

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042181**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.20

(21) Номер заявки
201990594

(22) Дата подачи заявки
2017.08.25

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) АНТИ-TIM-3 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PCT/CN2016/096924

(32) 2016.08.26

(33) CN

(43) 2019.08.30

(86) PCT/CN2017/099098

(87) WO 2018/036561 2018.03.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БЕЙДЖИН, ЛТД. (КУ)

(72) Изобретатель:
**Чжан Тун, Сюэ Лю, Лю Ци, Пэн Хао,
Вэй Минь, Ли Кан (CN)**

(74) Представитель:
**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)**

(56) WO-A1-2015117002
CN-A-103079644
CN-A-103721255
WO-A2-03063792
WO-A1-2009052623
WO-A1-2016068803

ANDERSON, A.C. "Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity," Current Opinion in Immunology, Vol. 24, No. 2, 04 January 2012 (2012-01-04), 213-216

SAKUIISHI, K. et al. "Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity," J. Exp. Med., Vol. 207, No. 10, 31 December 2010 (2010-12-31), 2187-2194

KEARLEY, J. et al. "Th2-driven, allergen-induced airway inflammation is reduced after treatment with anti-Tim-3 antibody in vivo," J. Exp. Med., Vol. 204, No. 6, 11 June 2007 (2007-06-11), 1289-1294

(57) Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с Т-клеточным иммуноглобулиновым доменом и доменом муцина 3. Анти-Tim-3 антитела можно применять для лечения, профилактики или диагностики иммунных, раковых, инфекционных заболеваний или других патологических расстройств, которые можно моделировать Tim-3-опосредованными функциями.

B1

042181

**042181
B1**

Для этой заявки испрашивается преимущество приоритета в соответствии с международной заявкой № PCT/CN2016/096924, поданной 26 августа 2016 года, которая включена в данный документ полностью путем ссылки на нее.

Область техники

В данном документе раскрыты антитела, которые специфически связываются с Т-клеточным иммуноглобулиновым доменом и доменом муцина 3 (Tim-3, T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3).

Предшествующий уровень техники

Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен муцина 3 (Tim-3, HAVCR2 или CD366) является 33 кДа трансмембранным гликопротеином I типа, членом семейства, содержащего Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен муцина, который играет важную роль в промотировании истощения Т-клеток как при хронических вирусных инфекциях, так и ускользании опухоли от иммунологического надзора (Monney et al., 2002 Nature 415:536-541; Sanchez-Fueyo A, et al., 2003 Nat Immunol. 4:1093-101; Sabatos CA, et al., 2003 Nat Immunol. 4:1102-10; Anderson et al., 2006 Curt Opin Immunol. 18:665-669). Гены и кДНК, кодирующие Tim-3, были клонированы и охарактеризованы на мыши и человеке (Monney et al., 2002 Nature 415:536-541; McIntire et al., 2001 Nat. Immunol. 2:1109-1116). Зрелый Tim-3 человека содержит 280 аминокислотных остатков (номер доступа NCBI (National Center for Biotechnological Information - Национальный центр биотехнологической информации): NP_116171.3). Его внеклеточный домен состоит из аминокислотных остатков 1-181, и трансмембранный домен и цитоплазматический С-концевой хвост включают остатки 182-280. Не существует известных ингибирующих сигнальных мотивов, таких как иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) и мотив переключения тирозина (ITSM, tyrosine switch motif), находящихся в цитоплазматическом домене.

Первоначально Tim-3 был идентифицирован в клетках Th1. Последующие исследования показали, что в дополнение к Т-клеткам Tim-3 также экспрессируется в других типах иммунных клеток, таких как НК-клетки, макрофаги, DC-клетки и тучные клетки (Hastings et al., 2009 Eur J Immunol 39:2492-2501; Anderson et al., 2007 Science 318: 1141-1143; Phong BL, et al., 2015 J Exp Med. pii: jem. 20150388). Tim-3 редко экспрессируется в других тканях человека. В Т-клетках экспрессия Tim-3 положительно регулируется посредством активации TCR/CD3 (Hastings et al., 2009 Eur J Immunol 39:2492-2501). Кроме того, обычные цитокины у цепи (например, ИЛ-2 (интерлейкин-2), ИЛ-7, ИЛ-15 и ИЛ-21) также повышают экспрессию Tim-3 ФИ (фосфоинозитид)-3-киназа-зависимым образом (Mujib S, et al., 2012 J Immunol. 188:3745-56). Т-клетки в микроокружении опухоли (МОО) часто совместно экспрессируют Tim-3 с другими иммунными рецепторами, ингибирующими "контрольные точки", такими как PD-1 (programmed cell death protein 1 - белок программируемой смерти клеток 1), Lag-3 и Tigit (Fourcade J, et al., 2010 J Exp Med. 207:2175-86; Gros A, et al., 2014 J Clin Invest. 124:2246-59).

До настоящего времени сообщалось о нескольких лигандах Tim-3 (Tim-3L), которые включают галектин-9 и фосфатидилсерин (ФС), считающиеся двумя основными (Anderson AC, 2012 Curt Opin Immunol. 24:213-6). Связывание Tim-3L с рецептором Tim-3 индуцирует внутриклеточную передачу сигналов, которая ингибирует активацию Т-клеток, что приводит к ослаблению пролиферации клеток, секреции ИЛ-2 и ИФН-γ (интерферон гамма) (Dekruyff et al., 2010 J. Immunol. 184:1918-1930; Zhu et al., 2005 Nat. Immunol. 6:1245-1252). Подробные механизмы передачи сигналов Tim-3 в Т-клетках все еще остаются по большей части неизвестными. Некоторые исследования показали, что Tim-3 может участвовать в иммунологических синапсах и секвестировать Src киназу Lck при взаимодействии с TCR, тем самым ингибируя его передачу сигналов, особенно сигнальный путь NFAT (nuclear factor of activated T cells - ядерный фактор активированных Т-клеток) (Tomkowicz B, et al., 2015 PLoS One 10:e0140694; Clayton KL, et al., 2014 J. Immunol. 192:782-91).

При раке и вирусных инфекциях активация передачи сигналов Tim-3 вызывает дисфункцию иммунных клеток, что приводит к росту злокачественного новообразования или распространенной вирусной инфекции. Сообщалось о повышенной регуляции экспрессии Tim-3 в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (ОИЛ), макрофагах и опухолевых клетках при многих типах рака, таких как рак легкого (Zhuang X, et al., Am J Clin Pathol 2012 137: 978-985), печени (Li H, et al., Hepatology 2012 56:1342-1351), желудка (Jiang et al., PLoS One 2013 8:e81799), почки (Komohara et al., Cancer Immunol Res. 2015 3:999-1000), молочной железы (Heon EK, et al., 2015 Biochem Biophys Res Commun. 464:360-6), толстой кишки (Xu et al., Oncotarget 2015), меланоциты (Gros A, et al., 2014 J Clin Invest. 2014 124:2246-2259) и рак шейки матки (Cao et al., PLoS One 2013 8:e53834). Повышенная экспрессия Tim-3 при этих типах рака связана с неблагоприятным прогнозом результата выживаемости пациентов. Не только повышенная регуляция передачи сигналов Tim-3 играет важную роль в иммунологической толерантности к раку, но также хроническая вирусная инфекция. При инфекциях ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) и ВГС (вирус гепатита С) экспрессия Tim-3 на Т-клетках была значительно выше по сравнению с таковой у здоровых людей и положительно коррелировала с вирусными нагрузками и прогрессированием болезни (Jones RB, et al., 2008 J Exp Med. 205:2763-79; Sakhdari A, et al., 2012 PLoS One 7:e40146; Golden-Mason L, et al., 2009 J Virol. 83:9122-30; 2012 Moorman JP, et al., J Immunol. 189:755-66). Кроме того, блокада рецептора Tim-3

в отдельности или в сочетании с блокадой PD-1/PD-L1 могла бы спасти функционально "истощенные" Т-клетки как *in vitro*, так и *in vivo* (Dietze KK, et al., 2013 PLoS Pathog 9:e1003798; Golden-Mason L, et al., 2009 J Virol. 83:9122-30). Следовательно, модуляция передачи сигналов Tim-3 терапевтическими агентами может спасти иммунные клетки, например, Т-клетки, NK-клетки и макрофаги (Mφ), от толерантности, вызывая эффективные иммунные ответы для уничтожения опухолей или хронических вирусных инфекций.

Сообщалось, что некоторые антитела могут поглощаться при связывании с их мишенью на клеточной поверхности (Hurwitz E, et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92:3353-7; Poul MA, et al., 2000, J Mol Biol. 301:1149-61; Fischer E, et al., 2012, Clin Cancer Res. 18:6208-18). Антитело-индуцированный рецепторный эндоцитоз приводит к снижению модуляции рецепторов на клеточной поверхности и ингибированию рецепторно-зависимой передачи сигналов (Liu L, et al., 2014, Clin Cancer Res. 20:6059-70). Так как интернализация антител будет снижать поверхностную экспрессию рецептора, обычно желательна постоянная интернализация для антитела рецептора.

Следовательно, существует потребность в анти-Tim-3 антителе, которое обладает высокой аффинностью и специфичностью к рецептору Tim-3 и предпочтительно дополнительно имеет постоянную интернализацию рецептора Tim-3.

Краткое описание изобретения

В настоящем документе раскрыты молекулы антител, которые связываются с Tim-3 с высокой аффинностью и специфичностью. В частности, раскрытое в данном документе анти-Tim-3 антитело обеспечивает постоянную или длительную интернализацию рецептора Tim-3. Также предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы антител, векторы экспрессии, клетки-хозяева, и способы получения молекул антител. Также предложены фармацевтические композиции, включающие молекулы антител. Раскрытые в данном документе молекулы анти-Tim-3 антител можно применять отдельно или в сочетании с другими агентами или терапевтическими средствами для лечения, профилактики и/или диагностики заболеваний, которые связаны с супрессией иммунных клеток при Tim-3-опосредованной внутриклеточной передаче сигналов, например, иммунных расстройств, рака, инфекционного заболевания, болезни Крона, сепсиса, синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) и гломерулонефрита. Таким образом, в данном документе раскрыты композиции и способы лечения различных расстройств или заболеваний, упомянутых выше, согласно которым применяют молекулы анти-Tim-3 антител, и также предложено применение молекул анти-Tim-3 антител в изготовлении лекарственного средства для лечения различных расстройств или заболеваний, упомянутых выше.

В конкретных аспектах данного изобретения предложено анти-Tim-3 антитело, способное связываться с Tim-3 человека, включающее по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO 3-8 или 26-27, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело включает по меньшей мере одну, две или три CDR из варибельной области тяжелой цепи (VH, heavy chain variable region), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 3-5 или 26, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен. В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело включает по меньшей мере одну, две или три CDR из варибельной области легкой цепи (VL, light chain variable region), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 6-8 или 27, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело включает по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR из варибельной области тяжелой и легкой цепей, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 3-8 или 26-27, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело включает шесть CDR из варибельной области тяжелой и легкой цепей, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 3-8 или 26-27, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит:

(a) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую одну, две или три аминокислотные последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO 3, 4, 5 или 26, или их вариантов, содержащих одну или более консервативных замен; и/или

(b) варибельную область легкой цепи (VL), содержащую одну, две или три аминокислотные последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO 6, 7, 8 или 27, или их вариантов, содержащих одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит:

(a) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 4 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен; и варибельную область легкой цепи (VL), содер-

98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 32, и легкую цепь, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 38.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит:

(a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 13, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 15;

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 22, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 24;

(c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 32, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 34; или

(d) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 32, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 38. В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит одну или более из:

(a) легкой цепи с мутацией аспарагиновой кислоты в глутаминовую кислоту в положении 1 SEQ ID NO 24;

(b) легкой цепи с мутацией лейцина в метионин в положении 4 SEQ ID NO 24;

(c) легкой цепи с мутацией валина в изолейцин в положении 62 SEQ ID NO 24;

(d) легкой цепи с мутацией аспарагиновой кислоты в глутаминовую кислоту в положении 74 SEQ ID NO 24;

(e) легкой цепи с мутацией метионина в лейцин в положении 96 SEQ ID NO 24;

(f) тяжелой цепи с мутацией фенилаланина в тирозин в положении 59 SEQ ID NO 22;

(g) тяжелой цепи с мутацией пролина в валин в положении 60 SEQ ID NO 22;

(h) тяжелой цепи с мутацией серина в треонин в положении 77 SEQ ID NO 22; или

(i) тяжелой цепи с мутацией цистеина в лейцин в положении 78 SEQ ID NO 22.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело представляет собой Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (ScFv).

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит константную область тяжелой цепи подкласса IgG1 (immunoglobulin G - иммуноглобулин G), IgG2, IgG3, IgG4 или ее вариант, и константную область легкой цепи типа каппа или лямбда или ее вариант.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит вариантную константную область тяжелой цепи IgG1 человека, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 21, и константную область легкой цепи каппа человека.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело является выделенным или рекомбинантным.

В конкретных аспектах настоящего изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одну из молекул антител, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает сочетание анти-Tim-3 антитела и одного или более других агентов, например терапевтического агента или молекулы другого антитела. В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело конъюгировано с меткой или терапевтическим агентом.

В конкретных аспектах настоящего изобретения также предложен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта. Согласно способу вводят субъекту описанное в данном документе антитело (например, терапевтически эффективное количество молекулы анти-Tim-3 антитела), отдельно или в сочетании с одним или более агентами, или процедурами.

В конкретных аспектах настоящего изобретения также предложен способ лечения (например, одно или более из ослабления, ингибирования или замедления развития) рака или опухоли у субъекта. Согласно способу вводят субъекту описанное в данном документе антитело (например, терапевтически эффективное количество молекулы анти-Tim-3 антитела), отдельно или в сочетании с одним или более агентами, или процедурами. В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело вводят в сочетании с химиотерапией, таргетной терапией, онколитическим лекарственным средством, цитотоксическим агентом, иммунной терапией, цитокином, хирургической процедурой, лучевой процедурой, активатором стимулирующей молекулы, ингибитором ингибирующей молекулы, вакциной или клеточной иммунотерапией. В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело вводят в сочетании с ингибитором молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 или TGFR. В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело вводят в сочетании с анти-PD-1 mAb 317-4B6 (также называемом Hu317-4B6, 317-4B6/IgG4mt10, описанном в патенте США № 8735553).

В конкретных воплощениях рак включает, но не ограничивается этим, рак легкого, рак печени, рак желудка, рак шейки матки, меланому рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, лейкоз, лимфому, рак яичника, рак головы и шеи или метастатическое поражение рака.

В дополнительных аспектах данного изобретения предложен способ лечения инфекционного заболевания, согласно которому вводят субъекту терапевтически эффективное количество описанного в данном документе анти-Tim-3 антитела отдельно или в сочетании с одним или более агентами, или проце-

дурами. В некоторых воплощениях инфекционное заболевание представляет собой хроническое вирусное инфекционное заболевание, выбранное из инфекции ВИЧ и инфекции ВГС.

В некоторых аспектах настоящего изобретения также предложено применение молекул анти-Tim-3 антител в изготовлении лекарственного средства для лечения различных расстройств или заболеваний, описанных в данном документе.

Молекулы анти-Tim-3 антител, описанные в данном документе, демонстрируют особый набор эффекторных функций и физико-химических свойств, которые могут ингибировать Tim-3-опосредованную клеточную передачу сигналов в иммунных клетках, реактивировать иммунные клетки и повышать иммунитет. И mAb в формате полноразмерного IgG1 человека с модифицированной константной областью тяжелой цепи обладают уникальным набором особенностей в аспектах эффекторных функций.

Также анти-Tim-3 mAb были гуманизированы с высокой степенью сходства с молекулами антител человека. Кроме того, анти-Tim-3 антитело может синергически действовать с анти-PD-1 антителом, активируя Т-клетки *in vitro*, снижая рост опухоли. Таким образом, раскрытые в данном документе анти-Tim-3 антитела могут обладать терапевтической пользой в лечении рака, вирусных инфекций и других заболеваний человека, которые механистически связаны с иммунологической толерантностью или "истощением".

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 демонстрирует схематические изображения Tim-3-mIgG2a (вверху) и Tim-3 -huIgG1 (внизу), где L представляет собой линкер, N представляет собой N-конец, и C представляет собой C-конец.

Фиг. 2А-2В демонстрируют филогенетические деревья анти-Tim-3 антител. Фиг. 2А демонстрирует филогенетическое дерево переменных областей тяжелой цепи (Vh) анти-Tim-3 антитела; фиг. 2В демонстрирует филогенетическое дерево переменных областей легкой цепи (Vl) анти-Tim-3 антитела. Всего 23 Tim-3 Vh и 20 Vc последовательностей были выверены с использованием программного обеспечения Megalign от DNASTAR. Гомология последовательностей показана в филогенетических деревьях.

Фиг. 3 демонстрирует сравнение аффинностей связывания Tim-3 hu425-2E-1 и hu425-2F-1 с аффинностью связывания hu425-1-1 в ИФА.

Фиг. 4 демонстрирует аффинности связывания Tim-3 mAb 1G5 и Ab2000 вместе с аффинностью связывания hu425-2-3b в ИФА.

Фиг. 5 демонстрирует ингибирование Tim-3-опосредованного фагоцитоза анти-Tim-3 антителом hu425-2-3b.

Фиг. 6 демонстрирует активацию секреции ИФН- γ анти-Tim-3 антителами, включая ch425 и hu425-1-1, в первичных МКПК (моноклеарная клетка периферической крови) человека.

Фиг. 7 демонстрирует активацию ЦМВ (цитомегаловирус)-специфичных Т-клеток человека анти-Tim-3 антителом hu425-2-3b.

Фиг. 8А-8В демонстрируют, что анти-Tim-3 антитело hu425-2-3b промотирует цитотоксичность, опосредованную NK-клетками.

Фиг. 9 демонстрирует, что анти-Tim-3 антитело hu425-2-3b снижает поверхностную экспрессию рецептора Tim-3.

Фиг. 10 демонстрирует интернализацию рецептора Tim-3 анти-Tim-3 антителами (hu425-2-3b, Ab1 и Ab2).

Фиг. 11 демонстрирует, что анти-Tim-3 антитело hu425-2-3b, отдельно или в сочетании с анти-PD-1 антителом hu317-4B6, усиливает секрецию ИФН- γ в РСЛ (реакция смешанных лимфоцитов).

Фиг. 12А-12В демонстрируют, что анти-Tim-3 антитело hu425-2-3b не вызывало АЗКЦ (антитело-зависимая клеточноопосредованная цитотоксичность) и КЗЦ (комплементзависимая цитотоксичность).

Фиг. 13 демонстрирует противоопухолевые эффекты анти-Tim-3 антитела ch425, анти-PD-1 антитела hu317-4B6 и их сочетания на аллогенной ксенотрансплантатной модели A431 человека.

Подробное описание изобретения

Определения.

Примеры консервативных аминокислотных замен

Исходный аминокислотный остаток	Однобуквенный и трехбуквенный коды	Консервативная замена
Аланин	A или Ala	Gly; Ser
Аргинин	R или Arg	Lys; His
Аспарагин	N или Asn	Gln; His
Аспарагиновая кислота	D или Asp	Gln; Asn
Цистеин	C или Cys	Ser; Ala
Глутамин	Q или Gln	Asn
Глутаминовая кислота	E или Glu	Asp; Gln
Глицин	G или Gly	Ala
Гистидин	H или His	Asn; Gln
Изолейцин	I или Ile	Leu; Val
Лейцин	L или Leu	Ile; val
Лизин	K или Lys	Arg; His
Метионин	M или Met	Leu; Ile; Tyr
Фенилаланин	F или Phe	Tyr; Met; Leu
Пролин	P или Pro	Ala
Серин	S или Ser	Thr
Треонин	T или Thr	Ser
Триптофан	W или Trp	Tyr; Phe
Тирозин	Y или Tyr	Trp; Phe
Валин	V или Val	Ile; Leu

Если специально не определено где-либо еще в этом документе, то все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понимаемые под ними одним из специалистов в области техники, к которой относится это изобретение.

Как используется в данном документе, включая прилагаемую формулу изобретения, формы слов в единственном числе включают соответствующие им ссылки во множественном числе, если контекстом ясно не предписано иное.

Термин "или" используется в значении и используется взаимозаменяемо с термином "и/или", если контекстом ясно не предписано иное.

Во всем этом описании и последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, следует понимать, что слово "содержать" и варианты, такие как "содержит" и "содержащий", означает включение указанной аминокислотной последовательности, последовательности ДНК, их стадии или группы, но не исключает любой другой аминокислотной последовательности, последовательности ДНК, стадии. При использовании в данном документе термин "содержащий" может быть заменен термином "вмещающий", "включающий" или иногда "имеющий".

Термин "Tim-3" включает разные изоформы млекопитающих, например, Tim-3 человека, видовые гомологи Tim-3 человека, и аналоги, содержащие по меньшей мере один эпитоп в Tim-3. И аминокислотная последовательность Tim-3, например, Tim-3 человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая то же, известны в данной области техники.

Термины "введение", "вводить", "лечение" и "обработка" в данном документе, когда применяются к животному, человеку, субъекту исследования, клетке, ткани, органу или биологической жидкости, означают контакт экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Обработка клетки охватывает контакт реагента с клеткой, а также контакт реагента с жидкостью, когда жид-

кость находится в контакте с клеткой. Также термины "введение" и "обработка" означают обработки *in vitro* и *ex vivo*, например клетки, реагентом, диагностическим, связывающим соединением или другой клеткой. Термин "субъект" в данном документе включает любой организм, предпочтительно животное, более предпочтительно млекопитающее (например, крысу, мышь, собаку, кошку, кролика) и наиболее предпочтительно человека.

Антитело или молекула антитела.

В данном документе раскрыты молекулы антител, которые связываются с Tim-3 с высокой аффинностью и специфичностью.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело включает по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO 3-8 или 26-27, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело включает по меньшей мере одну, две или три CDR из вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 3-5 или 26, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен. В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело включает по меньшей мере одну, две или три CDR из вариабельной области легкой цепи (VL), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 6-8 или 27, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело включает по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR из вариабельной области тяжелой и легкой цепей, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 3-8 или 26-27, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело включает шесть CDR из вариабельной области тяжелой и легкой цепей, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO 3-8 или 26-27, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую одну, две или три аминокислотные последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO 3, 4, 5 или 26, или их вариантов, содержащих одну или более консервативных замен; и/или

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую одну, две или три аминокислотные последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO 6, 7, 8 или 27, или их вариантов, содержащих одну или более консервативных замен.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 4 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен;

(b) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 26 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен;

(c) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 4 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 27 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен; или

(d) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3 или ее варианты, содержащие одну или более консервативных замен, аминокис-

чечный Fv (ScFv).

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит константную область тяжелой цепи подкласса IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или ее вариант, и константную область легкой цепи типа каппа или лямбда или ее вариант.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит вариантную константную область тяжелой цепи подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, где вариантная константная область тяжелой цепи обеспечивает пониженную или элиминированную эффекторную функцию, такую как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) и комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ).

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека или ее вариант. В более предпочтительных воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит вариантную константную область тяжелой цепи IgG1 человека, содержащую одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из E₂₃₃P, L₂₃₄A, L₂₃₅A, L₂₃₆Δ и R₃₂₉A. В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит вариантную константную область тяжелой цепи IgG1 человека, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 21, и константную область легкой цепи каппа человека.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело является выделенным или рекомбинантным.

В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт или по меньшей мере вариабельную область. В некоторых воплощениях анти-Tim-3 антитело содержит антигенсвязывающий фрагмент из описанного в данном документе антитела.

Термин "антитело" в данном документе используется в самом широком смысле и особо охватывает антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела) и фрагменты антител, если они распознают антиген, например, Tim-3, PD-1. Обычно антитело является моноспецифическим, но также может быть описано как идиоспецифическое, гетероспецифическое или полиспецифическое. Молекулы антител связываются через сайты специфического связывания со специфическими антигенными детерминантами или эпитопами на антигенах.

Термин "моноклональное антитело", или "mAb", или "Mab" в данном документе означает популяцию по существу гомогенных антител, т.е. молекулы антител, содержащиеся в популяции, являются одинаковыми в аминокислотной последовательности за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут находиться в незначительных количествах. Напротив, препараты стандартных (поликлональных) антител обычно включают множество разных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности в своих вариабельных доменах, особенно своих определяющих комплементарность областях, которые часто специфичны для разных эпитопов. Модификатор "моноклональный" указывает на признак антитела, получаемого из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует толковать, как требующий продуцирования антитела каким-либо особым способом. Моноклональные антитела можно получить способами, известными специалистам в данной области техники. Смотрите, например Kohler G et al., Nature 1975 256:495-497; патент США № 4376110; Ausubel FM et al., Current protocols in molecular biology 1992; Harlow E et al., Antibodies: a laboratory manual, Cold spring Harbor Laboratory 1988; и Colligan JE et al., Current protocols in immunology 1993. Раскрытые в данном документе mAb могут принадлежать к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgD, IgE, IgA, и любому их подклассу. Гибридома, продуцирующая mAb, может быть культивирована in vitro или in vivo. Высокие титры mAb можно получить при продуцировании in vivo, когда клетки из отдельных гибридом инъецируют внутривенно мышам, таким как первоначально примированные мыши Balb/c, получая асцитную жидкость, содержащую высокие концентрации требуемых mAb. MAb изотипа IgM или IgG можно очистить из таких асцитных жидкостей или из надосадочных жидкостей культур, используя способы колоночной хроматографии, хорошо известные специалистам в данной области техники.

Как правило, основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер включает две одинаковые пары полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую цепь" (около 25 кДа) и одну "тяжелую цепь" (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область примерно из 100-110 или более аминокислот, ответственных главным образом за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть тяжелой цепи может определять константную область, ответственную главным образом за эффекторную функцию. Обычно легкие цепи человека классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда. Кроме того, тяжелые цепи человека обычно классифицируются как α, δ, ε, γ или μ, и определяют изотипы антитела как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно. Внутри легких и тяжелых цепей вариабельные и константные области соединены "J" областью из приблизительно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает "D" область из приблизительно 10 или более аминокислот.

Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи (VL/VH) образуют антителосвязывающий сайт. Таким образом, как правило, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител два сайта связывания, как правило, одинаковы.

Обычно вариабельные домены как тяжелых, так и легких цепей содержат три гипервариабельных области, также называемых "определяющие комплементарность области (CDR)", которые расположены между относительно консервативными каркасными областями (FR, framework region). Обычно CDR вы-

ровнены каркасными областями, что позволяет связываться со специфическим эпитопом. Как правило, от N-конца до C-конца переменные домены и легкой, и тяжелой цепи содержат FR-1 (или FR1), CDR-1 (или CDR1), FR-2 (FR2), CDR-2 (CDR2), FR-3 (или FR3), CDR-3 (CDR3) и FR-4 (или FR4). Присвоение аминокислот каждому домену, как правило, находится в соответствии с определениями из Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. ; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32: 1-75; Kabat, et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, et al., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 или Chothia, et al., (1989) Nature 342:878-883.

Термин "гипервариабельная область" означает аминокислотные остатки антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из "CDR" (т.е. VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 в переменном домене легкой цепи и VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 в переменном домене тяжелой цепи). Смотрите Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (определение областей CDR антитела по последовательности); также смотрите Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917 (определение областей CDR антитела по структуре). Термин "каркасные" или остатки "FR" означает те остатки переменного домена, что отличны от остатков гипервариабельной области, определенных в настоящем документе как остатки CDR.

Если не указано иное, то "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" означает антигенсвязывающие фрагменты антител, т.е. фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связанным полноразмерным антителом, например фрагменты, которые сохраняют одну или более областей CDR. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются этим, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител, например, одноцепочечный Fv (ScFv); нанотела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Антитело, которое связывается с определенным целевым белком со специфичностью, также описано как специфически связывающееся с определенным целевым белком. Это означает, что антитело проявляет преимущественное связывание с этой мишенью по сравнению с другими белками, но эта специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело считается "специфическим" для своей предполагаемой мишени, если его связывание является определяющим наличие целевого белка в образце, например без получения нежелательных результатов, таких как ложноположительные. Антитела или его фрагменты связывания, полезные в настоящем изобретении, будут связываться с целевым белком с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз больше, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз больше и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз больше чем аффинность с нецелевыми белками. Считается, что в данном документе антитело специфически связывается с полипептидом, содержащим заданную аминокислотную последовательность, например аминокислотную последовательность зрелой молекулы Tim-3 человека, если оно связывается с полипептидами, содержащими эту последовательность, но не связывается с белками, у которых отсутствует эта последовательность.

Термин "антитело человека" в данном документе означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина человека. Антитело человека может содержать мышинные углеводные цепи, если продуцируется в мышце, в клетке мышцы или в гибридоме, полученной из клетки мышцы. Подобным образом, "антитело мышцы" или "антитело крысы" означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина мышцы или крысы, соответственно.

Термин "гуманизованное антитело" означает формы антител, которые содержат последовательности из не относящихся к человеку (например, мышинных) антител, а также антител человека. Такие антитела содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не относящегося к человеку. Как правило, гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, и обычно двух, переменных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют таковым иммуноглобулина, не относящегося к человеку, и все или по существу все области FR являются таковыми последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизованное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Префикс "hum", "hu", "Hu" или "h" добавляют к обозначениям клонов антител, когда необходимо отличить гуманизованные антитела от исходных антител грызунов. Гуманизованные формы антител грызунов, как правило, будут содержать те же самые последовательности CDR исходных антител грызунов, хотя определенные аминокислотные замещения могут быть включены для увеличения аффинности, повышения стабильности гуманизованного антитела или по другим причинам.

Термины "рак" или "опухоль" в данном документе означают или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. Примеры рака включают, но не ограничиваются этим, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого), рак надпочечников, рак печени, рак желудка, рак шейки матки, меланому, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, лейкоз, рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга, рак эндометрия, рак головы и шеи, лимфому, рак яичника, рак кожи, опухоль щитовид-

ной железы или метастатическое поражение раком.

Термин "CDR" означает определяющую комплементарность область(и) в вариабельной области иммуноглобулина, определенную с использованием системы нумерации Кабата, если не указано иное.

Фармацевтические композиции и наборы.

В некоторых аспектах этого изобретения предложены композиции, например фармацевтически приемлемые композиции, которые включают анти-Tim-3 антитело, описанное в данном документе, объединенное с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым эксципиентом. Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, и подобные, которые являются физиологически совместимыми. Эксципиент может подходить для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, ректального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

Композиции в данном документе могут находиться в различных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Подходящая форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Обычные подходящие композиции находятся в форме инъекционных или инфузионных растворов. Одним подходящим способом введения является парентеральное (например, внутривенное, подкожное, внутрибрюшинное, внутримышечное). В некоторых воплощениях антитело вводят в ходе внутривенной инфузии или инъекции. В конкретных воплощениях антитело вводят посредством внутримышечной или подкожной инъекции.

Термин "терапевтически эффективное количество", как используется в данном документе, относится к количеству антитела, которое при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания или расстройства является достаточным для осуществления такого лечения заболевания, расстройства или симптома. "Терапевтически эффективное количество" может меняться в зависимости от антитела, заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, тяжести заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, возраста подлежащего лечению субъекта и/или веса подлежащего лечению субъекта. Подходящее количество в любом конкретном случае может быть очевидным специалистам в данной области техники или может быть определено в ходе рутинных экспериментов. В случае комбинированной терапии "терапевтически эффективное количество" относится к общему количеству комбинированных объектов для эффективного лечения заболевания, расстройства или состояния.

"Субъект" представляет собой млекопитающее, например примата, предпочтительно высшего примата, например человека (например, пациента, имеющего или подверженного риску иметь расстройство, описанное в данном документе).

Примеры.

Пример 1. Генерация анти-Tim-3 моноклональных антител.

Ряд мышечных анти-Tim-3 моноклональных антител (mAb) генерируют на основе традиционной гибридомной технологии (de StGroth and Sheidegger, 1980, J Immunol Methods 35:1; Mechetner, 2007, Methods Mol Biol 378:1). Для дополнительной характеристики отбирают mAb с высокой активностью связывания в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) и анализе сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS, fluorescence-activated cell sorting).

Рекомбинантные белки Tim-3 для анализов иммунизации и связывания.

кДНК, кодирующую полноразмерный Tim-3 человека (SEQ ID NO. 1), синтезируют на основе последовательности GenBank (номер доступа: AF450242.1). Кодирующая область внеклеточного домена (ВКД), состоящая из аминокислот (АМК) 1-202 Tim-3 (SEQ ID NO. 2), была амплифицирована ПЦР (полимеразная цепная реакция) и клонирована в вектор экспрессии на основе pcDNA3.1 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) с С-концом, слитым либо с Fc областью IgG2a мыши (номер доступа GenBank: SAC20702), либо с Fc областью тяжелой цепи IgG1 человека (номер доступа UniProtKB/Swiss-Prot: P01857), что дало в результате две плазмиды экспрессии рекомбинантного белка слияния, Tim-3-mIgG2a и Tim-3-huIgG1, соответственно. Схематичное представление белков слияния Tim-3 показано на фиг. 1. Для продуцирования рекомбинантного белка слияния плазмиды Tim-3-mIgG2a и Tim-3-huIgG1 временно трансфицируют в систему экспрессии клеток млекопитающего на основе НЕК293 (разработанную самостоятельно) и культивируют в течение 5-7 дней в CO₂-инкубаторе, оборудованном вращающимся шейкером. Надосадочную жидкость, содержащую рекомбинантный белок, собирают и осветляют центрифугированием. Tim-3-mIgG2a и Tim-3-huIgG1 очищают, используя колонку Protein G Sepharose Fast Flow (номер по каталогу: 17061805, GE Life Sciences). Оба белка Tim-3-mIgG2a и Tim-3-huIgG1 подвергают диализу против фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и хранят в морозильной установке при -80°C в виде небольших аликвот.

Стабильные клеточные линии экспрессии.

Для создания стабильных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерный Tim-3 человека (huTim-3) или Tim-3 обезьяны (mkTim-3, ген имеется в продаже у ZYAGE, номер по каталогу: KD-

702), гены Tim-3 клонируют в ретровирусном векторе pFB-Neo (номер по каталогу: 217561, Agilent, США). Ретровирусные векторы с двойной тропностью генерируют согласно предыдущему протоколу (Zhang T, et al., 2005, Blood 106:1544-51). Векторы, содержащие huTim-3 и mkTim-3, трансдуцируют в клетки HuT78 и NK92MI (ATCC (American Type Culture Collection - Американская коллекция типовых культур), Манассас, Вирджиния, США), соответственно, для генерации клеточных линий HuT78/huTim-3 и NK92MI/mkTim-3. Высокоэкспрессирующие клеточные линии собирают культивированием в полной среде RPMI1640, содержащей 10% ЭБС (эмбриональная бычья сыворотка) с G418, и анализом связывания FACS.

Иммунизация, слияние гибридом и клонирование.

Мышей Balb/c в возрасте от восьми до двенадцати недель (HFK BIOSCIENCE CO., LTD, Пекин, Китай) иммунизируют внутривенно (в/в) 100 мкл раствора антигена, содержащего 10 мкг Tim-3-mIgG2a и водорастворимый адъювант (номер по каталогу: KX0210041, KangBiQuan, Пекин, Китай). Процедуру повторяют через три недели. Через две недели после 2-й иммунизации мышьиные сыворотки оценивают на связывание Tim-3 в ходе ИФА и FACS. Через десять дней после скрининга сыворотки мышей с наивысшими сывороточными титрами анти-Tim-3 антигена стимулируют в/в 50 мкг Tim-3 - mIgG2a. Через три дня после стимулирования спленоциты выделяют и гибридизируют с линией клеток мышьиной миеломы, клетки SP2/0 (ATCC), используя стандартные методики (Colligan JE, et al., Current protocols in immunology, 1993).

Оценка активности связывания Tim-3 антител в ходе ИФА и FACS.

Надосадочные жидкости клонов гибридом сначала проверяют в ходе ИФА, как описано в Methods in Molecular Biology (2007) 378:33-52 с некоторыми модификациями. Кратко, белком Tim-3-huIgG1 покрывали 96-луночные планшеты. Связанное с HRP (horseradish peroxidase - пероксидаза хрена) антимышиное антитело IgG (номер по каталогу: 7076S, Cell Signaling Technology, США) и субстрат (номер по каталогу: 00-4201-56, eBioscience, США) используют для разработки, и измеряют сигнал поглощения при длине волны 450 нм, используя спектрофотометр (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, США). ИФА-положительные клоны дополнительно проверяют помощью FACS, используя либо клетки HuT78/huTim-3, либо клетки NK92mi/mkTim-3, описанные выше. Tim-3-экспрессирующие клетки (10^5 клеток/луночка) инкубируют с надосадочными жидкостями ИФА-положительных гибридом с последующим связыванием с козым антимышиным антителом IgG, меченным Alexa Fluoro-647 (номер по каталогу: A0473, Beyotime Biotechnology, Китай). Количественно выражали флуоресценцию клеток, используя проточный цитометр (Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, США).

Кондиционированные среды из гибридом, которые показали положительные сигналы при скрининге как ИФА, так и FACS, подвергают функциональным анализам для распознавания антител с хорошей функциональной активностью в анализах на основе иммунных клеток человека (смотрите следующие разделы). Антитела с требуемыми функциональными активностями дополнительно субклонировать и характеризуют.

Субклонирование и адаптация гибридом к бессывороточной или с низким содержанием сыворотки среде

После скрининга главным образом с помощью ИФА, FACS и функциональных анализов (описанных в примерах 7 и 8) положительные клоны гибридом субклонировать посредством предельного разведения. Лучшие субклоны антител, проверенные в ходе функциональных анализов, адаптируют для роста в среде CDM4MAb (номер по каталогу: SH30801.02, Nyclone, США) с 3% ЭБС.

Экспрессия и очистка моноклональных антител.

Клетки гибридом культивируют в среде CDM4MAb (номер по каталогу: SH30801.02, Nyclone) и инкубируют в CO₂-инкубаторе в течение 5-7 дней при 37°C. Кондиционированную среду собирают посредством центрифугирования и фильтруют, пропуская через 0,22 мкм мембрану, перед очисткой. Надосадочные жидкости, содержащие мышьиные антитела, наносят и связывают с колонкой Protein A (номер по каталогу: 17127901, GE Life Sciences), следуя инструкции изготовителя. Обычно в ходе процедуры получали антитела с чистотой выше 90%. Аффинно очищенные белком А антитела либо подвергают диализу против ФСБ, либо дополнительно очищают, используя колонку HiLoad 16/60 Superdex200 (номер по каталогу: 17531801, GE Life Sciences), чтобы удалить агрегаты. Концентрации белка определяют, измеряя поглощение при 280 нм. Конечные препараты антител хранили в аликвотах в морозильной установке при -80°C.

Пример 2. Клонирование и анализ последовательностей антител к Tim-3.

Мышиные клетки гибридом отбирают, чтобы получить суммарные РНК, используя набор Ultrapure RNA (номер по каталогу: 74104, QIAGEN, Германия) согласно протоколу изготовителя. 1-ую цепь к ДНК синтезируют, используя набор для синтеза к ДНК от Invitrogen (номер по каталогу: 18080-051), и амплификацию ПЦР генов Vh и Vk мышьиных mAb осуществляли, используя набор для ПЦР (номер по каталогу: CW0686, CWBio, Пекин, Китай). Олигопраймеры, используемые для клонирования кДНК антител вариабельной области тяжелой цепи (Vh) и вариабельной области легкой цепи каппа (Vk), синтезируют на основании последовательностей, о которых сообщалось прежде (Brocks et al., 2001 Mol Med 7:461). Затем продукты ПЦР субклонировать в клонирующий вектор pEASY-Blunt (номер по каталогу: CB101-02,

TransGen, Китай) и секвенируют. Аминокислотные последовательности областей Vh и Vk выводят из результатов секвенирования ДНК.

Мышинные mAb анализируют, сравнивая гомологию последовательностей, и группируют, исходя из сходства последовательностей (фиг. 2). Определяющие комплементарность области устанавливают на основании системы Кабата (Wu and Kabat, 1970, J. Exp. Med. 132:211-250) и IMGT (ImMunoGeneTics information system) (Lefranc, 1999, Nucleic Acids Research 27:209-212) по аннотации последовательностей и по анализу последовательностей в интернете (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html). Аминокислотные последовательности репрезентативного лучшего клона mu425 (Vh и Vk) перечислены в табл. 1 (SEQ ID NO. 9 и 11). Последовательности CDR mu425 перечислены в табл. 2 (SEQ ID NO 3-8).

Таблица 1
Аминокислотные последовательности областей VH и VK mu425

	Последовательность	SEQ ID NO
VH mu425	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSRYAMSWVRQIP	9
	EKRLEWVAAISSGGSLYFPDSVKGRFTISRDNARNICYLQMN	
	SLRSDDTAMYCCARGREADGGYFDYWGQGTTTLTVSS	
VK mu425	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSLMQWYQQ	11
	KPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEED	
	DIAMYFCQQSMKVPLTFGAGTKLELK	

Таблица 2
Последовательности CDR (аминокислоты) областей VH и VK mu425

	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
mu425, VH	RYAMS	3	AISSGGSLYF PDSVKG	4	GREADGG YFDY	5
mu425, VK	RASESVEY YGTSLMQ	6	AASNVES	7	QQSMKVP LT	8

Пример 3. Определение аффинности очищенных мышиных анти-Tim-3 антител с помощью НИР (поверхностный плазмонный резонанс).

Антитела к Tim-3 с высокими активностями связывания в ИФА и FACS, а также с сильными функциональными активностями в клеточных анализах (описанных в примерах 7 и 8) характеризуют по их кинетике связывания в ходе анализов ППР, используя BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences). Кратко, античеловеческое антитело IgG иммобилизуют на активированном CM5 биосенсорном чипе (номер по каталогу: BR100530, GE Life Sciences). Fc-меченый Tim-3 IgV домен человека пропускают над поверхностью чипа, и он захватывался античеловеческим антителом IgG. Затем последовательно разведенные (0,36 нМ до 90 нМ) очищенные мышиные антитела пропускают над поверхностью чипа, и изменения в сигналах поверхностного плазмонного резонанса анализируют, чтобы вычислить скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}), используя модель связывания Ленгмюра один к одному (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляют как соотношение k_{off}/k_{on} . Профили аффинностей связывания лучших mAb, включая mu425, mu44, mu 225 и mu411, показаны в табл. 3.

Таблица 3
Сравнение аффинностей связывания гибридомных антител с помощью ППР

Антитела	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)
mu425	$1,59 \cdot 10^6$	$9,33 \cdot 10^{-5}$	0,058
mu44	$1,24 \cdot 10^6$	$1,86 \cdot 10^{-4}$	0,150
mu255	$5,52 \cdot 10^5$	$7,84 \cdot 10^{-4}$	1,42
mu411	$1,44 \cdot 10^6$	$3,36 \cdot 10^{-4}$	0,234

Пример 4. Гуманизация мышиного античеловеческого mAb mu425 к Tim-3.

Гуманизация и инженерия mAb.

Для гуманизации mu425 гены IgG зародышевой линии человека исследуют на последовательности, которые имеют высокие степени гомологии с последовательностями кДНК переменных областей mu425, используя BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) для базы данных генов иммуноглобулинов человека на вебсайтах IMGT (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html) и NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Гены IGVH и IGVK человека, которые присутствуют в спектрах

антител человека с высокими частотами (Glanville, 2009, PNAS 106:20216-20221) и являются высокомолекулярными к μ 425, отбирают в качестве матриц для гуманизации. Перед гуманизацией переменные домены тяжелой и легкой цепей μ 425 сливают с модифицированной константной областью IgG1 человека, называемой IgG1mf человека (SEQ ID NO. 21), и константной областью цепи каппа человека, соответственно. IgG1mf (SEQ ID NO: 21) представляет собой мутант IgG1, содержащий комбинацию мутаций, E₂₃₃P, L₂₃₄A, L₂₃₅A, L₂₃₆Δ и P₃₂₉A (нумерация аминокислот основана на системе EU), по сравнению с IgG1 дикого типа человека.

Гуманизацию проводят путем CDR-прививки (Methods in Molecular Biology, Vol 248: Antibody Engineering, Methods and Protocols, Humana Press), и гуманизированные антитела (hu425) конструируют в формате IgG1 человека. На начальном цикле гуманизации мутации аминокислотных остатков от мышиных до человеческих в каркасных областях проводят с помощью смоделированной 3D структуры, и мышиные каркасные остатки, структурно значимые для поддержания канонических структур CDR, сохраняют в 1-ой версии гуманизированного антитела 425, hu425-1-1 (аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи заданы в SEQ ID NO. 22 и 24). А именно, CDR V_k μ 425 прививают в каркасы изменчивого гена IGVK3-15 зародышевой линии человека с 4 сохраненными мышиными каркасными остатками (D1, L4, V62 и D74) (аминокислотные последовательности переменного домена легкой цепи заданы в SEQ ID NO. 19). CDR V_h μ 425 прививают в каркасы изменчивого гена IG VH3-7 зародышевой линии человека с 1 сохраненным мышиным каркасным (C₇₈) остатком (аминокислотные последовательности переменного домена тяжелой цепи заданы в SEQ ID NO. 17).

Hu425-1-1 конструируют в виде формата полноразмерного антитела человека, используя самостоятельно разработанные вектора экспрессии, которые содержат константные области варианта IgG1 человека, называемого IgG1mf (SEQ ID NO. 21), и каппа-цепь, соответственно, с легко адаптирующимися сайтами для субклонирования. Экспрессию и получение антитела hu425-1-1 достигают посредством контрансфекции двух вышеупомянутых конструкторов в клетки 293G и путем очистки с использованием колонки Protein A (номер по каталогу: 17543802, GE Life Sciences). Очищенные антитела концентрируют до 0,5-5 мг/мл в ФСБ и хранят в аликвотах в морозильной установке при -80°C.

На основе матрицы hu425-1-1 авторы делают целый ряд одиночных мутаций, превращающих сохраненные мышиные остатки в каркасных областях V_k в соответствующие остатки зародышевой линии человека, которые включают DIE, L4M, V62I и D74D в V_k. Полученные в результате все hu425-1-2a (DIE), hu425-1-2b (L4M), hu425-1-2c (V62I) и hu425-1-2d (D74E) имеют активности связывания и функциональные активности сходные с hu425-1-1. Чтобы дополнительно улучшить уровень гуманизации тяжелой цепи, авторы также изменяют сохраненный остаток C78 и C-концевую часть H-CDR2 (определение по Кабату) из мышиной последовательности на соответствующие остатки зародышевой линии человека. Спецификации 3 гуманизированных антител представляют собой hu425-2A-1 (F59Y в V_h), hu425-2B-1 (P60V в V_h) и hu425-2C-1 (C78L в V_h). Все мутации гуманизации выполняют с использованием праймеров, содержащих мутации в особых положениях, и набора для сайт-направленного мутагенеза (номер по каталогу FM111-02, TransGen, Пекин, Китай). Требуемые мутации проверяют с помощью анализа последовательностей. Эти варианты антитела hu425 исследуют в анализах связывания и функциональных анализах, как описано ранее. По сравнению с hu425-1-1 hu425-2B-1 имеет значительно сниженные аффинности связывания и функциональные свойства (данные не показаны), тогда как остальные версии гуманизированных вариантов hu425 имеют активности связывания и функциональные активности сходные с hu425-1-1.

Антитела hu425 дополнительно конструируют введением мутаций в CDR и каркасные области, чтобы улучшить молекулярные биохимические и биофизические свойства для терапевтического применения человеком. Рассматриваемые факторы включают аминокислотные составы, термостабильность (T_m), гидрофобность поверхности и изоэлектрические точки (pI, isoelectric points) при сохранении функциональных активностей.

Взяты вместе две хорошо сконструированные версии гуманизированных моноклональных антител, hu425-2-2 (аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи заданы в SEQ ID NO. 28 и 30) и hu425-2-3b (аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи заданы в SEQ ID NO. 28 и 36), получают в ходе процесса мутации, описанного выше, и подробно охарактеризованы. Оба hu425-2-2 и hu425-2-3b содержат мутацию в H-CDR2 (SEQ ID NO: 26) и в L-CDR3 (SEQ ID NO: 27). Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой/легкой цепи и шесть CDR hu425-2-2 и hu425-2-3b перечислены в табл. 4 и табл. 5 ниже. Результаты показали, что оба hu425-2-3b и hu425-2-2 очень схожи в аффинности связывания и функциональных активностях, таких как ингибирование опосредованной Tim-3 нисходящей передаче сигналов.

Таблица 4

Аминокислотные последовательности областей VH и VK hu425-2-2 и hu425-2-3b

	Последовательность	SEQ ID NO
VH hu425-2-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAP GKGLEWVAAISSGGSLLYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGREADGGYFDYWGQGTLTVSS	28
VK hu425-2-2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVEYYGTSLMQWYQ QKPGQAPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQSLKVPLTFGGGTKVEIK	30
VH hu425-2-3b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAP GKGLEWVAAISSGGSLLYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGREADGGYFDYWGQGTLTVSS	28
VK hu425-2-3b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAP GKGLEWVAAISSGGSLLYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGREADGGYFDYWGQGTLTVSS	36

Таблица 5

Последовательности CDR (аминокислоты) областей VH и VK hu425-2-2 и hu425-2-3b

	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
VH hu425-2-2	RYAMS	3	AISSGGSLLYY PDSVKG	26	GREADGGYF DY	5
VK hu425-2-2	RASESVEYY GTSLMQ	6	AASNVES	7	QQSLKVPLT	27
VH hu425-2-3b	RYAMS	3	AISSGGSLLYY PDSVKG	26	GREADGGYF DY	5
VK hu425-2-3b	RASESVEYY GTSLMQ	6	AASNVES	7	QQSLKVPLT	27

Для определения аффинности Fab, полученные из группы mAb hu425, готовят, используя набор Pierce Fab Preparation (номер по каталогу 44985, ThermoFisher Scientific), и используют в анализе аффинности на основе технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Результаты определенных с помощью ППР профилей связывания анти-Tim-3 Fab антител обобщены в табл. 6. Fab hu425-2-2 и hu425-2-3b имеют очень похожие профили связывания со средней константой диссоциации при 0,419 нМ и 0,361 нМ, соответственно, что близко к таковой hu425-1-1.

Таблица 6

Сравнение аффинностей связывания Fab hu425 с помощью ППР

Анти-Tim-3 Fab	Тест 1			Тест 2			Среднее значение
	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)	
ch425 ^a	$1,67 \cdot 10^6$	$2,04 \cdot 10^{-4}$	0,122				н.д. ^б
hu425-1-1	$6,79 \cdot 10^5$	$1,08 \cdot 10^{-4}$	0,159	$1,26 \cdot 10^6$	$4,35 \cdot 10^{-4}$	0,346	0,253
hu425-2-2	$1,71 \cdot 10^6$	$7,40 \cdot 10^{-4}$	0,434	$1,97 \cdot 10^6$	$7,95 \cdot 10^{-4}$	0,404	0,419
hu425-2-3b	$1,60 \cdot 10^6$	$5,70 \cdot 10^{-4}$	0,356	$1,75 \cdot 10^6$	$6,40 \cdot 10^{-4}$	0,366	0,361

^a ch425 состоит из переменных доменов hu425, слитых с константными областями IgG1mf человека/цепи каппа мыши (аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи заданы в SEQ ID NO. 13 и 15)

^б н.д.: нет данных.

Для всех гуманизированных антител, показанных выше, также подтверждают функциональные активности на первичных иммунных клетках человека, выделенных у здоровых доноров (описано в примере 8).

Пример 5. Сравнение аффинностей анти-Tim-3 антител с помощью ППР.

Hu425-2-3b и два известных антитела к Tim-3, Ab1 (содержащее варибельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 40 и варибельную область легкой цепи SEQ ID NO: 41) и Ab2 (содержащее варибельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 42 и варибельную область легкой цепи SEQ ID NO: 43), генерируют в формате IgG4 человека с мутацией S228P и характеризуют по их кинетике связывания в ходе анализов ППР, используя BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences).

Кратко, античеловеческое антитело Fab иммобилизуемо на активированном CM5 биосенсорном чипе (номер по каталогу: BR100530, GE Life Sciences). Анти-Tim-3 пропускают по поверхности чипа, и они захватываются античеловеческим антителом Fab. Затем последовательно разведенные (0,12 нМ до 30 нМ) Tim-3-his пропускают над поверхностью чипа, и изменения в сигналах поверхностного плазмонного резонанса анализируют, чтобы вычислить скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}), используя модель связывания Ленгмюра один к одному (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляют как соотношение k_{off}/k_{on} . Hu425-2-3b, Ab1 и Ab2 проявляют сопоставимые аффинности связывания. Антитела, в частности ошибка! Источник ссылки не найден. Hu425-2-3b, связываются с Tim-3 дозозависимым образом с наномолярной K_D .

Таблица 7

Сравнение аффинностей связывания анти-Tim-3 с помощью ППР

Анти-Tim-3	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)	K_D (М)
Hu425-2-3b	5,28E+05	7,78E-04	1,47E-09
Ab1	4,44E+05	1,20E-04	2,71E-10
Ab2	6,27E+05	0,0122	1,94E-08

Пример 6. Вклад CDR mu425/hu425 в связывание Tim-3.

В ходе процесса гуманизации генерируют несколько вариантов с одиночной мутацией аминокислоты из hu425-1-1. Два из таких мутантных варианта почти полностью отменяют связывание с Tim-3, как видно на фиг. 3, но каждый имеет только нейтральное (химически схожее) аминокислотное замещение, D102E (mAb назван hu425-2E-1) и G103A (назван hu425-2F-1), в CDR3 тяжелой цепи. Эти открытия подтвердили мнение о том, что CDR3 тяжелой цепи в гуманизированных антителах mu425 оказывает значительный вклад в функциональную способность связывания Tim-3.

С другой стороны, CDR1 и CDR2 легкой цепи mu425/hu425 являются идентичными гену IGKV3-1 зародышевой линии мыши. Также было найдено несколько мышиных антител, содержащих такие же последовательности CDR1 и CDR2 зародышевой линии мыши в своих варибельных областях легкой цепи, например Ab2000 (патент США № 7989597) и mAb 1G5 (патент США № 7563874). Авторы исследуют, могут ли эти антитела также связываться с Tim-3. С этой целью генерируют Ab2000 и 1G5 с форматом IgG1mf человека и оценивают на связывание Tim-3-mIg с помощью ИФА. Как показано на фиг. 4, ни Ab2000, ни 1G5 не способны продуцировать какой-либо сигнал связывания Tim-3 в отличие от hu425-2-3b. Следовательно, CDR1 и CDR2 гена IGKV3-1 зародышевой линии мыши недостаточны для связывания Tim-3.

Для дополнительной оценки вклада CDR в связывание Tim-3 создают два гибридных антитела путем обмена тяжелой цепи и легкой цепи антитела hu425-2-3b и антитела Ab1 друг с другом. Оба hu425-2-3b и Ab1 являются производными анти-Tim-3 мыши, и они имеют одинаковые L-CDR1 и L-CDR2 с такими же IGKV3-1 зародышевой линии мыши. Тяжелая цепь hu425-2-3b и легкая цепь Ab1 совместны экспрессируют для генерации гибридного антитела 425 HC/Ab1 LC, тогда как гибридное антитело Ab1 HC/425 LC получали в ходе коэкспрессии тяжелой цепи Ab1 и легкой цепи hu425-2-3b. Активности связывания гибридных антител анализируют биослойной интерферометрией (ForteBio Octet). Гибридные антитела захватываются концами белка A, и затем их погружают в раствор Tim-3-his для анализа сигнала связывания BLI (BioLayer Interferometry - биослойная интерферометрия). Было обнаружено, что Ab1 HC/425 LC сохраняет способность к связыванию Tim-3, тогда как захваченный 425 HC/Ab1 LC не продуцирует значительный сигнал связывания. Предполагается, что LC-CDR3 hu425-2-3b необходим для его связывания с Tim3, тогда как его L-CDR1 и L-CDR2 недостаточны для связывания Tim3, или могут не требоваться для связывания с Tim3.

Пример 7. Блокада Tim-3-опосредованного фагоцитоза анти-Tim-3 антителами.

Было показано, что Tim-3 связывается с фосфатидилсеринем (ФС) через его домен IgV и опосредует фагоцитоз апоптотических клеток (DeKruyff et al., J. Immunol, 2010, 184:1918-1930; Nakayama et al., Blood, 2009, 113: 3821-3830). ФС представляет собой фосфолипид, который ограничен внутренним листком цитоплазматической мембраны в нормальных клетках млекопитающих, но становится открытым на внешней поверхности апоптотических клеток. ФС участвует в иммуносупрессии в микроокружении опухоли, препятствуя иммунным ответам (Fadok et al., J Clin Invest, 1998, 101:890-898; Frey et al., Semin Immunopathol, 2011, 33:497-516). Введение in vivo анти-Tim-3 антител приводит к меньшему клиренсу апоптотических клеток, повышенному местному воспалению и нарушению иммунологической толерантности, что предполагает, что ось ФС-Tim-3 участвует в иммуносупрессии in vivo (Chabini et al., J.

Immunol 190:88-96, 2013; Nakayama et al., Blood 113: 3821-30, 2009).

Чтобы определить, могут ли анти-Tim-3 антитела блокировать Tim-3-опосредованный фагоцитоз, осуществляли клеточный анализ с использованием сенсорной и функциональной клеточной линии считывания, TNP-1/Tim-3, т.е. TNP-1 (АТСС, клеточная линия моноцитов человека), стабильно трансфицированной с полноразмерным геном Tim-3. В этом анализе HuT78 (АТСС) подвергают ограниченному апоптозу при обработке в течение ночи 2% этанолом с последующим мечением красителем CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester - сукцинимидиловый сложный эфир карбоксифлуоресцеина) (Invitrogen, 1 мкМ) в соответствии с инструкцией изготовителя. Клетки TNP-1/Tim-3 затем совместно культивируют с CFSE-мечеными апоптотическими клетками HuT78 в течение 6 часов в присутствии анти-Tim-3 гуманизированных антител. Tim-3-опосредованный фагоцитоз определяют как процентное соотношение CFSE⁺TNP-1/Tim-3 ко всем клеткам TNP-1/Tim-3 (стробировано на популяции CD3⁺). Как показано на фиг. 5, hu425-2-3b дозозависимо ингибирует фагоцитоз апоптотической клетки HuT78 клетками TNP-1/Tim-3.

Пример 8. Активация секреции ИФН- γ анти-Tim-3 антителами в первичных МКПК человека, совместно культивированных с опухолевыми клетками, экспрессирующими привлекающий Т-клеток активатор.

Сообщалось, что оба Tim-3 и PD-1 являются ингибирующими рецепторами, экспрессируемыми в активированных Т-клетках, которые могут действовать, вызывая истощение Т-клеток (Anderson AC. et al., 2016, Immunity 44:989-1004). Tim-3⁺ CD4 и CD8 Т-клетки от онкологических пациентов действительно секретируют намного меньше Th1 цитокина, ИФН- γ , чем Tim-3⁻ Т-клетки (Arai Y. et al., 2012, Yonago Acta medica 55:1-9; Xu B, et al., 2015, Oncotarget 6:20592-603).

Авторы исследовали функцию Tim-3 и анти-Tim-3 антител с использованием анти-CD3 mAb ОКТ3-активированных Т-клеток в МКПК человека. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяют у здоровых доноров, используя протокол центрифугирования в градиенте плотности с Histopaque-1077 (номер по каталогу: 10771, Sigma). За три дня до анализа МКПК стимулируют 40 нг/мл анти-CD3 mAb ОКТ3 (номер по каталогу: 16-0037, eBioscience, США), чтобы амплифицировать CD3⁺ Т-клетки, которые используются в качестве эффекторных клеток. Клетка-мишень, называемая A549/OS8, представляет собой клеточную линию рака легкого A549 (АТСС), стабильно трансфицированную с привлекающим Т-клетки активатором (OS8) согласно способу, описанному в патенте США № 8735553. OS8 содержит scFv античеловеческого CD3 mAb ОКТ3 в N-концевых доменах, которые непосредственно взаимодействуют с комплексом TCR/CD3 и активируют Т-клетки. Эффекторные клетки, МКПК, совместно культивируют с быстро обработанными митомицином С клетками-мишенями A549/OS8, чтобы имитировать ответ активированных Т-клеток на опухолевые клетки при вовлечении комплекса TCR/CD3. Анализ проводят в присутствии или отсутствии анти-Tim-3 антител в 96-луночных плоскодонных планшетах. После 15-18 ч совместного культивирования надосадочные жидкости культур анализируют на уровень ИФН- γ с помощью ИФА, используя наборы для ИФА Ready-Set-Go! (номер по каталогу: 88-7316, eBiosciences). Как показано на фиг. 6, когда клетки-мишени A549/OS8 совместно культивируют с эффекторными клетками, анти-Tim-3 антитела (ch425 и hu425-1-1) вызывают повышенную секрецию ИФН- γ в эффекторных клетках.

Пример 9. Активация ЦМВ-специфичных Т-клеток человека анти-Tim-3 антителами.

Функциональную активность антител к Tim-3 дополнительно оценивают, используя полученные природным способом Т-клетки, которые распознают пептид PP65 ЦМВ человека (NLVPMVATV, 495-503, HLA-A2.1-рестриктированный) (Voeckh M, Voeckh M and Geballe AP, 2011, J Clin Invest. 121:1673-80). Кратко, сначала проводят скрининг МКПК от здоровых доноров с помощью FACS, используя анти-HLA-A2 mAb. Затем HLA-A2⁺ МКПК моделируют с пептидом PP65 (более 98% чистоты, синтезирован GL Biochem, Шанхай) в полной RPMI с 10% ЭБС в течение недели.

Целевую клеточную линию A549/A2.1 устанавливают путем стабильной трансфекции HLA-A2.1. После 30 минут обработки митомицином С (100 мкг/мл) и пептидом pp65 (5 мкг/мл) клетки A549/A2.1 (10⁴) совместно культивируют с равным числом активированных pp65 МКПК в 96-луночных планшетах в течение ночи в присутствии или отсутствии анти-Tim-3 антител или контрольных образцов. ИФН- γ в надосадочной жидкости культуры определяют с помощью ИФА. Все условия выполняют в трех экземплярах. Как показано на фиг. 7, hu425-2-3b стимулирует pp65-специфичные Т-клетки секретировать ИФН- γ в надосадочной жидкости клеточной культуры.

Пример 10. Анти-Tim-3 антитела увеличивают опосредованную NK-клетками цитотоксичность.

Известно, что Tim-3 конститутивно экспрессируется на естественных клетках-киллерах (NK) на относительно высоких уровнях (Ndhlovu LC, et al., 2012, Blood 119:3734-43; da Silva IP, et al., 2014, Cancer Immunol Res. 2:410-22). Обнаружено, что при меланоме более высокая экспрессия Tim-3 на NK-клетках связана с прогрессирующими стадиями опухоли и неблагоприятным прогнозом. Кроме того, на функцию NK-клеток, по-видимому, влияет активность Tim-3 (da Silva IP, et al., 2014, Cancer Immunol Res. 2:410-22).

Чтобы подтвердить, могут ли гуманизированные анти-Tim-3 антитела промотировать NK-

опосредованную цитотоксичность, первичные NK-клетки выделяют из МКПК здоровых доноров, используя набор для выделения NK-клеток от Miltenyi Biotec (Германия) в соответствии с инструкцией изготовителя. После однодневной стимуляции с ИЛ-2 человека (1000 Ед/мл) NK-клетки совместно культивируют с клетками K562 в присутствии анти-Tim-3 антител, брефелдина А и анти-CD107а-АПК (eBioscience) при 37°C в течение 5 часов. Экспрессию CD107а на NK-клетках CD3⁺CD56⁺ выражают количественно с помощью проточной цитометрии. Результаты показывают, что анти-Tim-3 антитело hu425-2-3b увеличивает экспрессию CD107а, измеренную по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) и процентному отношению количества клеток (фиг. 8).

Пример 11. Анти-Tim-3 антитела уменьшают поверхностную экспрессию рецептора Tim-3.

Чтобы обратиться к возможности hu425-2-3b-включающей интернализации Tim-3, NK-клетки от здоровых доноров сначала инкубируют с hu425-2-3b (10 мкг/мл) в полной среде RPMI1640 либо при 37°C, либо при 4°C в течение 1 часа. Поверхностную экспрессию рецептора Tim-3 определяют по окрашиванию неконкурирующим Ab mu420 к Tim-3 (получено самостоятельно) с последующим окрашиванием козым антимышиным IgG-АПК (Biolegend). Как показано на фиг. 9, hu425-2-3b при 37°C вызывает значительное снижение поверхностной экспрессии Tim-3 по сравнению с IgG-обработанными клетками человека отрицательного контроля. Видимо, снижение является результатом вызванной анти-Tim-3 антителом интернализации рецептора, поскольку обнаружена четкая температурная зависимость в течение короткого периода времени. Результаты ясно показали, что hu4-25-2-3b вызывает понижающую регуляцию рецептора Tim-3, вероятно вследствие интернализации Tim-3. Ожидается, что вызывая интернализацию Tim-3, hu425-2-3b снижает взаимодействия Tim-3 с его многочисленными лигандами (такими как галектин-9 и FC).

Пример 12. Анти-Tim-3 антитела проявляют повышенную скорость интернализации.

Чтобы дополнительно исследовать интернализацию антител, вызванную анти-Tim-3 антителом интернализацию определяют, используя Tim-3-экспрессирующую линию NK-клеток (NK92MI/huTim-3) в разные моменты времени (1, 3, 5 и 18 часов). Кратко, анти-Tim-3 антитела (10 мкг/мл), включая hu425-2-3b, Ab1 и Ab2, инкубируют с NK92MI/huTim-3 ($5 \cdot 10^4$) либо при 37°C, либо при 4°C в течение 18 часов. Поверхностную экспрессию рецептора Tim-3 определяют по окрашиванию козым античеловеческим IgG-ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат). Вычисляют % интернализации как уменьшение (%) поверхностной экспрессии Tim-3 при 37°C по сравнению с уровнем экспрессии при 4°C. Как показано на фиг. 10, в ходе более короткой инкубации (1-5 часов) hu425-2-3b вызывает сопоставимые уровни интернализации Tim-3, как Ab1 и Ab2. Оно показывает значительно более устойчивую интернализацию, чем оба Ab1 и Ab2, после 18 часов инкубации, что предполагает постоянную активность интернализации Tim-3 hu425-2-3b.

Пример 13. Гуманизированные анти-Tim-3 mAb стимулируют иммунные клетки отдельно и в сочетании с mAb к PD-1.

Сообщалось, что иммунные ингибирующие рецепторы PD-1 и Tim-3 повышающе регулируются в "дисфункциональных" опухолевых антиген-специфических CD8⁺ Т-клетках у пациентов с запущенными опухолями и хроническими вирусными инфекциями (Fourcade J, et al., 2010, J Exp Med. 207:2175-86; Thommen DS, et al., 2015, Cancer Immunol Res. 3:1344-55; Jin HT, et al., 2010, Proc Natl Acad Sci USA. 107:14733-8). Одновременная блокада обоих рецепторов PD-1 и Tim-3 может распространить вызванные вакциной NY-ESO-1-специфические CD8⁺ Т-клетки (Fourcade J, et al., 2014, Cancer Res. 74:1045-55). Традиционный анализ Т-клеточного ответа, реакцию смешанных лимфоцитов (РСЛ), разрабатывают, чтобы охарактеризовать возможные костимулирующие эффекты анти-Tim-3 и анти-PD-1 антител. Кратко, "стимулирующие МКПК" предварительно обрабатывают митомицином С (100 мкг/мл, Sigma) и совместно культивировали с "реагирующими МКПК" другого донора в соотношении один к одному в полной среде RPMI1640 с 10% АВ сывороткой (Sigma) плюс анти-Tim-3 и/или анти-PD-1 mAb 317-4B6 (также называемое hu317-4B6, 317-4B6/IgG4mt10, описано в патенте США № 8735553). Реакции проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах в течение 4 дней с тройной точкой измерения, заданной для каждого условия. Секретию ИФН-γ в надосадочной жидкости клеточной культуры анализируют как считывание данных.

Результаты показывают, что hu425-2-3b значительно усиливает продуцирование ИФН-γ в РСЛ в зависимости от дозы. Сочетание hu425-2-3b с 317-4B6 (50 нг/мл) приводит к большему увеличению продуцирования ИФН-γ, чем hu425-2-3b или анти-PD-1 антитело в отдельности, демонстрируя костимулирующие эффекты анти-Tim-3 mAb с анти-PD-1 mAb (фиг. 11).

Предварительно обработанные митомицином С "стимулирующие МКПК" совместно культивировали с "реагирующими МКПК" в присутствии анти-Tim-3 mAb, или hu425-2-3b, или hu425-2-3b, плюс анти-PD-1 Ab hu317-4b6 (50 нг/мл) в 96-луночных плоскодонных планшетах в течение 4 дней. ИФН-γ в надосадочной жидкости определяют с помощью ИФА. Все условия были выполнены в трех экземплярах. Результаты показаны в виде среднего значения плюс СКО (среднеквадратическое отклонение).

Пример 14. Hu425-2-3b не обладает эффекторными функциями АЗКЦ и КЗЦ. Способность hu425-2-3b вызывать АЗКЦ и КЗЦ определяют, используя анализ *in vitro*, как описано ниже. IgG1mf (SEQ ID NO:

21) представляет собой мутант IgG1, содержащий комбинацию мутаций, E₂₃₃P, L₂₃₄A, L₂₃₅A, L₂₃₆Δ и R₃₂₉A (нумерация аминокислот основана на системе EU). Эти мутации предназначены для исключения связывания Fc со всеми FcγR, а также C1q.

АЗКЦ (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность).

Классический анализ АЗКЦ осуществляют для определения, может ли hu425-2-3b вызывать АЗКЦ. Линию эффекторных клеток для анализа, клетки NK92MI/CD16V, генерируют из клеток NK92MI (ATCC) путем совместной трансдукции плазмид экспрессии, содержащих CD16V₁₅₈ (аллель V158) и FcγR κДНК. Tim-3-экспрессирующую линию Т-клеток, HuT78/Tim-3, используют в качестве клеток-мишеней. Эффекторные клетки (4*10⁴) совместно культивируют с равным количеством клеток-мишеней в течение 5 часов в присутствии hu425-2-3b или контрольных антител, либо анти-ГКГС-I A, B, C положительного контроля (Biolegend), либо IgG человека отрицательного контроля. Цитотоксичность определяли в ходе анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ), используя набор для нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Мэдисон, Висконсин). Специфический лизис определяют по следующему уравнению.

$$\% \text{ Специфического лизиса} = \frac{\text{Экспериментальный} - \text{Спонтанный с эффектором} - \text{Спонтанный с мишенью}}{\text{Максимальный с мишенью} - \text{Спонтанный с мишенью}} * 100$$

Результаты подтверждают, что hu425-2-3b имеет такой же основной уровень АЗКЦ, что и антитело отрицательного контроля, тогда как анти-МНС-I A,B,C вызывает АЗКЦ дозозависимым образом (фиг. 12A).

КЗЦ (комплементзависимая цитотоксичность).

Будет ли hu425-2-3b инициировать КЗЦ, определяют, используя предварительно активированные МКПК человека и свежие аутологичные сыворотки от здоровых доноров. Клеточный лизис через КЗЦ определяли с помощью набора для анализа Celltiter glo (Promega, Пекин, Китай). Кратко, МКПК от здоровых доноров предварительно активировали ФГА (фитогемагглютинин) (10 мкг/мл, Sigma) в течение 3 дней и затем инкубируют в RPMI1640 плюс аутологичная сыворотка (15%) и hu425-2-3b или контрольные антитела (0,04-30 мкг/мл) в течение ночи при 37°C. Гибель клеток вследствие КЗЦ анализируют по уменьшению АТФ (аденозинтрифосфат), высвобождаемому из жизнеспособных клеток после клеточного лизиса в конце реакции. Анти-МНС-I A,B,C используют в качестве положительного контроля. Считывание флуоресценции выполняли, используя 96-луночный флуориметр (PHERA Star FS, BMG LABTECH), и активности КЗЦ вычисляют по считыванию относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) следующим образом: % активности КЗЦ = [(ОЕФ тест - ОЕФ фон)/(ОЕФ при полном клеточном лизисе - ОЕФ фон)] * 100. Результаты экспериментов показывают, что hu425-2-3b не имеет детектируемой КЗЦ с МКПК, выделенными у двух разных доноров. Наоборот, антитело положительного контроля, анти-МНС-I, вызывает значительную активность КЗЦ (фиг. 12B).

Результаты показали, что hu425-2-3b элиминирует эффекторные функции АЗКЦ и КЗЦ при сохранении оптимальных физико-химических свойств.

Пример 15. Анти-Tim-3 антитело в сочетании с анти-PD-1 антителом ингибирует рост опухоли на мышинной ксенотрансплантатной модели рака.

Возможную противораковую активность антитела к Tim-3 оценивают в сочетании с анти-PD-1 антителом на ксенотрансплантатной модели рака, в которой иммунокомпроментированным мышам вживляют раковые клетки человека и аллогенные МКПК. Кратко, мышей NOD/SCID предварительно обрабатывают циклофосфамидом (150 мг/кг) за 2 дня до инокуляции опухоли. МКПК человека выделяют из периферической крови здоровых добровольцев, смешивают с клетками плоскоклеточной карциномы A431 (номер по каталогу CRL-1555, ATCC) в матригеле и инъецируют подкожно животным. Начиная с 0-го дня, животных случайным образом распределяют на 4 группы по 5-10 мышей на группу. Мышам делают раз в неделю (QW, once a week) инъекцию в/б наполнителя (ФСБ), 5 мг/кг анти-Tim-3 mAb химерного 425 (ch425), анти-PD-1 антитела 317-4B6 (1 мг/кг) или комбинированной терапии (5 мг/кг ch425 плюс 1 мг/кг 317-4B6) в течение 4 недель. Размер опухоли отдельной мыши регистрируют два раза в неделю, при этом мышей ежедневно проверяют на клинические признаки токсичности в течение исследования. Объемы опухолей вычисляют, используя формулу: $[D * (d^2)]/2$, в которой D представляет собой длинный диаметр опухоли, и d представляет собой короткий диаметр. Все исследования на животных проводятся в соответствии с Animal Care and Use Procedure (процедура содержания и использования животных) от Weigene.

Как показано на фиг. 13, обработка только ch425 при дозе 5 мг/кг оказывает небольшой эффект или не влияет на рост опухоли. 317-4B6 при дозе 1 мг/кг показывает тенденцию к замедленному росту опухоли без статистической значимости (P>0,05). Однако комбинированная обработка ch425 и 317-4B6 показывает значительные синергетические эффекты, ингибируя рост опухоли более чем на 60% по сравнению с группой, получавшей наполнитель.

Результаты показывают, что комбинированная терапия ch425 с 317-4B6 может активировать иммунные клетки человека, ингибируя рост опухоли на мышинной in vivo модели рака, что согласуется с данными in vitro, описанными в примере 11.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело, способное связываться с Tim-3 (Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен муцина 3) человека, содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 26 и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 27.

2. Антитело по п.1, содержащее:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 28, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 36; или

(ii) вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 28, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 30.

3. Антитело по п.1, содержащее:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий одну или более консервативных замен в SEQ ID NO 28, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий одну или более консервативных замен в SEQ ID NO 36; или

(ii) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий одну или более консервативных замен в SEQ ID NO 28, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий одну или более консервативных замен в SEQ ID NO 30.

4. Антитело по п.1, содержащее:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 28, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 36; или

(ii) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 28, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 30.

5. Антитело по п.1, представляющее собой Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (ScFv).

6. Антитело по п.1, содержащее константную область тяжелой цепи подкласса IgG1 (иммуноглобулин G), IgG2, IgG3 или IgG4 или ее вариант, и константную область легкой цепи типа каппа или лямбда или ее вариант.

7. Антитело по п.6, содержащее вариантную константную область тяжелой цепи подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, обеспечивающую пониженную или элиминированную эффекторную функцию.

8. Антитело по п.7, где эффекторная функция представляет собой антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность или комплементзависимую цитотоксичность.

9. Антитело по п.6, где антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека или ее вариант.

10. Антитело по п.9, где вариантная константная область тяжелой цепи IgG1 человека содержит одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из E233P, L₂₃₄A, L₂₃₅A, L₂₃₆Δ и P₃₂₉A.

11. Антитело по п.10, где антитело содержит вариантную константную область тяжелой цепи IgG1 человека, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 21, и константную область легкой цепи каппа IgG1 человека.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

13. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела по любому из пп.1-11 в количестве, эффективном для лечения рака.

14. Способ по п.13, где рак выбран из рака легкого, рака печени, рака желудка, рака шейки матки, меланомы, рака почки, рака молочной железы, колоректального рака, лейкоза, лимфомы, рака яичника, рака головы и шеи или метастатического поражения раком.

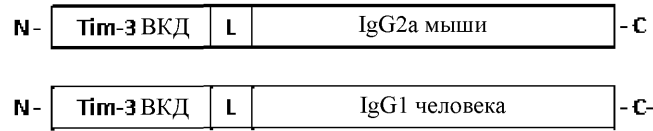
15. Способ по п.13, где антитело вводят в сочетании со вторым терапевтическим агентом или процедурой, где второй терапевтический агент или процедуру выбирают из химиотерапии, таргетной терапии, онколитического лекарственного средства, цитотоксического агента, иммунной терапии, цитокина, хирургической процедуры, лучевой процедуры, активатора костимулирующей молекулы, ингибитора ингибирующей молекулы, вакцины или клеточной иммунотерапии.

16. Способ по п.13, где антитело вводят в сочетании с ингибитором молекулы иммунной контрольной точки, выбранной из PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 или TGFR.

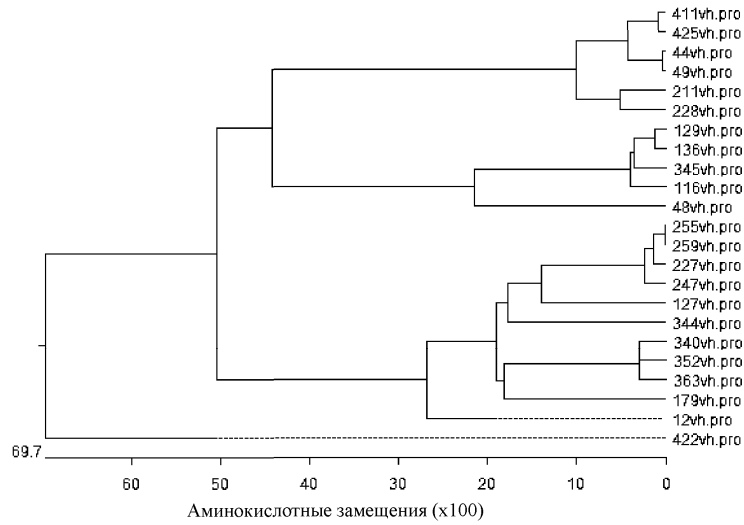
17. Способ по п.13, где антитело вводят в сочетании с анти-PD-1 mAb 317-4B6 или 317-4B6/IgG4mt10.

18. Способ лечения инфекционного заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела по любому из пп.1-11 в количестве, эффективном для лечения инфекционного заболевания.

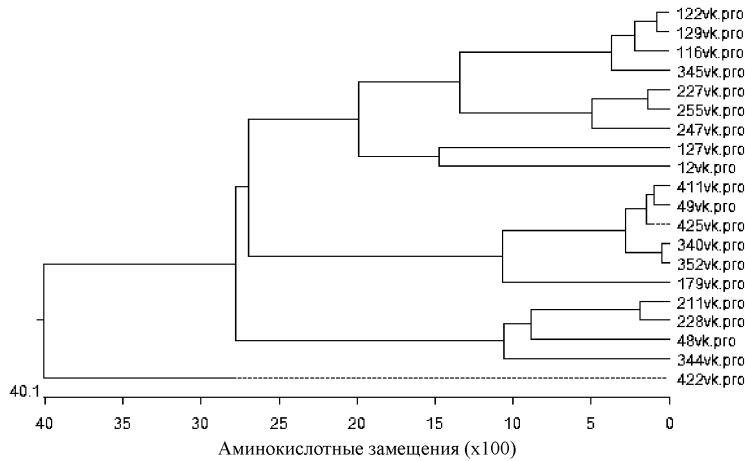
19. Способ по п.18, где инфекционное заболевание представляет собой хроническую вирусную инфекцию, выбранную из инфекции ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) и инфекции ВГС (вирус гепатита С).



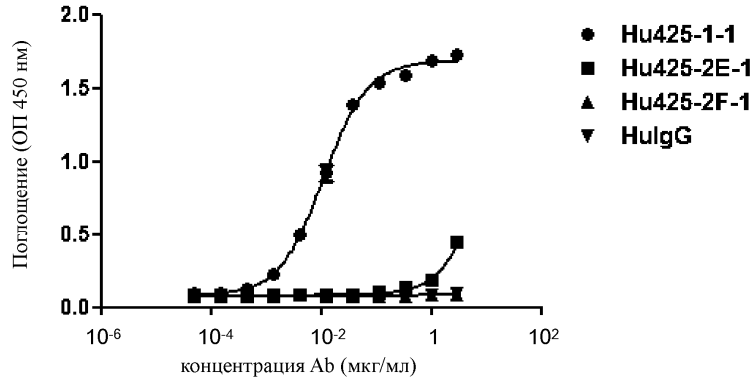
Фиг. 1



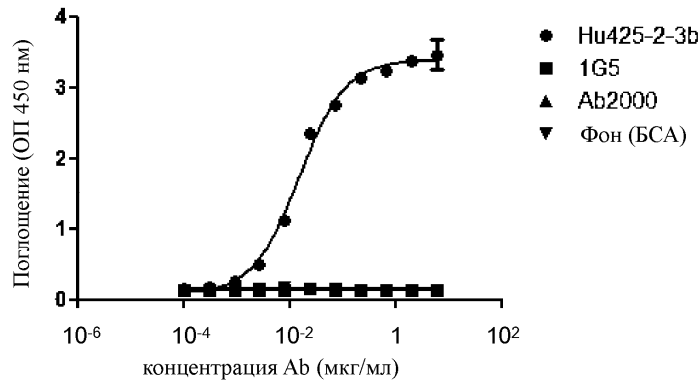
Фиг. 2А



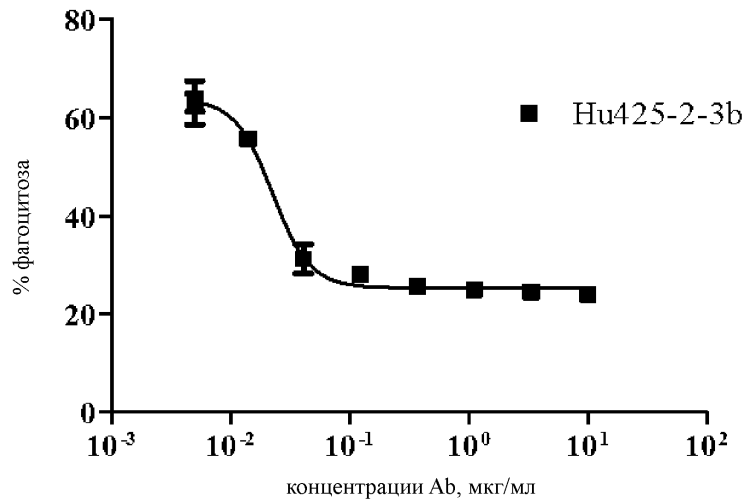
Фиг. 2В



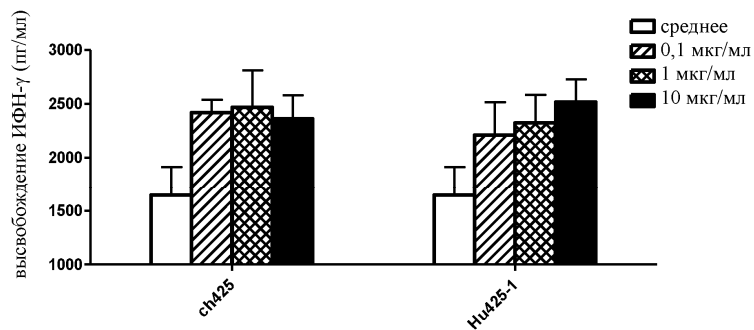
Фиг. 3



Фиг. 4

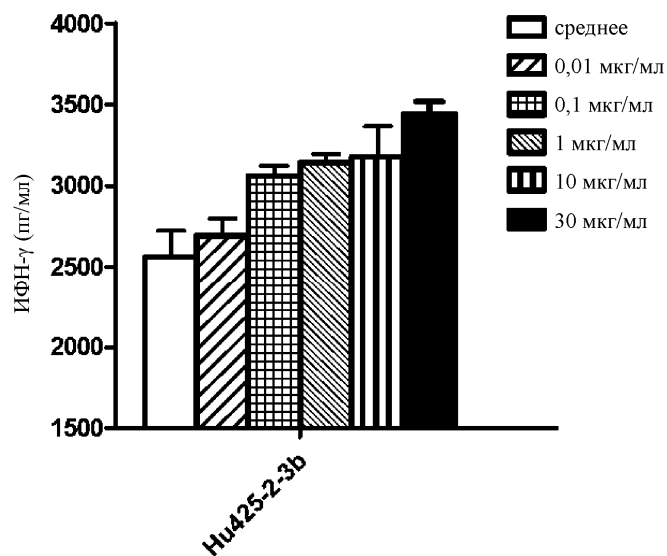


Фиг. 5

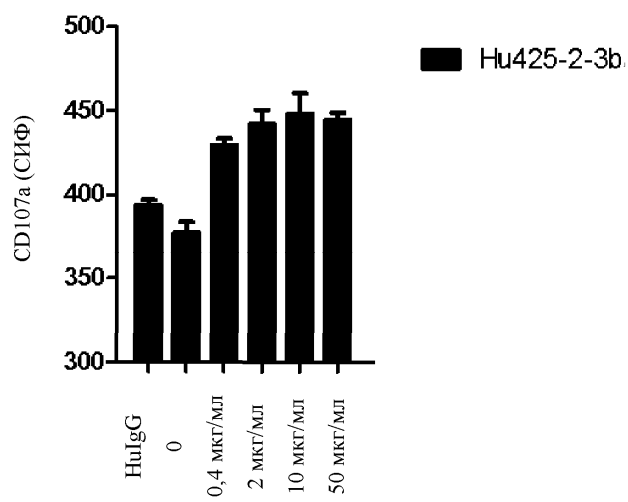


Анти-Tim-3-Ab

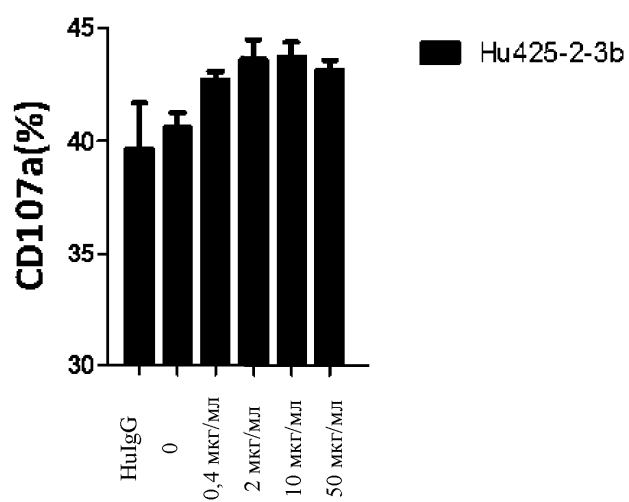
Фиг. 6



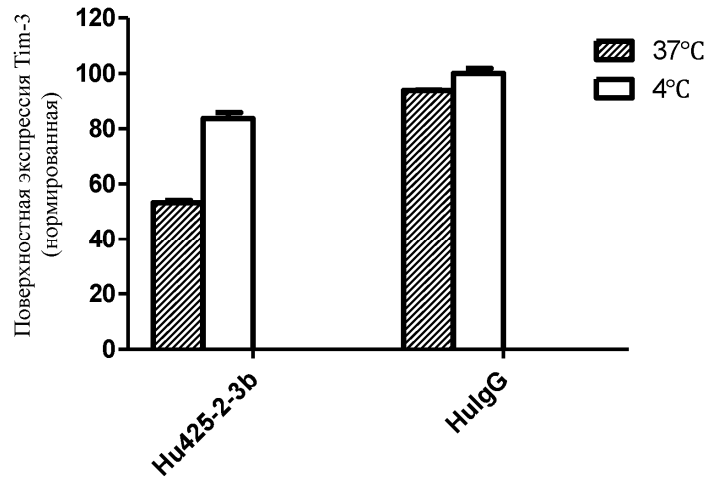
Фиг. 7



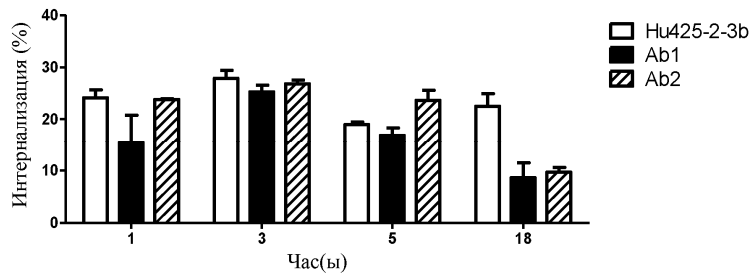
Фиг. 8А



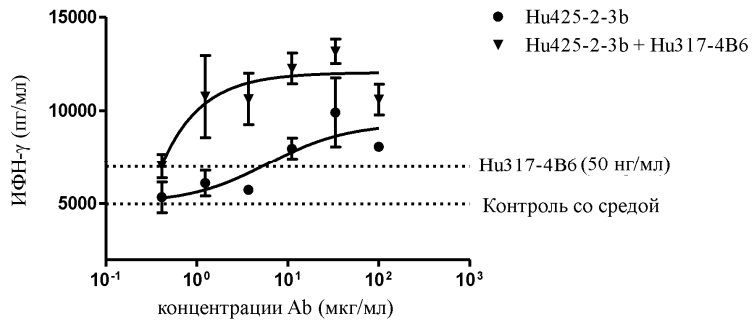
Фиг. 8В



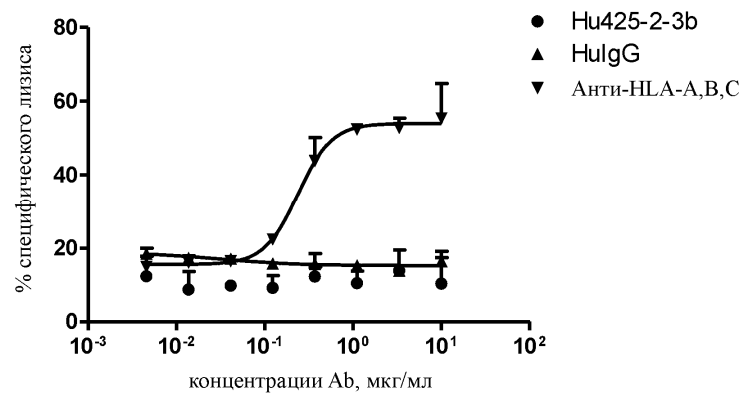
Фиг. 9



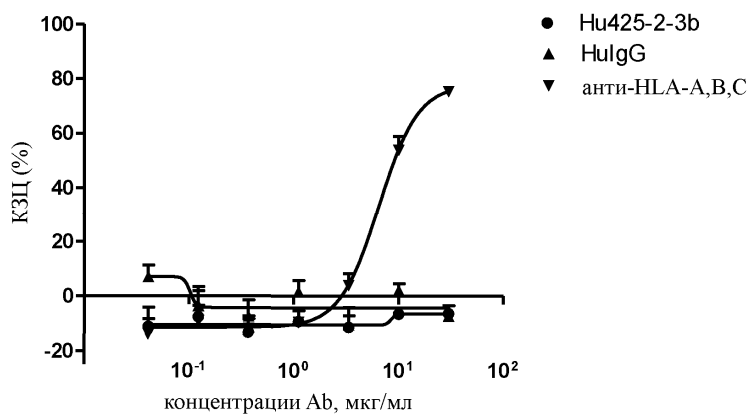
Фиг. 10



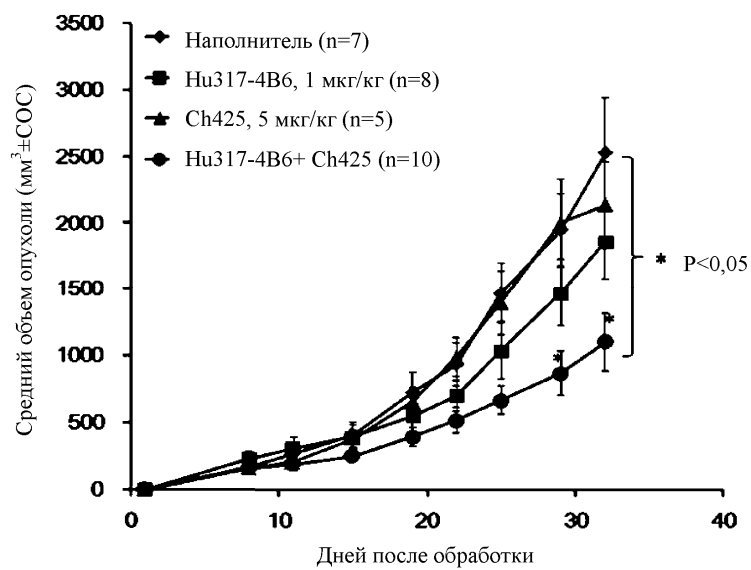
Фиг. 11



Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 13

