно изобретению, может (могут) быть введен(ы) в клетку-хозяина, способную экспрессировать полипептиды, кодируемые этими нуклеиновыми кислотами, и такими клетками являются любые подходящие прокариотические или эукариотические клетки. Так, например, настоящее изобретение относится к выделенной клетке, содержащей вектор согласно изобретению. Предпочтительными клетками-хозяевами являются клетки, которые могут легко и надежно размножаться, быстро растут в условиях голодания, имеют хорошо охарактеризованные экспрессионные системы и мо-

гут быть легко и эффективно трансформированы или трансфецированы.

Примерами подходящих прокариотических клеток являются, но не ограничиваются ими, клетки рода *Bacillus* (такие как *Bacillus subtilis* и *Bacillus brevis*), *Escherichia* (такие как *E. coli*), *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Salmonella* и *Erwinia*. Особенно подходящими прокариотическими клетками являются различные штаммы *Escherichia coli* (например, K12, HB101 (ATCC No. 33694), DH5a, DH10, MC1061 (ATCC No. 53338) и CC102).

Предпочтительно, вектор вводят в эукариотическую клетку. Подходящие эукариотические клетки известны специалистам, и такими клетками являются, например, дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Примерами подходящих дрожжевых клеток являются клетки рода *Kluveromyces*, *Pichia*, *Rhino-sporidium*, *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*.

Предпочтительными дрожжевыми клетками являются, например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Подходящие клетки насекомых описаны, например, Kitts et al., *Biotechniques*, 14: 810-817 (1993); Lucklow, *Cult. Opin. Biotechnol.*, 4: 564-572 (1993); и Lucklow et al., *J. Virol.*, 67: 4566-4579 (1993). Предпочтительными клетками насекомых являются Sf-9 и HI5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

В настоящем изобретении предпочтительно используются клетки млекопитающих. Специалистам известен ряд подходящих клеток-хозяев млекопитающих, и многие из них имеются в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA). Примерами подходящих клеток млекопитающих являются, но не ограничиваются ими, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (ATCC No. CCL61), DHFR-клетки CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4216-4220 (1980)), клетки почек человеческого эмбриона (HEK) 293 или клетки 293T (ATCC No. CRL1573) и клетки 3T3 (ATCC No. CCL92). Другими подходящими клеточными линиями млекопитающих являются обезьяньи клеточные линии COS-1 (ATCC No. CRL1650) и COS-7 (ATCC No. CRL1651), а также клеточная линия CV-1 (ATCC No. CCL70). Другими репрезентативными клетками-хозяевами млекопитающих являются клеточные линии приматов и клеточные линии грызунов, включая трансформированные клеточные линии. Подходящими также являются нормальные диплоидные клетки, клеточные штаммы, происходящие от *in vitro* культуры первичной ткани, а также первичные эксплантаты. Другими подходящими клеточными линиями млекопитающих являются, но не ограничиваются ими, мышинные клетки нейробластомы N2A, HeLa, мышинные клетки L-929 и клеточные линии хомячка ВНК или HaK, и все эти клетки имеются в ATCC. Методы отбора подходящих клеток-хозяев млекопитающих и методы трансформации, культивирования, амплификации, скрининга и очистки клеток известны специалистам.

В одном из вариантов осуществления изобретения, клеткой млекопитающего является человеческая клетка. Так, например, клеткой млекопитающего может быть человеческая лимфоидная клеточная линия или клеточная линия, происходящая от этой линии, такая как клеточная линия первичных В-лимфоцитов. Примерами человеческих лимфоидных клеточных линий являются, но не ограничиваются ими, клетки RAMOS (CRL-1596), Дауди (CCL-213), EB-3 (CCL-85), DT40 (CRL-2111), 18-81 (Jack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 1581-1585 (1988)), Raji-клетки (CCL-86), клетки PER.C6 (Crucell Holland B.V., Leiden, The Netherlands) и их производные.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность согласно изобретению, может быть введена в клетку путем "трансфекции", "трансформации" или "трансдукции". Используемые здесь термины "трансфекция", "трансформация" или "трансдукция" означают введение одного или более экзогенных полинуклеотидов в клетку-хозяина физическими или химическими методами. Специалистам известно множество методов трансфекции, и эти методы включают, например, копреципитацию ДНК фосфатом кальция (см., например, Murray E.J.(ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)); метод с использованием DEAE-декстрана; электропорацию; трансфекцию, опосредуемую катионными липосомами; бомбардировку микрочастицами, осуществляемую с использованием вольфрамовых частиц (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); и копреципитацию ДНК фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)). Фаговые или вирусные векторы могут быть введены в клетки-хозяева после культивирования инфекционных частиц в подходящих упаковывающих клетках, многие из которых являются коммерчески доступными.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей эффективное количество полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, полипептида легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, Т1М-3-связывающего агента согласно изобретению, последовательности нуклеиновой кислоты согласно изобретению, кодирующей любой из вышеуказанных агентов, или вектора согласно изобретению, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Предпочтительно, композиция представляет собой фармацевтически приемлемую (например, физиологически приемлемую) композицию, которая содержит носитель, а предпочтительно, фармацевтически приемлемый (например, физиологически приемлемый) носитель и аминокислотные последовательности, антигенсвязывающий агент или вектор согласно изобретению. В настоящем изобретении может быть использован любой подходящий носитель, и такие носители хорошо известны специалистам. Выбор носителя зависит, в частности, от конкретного участка, в который может быть введена композиция, и от

конкретного метода введения композиции. Композиция может быть, но необязательно, стерильной. Композиция может быть заморожена или лиофилизована для ее хранения и разведена подходящим стерильным носителем перед ее применением. Композиции могут быть получены стандартными методами, описанными, например, в руководстве Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001).

Настоящее изобретение также относится к способу лечения расстройства у млекопитающего, чувствительного к ингибированию или нейтрализации ТИМ-3. Этот способ включает введение вышеупомянутой композиции млекопитающему, страдающему расстройством, которое поддается лечению посредством ингибирования или нейтрализации ТИМ-3, и тем самым лечение этого расстройства у млекопитающего. Расстройство, "поддающееся лечению посредством ингибирования ТИМ-3" или "поддающееся лечению посредством нейтрализации ТИМ-3", означает любое заболевание или расстройство, при котором у млекопитающего, а предпочтительно, у человека, снижение уровней или активности ТИМ-3 дает терапевтический эффект, или при котором неадекватная экспрессия (например, сверхэкспрессия) или повышенная активность ТИМ-3 вызывает или стимулируют патологические эффекты этого заболевания или расстройства. Расстройствами, поддающимися лечению посредством ингибирования ТИМ-3, являются, например, рак, инфекционные заболевания и аутоиммунные заболевания. Способ согласно изобретению может быть применен для лечения рака любого типа, известного специалистам, такого как, например, меланома, почечноклеточная карцинома, рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак носоглотки, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак слюнных желез, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, лейкоз, лимфома или карцинома клеток Меркеля (см., например, Bhatia et al., *Curr. Oncol. Rep.*, 13(6) : 488-497 (2011)). Способ согласно изобретению может быть применен для лечения инфекционного заболевания любого типа (то есть, заболевания или расстройства, вызываемого бактериями, вирусами, грибами или паразитами). Примерами инфекционных заболеваний, которые могут быть подвергнуты лечению способом согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, заболевания, вызываемые вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), вирусом гриппа, вирусом денге, вирусом гепатита В (HBV) или вирусом гепатита С (HCV). Способ согласно изобретению может быть применен для лечения аутоиммунного заболевания любого типа (то есть, заболевания или расстройства, вызываемого гиперактивностью иммунной системы, при которой организм атакует и повреждает свои собственные ткани), такие как заболевания, описанные, например, MacKay I.R. and Rose N.R., eds., *The Autoimmune Diseases*, Fifth Edition, Academic Press, Waltham, MA (2014). Примерами аутоиммунных заболеваний, которые могут быть подвергнуты лечению способом согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, рассеянный склероз, сахарный диабет типа 1, ревматоидный артрит, склеродермия, болезнь Крона, псориаз, системная красная волчанка (СКВ) и язвенный колит.

Введение композиции, содержащей полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, полипептид легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению, последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению, кодирующую любой из вышеуказанных агентов, или вектор согласно изобретению, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению, индуцирует иммунный ответ против рака или инфекционного заболевания у млекопитающего. "Иммунный ответ" может вызывать, например, продуцирование антител и/или активацию иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток).

Используемые здесь термины "лечение", "терапия" и т.п. означает достижение желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Предпочтительным эффектом является терапевтический эффект, то есть, эффект частичного или полного устранения заболевания и/или негативного симптома, ассоциированного с этим заболеванием. Для этой цели применяется способ согласно изобретению, включающий "терапевтически эффективное количество" ТИМ-3-связывающего агента.

"Терапевтически эффективное количество" означает количество, которое является эффективным в соответствующих дозах и в течение необходимого периода времени для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность ТИМ-3-связывающего агента вырабатывать нужный ответ у индивидуума. Так, например, терапевтически эффективным количеством ТИМ-3-связывающего агента согласно изобретению является количество, снижающее биоактивность ТИМ-3 у человека.

Альтернативно, фармакологический и/или физиологический эффекты могут быть профилактическими, то есть, они могут полностью или частично предупреждать заболевание или его симптом. В соответствии с этим, способ согласно изобретению включает введение "профилактически эффективного количества" ТИМ-3-связывающего агента. "Профилактически эффективное количество" означает количество, которое является эффективным в соответствующих дозах и в течение необходимого периода времени для достижения желаемого профилактического результата (например, предупреждения начала развития заболевания).

Типичная доза может составлять, например, в пределах от 1 пг/кг до 20 мг/кг массы тела животного или человека; однако в объем настоящего изобретения входят дозы, величина которых ниже или выше

этого репрезентативного интервала. Суточная парентеральная доза может составлять приблизительно от 0,00001 мкг/кг до приблизительно 20 мг/кг общей массы тела (например, приблизительно 0,001 мкг/кг, приблизительно 0,1 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 5 мкг/кг, приблизительно 10 мкг/кг, приблизительно 100 мкг/кг, приблизительно 500 мкг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, или в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами), предпочтительно, приблизительно от 0,1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг общей массы тела (например, приблизительно 0,5 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 50 мкг/кг, приблизительно 150 мкг/кг, приблизительно 300 мкг/кг, приблизительно 750 мкг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, или в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами), более предпочтительно, приблизительно от 1 мкг/кг до 5 мг/кг общей массы тела (например, приблизительно 3 мкг/кг, приблизительно 15 мкг/кг, приблизительно 75 мкг/кг, приблизительно 300 мкг/кг, приблизительно 900 мкг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, или в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами), и еще более предпочтительно, приблизительно от 0,5 до 15 мг/кг общей массы тела в день (например, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 11 мг/кг, приблизительно 13 мг/кг, или в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами). Мониторинг терапевтической или профилактической эффективности может быть проведен путем периодического обследования пациентов, подвергаемых лечению. В зависимости от условий, лечение может быть проведено повторно в течение нескольких дней или более до желаемого подавления симптомов заболевания, или альтернативно, лечение может продолжаться в течение всей жизни пациента. Однако могут быть применены и другие схемы введения доз, и эти схемы входят в объем настоящего изобретения. Нужная доза может быть доставлена путем введения одной ударной дозы композиции, нескольких ударных доз композиции или непрерывного вливания композиции.

Композиция, содержащая эффективное количество полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, полипептида легкой цепи иммуноглобулина согласно изобретению, ТИМ-3-связывающего агента согласно изобретению, последовательности нуклеиновой кислоты согласно изобретению, кодирующей любой из вышеуказанных агентов, или вектора согласно изобретению, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению, может быть введена млекопитающему стандартными методами введения, включая пероральное, внутривенное, внутривенное, подкожное, пульмональное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, трансбуккальное и подязычное введение или введение посредством суппозитория. Предпочтительно, такая композиция является подходящей для парентерального введения. Используемый здесь термин "парентеральный" включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутривенное введение. Более предпочтительно, такую композицию вводят млекопитающему посредством периферической системы доставки путем внутривенной, внутривенной или подкожной инъекции.

После введения млекопитающему (например, человеку) ТИМ-3-связывающего агента согласно изобретению, его биологическая активность может быть определена любым подходящим методом, известным специалистам. Так, например, биологическая активность может быть оценена путем определения стабильности конкретного ТИМ-3-связывающего агента. В одном из вариантов осуществления изобретения, ТИМ-3-связывающий агент (например, антитело) имеет время полужизни *in vivo* приблизительно от 30 мин и до 45 дней (например, приблизительно 30 мин, приблизительно 45 мин, приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 6 ч, приблизительно 10 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 1 день, приблизительно 5 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 25 дней, приблизительно 35 дней, приблизительно 40 дней, приблизительно 45 дней, или в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами). В другом варианте осуществления изобретения, ТИМ-3-связывающий агент имеет время полужизни *in vivo* приблизительно от 2 ч и до 20 дней (например, приблизительно 5 ч, приблизительно 10 ч, приблизительно 15 ч, приблизительно 20 ч, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 7 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 19 дней, или в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами). В другом варианте осуществления изобретения, ТИМ-3-связывающий агент имеет время полужизни *in vivo* приблизительно от 10 дней до приблизительно 40 дней (например, приблизительно 10 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 23 дня, приблизительно 26 дней, приблизительно 29 дней, приблизительно 30 дней, приблизительно 33 дня, приблизительно 37 дней, приблизительно 38 дней, приблизительно 39 дней, приблизительно 40 дней, или в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами).

Стабильность ТИМ-3-связывающего агента согласно изобретению может быть определена с помощью любого другого подходящего анализа, известного специалистам, такого как, например, определение время полужизни в сыворотке, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), анализы на тепловой сдвиг и анализы "пульс-чейз". Другие методы оценки стабильности белка *in vivo* и *in vitro*, которые могут быть применены в соответствии с настоящим изобретением, описаны, например, в Protein Stability and Folding, B.A. Shirley (ed.), Human Press, Totowa, New Jersey (1995); Protein Structure, Stability, and In-

teractions (Methods in Molecular Biology), Shiver J.W. (ed.), Humana Press, New York, NY (2010); и Ignatova, Microb. Cell Fact., 4: 23 (2005). Стабильность TIM-3-связывающего агента согласно изобретению может быть определена по величине средней точки перехода ( $T_m$ ), представляющей собой температуру, при которой 50% аминокислотной последовательности присутствует в своей нативной конформации, а остальные 50% денатурируются. Вообще говоря, чем выше  $T_m$ , тем более стабильным является белок. В одном из вариантов осуществления изобретения, TIM-3-связывающий агент согласно изобретению имеет величину средней точки перехода ( $T_m$ ) *in vitro*, составляющую приблизительно 60-100°C. Так, например, TIM-3-связывающий агент согласно изобретению может иметь  $T_m$  *in vitro*, составляющую приблизительно 65-80°C (например, 66°C, 68°C, 70°C, 71°C, 75°C или 79°C), приблизительно 80-90°C (например, приблизительно 81°C, 85°C или 89°C), или приблизительно 90-100°C (например, приблизительно 91°C, приблизительно 95°C, или приблизительно 99°C).

Биологическая активность конкретного TIM-3-связывающего агента может быть также оценена путем определения аффинности его связывания с TIM-3 или с его эпитопом. Термин "аффинность" означает константу равновесия для обратимого связывания двух агентов и выражается как константа диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность связывания агента с лигандом, такая как аффинность связывания антитела с эпитопом, может составлять, например, приблизительно от 1 пикомоль (пМ) до приблизительно 100 микромоляр (мкМ) (например, приблизительно от 1 пикомоль (пМ) до приблизительно 1 наномоль (нМ), приблизительно от 1 нМ до приблизительно 1 микромоляр (мкМ), или приблизительно от 1 мкМ до приблизительно 100 мкМ). В одном из вариантов осуществления изобретения, TIM-3-связывающий агент может связываться с белком TIM-3 с  $K_D$  менее, чем или равным 1 наномоль (например, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ, 0,025 нМ, 0,01 нМ, 0,001 нМ или в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами). В другом варианте осуществления изобретения, TIM-3-связывающий агент может связываться с белком TIM-3 с  $K_D$  менее, чем или равным 200 пМ (например, 190 пМ, 175 пМ, 150 пМ, 125 пМ, 110 пМ, 100 пМ, 90 пМ, 80 пМ, 75 пМ, 60 пМ, 50 пМ, 40 пМ, 30 пМ, 25 пМ, 20 пМ, 15 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ, или в интервале, определенном любыми двумя вышеупомянутыми величинами). Аффинность иммуноглобулина по отношению к представляющему интерес антигену или эпитопу может быть оценена с помощью любого известного анализа. Такими методами являются, например, клеточный сортинг с активацией флуоресценции (FACS), метод с использованием отдельных сфер (например, магнитных сфер), поверхностный плазмонный резонанс (ППР), анализ на конкурентное связывание в жидкой фазе (KINEXA™), пэннинг антигена, анализы на конкурентное связывание и/или ELISA (см., например, Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th ed., Garland Publishing, New York, NY, 2001).

TIM-3-связывающий агент согласно изобретению может быть введен отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами. Так, например, TIM-3-связывающий агент может быть введен в комбинации с другими средствами для лечения или профилактики описанных здесь заболеваний, такими как средства, которые являются цитотоксичными для раковых клеток, модулируют иммуногенность раковых клеток или стимулируют иммунные ответы на раковые клетки. В соответствии с этим, например, TIM-3-связывающий агент может быть использован в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым средством, включая, например, любое химиотерапевтическое средство, известное специалистам; ионизирующее излучение; низкомолекулярные противораковые средства; противораковые вакцины; биологические терапевтические средства (например, другие моноклональные антитела, противораковые вирусы, средства для генотерапии и адоптивный перенос Т-клеток) и/или хирургическую операцию. Если способ согласно изобретению применяется для лечения инфекционного заболевания, то TIM-3-связывающий агент может быть введен в комбинации по меньшей мере с одним антибактериальным средством или по меньшей мере с одним противовирусным средством. В соответствии с этим, таким антибактериальным средством может быть любой подходящий антибиотик, известный специалистам. Противовирусным средством может быть любая вакцина любого подходящего типа, которая специфически нацелена на конкретный вирус (например, "живые" аттенюированные вакцины, субъединичные вакцины, вакцины на основе рекомбинантного вектора и низкомолекулярные противовирусные терапевтические средства (например, ингибиторы репликации вируса и нуклеозидные аналоги). Если способ согласно изобретению применяется для лечения аутоиммунного заболевания, то TIM-3-связывающий агент может быть использован в комбинации с противовоспалительным средством, включая, например, кортикостероиды (например, преднизон и флутиказон) и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (НСПВС) (например, аспирин, ибупрофен и напроксен).

В другом варианте осуществления изобретения, если TIM-3-связывающий агент согласно изобретению используется для лечения рака или инфекционного заболевания, то TIM-3-связывающий агент может быть введен в комбинации с другими агентами, которые ингибируют иммунные пути сверхточных точек. Так, например, TIM-3-связывающий агент согласно изобретению может быть введен в комбинации с агентами, которые ингибируют или подавляют пути белка запрограммированной гибели 1 (PD-1), белка гена активации лимфоцитов-3 (LAG-3), и/или белка 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4). Было продемонстрировано, что комбинированная терапия, одновременно на-

правленная на два или более этих иммунных путей сверхточных точек, повышает, возможно синергически, противоопухольевую активность (см., например, Sakuishi et al., *J. Exp. Med.*, 207: 2187-2194 (2010); Ngiow et al., *Cancer Res.*, 71: 3540-3551 (2011); и Woo et al., *Cancer Res.*, 72: 917-927 (2012)). В одном из вариантов осуществления изобретения, ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению вводят в комбинации с антителом, которое связывается с LAG-3 и/или с антителом, которое связывается с PD-1. В соответствии с этим, способ согласно изобретению, применяемый для лечения расстройства, восприимчивого к ингибированию ТИМ-3 (например, рака или инфекционного заболевания) у млекопитающего, может также включать введение млекопитающему композиции, содержащей (i) антитело, которое связывается с белком ТИМ-3 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель, или композиции, содержащей (i) антитело, которое связывается с белком PD-1, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

Описанный здесь ТИМ-3-связывающий агент, помимо его применения в терапии, может быть использован в диагностических или в исследовательских целях. В соответствии с этим, ТИМ-3-связывающий агент может быть использован в методе диагностики расстройства или заболевания, при которых неадекватная экспрессия (например, сверхэкспрессия) или повышенная активность ТИМ-3 вызывает или стимулирует патологические эффекты этого заболевания или расстройства. Аналогичным образом, ТИМ-3-связывающий агент может быть использован в анализе для мониторинга уровней белка ТИМ-3 у индивидуума, обследуемого на наличие заболевания или расстройства, восприимчивого к ингибированию ТИМ-3. Методами, применяемыми в исследовательских целях, являются, например, методы, в которых используются ТИМ-3-связывающий агент и метка для детектирования белка ТИМ-3 в образце, например, в человеческой физиологической жидкости или в клеточном или тканевом экстракте. ТИМ-3-связывающий агент может быть использован без модификации или с модификацией, такой как ковалентное или нековалентное мечение детектируемой молекулой. Так, например, детектируемой молекулой может быть радиоизотоп (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^{125}\text{I}$ ), флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение (например, флуоресцеин-изотиоцианат, родамин или люциферин), фермент (например, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена) или простетические группы. В соответствии с настоящим изобретением может быть применен любой известный метод отдельного конъюгирования антигенсвязывающего агента (например, антитела) с детектируемой молекулой (см., например, Hunter et al., *Nature*, 194: 495-496 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40: 219-230 (1981); и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982)).

Уровни белка ТИМ-3 могут быть измерены с использованием ТИМ-3-связывающего агента согласно изобретению любым подходящим методом, известным специалистам. Такими методами являются, например, радиоиммуноанализ (РИА) и FACS. Нормальные или стандартные величины экспрессии ТИМ-3 могут быть получены любым подходящим методом, например, путем объединения образца, содержащего или, предположительно, содержащего ТИМ-3 и ТИМ-3-специфическое антитело, в условиях, подходящих для образования комплекса антиген-антитело. Антитело прямо или опосредованно метят детектируемым веществом для облегчения детектирования связанного или несвязанного антитела. Подходящими детектируемыми веществами являются различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества и радиоактивные вещества (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)). Затем количество полипептида ТИМ-3, экспрессируемого в образце, сравнивают со стандартной величиной.

ТИМ-3-связывающий агент может содержаться в наборе, то есть, в упаковке, содержащей комбинацию реагентов в предварительно определенных количествах и инструкции по осуществлению диагностического анализа. Если ТИМ-3-связывающий агент метят ферментом, то набор, предпочтительно, включает субстраты и кофакторы, утилизируемые ферментом (например, предшественник субстрата, который представляет собой детектируемый хромофор или флуорофор). Кроме того, в набор могут быть включены и другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или буфер для лизиса) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться в зависимости от концентрации реагентов в растворе, которые значительно оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут быть получены в виде сухих порошков (обычно лиофилизированных), включая наполнители, которые после растворения образуют раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию.

Кроме того, настоящее изобретение проиллюстрировано на нижеследующих примерах, которые не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

#### Пример 1.

В этом примере продемонстрирован метод идентификации антител, направленных против человеческого ТИМ-3, в выделенной библиотеке и аффинного созревания идентифицированных антител.

Выделенная библиотека IgG, полученная на основе сегментов последовательности V-гена зародышевой линии, присоединенных к рекомбинантным (D)J-областям, полученным от человека-донора, была сконструирована как описано Bowers et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(51) : 20455-20460 (2011). Тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) IgG клонировали в отдельные эпизомные векторы (Horlick et al., *Gene*, 243(1-2): 187-194 (2000)), где каждый вектор кодирует отдельный маркер, селективный по отношению к антибиотик. Клетки, экспрессирующие поверхностные полностью человеческие антитела, кото-

рые связываются с человеческим TIM-3, были идентифицированы с помощью скрининг-анализа выделенной библиотеки с использованием магнитных сфер, покрытых внеклеточным доменом huTIM-3. Была выделена панель антител, которые специфически связываются с TIM-3.

Стабильные клеточные линии, коэкспрессирующие HC и LC каждого антитела, идентифицированного с использованием вышеописанной выделенной библиотеки, трансфецировали цитидиндезаминазой, индуцируемой путем активации, (AID) для инициации SHM *in vitro*. AID была также сразу перенесена в исходную смешанную популяцию клеток, размноженных путем скрининга библиотеки. Во всех случаях, клеточные популяции окрашивали на экспрессию IgG и связывание с антигеном, собирали с помощью проточной цитометрии в виде объемной популяции, а затем размножали для анализа последовательности путем секвенирования последующего поколения (NGS). Эту процедуру несколько раз повторяли для аккумуляции происходящих от SHM мутаций в переменных областях тяжелой и легкой цепей и их производных для каждой стратегии. Созревание наилучших антител в первичной библиотеке было продемонстрировано в исследованиях по связыванию с использованием VIACORE™ и по связыванию с TIM-3, присутствующим на поверхности клеточной линии CHO.

Зрелые антитела охарактеризовывали на строгое выполнение требований по продуцированию терапевтических антител, включая оценку критерия "продуцируемости", а также функциональные анализы на активность всех этих антител. Критериями продуцируемости являются термостабильность, уровень экспрессии, отсутствие нежелательных мотивов последовательностей (например, N-связанных сайтов гликозилирования переменной области, свободных цистеинов, наиболее вероятных сайтов дезамидирования, изомеризации и т.п.). Кроме того, для облегчения преclinical испытаний были выбраны антитела, обладающие высокой аффинностью связывания с TIM-3 собакоподобных обезьян. Были идентифицированы главные и дополнительные антитела с сильной антагонистической активностью, которые удовлетворяли всем критериям последующего продуцирования. Главное антитело содержало полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, включающий SEQ ID NO: 34 и полипептид легкой цепи иммуноглобулина, включающий SEQ ID NO: 115, и это антитело было обозначено APE5137. CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи APE5137 содержали SEQ ID NN: 329, 330 и 331, соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи APE5137 содержали SEQ ID NN: 332, 333 и 334, соответственно. Дополнительное антитело содержало полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина, включающий SEQ ID NO: 238 и полипептид легкой цепи иммуноглобулина, включающий SEQ ID NO: 327, и это антитело было обозначено APE5121. CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи APE5121 содержали SEQ ID NN: 335, 336 и 337, соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи APE5121 содержали SEQ ID NN: 338, 339 и 340, соответственно.

Характеристики главного и дополнительного анти-TIM-3 антитела описаны в табл. 1.

Таблица 1

	Тяжелая цепь SEQ ID NO	Легкая цепь SEQ ID NO	VIACORE™ KD		T <sub>m</sub> (Анализ ThermoFluor)	Неспецифическое связывание	Чистота (эксклюзивная хроматография)
			TIM-3 человека	TIM-3 собакоподобной обезьяны			
Главное антитело	34	115	50 нМ	190 нМ	72°C	Не детектируемое	>97%
Дополнительное антитело	238	327	<50 нМ	1,5 нМ	71°C	Не детектируемое	>97%

Результаты этого примера подтвердили эффективность метода аффинного созревания моноклональных антител, направленных против TIM-3 и идентифицированных с использованием выделенной библиотеки.

#### Пример 2.

В этом примере было продемонстрировано, что моноклональное анти-TIM-3 антитело согласно изобретению может ингибировать передачу TIM-3-сигнала и усиливать активацию Т-клеток *in vitro* отдельно и в комбинации с анти-PD-1 антителом.

Функциональную антагонистическую активность антител с улучшенными TIM-3-связывающими свойствами (как описано в примере 1) тестировали в анализе на реакцию смеси лимфоцитов и человеческих CD4<sup>+</sup>-Т-клеток (MLR), где активацию CD4<sup>+</sup>-Т-клеток в присутствии анти-TIM-3 антител анализировали путем оценки секреции IL-2. Анти-TIM-3 антитела тестировали отдельно или в комбинации с 2 нг/мл или 20 нг/мл антагонистического анти-PD-1 антитела. В частности, выделенные моноциты периферической крови человека-донора дифференцировали в дендритные клетки (ДК), а затем смешивали с CD4<sup>+</sup>-Т-клетками, выделенными у другого донора. Уровни IL-2 измеряли через 48 ч. Предполагается, что антагонистическое действие TIM-3, взятого отдельно и в комбинации с антагонистом PD-1, будет приводить к повышению активации Т-клеток, как было оценено по увеличению уровня продуцирования IL-2. Анти-TIM-3 антитело, взятое отдельно и в комбинации с анти-PD1 антителом, увеличивало уровень секреции IL-2 через 48 ч в анализе на MLR, а анти-TIM-3 антитело, взятое в комбинации с анти-PD1 антите-

лом, обладало повышенной активностью как показано на фиг. 1A-1D.

Результаты этого примера продемонстрировали, что ТИМ-3-связывающий агент согласно изобретению, взятый отдельно и в комбинации с антагонистами других негативных регуляторов иммунной системы, может ингибировать биологическую активность ТИМ-3.

#### Пример 3.

В этом примере продемонстрировано, что анти-ТИМ-3 антитело ингибирует активность ТИМ-3 у мышей с моделью сингенной опухоли.

Суррогатные крысиные антитела, распознающие мышинный PD-1 (RMP1-14) и мышинный ТИМ-3 (RMT3-23), были закуплены у Bio X Cell (West Lebanon, NH) и протестированы на модели сингенной опухоли как отдельно, так и в комбинации. В частности, клетки аденокарциномы толстой кишки MC38 ( $1 \times 10^6$ , s.c.) имплантировали мышам C57B1/6 и культивировали в течение 10 дней. Мышей с опухолями размером 40-90 мм<sup>3</sup> произвольно распределяли (день такого распределения обозначали как день 1) на четыре группы по 10 животных/группу и вводили дозы каждого антитела в количестве 10 мг/кг на дни 1, 4, 8 и 11. Мыши, которым инъецировали PBS, служили в качестве контроля. Размер опухоли измеряли два раза в неделю до тех пор, пока он не достигал 2000 мм<sup>3</sup>, и этот размер определяли как конечную точку, после которой мышей умерщвляли. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 2A-2D, и было продемонстрировано, что комбинация суррогатных анти-PD-1 и анти-ТИМ-3 антител может ингибировать рост опухоли у мышинной модели, что позволяет предположить, что двойная блокада иммунных путей сверточной точки может повышать клиническую эффективность.

#### Пример 4.

В этом примере продемонстрированы некоторые эффекты антитела определенного изотипа, влияющие на противоопухолевую активность анти-ТИМ-3 антитела, взятого отдельно или в комбинации с анти-PD-1 антителом у мышей с моделью сингенной опухоли.

Суррогатные крысиные/мышинные химерные антитела, распознающие мышинный PD-1 и мышинный ТИМ-3 и принадлежащие к изотипам мышинных IgG1(D265A) и мышинных IgG2a, были сконструированы из крысиных антител, протестированных в примере 3. Эти антитела тестировали на модели сингенной опухоли MC38 отдельно и в комбинации с анти-PD-1 антителом мышинного изотипа IgG1(D265A). В частности, клетки аденокарциномы толстой кишки MC38 ( $1 \times 10^6$ , s.c.) имплантировали мышам C57B1/6 и культивировали в течение 8 дней. Мышей с опухолями размером 40-80 мм<sup>3</sup> произвольно распределяли (день такого распределения обозначали как день 1) на семь групп по 10 животных/группу и вводили дозы каждого антитела или комбинации антител на дни 1, 4, 8 и 11, как показано в табл.2. Мыши, которым инъецировали контрольные антитела соответствующего изотипа, не распознающие каких-либо мышинных антигенов, служили в качестве контроля (Группы 1 и 2). Объем опухоли измеряли два раза в неделю до тех пор, пока он не достигал 2000 мм<sup>3</sup>, и этот объем определяли как конечную точку, после которой мышей умерщвляли.

Таблица 2

Группа	Обработка	Доза
1	Изотип IgG2a+изотип IgG1 (D265A)	10 мг/кг, 0.5 мг/кг
2	Изотип IgG1 (D265A)	10 мг/кг
3	Анти-мPD-1 IgG1 (D265A)	0,5 мг/кг
4	Анти-мТИМ-3 IgG2a	10 мг/кг
5	Анти-мТИМ-3 IgG1 (D265A)	10 мг/кг
6	Анти-мPD-1 IgG1 (D265A)+анти-мТИМ-3 IgG2a	0,5 мг/кг, 10 мг/кг
7	Анти-мPD-1 IgG1 (D265A)+ анти-мТИМ-3 IgG1 (D265A)	0,5 мг/кг, 10 мг/кг

Промежуточные результаты этого эксперимента, представленные на фиг. 3, продемонстрировали, что антитело против мышинного ТИМ-3, взятое отдельно и обладающее эффекторной функцией (то есть, IgG2a), имело повышенную противоопухолевую активность по сравнению с антителом против мышинного ТИМ-3, обладающим минимальной эффекторной функцией (то есть, IgG1(D265A)). Кроме того, антитело против мышинного ТИМ-3 с минимальной эффекторной функцией (то есть, IgG1(D265A)), используемое в комбинации с антителом против мышинного PD-1 IgG1(D265A) и вводимое по соответствующей схеме, обладало слегка повышенной противоопухолевой активностью по сравнению с отдельно взятым антителом против мышинного PD-1 IgG1(D265A). Антитело против мышинного ТИМ-3 с полной эффекторной функцией (IgG2a), взятое в комбинации с антителом против мышинного PD-1 IgG1(D265A), обладало такой же противоопухолевой активностью, как и отдельно взятое антитело против мышинного PD-1 IgG1(D265A).

Результаты этого примера продемонстрировали, что антитела против мышинного ТИМ-3 и против мышинного PD-1, имеющие различные изотипы и различные уровни эффекторных функций, и взятые отдельно и в комбинации друг с другом, могут ингибировать рост опухоли у мышинной модели. Эти данные

также продемонстрировали, что в некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела (или их фрагменты) лишь с минимальной эффекторной функцией, вводимые отдельно или в комбинации с другими антителами (или их фрагментами, которые могут обладать, а могут и не обладать значительной эффекторной функцией), могут обеспечивать эффективную терапию.

Все цитируемые здесь ссылки, включая публикации, патентные заявки и патенты, вводятся в настоящее описание посредством ссылки, так, как если бы содержание каждого отдельного документа во всей своей полноте было конкретно и независимо изложено в настоящей заявке.

Используемые в настоящем описании артикли "a", "an" и "the" и "по меньшей мере один" и аналогичные референты (в частности, соответствующие контексту описания прилагаемой формулы изобретения), употребляемые с существительными в единственном числе, могут относиться и к существительным во множественном числе, если из контекста описания не следует обратное, или если это явно не противоречит контексту описания изобретения. Используемое здесь словосочетание "по меньшей мере один", за которым следует перечисление одного или более элементов (например, "по меньшей мере один из А и В"), рассматривается как один элемент, выбранный из перечисленных элементов (А или В) или любой комбинации двух или более перечисленных элементов (А и В), если из контекста описания не следует обратное, или если это явно не противоречит контексту описания изобретения. Используемые здесь термины "составляющий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" имеют инклюзивное значение (то есть, "включают, но не ограничиваются ими"), если это не оговорено особо. Используемые здесь указания на интервалы величин служат лишь способом сокращенной записи каждой отдельной величины, входящей в этот интервал, если это не оговорено особо, и каждая такая отдельная величина вводится в описание настоящего изобретения так, как если бы она указывалась индивидуально. Все описанные здесь способы могут быть осуществлены в любом нужном порядке, если это не оговорено особо, или если это явно не противоречит контексту описания изобретения. Любые и все примеры или пояснительные слова (например, "такой как") приводятся здесь лишь для лучшего понимания настоящего изобретения и не ограничивают объема изобретения, если это не оговорено особо. Ни одно приводимое здесь словесное описание любого элемента не должно рассматриваться как указание на какой-либо незаявленный элемент, необходимый для осуществления способов согласно изобретению.

В настоящей заявке описаны предпочтительные варианты осуществления изобретения, включая наилучший способ осуществления изобретения, известный авторам настоящей заявки. Другие предпочтительные варианты осуществления изобретения будут очевидны для специалиста в данной области исходя из описания, приведенного выше, авторы настоящего изобретения считают, что такие варианты, при необходимости, могут входить в объем настоящего изобретения и могут быть использованы для осуществления способов согласно изобретению, если это не оговорено особо. В соответствии с этим, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объектов изобретения, заявленных в прилагаемой формуле изобретения, если это входит в область применимости закона. Кроме того, в настоящем изобретении рассматривается любая комбинация описанных выше элементов во всех возможных их вариантах, если это не оговорено особо, или если это явно не противоречит контексту описания изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, который специфически связывается с белком Т-клеточного иммуноглобулина и домена муцина-3 (ТИМ-3), где полипептид содержит вариабельную область легкой цепи ( $V_L$ ) иммуноглобулина, содержащую определяющую комплементарность область (CDR)1, CDR2 и CDR3, с последовательностью SEQ ID NO:115; и вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) иммуноглобулина, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, с последовательностью SEQ ID NO:34.

2. Полипептид по п.1, где CDR1  $V_H$  содержит SEQ ID NO:329; CDR2  $V_H$  содержит SEQ ID NO:330; CDR3  $V_H$  содержит SEQ ID NO:331; CDR1  $V_L$  содержит SEQ ID NO:332; CDR2  $V_L$  содержит SEQ ID NO:333 и CDR3  $V_L$  содержит SEQ ID NO:334.

3. Полипептид, который специфически связывается с белком Т-клеточного иммуноглобулина и домена муцина-3(ТИМ-3), содержащий

вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина ( $V_L$ ), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:115, где CDR1  $V_L$  содержит SEQ ID NO:332; CDR2  $V_L$  содержит SEQ ID NO:333 и CDR3  $V_L$  содержит SEQ ID NO:334; и

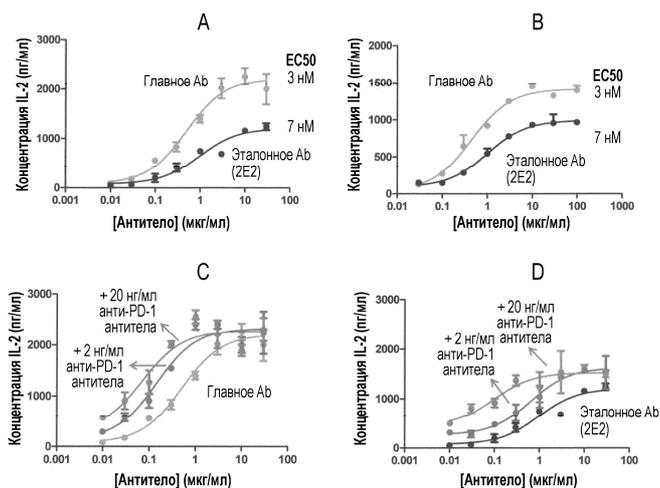
вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина ( $V_H$ ), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:34, где CDR1  $V_H$  содержит SEQ ID NO:329; CDR2  $V_H$  содержит SEQ ID NO:330 и CDR3  $V_H$  содержит SEQ ID NO:331.

4. Полипептид по любому из пп.1-3, где  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:115.

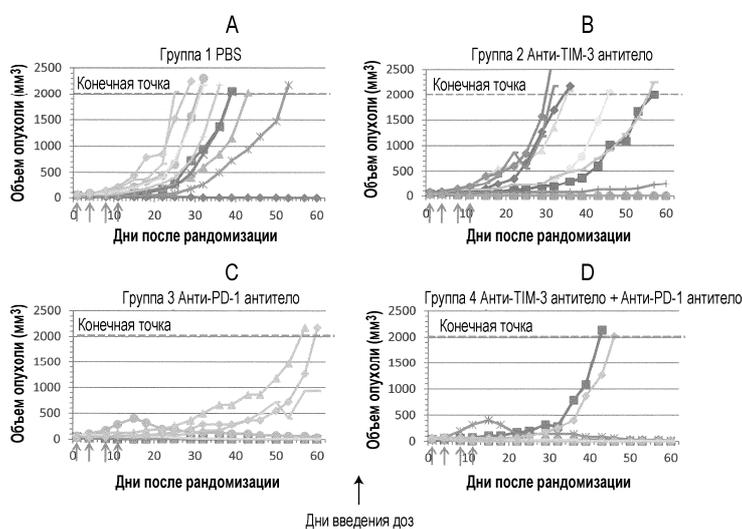
5. Полипептид по любому из пп.1-4, в котором  $V_L$  содержит SEQ ID NO:115.

6. Полипептид по любому из пп.1-5, в котором  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:34.

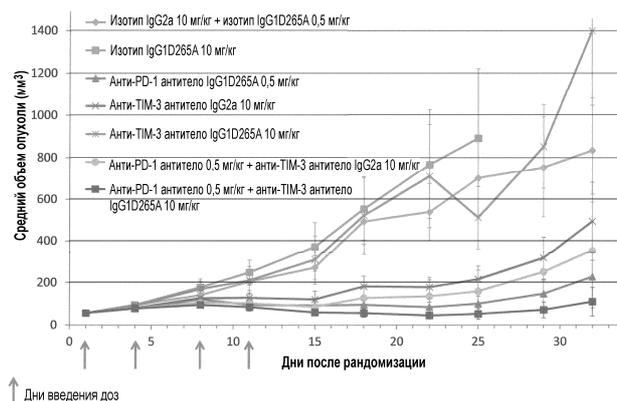
7. Полипептид по любому из пп.1-6, в котором область  $V_H$  содержит SEQ ID NO:34.
8. Полипептид по любому из пп.1-7, где полипептид представляет собой F (ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fab'-фрагмент, Fab-фрагмент, Fv-фрагмент, scFv-фрагмент, dsFv-фрагмент, dAb-фрагмент или одноцепочечный связывающийся полипептид.
9. Полипептид по любому из пп.1-7, где полипептид представляет собой антитело.
10. Полипептид по п.9, где полипептид представляет собой антитело IgG1.
11. Полипептид по любому из пп.9-10, где антитело содержит Fc-область.
12. Полипептид по любому из пп.1-11, где время полужизни полипептида при введении млекопитающему составляет от 30 мин до 45 дней.
13. Полипептид по любому из пп.1-12, где полипептид связывается с TIM-3 с  $K_D$ , равным от примерно 1 пикомолей (пМ) до примерно 1 наномоля (нМ).
14. Конъюгат для нацеливания на TIM-3, содержащий полипептид по любому из пп.1-13 и флуоресцентную молекулу или химиотерапевтическое средство.
15. Выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид легкой цепи и тяжелой цепи полипептида по любому из пп.1-13.
16. Вектор экспрессии, содержащий выделенную или очищенную нуклеиновую кислоту по п.15.
17. Выделенная клетка для получения полипептида, который специфически связывается с белком TIM-3, содержащая нуклеиновую кислоту по п.15 или вектор по п.16.
18. Фармацевтическая композиция, содержащая (а) полипептид по любому из пп.1-14 или вектор по п.16 и (б) фармацевтически приемлемый носитель.
19. Способ лечения расстройства у млекопитающего, чувствительного к ингибированию TIM-3, где указанный способ включает введение эффективного количества композиции по п.18 млекопитающему, страдающему расстройством, поддающимся лечению посредством ингибирования TIM-3, и тем самым лечение указанного расстройства у млекопитающего.
20. Способ по п.19, где расстройством является рак.
21. Способ по п.20, где раком является меланома, почечно-клеточная карцинома, рак легких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак желчного пузыря, рак носоглотки, рак печени, рак щитовидной железы, рак желудка, рак слюнных желез, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы или карцинома клеток Меркеля.
22. Способ по п.19, где расстройством является инфекционное заболевание.
23. Способ по п.22, где инфекционное заболевание вызвано вирусом или бактерией.
24. Способ по п.23, где вирусом является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирус гриппа, вирус денге или вирус гепатита В (HBV).
25. Способ по п.19, где расстройством является аутоиммунное заболевание.
26. Способ по п.25, где аутоиммунным заболеванием является рассеянный склероз, сахарный диабет типа 1, ревматоидный артрит, склеродермия, болезнь Крона, псориаз, системная красная волчанка (СКВ) или язвенный колит.
27. Способ по любому из пп.19-26, который также включает введение млекопитающему PD-1-связывающего агента.
28. Способ по п.27, где PD-1-связывающим агентом является антитело, конъюгат антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.
29. Способ по любому из пп.19-28, также включающий введение млекопитающему LAG-3-связывающего агента.
30. Способ по п.29, где LAG-3-связывающим агентом является антитело, конъюгат антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.



Фиг. 1A-D



Фиг. 2A-D



Фиг. 3

