

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043100**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.25

(21) Номер заявки
201892804

(22) Дата подачи заявки
2017.05.26

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ TIM-3 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/342,610; 62/420,276**

(32) **2016.05.27; 2016.11.10**

(33) **US**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/US2017/034645**

(87) **WO 2017/205721 2017.11.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЙДЖЕНУС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Ван Дейк Марк (NL), Бреус-Нистром
Екатерина Владимировна (CH),
Уилсон Николас Стюарт, Уэйт
Джереми Дейл, Андервуд Деннис
Джон (US)**

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

(56) **WO-A1-2016071448
US-A1-2015218274**

NGIOW S.F. ET AL.: "Prospects for TIM3-Targeted Antitumor Immunotherapy", CANCER RESEARCH, AACR - AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 71, no. 21, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 6567-6571, XP002741957, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1487 [retrieved on 2011-10-18] The whole document, in particular, the key findings on p.6569

H. Toni Jun ET AL.: "Generation of antagonistic anti-TIM-3 and anti-LAG-3 monoclonal antibodies for potential novel immunotherapy combinations", 31 December 2015 (2015-12-31), XP055286315, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2014-LB-266, Retrieved from the Internet: URL:http://www.tesarobio.com/documents/2014AACRposterLB266.pdf [retrieved on 2016-07-06], antagonistic anti-TIM-3 and LAG-2 antibodies

JEAN DA SILVA CORREIA ET AL.: "Identification and Characterization of a Potent Anti-Human TIM-3 Antagonist", AACR CONFERENCE: TUMOR IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY: A NEW CHAPTER, 2 December 2014 (2014-12-02), XP055400172, abstract & Tesaro: "TESARO and AnaptysBio Expand Immuno-Oncology Collaboration to Include Novel Bispecific Antibody Candidate", 2 December 2014 (2014-12-02), XP055400165, Retrieved from the Internet: URL:http://files.shareholder.com/downloads/AMDA-Z6KN1/0x0x797358/b3cd01f6-d9a7-4e69-b71c-63242cb8cda6/TSR0_News_2014_12_2_General_Releases.pdf [retrieved on 2017-08-22], the whole document
CN-B-102492038

(57) Согласно изобретению предложены антитела, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и антагонизируют функцию TIM-3. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела, экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения указанных антител, а также способы лечения индивида с применением указанных антител.

B1**043100****043100****B1**

1. Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/342610, поданной 27 мая 2016 г.; и предварительной заявке на патент США № 62/420276, поданной 10 ноября 2016 г., каждая из которых полностью включена посредством ссылки в настоящий документ.

2. Область техники

Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека), и способам их применения.

3. Уровень техники

Т-клеточный иммуноглобулин и домен 3 муцина (TIM-3) представляет собой мембранный белок типа I суперсемейства иммуноглобулинов (Ig). Он содержит внеклеточный подобный вариабельному домену Ig (IgV) домен, внеклеточный муциноподобный домен и цитоплазматический домен с шестью консервативными остатками тирозина (Monney et al. (2002) Nature 415:536-41). TIM-3 экспрессируется на активированных Т-хелперах типа 1 (Th1) и CD8⁺ Т-лимфоцитах (Tc1), некоторых макрофагах (Monney et al. (2002) Nature 415:536-41), активированных естественных киллерных (NK) клетках (Ndhlovu et al. (2012) Blood 119 (16) :3734-43) и ИЛ-17-продуцирующих клетках Th17 (Nakae et al. (2007) J. Leukoc. Biol. 81: 1258-68).

Исследования показали, что функция TIM-3 ингибирует опосредованные Т-клетками, миелоидными клетками и NK-клетками ответы и способствует иммунологической толерантности. Например, IgV-пептид TIM-3, слитый с доменом иммуноглобулина, который связывает и нейтрализует лиганды TIM-3, вызывал гиперпролиферацию клеток Th1 и высвобождение цитокинов Th1 у иммунизированных мышей (Sabatos et al. (2003) Nat. Immunol. 4:1102-10). Так, введение *in vivo* антитела против TIM-3 повышало патологическую тяжесть экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, модели рассеянного склероза на животных (Monney et al. (2002) Nature 415:536-41). Кроме того, экспрессия TIM-3 положительно регулируется в CD8⁺ Т-клетках у раковых пациентов. Например, приблизительно в 30% NY-ESO-1-специфических CD8⁺ Т-клеток у пациентов с распространенной меланомой наблюдалась положительная регуляция экспрессии TIM-3 (Fourcade et al. (2010) J. Exp. Med. 207:2175-86).

Учитывая очевидную роль TIM-3 человека в модуляции иммунного ответа, терапевтические агенты, разработанные для антагонизации сигнализации TIM-3, являются очень перспективными для лечения заболеваний, в которые вовлечено опосредованное TIM-3 подавление иммунитета.

4. Краткое описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и антагонизируют функцию TIM-3, например опосредованное TIM-3 подавление иммунитета. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела, экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения указанных антител, и способы лечения индивида с применением указанных антител. Антитела согласно описанию в настоящем документе, в частности, подходят для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и/или уменьшения опосредованного Treg подавления иммунитета, и, соответственно, для лечения рака у индивида, или для лечения или предотвращения инфекционного заболевания у индивида.

Соответственно, согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом:

(a) CDRH1 содержит последовательность аминокислот X₁X₂X₃X₄X₅S (SEQ ID NO: 48), где

X₁ представляет собой R, S, A, G, K, M или T,

X₂ представляет собой Q, S, A, G, R или T,

X₃ представляет собой N, Y, G или Q,

X₄ представляет собой A или Q, и

X₅ представляет собой W, M, A, S или T;

(b) CDRH2 содержит последовательность аминокислот WVSAISGSGGSTY (SEQ ID NO: 2);

(c) CDRH3 содержит последовательность аминокислот AKGGDYGGNYFD (SEQ ID NO: 3);

(d) CDRL1 содержит последовательность аминокислот X₁ASQSVX₂SSYLA (SEQ ID NO: 52), где

X₁ представляет собой R или G, и

X₂ отсутствует или представляет собой S;

(e) CDRL2 содержит последовательность аминокислот X₁ASX₂RAT (SEQ ID NO: 53), где

X₁ представляет собой D или G, и X₂ представляет собой N, S или T; и

(f) CDRL3 содержит последовательность аминокислот QQYGSSPX₁T (SEQ ID NO: 54), где X₁ представляет собой L или I.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3,

при этом:

- (a) CDRH1 содержит последовательность аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5S$ (SEQ ID NO: 48), где X_1 представляет собой R, S, A, G, K, M или T, X_2 представляет собой Q, S, A, G, R или T, X_3 представляет собой N, Y, G или Q, X_4 представляет собой A или Q, и X_5 представляет собой W, M, A, S или T;
- (b) CDRH2 содержит последовательность аминокислот WVSAISGSGGSTY (SEQ ID NO: 2);
- (c) CDRH3 содержит последовательность аминокислот AKGGDYGGNYFD (SEQ ID NO: 3);
- (d) CDRL1 содержит последовательность аминокислот $X_1ASQSVX_2SSYLA$ (SEQ ID NO: 52), где X_1 представляет собой R или G, и X_2 отсутствует или представляет собой S;
- (e) CDRL2 содержит последовательность аминокислот X_1ASX_2RAT (SEQ ID NO: 53), где X_1 представляет собой D или G, и X_2 представляет собой N, S или T; и
- (f) CDRL3 содержит последовательность аминокислот QQYGSSPX₁T (SEQ ID NO: 54), где X_1 представляет собой L или I.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом указанное антитело интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 человека, а CDRH3 содержит последовательность аминокислот AKGGDYGGNYFD (SEQ ID NO: 3).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 человека, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, при этом указанное антитело интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 человека, а CDRH3 содержит последовательность аминокислот AKGGDYGGNYFD (SEQ ID NO: 3).

Согласно определенным вариантам реализации:

- (a) CDRH1 содержит последовательность аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5S$ (SEQ ID NO: 48), где X_1 представляет собой R, S, A, G, K, M или T, X_2 представляет собой Q, S, A, G, R или T, X_3 представляет собой N, Y, G или Q, X_4 представляет собой A или Q, и X_5 представляет собой W, M, A, S или T;
- (b) CDRH2 содержит последовательность аминокислот WVSAISGSGGSTY (SEQ ID NO: 2);
- (c) CDRL1 содержит последовательность аминокислот $X_1ASQSVX_2SSYLA$ (SEQ ID NO: 52), где X_1 представляет собой R или G, и X_2 отсутствует или представляет собой S;
- (d) CDRL2 содержит последовательность аминокислот X_1ASX_2RAT (SEQ ID NO: 53), где X_1 представляет собой D или G, и X_2 представляет собой N, S или T; и
- (e) CDRL3 содержит последовательность аминокислот QQYGSSPX₁T (SEQ ID NO: 54), где X_1 представляет собой L или I.

Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1 содержит последовательность аминокислот X_1X_2NAWS (SEQ ID NO: 49), где X_1 представляет собой R или A; и X_2 представляет собой Q или R. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1 содержит последовательность аминокислот $X_1X_2GX_3S$ (SEQ ID NO: 50), где X_1 представляет собой K, M или G; X_2 представляет собой A или S; и X_3 представляет собой S или T. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1 содержит последовательность аминокислот X_1X_2QQAS (SEQ ID NO: 51), где X_1 представляет собой S, R, T или G; и X_2 представляет собой A, S, T или G. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1 содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1 и 4-12.

Согласно некоторым вариантам реализации CDRL1 содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 13-16. Согласно некоторым вариантам реализации CDRL2 содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 17-21. Согласно некоторым вариантам реализации CDRL3 содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 22 и 23.

Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, последовательностях SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 4, 2 и 3; 5, 2 и 3; 6, 2 и 3; 7, 2 и 3; 8, 2 и 3; 9, 2 и 3; 10, 2 и 3; 11, 2 и 3; или 12, 2 и 3.

Согласно некоторым вариантам реализации CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательности

стью 2×10^4 клеток на лунку в планшет для тканевых культур; (b) добавление 1111 нг/мл α HFc-NC-DM1 и 1111 нг/мл указанного антитела или rab1944w (IgG₁ N297A) до конечного объема 100 мкл/лунку; (c) инкубацию при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч; (d) измерение выживания клеток, экспрессирующих TIM-3 человека; и (e) вычисление процента относительного выживания клеток по сравнению с необработанными клетками, экспрессирующими TIM-3 человека. Согласно некоторым вариантам реализации процент выживания клеток в присутствии указанного антитела по меньшей мере на 50% ниже, чем процент выживания клеток в присутствии rab1944w (IgG₁ N297A). Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки, экспрессирующие TIM-3 человека, представляют собой клетки Kasumi-3. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки, экспрессирующие TIM-3 человека, представляют собой клетки Jurkat, сконструированные для экспрессии TIM-3 человека.

Согласно некоторым вариантам реализации в присутствии указанного антитела выживает меньший процент клеток, экспрессирующих TIM-3 человека, чем в присутствии Hum11 (IgG₄ S228P), в анализе, включающем следующие этапы: (a) высевание клеток, экспрессирующих TIM-3 человека, с плотностью 2×10^4 клеток на лунку в планшет для тканевых культур; (b) добавление 1111 нг/мл α HFc-NC-DM1 и 1111 нг/мл указанного антитела или Hum11 (IgG₄ S228P) до конечного объема 100 мкл/лунку; (c) инкубацию при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч; (d) измерение выживания клеток, экспрессирующих TIM-3 человека; и (e) вычисление процента относительного выживания клеток по сравнению с необработанными клетками, экспрессирующими TIM-3 человека. Согласно некоторым вариантам реализации процент выживания клеток в присутствии указанного антитела по меньшей мере на 50% ниже, чем процент выживания клеток в присутствии Hum11 (IgG₄ S228P). Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки, экспрессирующие TIM-3 человека, представляют собой клетки Kasumi-3. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки, экспрессирующие TIM-3 человека, представляют собой клетки Kasumi-3 (ATCC® CRL-2725™). Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки, экспрессирующие TIM-3 человека, представляют собой клетки Jurkat, сконструированные для экспрессии TIM-3 человека.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 55. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентична последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 24-35. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 24-35. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам реализации N-концевой остаток глутамата (E) вариабельной области тяжелой цепи антитела согласно описанию в настоящем документе заменяют на остаток пироглутамата (pE).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 56. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 36-47. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 36-47. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам реализации N-концевой остаток глутамата (E) вариабельной области легкой цепи антитела согласно описанию в настоящем документе заменяют на остаток пироглутамата (pE).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 24-35. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым ва-

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 36-47. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 69. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательностях SEQ ID NO: 76 или 77. Согласно некоторым вариантам реализации N-концевой остаток глутамата (E) легкой цепи антитела согласно описанию в настоящем документе заменяют на остаток пироглутамата (pE).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, отличающееся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи и указанная вариабельная область легкой цепи, соответственно, содержат последовательности аминокислот, последовательностях SEQ ID NO: 24 и 36; 24 и 38; 26 и 42; 24 и 42; 24 и 46; 24 и 43; 26 и 43; 26 и 46; 26 и 41; 24 и 41; 25 и 39; 24 и 47; 25 и 40; 26 и 47; 25 и 37; 25 и 45; 25 и 44; 25 и 46; 25 и 42; 25 и 41; 25 и 43; 25 и 47; 27 и 46; 28 и 46; 29 и 46; 30 и 46; 31 и 46; 32 и 46; 33 и 46; 34 и 46; или 35 и 46. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи и указанная вариабельная область легкой цепи, соответственно, содержат последовательности аминокислот, последовательностях SEQ ID NO: 25 и 46. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи и указанная вариабельная область легкой цепи, соответственно, содержат последовательности аминокислот, последовательностях SEQ ID NO: 28 и 46. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи и указанная вариабельная область легкой цепи, соответственно, содержат последовательности аминокислот, последовательностях SEQ ID NO: 32 и 46. Согласно некоторым вариантам реализации N-концевой остаток глутамата (E) вариабельной области тяжелой цепи антитела согласно описанию в настоящем документе заменяют на остаток пироглутамата (pE); и/или N-концевой остаток глутамата (E) вариабельной области легкой цепи указанного антитела заменяют на остаток пироглутамата (pE).

- 5 -

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 человека, содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 65, и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 69.

Согласно некоторым вариантам реализации N-концевой остаток глутамата (E) тяжелой цепи антитела согласно описанию в настоящем документе заменяют на остаток пироглутамата (pE); и/или N-концевой остаток глутамата (E) легкой цепи указанного антитела заменяют на остаток пироглутамата (pE).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности зародышевой линииIGHV3-23 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности зародышевой линии человека, выбранной из группы, состоящей из IGKV1-27, IGKV3-11, IGKV3-20 и IGKV3D-20.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 человека, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности зародышевой линииIGHV3-23 человека, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности зародышевой линии человека, выбранной из группы, состоящей из IGKV1-27, IGKV3-11, IGKV3-20 и IGKV3D-20.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область тяжелой цепи представляет собой IgG₁. Согласно некоторым вариантам реализации указанная последовательность аминокислот IgG₁ содержит мутацию N297A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанная последовательность аминокислот IgG₁ содержит мутацию N297Q в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанный IgG₁ представляет собой нефукозилированный IgG₁. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область тяжелой цепи представляет собой IgG₄. Согласно некоторым вариантам реализации указанная последовательность аминокислот IgG₄ содержит мутацию S228P в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 74.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgGκ и IgGλ, человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область легкой цепи представляет собой IgGκ. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 76. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область легкой цепи представляет собой IgGλ.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, перекрестно конкурирующее за связывание с TIM-3 человека с антителом согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, перекрестно конкурирующее за связывание с TIM-3 человека с антителом, содержащим последовательности аминокислот вариабельных областей тяжелых и легких цепей, последовательностях SEQ ID NO: 55 и 56, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, перекрестно конкурирующее за связывание с TIM-3 человека с антителом, содержащим последовательности аминокислот вариабельных областей тяжелых и легких цепей, последовательностях SEQ ID NO: 25 и 46, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, перекрестно конкурирующее за связывание с TIM-3 человека с антителом, содержащим последовательности аминокислот вариабельных областей тяжелых и легких цепей, последовательностях SEQ ID NO: 28 и 46, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, перекрестно конкурирующее за связывание с TIM-3 человека с антителом, содержащим последовательности аминокислот вариабельных областей тяжелых и легких цепей, последовательностях SEQ ID NO: 32 и 46, соответственно.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, которое связывается с тем же эпитопом TIM-3 человека, что и антитело согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело, которое связывается с тем же эпитопом TIM-3 человека, что и антитело, содержащее последовательности аминокислот вариабельных областей тяжелых и легких цепей, последовательностях SEQ ID NO: 55 и 56, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

[illegible]

- 10 -

ем анализа Pepscan, например, согласно описанию в разделе примеров, или с применением аланинового сканирования, например, согласно описанию в разделе примеров.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека, которая представляет собой вариант константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа, причем указанный вариант константной области тяжелой цепи IgG человека связывается с Fc-гамма-рецептором человека с аффинностью, более низкой по сравнению с аффинностью связывания константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа с рецептором Fc-гамма человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный Fc-гамма-рецептор человека выбран из группы, состоящей из FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант константной области тяжелой цепи IgG человека представляет собой константную область IgG₁, содержащую мутацию N297A.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой антитело человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело является антагонистическим по отношению к TIM-3 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело деактивирует, уменьшает или ингибирует активность TIM-3 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело ингибирует связывание TIM-3 человека с фосфатидилсеринем. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело индуцирует продуцирование ИФНγ мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК), стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA). Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело индуцирует продуцирование ИФНγ или ФНОα инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (ИОЛ), стимулированными антителами против CD3 и против CD28.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 человека.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело согласно описанию в настоящем документе, конъюгированное с цитотоксическим агентом.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело согласно описанию в настоящем документе конъюгированное с цитостатическим агентом.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело согласно описанию в настоящем документе конъюгированные с токсином.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело согласно описанию в настоящем документе конъюгированные с радионуклидом.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или выделенное антитело согласно описанию в настоящем документе конъюгированные с детектируемой меткой.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело согласно описанию в настоящем документе и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен полинуклеотид или выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую и/или легкую цепь антитела согласно описанию в настоящем документе. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен вектор, содержащий указанный полинуклеотид. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая указанный полинуклеотид. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая указанный вектор. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела согласно описанию в настоящем документе, при этом указанный способ включает культивирование указанной клетки-хозяина таким образом, чтобы происходила экспрессия указанного полинуклеотида и продуцирование указанного антитела. Согласно одному варианту реализации указанный способ представляет собой способ *in vitro*.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, или к фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, или к полинуклеотиду согласно настоящему изобретению, или к вектору согласно настоящему изобретению, или к рекомбинантной клетке-хозяину согласно настоящему изобретению для применения в качестве медикамента.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, или к фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, или к полинуклеотиду согласно настоящему изобретению, или к вектору согласно настоящему изобретению, или к рекомбинантной клетке-хозяину согласно настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у индивида, при этом указанный способ включает введение указанному индивиду эффективного количества антитела или фармацевтической композиции согласно описанию в настоящем документе. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения рака у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антитела или фар-

мацевтической композиции согласно описанию в настоящем документе. Согласно определенным вариантам реализации описанных выше способов указанное анти тело или указанную фармацевтическую композицию вводят подкожно. Согласно определенным вариантам реализации описанных выше способов указанное анти тело или указанную фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Согласно определенным вариантам реализации описанных выше способов указанное анти тело или указанную фармацевтическую композицию вводят внутрь опухоли. Согласно определенным вариантам реализации описанных выше способов указанное анти тело или указанную фармацевтическую композицию доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел. Согласно определенным вариантам реализации описанных выше способов указанное анти тело или указанную фармацевтическую композицию вводят интратекарально.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у индивида.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у индивида, включающем введение указанному индивиду эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения рака.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения рака у индивида.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения рака у индивида, включающем введение указанному индивиду эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения согласно настоящему изобретению указанные антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию вводят подкожно или внутривенно. Согласно другому варианту реализации антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения согласно настоящему изобретению указанные антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию вводят внутрь опухоли или интратаретально.

Согласно некоторым вариантам реализации описанные выше способы дополнительно включают введение дополнительного терапевтического агента указанному индивиду. Соответственно, согласно одному варианту реализации антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения в способе согласно настоящему изобретению, указанный способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического агента указанному индивиду.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению; и (b) дополнительному терапевтическому агенту для применения в качестве медикамента.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению; и (b) дополнительному терапевтическому агенту для применения в способе лечения рака.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или составному набору, содержащему (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению и (b) дополнительный терапевтический агент.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтическое средство. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой радиотерапевтическое средство.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой нацеленный на контрольную точку агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный нацеленный на контрольную точку агент выбран из группы, состоящей из антител-

антагониста против PD-1, антитела-антагониста против PD-L1, антитела-антагониста против PD-L2, антитела-антагониста против CTLA-4, антитела-антагониста против TIM-3, антитела-антагониста против LAG-3, антитела-антагониста против CEACAM1, антитела-агониста против CD137, антитела-антагониста против TIGIT, антитела-антагониста против VISTA, антитела-агониста против GITR и антитела-агониста против OX40. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО). Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор выбран из группы, состоящей из эпакадостата, F001287, индоксимода и NLG919. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор представляет собой эпакадостат. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор представляет собой F001287. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор представляет собой индоксимод. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор представляет собой NLG919.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой вакцину. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вакцина содержит комплекс пептида и белка теплового шока (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. Согласно некоторым вариантам реализации указанный белок теплового шока представляет собой hsc70 и находится в комплексе с опухлеассоциированным антигенным пептидом. Согласно некоторым вариантам реализации указанный белок теплового шока представляет собой белок gp96 и находится в комплексе с опухлеассоциированным антигенным пептидом, причем указанный HSPPC происходит из опухоли, полученной от индивида. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент содержит TCR. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой растворимый TCR. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой клетку, экспрессирующую TCR. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-МНС. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой адъювант. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению; и (б) вакцине для применения в качестве медикамента, например, для применения в способе лечения рака, необязательно отличающейся тем, что указанная вакцина содержит комплекс пептида и белка теплового шока (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или составному набору, содержащему (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению и (б) вакцину, необязательно отличающуюся тем, что указанная вакцина содержит комплекс пептида и белка теплового шока (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом.

5. Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена группа столбчатых диаграмм, отражающих связывание антител против TIM-3 pab2085 (IgG₁) и pab2088 (IgG₁) или изотипического контрольного антитела с клетками мыши 1624-5 или 1624-5 дикого типа, сконструированными для экспрессии TIM-3 человека, по оценке с применением проточной цитометрии.

На фиг. 2А и 2В представлена пара графиков, отражающих связывание антител против TIM-3 pab2085 (IgG₁) (фиг. 2А) и pab2088 (IgG₁) (фиг. 2В) с рекомбинантным TIM-1-His человека (rhTIM-1-His), рекомбинантным TIM-4-His человека (rhTIM-4 His), рекомбинантным TIM-3-His человека (rhTIM-3 His), рекомбинантным TIM-3-Fc человека (rhTIM-3-Fc), и рекомбинантным TIM-3-Fc яванского макака (rcmTIM-3-Fc) по оценке с применением анализа Lumines. На графиках представлена зависимость значений медианной интенсивности флуоресценции (MFI) от концентраций антитела.

На фиг. 3А, 3В, 3С и 3D представлена группа гистограмм, отражающих связывание антител против TIM-3 или изотипического контрольного антитела с клетками 1624-5 мыши, сконструированными для экспрессии TIM-3 человека (фиг. 3А и 3В) или яванского макака TIM-3 (фиг. 3С и 3D), по оценке с применением проточной цитометрии. Антитела против TIM-3, тестируемые в указанном исследовании, включают pab2173, pab2174, pab2175, pab2176, pab2177, pab2178, pab2179, pab2180, pab2181, pab2182, pab2183, pab2184, pab2185, pab2186, pab2187, pab2188, pab2189, pab2190, pab2191 и pab2192, все из которых содержат Fc-область IgG₁.

На фиг. 4 приведен график, отражающий связывание антитела против TIM-3 pab2085, варианты с оптимизированной легкой цепью (pab2184, pab2186, pab2187, pab2188, pab2189, pab2190, pab2191 и pab2192) или изотипического контрольного антитела с первичными CD8⁺ Т-клетками человека, активи-

рованными антителами против CD3 и против CD28, измеренное с применением проточной цитометрии. Варианты с оптимизированной легкой цепью содержат вариант Fc-области IgG₁. На графиках представлена зависимость значений MFI от ряда протестированных концентраций антител.

На фиг. 5 приведен график, отражающий связывание антитела против TIM-3 rab2188 (вариант IgG₁) или изотипического контрольного антитела с первичными миелоидными клетками CD11b⁺ яванского макака, измеренное с применением проточной цитометрии. На графиках представлена зависимость значений MFI от концентраций антитела.

На фиг. 6A и 6B приведены графики, отражающие процент связывания между облученными экспрессирующими фосфатидилсерин клетками лимфомы мыши WR19L и рекомбинантным TIM-3-Fc человека (фиг. 6A) или рекомбинантным TIM-3-Fc яванского макака (фиг. 6B) в присутствии титрованной дозы антитела против TIM-3 или изотипического контрольного антитела IgG₁. Антитела против TIM-3, протестированные в указанном исследовании, представлены rab2085 (IgG₁) и rab2188 (вариант IgG₁).

На фиг. 7 приведена столбчатая диаграмма, отражающая продуцирование ИФН γ , индуцированное антителами против TIM-3 или изотипическим контрольным антителом IgG₁ в комбинации с антителом против PD-1 пембролизумабом в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) человека при стимуляции энтеротоксином стафилококка A (SEA). Антитела против TIM-3, протестированные в указанном исследовании, включают варианты с оптимизированной легкой цепью rab2175 (IgG₁), rab2176 (IgG₁), rab2180 (IgG₁), rab2182 (IgG₁), rab2183 (вариант IgG₁), rab2184 (вариант IgG₁), rab2186 (вариант IgG₁), rab2187 (вариант IgG₁), rab2188 (вариант IgG₁), rab2189 (вариант IgG₁), rab2190 (вариант IgG₁), rab2191 (вариант IgG₁) и rab2192 (вариант IgG₁).

На фиг. 8A, 8B, 8C, 8D, 8E и 8F приведена группа столбчатых диаграмм, отражающих продуцирование ИФН γ , индуцированное антителом против TIM-3 rab2188w (N297A IgG₁) или изотипическим контрольным антителом IgG₁ N297A, по отдельности или в комбинации с антителом против PD-1 пембролизумабом, в МКПК человека от шести разных доноров после стимуляции SEA. Используемый для указанного исследования протокол, приведенный на фиг. 8A-8F, представлял собой модифицированный протокол, использованный в исследовании, представленном на фиг. 7.

На фиг. 9A, 9B, 9C, 9D, 9E и 9F приведены графики или гистограммы, отражающие связывание антител против TIM-3 с клетками, экспрессирующими TIM-3. На фиг. 9A, 9B, 9E и 9F на графиках отражена зависимость значений MFI от ряда протестированных концентраций антитела. На фиг. 9C и 9D приведена группа гистограмм, отражающих связывание антител против TIM-3 с экспрессирующими TIM-3 клетками. Протестированные антитела против TIM-3 включают rab2188w (IgG₁ N297A), AM-1 (IgG₁ N297A), AM-2 (IgG₁ N297A), AM-3 (IgG₁ N297A), AM-4 (IgG₁ N297A), AM-5 (IgG₁ N297A), AM-6 (IgG₁ N297A), AM-7 (IgG₁ N297A), AM-8 (IgG₁ N297A) и AM-9 (IgG₁ N297A). Протестированные клетки представлены клетками Jurkat, эктопически экспрессирующими TIM-3 человека (фиг. 9A), Kasumi-3, линией клеток острого миелоидного лейкоза человека, эндогенно экспрессирующих TIM-3 (фиг. 9B), CD8⁺ Т-клетками человека, стимулированными стафилококковым энтеротоксином A (SEA) (фиг. 9C), CD8⁺ Т-клетками яванского макака, стимулированными SEA (фиг. 9D), и первичными CD14⁺ миелоидными клетками человека (фиг. 9E) и яванского макака (фиг. 9F).

На фиг. 10A, 10B, 10C и 10D приведены графики, отражающие связывание антител против TIM-3 или изотипического контрольного антитела IgG₁ N297A с рекомбинантным TIM-3 His человека (rhTIM-3 His), рекомбинантным TIM-3 Fc яванского макака (rcmTIM-3 Fc), рекомбинантным TIM-3 Fc мыши (rmTIM-3 Fc), рекомбинантным TIM-1 His человека (rhTIM-1 His), рекомбинантным TIM-4 His человека (rhTIM-4 His), рекомбинантным OX40 His человека (rhOX40 His), рекомбинантным GITR-Fc человека (rhGITR Fc), рекомбинантным DR3 Fc человека (rhDR3 Fc) и рекомбинантным CD137 Fc человека (rhCD137 Fc), измеренное в анализе Luminex. На графиках представлена зависимость значений MFI от концентраций антител. Антитела против TIM-3, протестированные в указанном исследовании, включают rab2188w (IgG₁ N297A) (фиг. 10B), AM-2 (IgG₁ N297A) (фиг. 10C) и AM-6 (IgG₁ N297A) (фиг. 10D).

На фиг. 11A и 11B приведены графики, отражающие процент связывания рекомбинантного TIM-3 Fc человека (фиг. 11A) или рекомбинантного TIM-3 Fc яванского макака (фиг. 11B) с экспрессирующими фосфатидилсерин клетками WR19L в присутствии титрованной дозы антител против TIM-3 или изотипического контрольного антитела IgG₁ N297A. Антитела против TIM-3, протестированные в указанном исследовании, включают rab2188w (IgG₁ N297A), AM-2 (IgG₁ N297A) и AM-6 (IgG₁ N297A).

На фиг. 12A и 12B приведены столбчатые диаграммы, отражающие продуцирование ИФН γ , индуцированное антителами против TIM-3 или изотипическим контрольным антителом IgG₁ N297A, по отдельности или в комбинации с антителом против PD-1 пембролизумабом, в МКПК человека от двух разных доноров при стимуляции SEA. Протестированные антитела против TIM-3 включают rab2188w (IgG₁ N297A), AM-1 (IgG₁ N297A), AM-2 (IgG₁ N297A), AM-3 (IgG₁ N297A), AM-4 (IgG₁ N297A), AM-5 (IgG₁ N297A), AM-6 (IgG₁ N297A), AM-7 (IgG₁ N297A) и AM-8 (IgG₁ N297A).

На фиг. 13A, 13B, 13C, 13D, 13E и 13F приведены графики, отражающие продуцирование ИФН γ или ФНО α первичными инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (ИОЛ), индуцированное антителами против TIM-3 или изотипическим контрольным антителом IgG₁ N297A, по отдельности или в комбинации

ции с антителом против PD-1 пембролизумабом. Указанные ИОЛ были выделены из опухолей немелкоклеточного рака легкого (HMPJL) (фиг. 13A и 13B), аденокарциномы желчного пузыря (фиг. 13C и 13D) или рака молочной железы (фиг. 13E и 13F), и активированы микрогранулами с антителами против CD3/CD28. Антитела против TIM-3, протестированные в указанном исследовании, включают rab2188w (IgG₁ N297A), AM-2 (IgG₁ N297A) и AM-6 (IgG₁ N297A).

На фиг. 14A, 14B и 14C приведены графики, отражающие процент выживания клеток относительно необработанной контрольной группы после инкубирования с антителом против TIM-3 или изотипическим контрольным антителом IgG₁ N297A. На фиг. 14A и 14B представлена обработка указанным антителом в комбинации с конъюгатом вторичного антитела и лекарственного средства α HFc-NC-DM1. Протестированные клетки были представлены клетками Jurkat, сконструированными для сверхэкспрессии TIM-3 (фиг. 14A), или клетками Kasumi-3, линией клеток острого миелоидного лейкоза, эндогенно экспрессирующими TIM-3 (фиг. 14B). На фиг. 14C представлена обработка указанным антителом в виде конъюгата с монометилауристатином E (MMAE). Антитела против TIM-3, протестированные в указанном исследовании, включают rab2188w (IgG₁ N297A), AM-2 (IgG₁ N297A), AM-6 (IgG₁ N297A); а также референсные антитела Hum11 (IgG₄ S228P) и rab1944w (IgG₁ N297A).

На фиг. 15 приведен ряд графиков, отражающих интернализацию TIM-3 в клетках Jurkat, экспрессирующих слитый белок HaloTag-TIM-3, при инкубации с 10 мкг/мл либо антитела против TIM-3 AM 2, либо изотипического контрольного антитела, по оценке с применением конфокальной флуоресцентной микроскопии на живых клетках, в различные моменты времени (т.е. через 0-3,5 часа). Черными точками отмечены средние уровни флуоресценции для каждого состояния в определенный момент времени.

6. Подробное описание

Согласно изобретению предложены антитела, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и антагонизируют функцию TIM-3, например, опосредованное TIM-3 подавление иммунитета. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела, экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения указанных антител, и способы лечения индивида с применением указанных антител. Антитела согласно описанию в настоящем документе, в частности, подходят для увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и, соответственно, для лечения рака у индивида, или для лечения или предотвращения инфекционного заболевания у индивида. Во всех случаях под "выделенными антителами" в настоящем документе подразумеваются также антитела, которые могут быть, однако не обязательно являются выделенными. Во всех случаях под "выделенными полинуклеотидами" в настоящем документе подразумеваются также полинуклеотиды, которые могут быть, однако не обязательно являются выделенными. Во всех случаях под "антителами" в настоящем документе подразумеваются также антитела, которые могут быть, однако не обязательно являются выделенными. Во всех случаях под "полинуклеотидами" в настоящем документе подразумеваются также полинуклеотиды, которые могут быть, однако не обязательно являются выделенными.

6.1. Определения.

В настоящем документе термины "примерно" и "приблизительно" при использовании для модификации численного значения или численного диапазона указывают на то, что при отклонениях на 5-10% относительно верхней границы значений (например, до значений на 5-10% выше) и на 5-10% относительно нижней границы значений (например, до значений на 5-10% ниже) указанное значение или диапазон продолжают соответствовать предусмотренному указанному значению или диапазону.

В настоящем документе термин "TIM-3" относится к Т-клеточному иммуноглобулину и домену 3 муцина (также известному как содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен 3 муцина белок, или клеточный рецептор 2 вируса гепатита А (HAVCR2)), который у человека кодирует ген HAVCR2. Под номером доступа Q8TDQ0-1 в Swiss-Prot приведен пример последовательности аминокислот TIM-3 человека. Последовательность аминокислот незрелого TIM-3 человека представлена последовательностью SEQ ID NO: 78. Последовательность аминокислот зрелого TIM-3 человека представлена последовательностью SEQ ID NO: 79. В настоящем документе термин "TIM-3 человека" относится к TIM-3, содержащему последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 79.

В настоящем документе термины "антитело" и "антитела" включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител и молекулы, содержащие CDR, VH-области или VL-области антител. Примеры антител включают моноклональные антитела, полученные рекомбинантным способом антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (в том числе биспецифические антитела), антитела человека, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелых цепей и две молекулы легких цепей, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легких цепей антитела, димер тяжелых цепей антитела, пара легкой цепи антитела - тяжелой цепи антитела, интратела, гетероконъюгатные антитела, конъюгаты антител с лекарственными средствами, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), камелизированные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, связанные дисульфидными связями Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (в том числе, например, антитела против анти-Id), и

антигенсвязывающие фрагменты любых из перечисленных антител. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любому классу (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любому подклассу (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекул иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой антитела IgG, или антитела класса IgG (например, IgG₁ или IgG₄ человека) или подкласса IgG. Согласно конкретному варианту реализации указанное антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. Согласно другому конкретному варианту реализации указанное антитело представляет собой моноклональное антитело человека.

В настоящем документе термины "VH-область" и "VL-область" относятся к переменным областям тяжелых и легких цепей одного антитела, соответственно, содержащим FR (каркасные области) 1, 2, 3 и 4; и CDR (определяющие комплементарность участки) 1, 2 и 3 (см. источник: Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (публикация Национальных институтов здоровья (NIH) № 91-3242, Бетесда), который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

В настоящем документе термин "CDR", или "определяющий комплементарность участок" означает несмежные антигенсвязывающие сайты, обнаруживаемые в пределах переменной области полипептидов как тяжелых, так и легких цепей. Указанные конкретные области были описаны в источниках: Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest* (1991), Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), а также MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки, при этом указанные определения включают перекрывающиеся остатки аминокислот или подгруппы остатков аминокислот при сравнении друг с другом. Согласно некоторым вариантам реализации термин "CDR" представляет собой CDR, соответствующий определениям в источниках: MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996) и Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," в издании: *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübел, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). Согласно некоторым вариантам реализации термин "CDR" представляет собой CDR согласно определению в источниках: Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest.* (1991). Согласно некоторым вариантам реализации CDR тяжелых цепей и CDR легких цепей антитела определены с применением разных принятых систем. Например, согласно некоторым вариантам реализации CDR тяжелых цепей определены в соответствии с MacCallum (выше), а CDR легких цепей определены в соответствии с Kabat (выше). CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR тяжелых цепей, а CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR легких цепей.

В настоящем документе термин "каркасные (FR) остатки аминокислот" относится к аминокислотам в каркасной области цепи иммуноглобулина. Термин "каркасная область", или "FR-область" в настоящем документе включает остатки аминокислот, входящие в переменную область, однако не входят в CDR (например, при использовании определения CDR по Kabat или MacCallum).

В настоящем документе термины "переменная область" и "переменный домен" используются взаимозаменяемо и являются общепотребительными в данной области техники. Под переменной областью, как правило, подразумевают часть антитела, обычно часть легкой или тяжелой цепи, как правило, приблизительно 110-120 аминоконцевых аминокислот, или 110-125 аминоконцевых аминокислот в зрелой тяжелой цепи и приблизительно 90-115 аминоконцевых аминокислот в зрелой легкой цепи, которые существенно различаются в последовательностях разных антител и задействованы в связывании и специфичности конкретного антитела в отношении конкретного антигена. Переменная последовательностей сконцентрирована в указанных областях, называемых определяющими комплементарность участками (CDR), тогда как более высококонсервативные области переменного домена называют каркасными областями (FR). Безотносительно конкретного механизма или теории считается, что области CDR легких и тяжелых цепей в первую очередь отвечают за взаимодействие указанного антитела с антигеном и его специфичность. Согласно некоторым вариантам реализации указанная переменная область представляет собой переменную область человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанная переменная область содержит области CDR грызуна или мыши и каркасные области (FR) человека. Согласно конкретным вариантам реализации переменная область представляет собой переменную область примата (например, не являющегося человеком примата). Согласно некоторым вариантам реализации указанная переменная область содержит области CDR грызуна или мыши, и каркасные области (FR) примата (например, не являющегося человеком примата).

Термины "VL" и "домен VL" используются взаимозаменяемо и относятся к переменной области легкой цепи антитела.

Термины "VH" и "домен VH" используются взаимозаменяемо и относятся к переменной области тяжелой цепи антитела.

В настоящем документе термины "константная область" и "константный домен" являются взаимозаменяемыми и являются общепотребительными в данной области техники. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая не вовлечена напрямую в связывание антитела с антигеном, однако может проявлять различные эффек-

торные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором (например, Fc-гамма-рецептором). Константная область молекулы иммуноглобулина обычно содержит более консервативную последовательность аминокислот, чем вариабельный домен иммуноглобулина.

В настоящем документе термин "тяжелая цепь" в отношении антитела может относиться к любому из отдельных типов, например, альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), основанных на последовательности аминокислот константного домена, из которых происходят классы антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, в том числе подклассы IgG, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

В настоящем документе термин "легкая цепь" в отношении антитела может относиться к любому из отдельных типов, например, каппа (κ) или лямбда (λ), основанных на последовательности аминокислот константных доменов. Последовательности аминокислот легких цепей хорошо известны в данной области техники. Согласно конкретным вариантам реализации указанная легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

В настоящем документе термин "система нумерации EU" относится к система нумерации EU для константных областей антитела согласно описанию в источниках: Edelman G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) и Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

"Аффинность связывания" обычно относится к совокупной силе нековалентных взаимодействий между единственным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером партнером для связывания (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящем документе "аффинность связывания" относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении партнера Y может в общем быть описана константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена с применением нескольких способов, известных в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, равновесной константы диссоциации (K_D) и равновесной константы связывания (K_A). K_D вычисляют на основании частного k_{off}/k_{on} , а K_A вычисляют на основании частного k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости связывания, например, антитела с антигеном, а k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела и антигена. k_{on} и k_{off} могут быть определены с применением методик, известных специалисту в данной области техники, таких как BIAcore® или KinExA. В настоящем документе "более низкая аффинность" относится к большей K_D .

В настоящем документе термины "специфически связывает", "в частности распознает", "иммуноспецифически связывает" и "иммуноспецифически распознает" представляют собой аналогичные термины в контексте антител, и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитопом или иммунным комплексом) в том смысле, в котором такое связывание понимает специалист в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, обычно с более низкой аффинностью, по оценке с применением, например, иммунологических анализов, BIAcore®, инструмента KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Бойсе, Айдахо) или других анализов, известных в данной области техники. Согласно конкретному варианту реализации молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с указанным антигеном с K_A , превышающей K_A для неспецифического связывания молекул с другим антигеном по меньшей мере на 2, 2,5, 3, 4 или более по логарифмической шкале (например, при множителе 10).

Согласно другому конкретному варианту реализации молекулы, которые специфически связываются с антигеном, не реагируют перекрестно с другими белками в аналогичных условиях связывания. Согласно другому конкретному варианту реализации молекулы, которые специфически связываются с TIM-3, не реагируют перекрестно с другими белками, которые не являются белками TIM-3. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) с большей аффинностью по сравнению со связыванием с другим, неродственным антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) с аффинностью, которая выше на 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или более, чем аффинность в отношении другого, неродственного антигена, по оценке с применением, например, радиоиммунологического анализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. Согласно конкретному варианту реализации степень связывания антитела против TIM-3, описанного в настоящем документе, с неродственным белком, который не является белком TIM-3, составляет менее 10, 15 или 20% от связывания указанного антитела с белком TIM-3 по оценке с применением, например, радиоиммунологического анализа.

В настоящем документе термин "афукозилирование" или "афукозилированный" в контексте Fc относится к отсутствию по существу фукозы, ковалентно присоединенной, прямо или непрямо, к остатку 297 Fc-области IgG₁ человека в соответствии с системой нумерации EU, или соответствующему остатку в иммуноглобулинах, не являющихся IgG₁ или не являющихся человеческими IgG₁. Соответственно, в

композиции, содержащей совокупность афукозилированных антител, по меньшей мере 70% указанных антител не являются прямо или непрямо фукозилированными (например, посредством промежуточных Сахаров) по остатку 297 Fc-области указанных антител; согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% не являются прямо или непрямо фукозилированными по остатку 297 Fc-области.

В настоящем документе "эпитоп" представляет собой термин, известный в данной области техники и относится к локализованной области антигена, с которой может специфически связываться антитело. Эпитоп может быть представлен, например, непрерывной последовательностью аминокислот полипептида (линейный или непрерывный эпитоп); или эпитоп может, например, составлены из двух или более не являющихся непрерывными областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). Согласно некоторым вариантам реализации указанный эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследования методом рентгеновской дифракционной кристаллографии, ИФА ELISA, водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией/масс-спектрометрией с электрораспылением), олигопептидного сканирования на основе чипов (например, ограничения конформации пептидов с применением метода CLIPS ("Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds" -химического связывания пептидов на скаффолдах) для картирования прерывистых или конформационных эпитопов) и/или картирования на основе мутагенеза (например, картирования с применением сайт-специфического мутагенеза). Кристаллизация для проведения рентгеновской кристаллографии может осуществляться с применением любых известных в данной области техники способов (например, см. источники: Giegé R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr.* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A. (1990) *Eur. J. Biochem.* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 6300-6303, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Кристаллы антитело:антиген могут быть исследованы с применением хорошо известных методик рентгеновской дифракции и обработаны с применением компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, источники: *Meth. Enzymol.* (1985), vol. 114 & 115, eds Wyckoff H.W. et al.; US. 2004/0014194) и BUSTER (см. источники: Bricogne G. (1993) *Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr.* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G. (1997) *Meth. Enzymol.* 276A: 361-423, ed Carter C.W.; Roversi P. et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr.* 56(Pt 10): 1316-1323, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Исследования с применением картирования на основе мутагенеза могут осуществляться с применением любого способа, известного специалисту в данной области техники. См., например, описание методик мутагенеза, в том числе методик мутагенеза с аланиновым сканированием, в источниках: Champe M. et al., (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 1388-1394 и Cunningham B.C. & Wells J.A. (1989) *Science* 244: 1081-1085, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. CLIPS ("Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds" -химическое связывание пептидов на скаффолдах) представляет собой технологию представления одного или более пептидов в структурно ограниченной конфигурации, ведущих себя как функциональные миметики комплексных белковых доменов. См., например, источники: публикации США US 2008/0139407 A1 и US 2007/099240 A1, а также патент США № 7972993, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно конкретному варианту реализации эпитоп антитела определяют путем исследования методом мутагенеза с аланиновым сканированием. Согласно конкретному варианту реализации эпитоп антитела определяют с применением водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией. Согласно конкретному варианту реализации эпитоп антитела определяют с применением технологии картирования эпитопов CLIPS от Pepscan Therapeutics.

В настоящем документе термин "эпитоп, расположенный в пределах области TIM-3 человека", состоящий из конкретной последовательности аминокислот или набора остатков аминокислот, относится к эпитопу, содержащему один или более остатков аминокислот заданной области, причем указанная заданная область включает первый заданный остаток аминокислоты и последний заданный остаток аминокислоты указанной области TIM-3 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный эпитоп содержит каждый из остатков аминокислот, расположенных в пределах заданной области. Согласно некоторым вариантам реализации один или более дополнительных остатков аминокислот TIM-3 человека за пределами заданной области связываются с антителом совместно с эпитопом, расположенным в пределах заданной области.

В настоящем документе термины "Т-клеточный рецептор" и "TCR" используются взаимозаменяемо и относятся к полноразмерным гетеродимерным $\alpha\beta$ - или $\gamma\delta$ TCR, антигенсвязывающим фрагментам полноразмерных TCR, а также молекулам, содержащим CDR или варибельные области TCR. Примеры TCR включают, не ограничиваясь перечисленными, полноразмерные TCR, антигенсвязывающий фрагменты полноразмерных TCR, растворимые TCR без трансмембранных и цитоплазматических областей, одноцепочечные TCR, содержащие варибельные области TCR, присоединенные гибким линкером, цепи TCR, соединенные сконструированной дисульфидной связью, моноспецифические TCR, мультиспецифические TCR (в том числе биспецифические TCR), слитые TCR, TCR человека, гуманизированные TCR, химерные

TCR, полученные рекомбинантным способом TCR и синтетические TCR. Термин охватывает TCR дикого типа и генетически сконструированные TCR (например, химерный TCR, содержащий химерную цепь TCR, содержащую первую часть из TCR первого вида и вторую часть из TCR второго вида).

В настоящем документе термины "главный комплекс гистосовместимости" и "МНС" используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле МНС класса I и/или молекуле МНС класса II.

В настоящем документе термин "комплекс пептид-МНС" относится к молекуле МНС (МНС класса I или МНС класса II), связанной с пептидом в известном в данной области техники пептидсвязывающем кармане указанного МНС.

В настоящем документе термин "лечить" ("обрабатывать") и "лечение" ("обработка") относятся к терапевтическим или профилактическим мерам, описанным в настоящем документе. Способы "лечения" или "обработки" включают введение антитела индивиду, страдающему заболеванием или расстройством, или предрасположенному к такому заболеванию или расстройству, для предотвращения, исцеления, задержки, снижения тяжести или облегчения одного или более симптомов указанного заболевания или расстройства, или рецидива заболевания или расстройства, или для продления продолжительности выживания индивида за пределы ожидаемой в отсутствие такого лечения.

В настоящем документе термин "эффективное количество" в контексте проведения терапии у индивида относится к объему терапии, обеспечивающему требуемый профилактический или терапевтический эффект.

В настоящем документе термин "индивид" включает любого человека или любое не являющееся человеком животное. Согласно одному варианту реализации указанный индивид представляет собой человека или не являющееся человеком млекопитающее. Согласно одному варианту реализации указанный индивид представляет собой человека.

Определение "процента идентичности" двух последовательностей (например, последовательностей аминокислот или последовательностей нуклеиновых кислот) может осуществляться с применением математического алгоритма. Конкретный неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, представлен алгоритмом, описанным в источнике: Karlin S & Altschul S.F. (1990) PNAS 87: 22 64-22 68 и модифицированном согласно источнику Karlin S. & Altschul S.F. (1993) PNAS 90: 5873-5877; каждый из указанных источников включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (источник: Altschul S.F. et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403, включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Поиск нуклеотидов в BLAST может быть выполнен с использованием набора программных параметров NBLAST для нуклеотидов, например, счета выравнивания=100, длины слова=12, с получением последовательностей нуклеотидов, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, описанным в настоящем документе. Поиск белков BLAST может быть выполнен с использованием набора программных параметров XBLAST, например счета выравнивания 50, длины слова=3, с получением последовательностей аминокислот, гомологичных молекуле белка, описанной в настоящем документе. Для получения выравниваний с пропусками с целью сравнения, может быть использована программа Gapped BLAST согласно описанию в источнике: Altschul S.F. et al., (1997) Nuc. Acids. Res. 25: 3389-3402, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Как вариант, может быть использована программа PSI BLAST для проведения итерационного поиска, позволяющего детектировать отдаленные взаимосвязи между молекулами (там же). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast, могут применяться устанавливаемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, для XBLAST и NBLAST) (см., например, сайт Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, NCBI) в сети Интернет: ncbi.nlm.nih.gov). Другой конкретный неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, представлен алгоритмом, описанным в источнике: Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая входит в пакет программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения последовательностей аминокислот могут применяться следующие параметры: таблица весов замен остатков PAM120, штраф за продление пропуска=12 и штраф за пропуск в последовательности=4.

Процент идентичности двух последовательностей может быть определен с применением методик, аналогичных описанным выше, допускающих или не допускающих введение пропусков. При расчетах процента идентичности, как правило, учитывают только точные совпадения.

В настоящем документе термин "интернализация" или "интернализированный" относится к поступлению антитела во внутриклеточный компартмент клетки при связывании антитела с антигеном, экспрессируемым на поверхности указанной клетки.

6.2. Антитела против TIM-3.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены антитела, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и антагонизируют функцию TIM-3. Последовательности аминокислот примеров антител приведены в табл. 1-4 в настоящем документе.

Таблица 1. Последовательности аминокислот примеров антител против TIM-3

SEQ ID NO:	Описание*	Последовательность аминокислот
1	BADD456-2919 CDRH1	SSYAMS
2	BADD456-2919 CDRH2	WVSAISGSGGSTY
3	BADD456-2919 CDRH3	AKGGDYGGNYFD
4	AM-1 CDRH1	KAGQSS
5	AM-2 CDRH1	RQNAWS
6	AM-3 CDRH1	MSGQTS
7	AM-4 CDRH1	GAGQSS
8	AM-5 CDRH1	SAQQAS
9	AM-6 CDRH1	ARNAWS
10	AM-7 CDRH1	RSQQAS
11	AM-8 CDRH1	TTQQAS
12	AM-9 CDRH1	GGQQAS
13	BADD197-1181 CDRL1	RASQSVSSSYLA
14	BADD412-2513 CDRL1	RASQSVSSSYLA
15	BADD456-2928 CDRL1	RASQGISNYLA
16	BADD466-3169 CDRL1	GASQSVSSSYLA
17	BADD197-1181 CDRL2	GASSRAT
18	BADD456-2928 CDRL2	AASTLQS
19	BADD466-3165 CDRL2	GASTRAT
20	BADD466-3166 CDRL2	DASSRAT
21	BADD466-3167 CDRL2	DASNRAT
22	BADD197-1181 CDRL3	QQYGSSPLT
23	BADD392-2234 CDRL3	QQYGSSPIT
24	BADD456-2919 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGLTVTVSS
25	BADD466-3162 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGLTVTVSS
26	BADD466-3163 VH	EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGLTVTVSS
27	AM-1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAGQS SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGLTVTVSS

28	AM-2-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRQNAW SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGT LVTVSS
29	AM-3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFMSGQT SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGT LVTVSS
30	AM-4-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGAGQS SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGT LVTVSS
31	AM-5-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAQQA SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGT LVTVSS
32	AM-6-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFARNAW SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGT LVTVSS
33	AM-7-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSQQA SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGT LVTVSS
34	AM-8-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTQQA SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGT LVTVSS
35	AM-9-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGGQQA SWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDY GGNYFDYWGQGT LVTVSS
36	BADD197-1181 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG

		TKVEIK
37	BADD412-2513 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVEIK
38	BADD456-2928 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLA WYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVEIK
39	BADD466-3164 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVKIK
40	BADD466-3165 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVEIK
41	BADD466-3166 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVEIK
42	BADD466-3167 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNATGIPARFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVEIK
43	BADD466-3168 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNATGIPARFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVEIK
44	BADD466-3169 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYL AWYQQKPGAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIK
45	BADD466-3170 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNATGIPARFSGSGSG

		TDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVEIK
46	BADD466-3171 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPASFGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVEIK
47	VL BADD466-3172	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARFGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGGGT KVEIK
48	Консенсусная последовательность 1 CDRH1	$X_1X_2X_3X_4X_5S$, где: X_1 представляет собой R, S, A, G, K, M или T; X_2 представляет собой Q, S, A, G, R или T; X_3 представляет собой N, Y, G или Q; X_4 представляет собой A или Q; и X_5 представляет собой W, M, A, S или T
49	Консенсусная последовательность 2 CDRH1	X_1X_2NAWS , где: X_1 представляет собой R или A; и X_2 представляет собой Q или R
50	Консенсусная последовательность 3 CDRH1	$X_1X_2GQX_3S$, где: X_1 представляет собой K, M или G; X_2 представляет собой A или S; и X_3 представляет собой S или T
51	Консенсусная последовательность 4 CDRH1	X_1X_2QQAS , где: X_1 представляет собой S, R, T или G; и X_2 представляет собой A, S, T или G
52	Консенсусная последовательность CDRL1	$X_1ASQSVX_2SSYLA$, где X_1 представляет собой R или G; и X_2 отсутствует или представляет собой S
53	Консенсусная последовательность CDRL2	X_1ASX_2RAT , где: X_1 представляет собой D или G; и X_2 представляет собой N, S или T
54	Консенсусная последовательность CDRL3	$QQYGSSPX_1T$, где X_1 представляет собой L или I
55	Консенсусная	EVQLVESGGGLVQPX ₁ GSRLSCAASGFTF

	последовательность VH	$X_2X_3X_4X_5X_6SWVRX_7APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGQGLTVTVSS$, где: X_1 представляет собой G или R; X_2 представляет собой R, S, A, G, K, M или T; X_3 представляет собой Q, S, A, G, R или T; X_4 представляет собой N, Y, G или Q; X_5 представляет собой A или Q; X_6 представляет собой W, M, A, S или T; и X_7 представляет собой R или Q
56	Консенсусная последовательность VL	$EIVLTQSPF_1X_1TSLSPGERATLSCX_2ASQSVX_3SSYLAWYQQKPGX_4APRLLIYX_5ASX_6RATGIPX_7X_8FSGSGSGTDFTLTISX_9LEPEDFAVYYCQQYGSSPX_{10}TFGGGTKVX_{11}IK$, где: X_1 представляет собой A или G; X_2 представляет собой R или G; X_3 отсутствует или представляет собой S; X_4 представляет собой Q или L; X_5 представляет собой D или G; X_6 представляет собой N, S или T; X_7 представляет собой A или D; X_8 представляет собой S или R; X_9 представляет собой R или S; X_{10} представляет собой L или I; и X_{11} представляет собой E или K
57	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ , pab2188	$EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG$
58	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ N297A, pab2188	$EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF$

		PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
59	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₄ S228P, pab2188	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGGTGLVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE SKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
60	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ N297A, AM-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAGQSSWVRRAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGGTGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
61	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ N297A, AM-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRQNAWSWVRRAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGGTGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
62	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ N297A, AM-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFM SGQTSWVRRAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGGTGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG

		ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
63	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ N297A, AM-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGAGQSSWVRRAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGGTTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
64	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ N297A, AM-5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAQQASWVRRAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGGTTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
65	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ N297A, AM-6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFARNAWSWVRRAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGGTTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
66	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSQQASWVRRAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ

	N297A, AM-7	MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
67	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ N297A, AM-8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTQQAASWVRRAP GKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
68	Полноразмерная тяжелая цепь IgG ₁ N297A, AM-9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGGQQAASWVRRAP GKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGDYGGNYFDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
69	Последовательность полноразмерной легкой цепи BADD466-3171	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASN RATGIPASFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
70	IgG ₁ человека аллотипа G1m3 (без C-концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

		VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
71	IgG ₁ человека аллотипа G1m3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
72	IgG ₁ N297A (без С- концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
73	IgG ₁ N297A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
74	IgG ₄ S228P (без С- концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
75	IgG ₄ S228P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF

		PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
76	Константная область легкой цепи каппа человека аллотипа IGKC*01 Km3	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
77	Константная область легкой цепи каппа человека аллотипа IGKC*01 Km3 (с мутацией T109S)	RSVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
84	IGHV3-23*04	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAK
85	IGKV1-27*01	DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPG KVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED VATYYCQKNSAP
86	IGKV3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPED FAVYYCQQRNWP
87	IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQYGSSP
88	IGKV3D-20*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSYLAWYQQKP GLAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQYGSSP

*Области CDR тяжелых цепей определены в соответствии с системой нумерации MacCallum и об-
ласти CDR легких цепей определены в соответствии с системой нумерации Kabat.

Таблица 2. Последовательности аминокислот CDR тяжелых цепей примеров антител против TIM-3

VH	CDRH1*	SEQ ID NO:	CDRH2*	SEQ ID NO:	CDRH3*	SEQ ID NO:
BADD456-2919	SSYAMS	1	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
BADD466-3162	SSYAMS	1	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
BADD466-3163	SSYAMS	1	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
AM-1	KAGQSS	4	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
AM-2	RQNAWS	5	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
AM-3	MSGQTS	6	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
AM-4	GAGQSS	7	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
AM-5	SAQQAS	8	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
AM-6	ARNAWS	9	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
AM-7	RSQQAS	10	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
AM-8	TTQQAS	11	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3
AM-9	GGQQAS	12	WVSAISGSGGSTY	2	AKGGDYGGNYFD	3

*Определены в соответствии с системой нумерации MacCallum.

Таблица 3. Последовательности аминокислот CDR легких цепей примеров антител против TIM-3

VL	CDRL1*	SEQ ID NO:	CDRL2*	SEQ ID NO:	CDRL3*	SEQ ID NO:
BADD197-1181	RASQSVSSSYLA	13	GASSRAT	17	QQYGSSPLT	22
BADD412-2513	RASQSVSSSYLA	14	GASSRAT	17	QQYGSSPLT	22
BADD456-2928	RASQGISNYLA	15	AASTLQS	18	QQYGSSPLT	22
BADD466-3164	RASQSVSSSYLA	14	GASSRAT	17	QQYGSSPLT	22
BADD466-3165	RASQSVSSSYLA	14	GASTRAT	19	QQYGSSPLT	22
BADD466-3166	RASQSVSSSYLA	14	DASSRAT	20	QQYGSSPLT	22
BADD466-3167	RASQSVSSSYLA	14	DASNRAT	21	QQYGSSPLT	22
BADD466-3168	RASQSVSSSYLA	14	DASNRAT	21	QQYGSSPLT	22
BADD466-3169	GASQSVSSSYLA	16	DASSRAT	20	QQYGSSPLT	22
BADD466-3170	RASQSVSSSYLA	14	DASNRAT	21	QQYGSSPLT	22
BADD466-3171	RASQSVSSSYLA	14	DASNRAT	21	QQYGSSPLT	22
BADD466-3172	RASQSVSSSYLA	14	GASSRAT	17	QQYGSSPIT	23

*Определены в соответствии с системой нумерации Kabat.

Таблица 4. Примеры антител против TIM-3

Антитело	Вариабельная область тяжелой	SEQ ID NO:	Вариабельная область легкой	SEQ ID NO:
	цепи		цепи	
pab2085	BADD456-2919	24	BADD197-1181	36
pab2088	BADD456-2919	24	BADD456-2928	38
pab2173	BADD466-3163	26	BADD466-3167	42
pab2174	BADD456-2919	24	BADD466-3167	42
pab2175	BADD456-2919	24	BADD466-3171	46
pab2176	BADD456-2919	24	BADD466-3168	43
pab2177	BADD466-3163	26	BADD466-3168	43
pab2178	BADD466-3163	26	BADD466-3171	46
pab2179	BADD466-3163	26	BADD466-3166	41
pab2180	BADD456-2919	24	BADD466-3166	41
pab2181	BADD466-3162	25	BADD466-3164	39
pab2182	BADD456-2919	24	BADD466-3172	47
pab2183	BADD466-3162	25	BADD466-3165	40
pab2184	BADD466-3163	26	BADD466-3172	47
pab2185	BADD466-3162	25	BADD412-2513	37
pab2186	BADD466-3162	25	BADD466-3170	45
pab2187	BADD466-3162	25	BADD466-3169	44
pab2188	BADD466-3162	25	BADD466-3171	46
pab2189	BADD466-3162	25	BADD466-3167	42
pab2190	BADD466-3162	25	BADD466-3166	41
pab2191	BADD466-3162	25	BADD466-3168	43
pab2192	BADD466-3162	25	BADD466-3172	47
AM-1	AM-1-VH	27	BADD466-3171	46
AM-2	AM-2-VH	28	BADD466-3171	46
AM-3	AM-3-VH	29	BADD466-3171	46
AM-4	AM-4-VH	30	BADD466-3171	46
AM-5	AM-5-VH	31	BADD466-3171	46
AM-6	AM-6-VH	32	BADD466-3171	46
AM-7	AM-7-VH	33	BADD466-3171	46
AM-8	AM-8-VH	34	BADD466-3171	46
AM-9	AM-9-VH	35	BADD466-3171	46

Таблица 5. Ближайшие гены зародышевой линии.

Вариабельная область тяжелой цепи или легкой цепи	Ближайший ген зародышевой линии	SEQ ID NO гена зародышевой линии:
BADD456-2919 VH	IGHV3-23*04	84
BADD466-3162 VH	IGHV3-23*04	84
BADD466-3163 VH	IGHV3-23*04	84
AM-1-VH	IGHV3-23*04	84
AM-2-VH	IGHV3-23*04	84
AM-3-VH	IGHV3-23*04	84
AM-4-VH	IGHV3-23*04	84
AM-5-VH	IGHV3-23*04	84
AM-6-VH	IGHV3-23*04	84
AM-7-VH	IGHV3-23*04	84
AM-8-VH	IGHV3-23*04	84
AM-9-VH	IGHV3-23*04	84
VL BADD197-1181	IGKV3-20*01	87
VL BADD412-2513	IGKV3-20*01	87
VL BADD456-2928	IGKV1-27*01	85
VL BADD466-3164	IGKV3-20*01	87
VL BADD466-3165	IGKV3-20*01	87
VL BADD466-3166	IGKV3-20*01	87
VL BADD466-3167	IGKV3-11*01	86
VL BADD466-3168	IGKV3-20*01	87
VL BADD466-3169	IGKV3D-20*01	88
VL BADD466-3170	IGKV3-11*01	86
VL BADD466-3171	IGKV3-11*01	86
VL BADD466-3172	IGKV3-20*01	87

Таблица 6. Примеры последовательностей TIM-3

SEQ ID NO:	Описание*	Последовательность аминокислот
78	Незрелый белок TIM-3 человека (Q8TDQ0-1)	MFSLPFDCLVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVLGQAYL PCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVLRTE RDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIY CCRIQIPGIMNDEKFNKLVKPAKVTPAPTRQDF TAAFPRLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLA NELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALA

		LIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPSSGLAN AVAEGIRSEENIYTIENNVYEVEEPNEYCYVSSRQ QPSQPLGCRFAMP
79	Зрелый белок TIM-3 человека	SEVEYRAEVLGQAYLPCFYTPAAPGNLVPVWKGGA CPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDV SLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVI KPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRLTTRGHGPAETQTL GSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRI GIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPSSGLANAVAEGIRSEENIYTIENNVYEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP
101	TIM-3 человека, F40A	SEVEYRAEVLGQAYLPCFYTPAAPGNLVPVWKGGA CPVAECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDV SLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVI KPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRLTTRGHGPAETQTL GSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRI GIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPSSGLANAVAEGIRSEENIYTIENNVYEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP
102	Фрагмент TIM-3 человека	SEVEYRAEVLGQAYLPCFYTPAAPGNLVPVWKGGA CPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDV SLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVI KPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRLTTRGHGPAETQTL GSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIR
93	Эпитоп TIM-3	PVFECGN
94	Эпитоп TIM-3	VCWKGACPVFECGNVVL
95	Эпитоп TIM-3	RIQIPGIMND
96	Эпитоп TIM-3	RIQIPGIMNDEKFNKL
97	Эпитоп TIM-3	EKFNKL
98	Эпитоп TIM-3	PAAPGNLVP
99	Эпитоп TIM-3	GKGACPVFE
100	Эпитоп TIM-3	DFTAAFP

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее домен VH, содержащий одну, две или все три области CDR домена VH, представленного в табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное анти-тело содержит CDRH1 одного из доменов VH, представленных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное анти-тело содержит CDRH2 одного из доменов VH, представленных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное анти-тело содержит CDRH3 одного из доменов VH, представленных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее домен VL, содержащий одну, две или все три области CDR домена VL, представленного в табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное анти-тело содержит CDRL1 одного из доменов VL, представленных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное анти-тело содержит CDRL2 одного из доменов VL, представленных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное анти-тело содержит CDRL3 одного из доменов VL, представленных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам реализации CDR анти-тела могут быть определены в соответствии с источником: MacCallum RM et al., (1996) J. Mol. Biol. 262: 732-745, включенным в настоящий документ полностью посредством ссылки. См. также, например, источник: Martin A. "Protein Sequence and Structure

"Analysis of Antibody Variable Domains," in *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации CDR тяжелой цепи антитела определены по MacCallum, а CDR легкой цепи антитела определены в соответствии с другим способом.

Согласно некоторым вариантам реализации CDR антитела могут быть определены в соответствии с источниками: Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest* (1991), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации CDR легкой цепи антитела определены по Kabat, а CDR тяжелой цепи антитела определены по MacCallum (выше).

Согласно некоторым вариантам реализации CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации Chothia, которая относится к локализации структурных петель иммуноглобулина (см., например, источники: Chothia C. & Lesk A.M., (1987), *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Al-Lazikani B. et al., (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-948; Chothia C. et al., (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 799-817; Tramontano A. et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215(1): 17 5-82; и патент США № 7709226, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Как правило, при применении системы нумерации Kabat петля CDRH1 по Chothia расположена в положениях аминокислот тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля CDRH2 по Chothia расположена в положениях аминокислот тяжелой цепи 52-56, а петля CDRH3 по Chothia расположена в положениях аминокислот тяжелой цепи 95-102, тогда как петля CDRL1 по Chothia расположена в положениях аминокислот легкой цепи 24-34, петля CDRL2 по Chothia расположена в положениях аминокислот легкой цепи 50-56, а петля CDRL3 по Chothia расположена в положениях аминокислот легкой цепи 89-97. Расположение конца петли CDRH1 по Chothia при нумерации с применением системы нумерации по Kabat варьирует от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это обусловлено тем, что в схеме нумерации по Kabat в положениях H35A и H35B расположены инсерции; при отсутствии как 35A, так и 35B петля заканчивается в положении 32; при наличии только 35A петля заканчивается в положении 33; при наличии и 35A, и 35B петля заканчивается в положении 34).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее области CDR VH по Chothia домена VH, табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее области CDR VL по Chothia домена VL, табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее области CDR VH по Chothia и области CDR VL по Chothia антитела, табл. 1 в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержат одну или более CDR, при этом области CDR по Chothia и Kabat имеют одинаковую последовательность аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и содержит комбинации областей CDR по Kabat и областей CDR по Chothia.

Согласно некоторым вариантам реализации CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT согласно описанию в источниках: Lefranc M.-P., (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 и Lefranc M.-P. et al., (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. В соответствии со схемой нумерации IMGT CDRH1 располагается в положениях 26-35, CDRH2 располагается в положениях 51-57, CDRH3 располагается в положениях 93-102, CDRL1 располагается в положениях 27-32, CDRL2 располагается в положениях 50-52; и CDRL3 располагается в положениях 89-97.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитела, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и содержат области CDR антитела, представленного в табл. 1 в настоящем документе, по оценке с применением системы нумерации IMGT, например, согласно описанию в источниках: Lefranc M.-P. (1999), выше, и Lefranc M.-P. et al., (1999), выше.

Согласно некоторым вариантам реализации области CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям по AbM, представляющих собой компромисс между областями CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia, и используется в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.), включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложены антитела, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и содержат области CDR антитела, представленного в табл. 1 в настоящем документе, по оценке с применением схемы нумерации AbM.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности аминокислот областей CDRH1, CDRH2 и CDRH3 домена VH, приведенные в последовательностях SEQ

ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности аминокислот областей CDRL1, CDRL2 и CDRL3 домена VL, приведенные в последовательностях SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 или 47, причем каждый CDR определен в соответствии с определением CDR по MacCallum, определением по Kabat, определением по Chothia, комбинацией определения по Kabat и определения по Chothia, системой нумерации IMGT или определением AbM.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее:

(a) CDRH1 содержит последовательность аминокислот $X_1X_2X_3X_4X_5S$ (SEQ ID NO: 48), где

X_1 представляет собой R, S, A, G, R, M или T,

X_2 представляет собой Q, S, A, G, R или T,

X_3 представляет собой N, Y, G или Q,

X_4 представляет собой A или Q, и

X_5 представляет собой W, M, A, S или T; и/или

(b) CDRH2 содержит последовательность аминокислот WVSAISGSGGSTY (SEQ ID NO: 2); и/или

(c) CDRH3 содержит последовательность аминокислот AKGGDYGGNYFD (SEQ ID NO: 3); и/или

(d) CDRL1 содержит последовательность аминокислот $X_1ASQSVX_2SSYLA$ (SEQ ID NO: 52), где

X_1 представляет собой R или G, и

X_2 отсутствует или представляет собой S; и/или

(e) CDRL2 содержит последовательность аминокислот X_1ASX_2RAT (SEQ ID NO: 53), где

X_1 представляет собой D или G, и

X_2 представляет собой N, S или T; и/или

(f) CDRL3 содержит последовательность аминокислот QQYGSSPX₁T (SEQ ID NO: 54), где X_1 представляет собой L или I.

Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1 содержит последовательность аминокислот X_1X_2NAWS (SEQ ID NO: 49), где X_1 представляет собой R или A; и X_2 представляет собой Q или R. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1 содержит последовательность аминокислот $X_1X_2GQX_3S$ (SEQ ID NO: 50), где: X_1 представляет собой K, M или G; X_2 представляет собой A или S; и X_3 представляет собой S или T. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1 содержит последовательность аминокислот X_1X_2QQAS (SEQ ID NO: 51), где X_1 представляет собой S, R, T или G; и X_2 представляет собой A, S, T или G. Согласно некоторым вариантам реализации CDRH1 содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1 и 4-12. Согласно некоторым вариантам реализации CDRL1 содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 13-16. Согласно некоторым вариантам реализации CDRL2 содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 17-21. Согласно некоторым вариантам реализации CDRL3 содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 22 и 23.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что указанное анти-тело содержит домен VH, содержащий последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, последовательностях SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 4, 2 и 3; 5, 2 и 3; 6, 2 и 3; 7, 2 и 3; 8, 2 и 3; 9, 2 и 3; 10, 2 и 3; 11, 2 и 3; или 12, 2 и 3, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что указанное анти-тело содержит домен VH, содержащий последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, последовательностях SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что указанное анти-тело содержит домен VH, содержащий последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, последовательностях SEQ ID NO: 5, 2 и 3, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что указанное анти-тело содержит домен VH, содержащий последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, последовательностях SEQ ID NO: 9, 2 и 3, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что указанное анти-тело содержит домен VL, содержащий последовательности аминокислот CDRL1, CDRL2 и CDRL3, последовательности SEQ ID NO: 13, 17 и 22; 14, 17 и 22; 15, 18 и 22; 14, 19 и 22; 14, 20 и 22; 14, 21 и 22; 16, 20 и 22; или 14, 17 и 23, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что указанное анти-тело содержит домен VL, содержащий последовательности аминокислот CDRL1, CDRL2 и CDRL3, последовательности SEQ ID NO: 14, 21 и 22,

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 55. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичную последовательности аминокислот, представленной в последовательности SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 24. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 26. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 27. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 29. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 31. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 33. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 34. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 35. Согласно некоторым вариантам реализации N-концевой остаток глутамата (E) переменной области тяжелой цепи антитела согласно описанию в настоящем документе заменяют на остаток пироглутамата (pE).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящей изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности зародышевой линии человека, выбранной из группы, состоящей из IGKV1-27 (например, IGKV1-27*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 85), IGKV3-11 (например, IGKV3-11*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 86), IGKV3-20 (например, IGKV3-20*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 87) и IGKV3D-20 (например, IGKV3D-20*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 88). Одна или более областей, выбранных из каркаса 1, каркаса 2, каркаса 3, CDRL1 и CDRL2 (например, две, три, четыре или пять из указанных областей) могут происходить из последовательности зародышевой линии человека, выбранной из группы, состоящей из IGKV1-27 (например, IGKV1-27*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 85), IGKV3-11 (например, IGKV3-11*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 86), IGKV3-20 (например, IGKV3-20*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 87) и IGKV3D-20 (например, IGKV3D-20*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 88). Согласно одному варианту реализации все последовательности из каркаса 1, каркаса 2, каркаса 3, CDRL1 и CDRL2 происходят из последовательности зародышевой линии человека, выбранной из группы, состоящей из IGKV1-27 (например, IGKV1-27*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 85), IGKV3-11 (например, IGKV3-11*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 86), IGKV3-20 (например, IGKV3-20*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 87) и IGKV3D-20 (например, IGKV3D-20*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 88).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности зародышевой линии IGHV3-23 человека (например, IGHV3-23*04, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 84), и варибельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, происходящую из последовательности зародышевой линии человека, выбранной из группы, состоящей из IGKV1-27 (например, IGKV1-27*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 85), IGKV3-11 (например, IGKV3-11*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 86), IGKV3-20 (например, IGKV3-20*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 87) и IGKV3D-20 (например, IGKV3D-20*01, например, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 88).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, перекрестно конкурирующее за связывание с TIM-3 (например, TIM-3 человека) с антителом, содержащим последовательности аминокислот вариабельных областей тяжелых и легких цепей, последо-

вательностях SEQ ID NO: 24 и 36; 24 и 38; 26 и 42; 24 и 42; 24 и 46; 24 и 43; 26 и 43; 26 и 46; 26 и 41; 24 и 41; 25 и 39; 24 и 47; 25 и 40; 26 и 47; 25 и 37; 25 и 45; 25 и 44; 25 и 46; 25 и 42; 25 и 41; 25 и 43; 25 и 47; 27 и 46; 28 и 46; 29 и 46; 30 и 46; 31 и 46; 32 и 46; 33 и 46; 34 и 46; или 35 и 46, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное анти-тело, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом TIM-3 (например, эпитопом TIM-3 человека), что и антитело, описанное в настоящем документе, например, антитело, содержащее последовательности аминокислот переменных областей тяжелых и легких цепей, последовательностях SEQ ID NO: 24 и 36; 24 и 38; 26 и 42; 24 и 42; 24 и 46; 24 и 43; 26 и 43; 26 и 46; 26 и 41; 24 и 41; 25 и 39; 24 и 47; 25 и 40; 26 и 47; 25 и 37; 25 и 45; 25 и 44; 25 и 46; 25 и 42; 25 и 41; 25 и 43; 25 и 47; 27 и 46; 28 и 46; 29 и 46; 30 и 46; 31 и 46; 32 и 46; 33 и 46; 34 и 46; или 35 и 46, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации указанный эпитоп антитела может быть определен, например, с применением ЯМР-спектроскопии, поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®), исследования методом рентгеновской дифракционной кристаллографии, ИФА ELISA, водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией/масс-спектрометрией с электрораспылением), олигопептидного сканирования на основе чипов и/или картирования на основе мутагенеза (например, картирования с применением сайт-специфического мутагенеза). Кристаллизация для рентгеновской кристаллографии может осуществляться с применением любых известных в данной области техники способов (например, из источников: Giegé R. et al., (1994) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 50 (Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur. J. Biochem.* 189: 1-23; Chayen N.E. (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 6300-6303, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Кристаллы антитела:антигена могут быть исследованы с применением хорошо известных методик рентгеновской дифракции и обработаны с применением компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; см., например, источники: *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff H.W. et al.; и заявка на патент США № 2004/0014194); и BUSTER (Bricogne G. (1993) *Acta Crystallogr D. Biol. Crystallogr* 49 (Pt 1): 37-60; Bricogne G. (1997) *Meth. Enzymol.* 276A: 361-423, ed Carter C.W.; Roversi P. et al., (2000) *Acta Crystallogr D. Biol. Crystallogr.* 56(Pt 10): 1316-1323, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Исследования с применением картирования на основе мутагенеза могут осуществляться с применением любого способа, известного специалисту в данной области техники. См., например, описание методик мутагенеза, в том числе методик мутагенеза с применением аланинового сканирования, в источниках: Champe M. et al., (1995), выше, и Cunningham B.C. & Wells J.A. (1989), выше. Согласно конкретному варианту реализации указанный эпитоп антитела определяют, проводя исследование с применением мутагенеза с аланиновым сканированием. Кроме того, антитела, которые распознают и связываются с теми же или перекрывающимися эпитопами TIM-3 (например, TIM-3 человека), могут быть идентифицированы с применением рутинных методик, таких как иммунологический анализ, например, путем демонстрации способности одного антитела блокировать связывание другого антитела с целевым антигеном, т.е. конкурентного анализа связывания. Конкурентные анализы связывания также могут применяться для определения наличия у двух антител аналогичной связывающей специфичности в отношении эпитопа. Конкурентное связывание может быть определено в анализе, в ходе которого тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном, таким как TIM-3 (например, TIM-3 человека). Известно множество типов конкурентных анализов связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой ферментный иммунологический анализ (ФИА), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahli C. et al., (1983) *Methods Enzymol.* 9: 242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый ФИА (см. Kirkland T.N. et al., (1986) *J. Immunol.* 137: 3614-9); твердофазный прямой анализ с меткой, твердофазный прямой сэндвич-анализ с меткой (см. Harlow E. & Lane D., (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой РИА с применением метки I-125 (см. Morel G.A. et al., (1988) *Mol. Immunol.* 25(1): 7-15); твердофазный прямой биотин-авидиновый ФИА (см. Cheung R.C. et al., (1990) *Virology* 176: 546-52); и прямой РИА с меткой (см. Moldenhauer G. et al., (1990) *Scand J. Immunol.* 32: 77-82); каждый из перечисленных источников включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Как правило, такой анализ включает применение очищенного антигена (например, TIM-3, такого как TIM-3 человека), связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих либо немеченый тестируемый иммуноглобулин, либо меченый референсный иммуноглобулин. Конкурентное ингибирование может быть измерено путем определения количества метки, связавшегося с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Как правило, тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Как правило, при присутствии конкурирующего антитела в избытке оно ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или более. Конкурентный анализ связывания может быть проведен во множестве разных форматов с применением либо меченого антигена, либо меченого антитела. В общем варианте указанного анализа антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете. Затем, используя радиоактивные или ферментные метки, измеряют способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител с антигеном. Допол-

тельность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 69. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 64; и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 69. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 65; и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 69. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 66; и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 69. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 67; и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 69. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 68; и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 69. Согласно некоторым вариантам реализации N-концевой остаток глутамата (E) тяжелой цепи антитела согласно описанию в настоящем документе заменяют на остаток пироглутамата (pE); и/или N-концевой остаток глутамата (E) легкой цепи указанного антитела заменяют на остаток пироглутамата (pE).

В антителах согласно описанию в настоящем документе может применяться любая константная область Ig. Согласно некоторым вариантам реализации указанный область Ig представляет собой молекулу иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека, молекулу иммуноглобулина любого класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} и IgG_{2b}).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательностях SEQ ID NO: 70, 71, 72, 73, 74 или 75. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее константную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательностях SEQ ID NO: 76 или 77.

Согласно некоторым вариантам реализации одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) вводят в Fc-область антитела, описанного в настоящем документе (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG₁ человека) и/или в домен CH3 (остатки 341-447 IgG₁ человека), и/или в шарнирную область в соответствии с системой нумерации EU, для изменения одного или более функциональных свойств указанного антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывания Fc-рецептора и/или антиген-зависимой клеточной цитотоксичности.

Согласно некоторым вариантам реализации одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) вводят в шарнирную область Fc-области (домен CH1) таким образом, что число остатков цистеина в шарнирной области изменяется (например, увеличивается или уменьшается), согласно описанию, например, в патенте США № 5677425, включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки. Число остатков цистеина в шарнирной области домена CH1 может быть изменено, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей, или для изменения (например, увеличения или уменьшения) стабильности антитела.

Согласно конкретному варианту реализации одну, две или более мутаций аминокислот (например, замен, инсерций или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, фрагмент домена Fc или шарнира-Fc) для изменения (например, увеличения или уменьшения) времени полужизни указанного антитела *in vivo*. См., например, источники: международные публикации WO 02/060919; № WO 98/23289; и № WO 97/34631; и патент США № 5869046, № 6121022, № 6277375 и № 6165745, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки, где приведены примеры мутаций, которые изменяют (например, уменьшают или увеличивают) время полужизни антитела *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации одну, две или более мутаций аминокислот (например, замен, инсерций, или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, фрагмент домена Fc или шарнира-Fc) для уменьшения времени полужизни указанного антитела *in vivo*. Согласно другим вариантам реализации одну, две или более мутаций аминокислот (например, замен, инсерций или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, фрагмент домена Fc или шарнира-Fc) для увеличения времени полужизни указанного антитела *in vivo*. Согласно конкретному варианту реализации указанные антитела могут содержать одну или более мутаций аминокислот (например, за-

мен) во втором константном домене (CH2) (остатки 231-340 IgG₁ человека) и/или третьем константном домене (CH3) (остатки 341-447 IgG₁ человека) в соответствии с системой нумерации EU. Согласно конкретному варианту реализации константная область антитела IgG₁, описанного в настоящем документе, содержит замену метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в положении 254; и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в положении 256 в соответствии с системой нумерации EU. См. патент США № 7658921, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанный тип мутантного IgG, называемый "мутант YTE", как было показано, демонстрирует 4-кратно увеличенное время полужизни по сравнению с вариантами того же антитела дикого типа (см. источник: Dall'Acqua W.F. et al., (2006) J. Biol. Chem. 281: 23514-24, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации антитело содержит константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более замен остатков аминокислот в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436 в соответствии с системой нумерации EU.

Согласно некоторым вариантам реализации одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) вводят в Fc-область антитела, описанного в настоящем документе (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG₁ человека), и/или CH3 домен (остатки 341-447 IgG₁ человека), и/или шарнирную область в соответствии с системой нумерации EU, для увеличения или снижения аффинности указанного антитела в отношении Fc-рецептора (например, активированного Fc-рецептора) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-области антитела, которые уменьшают или увеличивают аффинность антитела в отношении Fc-рецептора, и методы введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций в Fc-области антитела, которые могут быть осуществлены для изменения аффинности указанного антитела в отношении Fc-рецептора, описаны, например, в источниках: Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186, патент США № 6737056 и международные публикации WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно дополнительному варианту реализации одну, две или более замен аминокислот вводят в Fc-область константного домена IgG для изменения эффекторной функции или функций указанного антитела. Например, одна или более аминокислот, выбранных из остатков аминокислот 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322 в соответствии с системой нумерации EU, могут быть заменены на другие остатки аминокислот, таким образом, чтобы аффинность указанного антитела в отношении эффекторного лиганда изменилась, при сохранении антигенсвязывающей способности исходного антитела. Эффекторный лиганд, в отношении которого изменяется аффинность, может представлять собой, например, Fc-рецептор или C1-компонент комплемента. Указанный подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и № 5648260, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации делеция или инактивация (за счет использования точечных мутаций или других способов) домена константной области может обеспечивать снижение связывания с Fc-рецептором циркулирующего антитела, стимулируя таким образом локализацию в опухоли. См., например, в патентах США № 5585097 и № 8591886, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки, описание мутаций, обеспечивающих делецию или инактивацию константного домена и, таким образом, стимулирующих локализацию в опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более замен аминокислот могут быть введены в Fc-область антитела, описанного в настоящем документе, для удаления потенциальных сайтов гликозилирования на Fc-области, которые могут снижать связывание с Fc-рецептором (см., например, Shields R.L. et al., (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-604, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Согласно различным вариантам реализации может быть осуществлена одна или более из следующих мутаций в константной области антитела, описанного в настоящем документе: замена N297A; замена N297Q; замена L235A и замена L237A; замена L234A и замена L235A; замена E233P; замена L234V; замена L235A; делеция C236; замена P238A; замена D265A; замена A327Q; или замена P329A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации может быть осуществлена мутация, выбранная из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации в соответствии с системой нумерации EU, в константной области антитела, описанного в настоящем документе.

Согласно конкретному варианту реализации антитело, описанное в настоящем документе, содержит константный домен IgG₁ с заменой аминокислоты N297Q или N297A в соответствии с системой нумерации EU. Согласно одному варианту реализации антитело, описанное в настоящем документе, содержит константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации в соответствии с системой нумерации EU. Согласно другому варианту реализации антитело, описанное в настоящем документе, содержит константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, состоящей из L234A, L235A и их комбинации в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации остатки аминокислот в константной области антитела, описанного в настоящем документе, в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG₁ человека в соответствии с системой нумерации EU, не представляют собой L, L и D, соответственно. Указанный способ подробно описан в международной публикации WO 14/108483, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно конкретному варианту реализации ами-

нокислоты, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG₁ человека представляют собой F, E и A; или A, A и A, соответственно, в соответствии с системой нумерации EU.

Согласно некоторым вариантам реализации одна или более аминокислот, выбранных из остатков аминокислот 329, 331 и 322 в константной области антитела, описанного в настоящем документе, в соответствии с системой нумерации EU, может быть заменена на другой остаток аминокислоты таким образом, чтобы изменить и/или снизить связывание C1q указанным антителом, или устранить комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ). Указанный способ подробнее описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al.), который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации один или более остатков аминокислот в положениях аминокислот от 231 до 238 в N-концевой области домена CH2 антитела, описанного в настоящем документе, изменяют для изменения таким образом способности указанного антитела к фиксации комплемента, в соответствии с системой нумерации EU. Указанный способ подробнее описан в международной публикации WO 94/29351, которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации Fc-область антитела, описанного в настоящем документе, модифицируют для увеличения способности указанного антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и/или для увеличения аффинности указанного антитела в отношении Fcγ-рецептора путем мутации одной или более аминокислот (например, введения замен аминокислот) в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 в соответствии с системой нумерации EU. Указанный способ подробнее описан в международной публикации WO 00/42072, которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело, описанное в настоящем документе, содержит константную область антитела IgG₄, и серин заменен на пролин в положении остатка аминокислоты 228 тяжелой цепи в соответствии с системой нумерации EU. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 74. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 75.

Согласно некоторым вариантам реализации любые из мутаций или модификаций константной области, описанных в настоящем документе, могут быть введены в одну или более константных областей тяжелых цепей антитела, описанного в настоящем документе, содержащего две константных области тяжелых цепей.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и функционирует как антагонист.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и уменьшает активность TIM-3 (например, TIM-3 человека) по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе и/или известных специалисту в данной области техники, относительно активности TIM-3 (например, TIM-3 человека) без применения какого-либо антитела или при применении неродственного антитела (например, антитела, которое не связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) специфически). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и уменьшает активность TIM-3 (например, TIM-3 человека) по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно или 100-кратно по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе и/или известных специалисту в данной области техники, относительно активности TIM-3 (например, TIM-3 человека) без применения какого-либо антитела или при применении неродственного антитела (например, антитела, которое не связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) специфически). Неограничивающие примеры активности TIM-3 (например, TIM-3 человека) могут включать сигнализацию TIM-3 (например, TIM-3 человека), связывание TIM-3 (например, TIM-3 человека) с лигандом TIM-3 (например, TIM-3 человека) (например, фосфатидилсерином) и ингибирование продуцирования цитокинов (например, ИФН-γ и/или ФНО-α). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и деактивирует, уменьшает или ингибирует активность TIM-3 (например, TIM-3 человека).

Согласно конкретным вариантам реализации уменьшение активности TIM-3 (например, TIM-3 человека) оценивают согласно описанию в разделе примеров, ниже.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и уменьшает связывание TIM-3 (например, TIM-3 человека) с его лигандом (например, фосфатидилсерином) по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно связывания TIM-3 (например, TIM-3 человека) с его лигандом (например, фосфатидилсерином) без применения какого-либо антитела или при применении неродственного антитела (например, антитела, которое не связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) специфически). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и уменьшает связывание TIM-3 (например, TIM-3 человека) с его лигандом (например, фосфатидилсерином) по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно, или 100-кратно, по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно связывания TIM-3 (например, TIM-3 человека) с его лигандом (например, фосфатидилсерином) без применения какого-либо антитела или при применении неродственного антитела (например, антитела, которое не связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) специфически).

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и увеличивает продуцирование цитокинов (например, ИФН- γ и/или ФНО- α) по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без применения какого-либо антитела или при применении неродственного антитела (например, антитела, которое не связывается специфически с TIM-3 (например, TIM-3 человека)). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и увеличивает продуцирование цитокинов (например, ИФН- γ и/или ФНО- α) по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно, или 100-кратно, по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без применения какого-либо антитела или при применении неродственного антитела (например, антитела, которое не связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) специфически).

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и либо по отдельности, либо в комбинации с антителом против PD-1 (например, пембролизумабом или ниволумабом) увеличивает продуцирование ИФН- γ в мононуклеарных клетках периферической крови человека (МКПК) в ответ на стимуляцию энтеротоксином стафилококка А (SEA) по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно, или 100-кратно, по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования ИФН- γ без применения какого-либо антитела или при применении неродственного антитела (например, антитела, которое не связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) специфически).

Согласно некоторым вариантам реализации человека в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), стимулированных энтеротоксином стафилококка А (SEA) в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), продуцирование ИФН- γ увеличивается по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно, или 100-кратно относительно МКПК, стимулированных только SEA, без применения какого-либо антитела или при применении неродственного антитела (например, антитела, которое не связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) специфически), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и либо по отдельности, либо в комбинации с антителом против PD-1 (например, пембролизумабом или ниволумабом) увеличивает продуцирование ИФН- γ и/или ФНО α в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (ИОЛ) в ответ на стимуляцию антителом против CD3 и антителом против CD28 по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно, или 100-кратно, по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования ИФН- γ и/или ФНО α без применения антитела, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека). Согласно одному варианту реализации указанные ИОЛ происходят из опухоли немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Согласно другому варианту реализации указанные ИОЛ происходят из опухоли аденокарциномы желчного пузыря. Согласно другому варианту реализации указанные ИОЛ происходят из опухоли рака молочной железы.

Согласно некоторым вариантам реализации инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ИОЛ), стимулированные антителами против CD3 и против CD28 в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), увеличивали продуцирование ИФН- γ и/или ФНО α по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно, или 100-кратно относительно ИОЛ, стимулированных только антителами против CD3 и против CD28 без антитела, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники. Согласно одному варианту реализации указанные ИОЛ происходят из опухоли немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Согласно другому варианту реализации указанный ИОЛ происходят из опухоли аденокарциномы желчного пузыря. Согласно другому варианту реализации указанные ИОЛ происходят из опухоли рака молочной железы.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) и интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека). Согласно конкретным вариантам реализации по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% антитела, описанного в настоящем документе, интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, выживает меньший процент клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека), чем в присутствии референсного антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека), в анализе, включающем следующие этапы:

- (а) высевание клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека) с плотностью 2×10^4 клеток на лунку в планшет для тканевых культур;
- (b) добавление α HFc-NC-DM1 и антитела, описанного в настоящем документе, или референсного антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека) в одинаковых концентрациях (например, 1,5, 4,6, 13,7, 41,2, 123,5, 370, 1111 или 3333 нг/мл) до конечного объема 100 мкл/лунку;
- (c) инкубацию при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч;
- (d) измерение выживания клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека); и
- (e) вычисление процента относительного выживания клеток по сравнению с необработанными клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека).

Согласно некоторым вариантам реализации процент выживания клеток в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, или 99% ниже, чем процент выживания клеток в присутствии референсного антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека). Согласно некоторым вариантам реализации процент выживания клеток в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, по меньшей мере приблизительно 1,2-кратно, 1,3-кратно, 1,4-кратно, 1,5-кратно, 2-кратно, 2,5-кратно, 3-кратно, 3,5-кратно, 4-кратно, 4,5-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно, или 100-кратно ниже, чем процент выживания клеток в присутствии референсного антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека). Согласно некоторым вариантам реализации указанное референсное антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) представляет собой rab1944w (IgG₁ N297A). Согласно некоторым вариантам реализации указанное референсное антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) представляет собой Hum11 (IgG₄ S228P). Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки, экспрессирующие TIM-3 (например, TIM-3 человека), представляют собой клетки Kasumi-3. Согласно неко-

торым вариантам реализации указанные клетки, экспрессирующие TIM-3 (например, TIM-3 человека), представляют собой клетки Kasumi-3 (ATCC® CRL-2725™). Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки, экспрессирующие TIM-3 (например, TIM-3 человека) представляют собой клетки Jurkat, сконструированные для экспрессии TIM-3 (например, TIM-3 человека).

Согласно некоторым вариантам реализации максимум 50% клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека), выживают в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, относительно количества необработанных клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека), в анализе, включающем следующие этапы:

(a) высевание клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека) с плотностью 2×10^4 клеток на лунку в планшет для тканевых культур;

(b) добавление α HFc-NC-DM1 и антитела, описанного в настоящем документе, в одинаковых концентрациях (например, 1,5, 4,6, 13,7, 41,2, 123,5, 370, 1111 или 3333 нг/мл) до конечного объема 100 мкл/лунку;

(c) инкубацию при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч;

(d) измерение выживания клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека); и

(e) вычисление процента относительного выживания клеток по сравнению с необработанными клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека).

Согласно некоторым вариантам реализации максимум 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50% клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека), выживают в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, относительно количества необработанных клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека). Согласно некоторым вариантам реализации α HFc-NC-DM1 и антитело, описанное в настоящем документе, добавляют в концентрации 1111 нг/мл, и максимум 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, или 50% клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека), выживают в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, относительно количества необработанных клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека). Согласно некоторым вариантам реализации α HFc-NC-DM1 и антитело, описанное в настоящем документе, добавляют в концентрации 1111 нг/мл, и максимум 50% клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека), выживают в присутствии антитела, описанного в настоящем документе, относительно количества необработанных клеток, экспрессирующих TIM-3 (например, TIM-3 человека).

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит CDRH1, содержащую последовательность аминокислот X₁X₂X₃X₄X₅S (SEQ ID NO: 48), где

X₁ представляет собой R, S, A, G, K, M или T,

X₂ представляет собой Q, S, A, G, R или T,

X₃ представляет собой N, Y, G или Q,

X₄ представляет собой A или Q, и

X₅ представляет собой W, M, A, S или T.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит CDRH1, содержащую последовательность аминокислот X₁X₂NAWS (SEQ ID NO: 49), где

X₁ представляет собой R или A; и

X₂ представляет собой Q или R.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит CDRH1, содержащую последовательность аминокислот X₁X₂GQX₃S (SEQ ID NO: 50), где

X₁ представляет собой K, M или G;

X₂ представляет собой A или S; и

X₃ представляет собой S или T.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое

специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит CDRH1, содержащую последовательность аминокислот X_1X_2QQAS (SEQ ID NO: 51), где

X_1 представляет собой S, R, T или G; и

X_2 представляет собой A, S, T или G.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит CDRH2, содержащую последовательность аминокислот WWSAISGSGGSTY (SEQ ID NO: 2).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит CDRH3, содержащую последовательность аминокислот AKGGDYGGNYFD (SEQ ID NO: 3).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит CDRL1, содержащую последовательность аминокислот $X_1ASQSVX_2SSYLA$ (SEQ ID NO: 52), где X_1 представляет собой R или G, и X_2 отсутствует или представляет собой S.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит CDRL2, содержащую последовательность аминокислот X_1ASX_2RAT (SEQ ID NO: 53), где

X_1 представляет собой D или G, и X_2 представляет собой N, S или T.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит CDRL3, содержащую последовательность аминокислот QQYGSSPX₁T (SEQ ID NO: 54), где X_1 представляет собой L или I.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело перекрестно конкурирует за связывание с TIM-3 (например, TIM-3 человека) с антителом, содержащим последовательности аминокислот переменных областей тяжелых и легких цепей, последовательности SEQ ID NO: 24 и 36; 24 и 38; 26 и 42; 24 и 42; 24 и 46; 24 и 43; 26 и 43; 26 и 46; 26 и 41; 24 и 41; 25 и 39; 24 и 47; 25 и 40; 26 и 47; 25 и 37; 25 и 45; 25 и 44; 25 и 46; 25 и 42; 25 и 41; 25 и 43; 25 и 47; 27 и 46; 28 и 46; 29 и 46; 30 и 46; 31 и 46; 32 и 46; 33 и 46; 34 и 46; или 35 и 46, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по

меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом TIM-3 (например, эпитопом TIM-3 человека), что и антитело, описанное в настоящем документе, например, антитело, содержащие последовательности аминокислот вариабельных областей тяжелых и легких цепей, последовательности SEQ ID NO: 24 и 36; 24 и 38; 26 и 42; 24 и 42; 24 и 46; 24 и 43; 26 и 43; 26 и 46; 26 и 41; 24 и 41; 25 и 39; 24 и 47; 25 и 40; 26 и 47; 25 и 37; 25 и 45; 25 и 44; 25 и 46; 25 и 42; 25 и 41; 25 и 43; 25 и 47; 27 и 46; 28 и 46; 29 и 46; 30 и 46; 31 и 46; 32 и 46; 33 и 46; 34 и 46; или 35 и 46, соответственно.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), отличающееся тем, что по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанного антитела интернализуется при связывании с клетками, экспрессирующими TIM-3 (например, TIM-3 человека), по оценке с применением способов, описанных в настоящем документе (см. раздел примеров, ниже) или известных специалисту в данной области техники, и при этом указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG человека, которая представляет собой вариант константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа, причем указанный вариант константной области тяжелой цепи IgG человека связывается с Fc-гамма-рецептором человека с аффинностью, более низкой по сравнению с аффинностью связывания константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа с рецептором Fc-гамма человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный Fc-гамма-рецептор человека выбран из группы, состоящей из FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант константной области тяжелой цепи IgG человека представляет собой константную область IgG₁, содержащую мутацию N297A в соответствии с системой нумерации EU.

6.3. Фармацевтические композиции.

В настоящем изобретении предложены композиции, содержащие антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе, обладающие требуемой степенью чистоты, в физиологически приемлемом носителе, вспомогательном веществе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, такие как фосфатный буфер, цитратный буфер и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензилхлорид аммония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; феноловый, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn с белками); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, плуроники (™) или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Согласно конкретному варианту реализации фармацевтические композиции содержат антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, и, необязательно, один или более дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. Согласно конкретному варианту реализации фармацевтические композиции содержат эффективное количество антитела, описанного в настоящем документе, и, необязательно, один или более дополнительных профилактических или терапевтических агентов в фармацевтически приемлемом носителе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой единственный активный ингредиент, включенный в указанную фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут подходить для применения при ингибировании активности TIM-3 (например, TIM-3 человека) и лечении такого состояния, как рак или инфекционное заболевание. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, содержащей антитело против TIM-3 согласно настоящему изобретению, для применения в качестве медикамента. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения рака или инфекционного заболевания. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для получения медикамента для лечения рака или инфекционного заболевания.

Фармацевтически приемлемые носители, применяемые в парентеральных составах, включают водные основы, неводные основы, противомикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксидан-

ты, местные анестетики, суспензирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, комплексообразующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных основ включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, раствор Рингера для инъекций с декстрозой и лактатом. Неводные парентеральные основы включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. В парентеральные составы, упакованные в многодозовые контейнеры могут быть добавлены в бактериостатических или фунгистатических концентрациях противомикробные агенты, которые включают фенолы или крезолы, ртутьсодержащие вещества, бензиловый спирт, хлорбутанол, сложные эфиры метил- и пропил-п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфатный и цитратный буфер. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают гидрохлорид прокаина. Суспензирующие и диспергирующие агенты включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгирующие агенты включают Полисорбат-80 (TWEEN® 80). Комплексообразующий или хелатирующий ионы металлов агент включает ЭДТК. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешиваемых с водой основ; и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для коррекции pH.

Фармацевтическая композиция может быть введена в состав для введения индивиду через любой маршрут. Конкретные примеры маршрутов введения включают интраназальный, пероральный, легочный, чрескожный, внутрикожный и парентеральный. Парентеральное введение, характеризующееся использованием подкожных, внутримышечных или внутривенных инъекций, также предусмотрено настоящим изобретением. Инъекцируемые составы могут быть получены в виде стандартных форм: жидких растворов или суспензий; твердых форм, подходящих для растворения или суспензирования в жидкости перед инъектированием; или эмульсий. Инъекцируемые составы, растворы и эмульсии также содержат одно или более вспомогательных веществ. Подходящие вспомогательные вещества представлены, например, водой, солевым раствором, декстрозой, глицерином или этанолом. Кроме того, при необходимости, фармацевтические композиции для введения могут также содержать незначительные количества нетоксичных сопутствующих веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-забуферизующие агенты, стабилизаторы, усилители растворимости, и другие такие агенты, например, ацетат натрия, сорбитан монолаурат, триэтаноламинолеат и циклодекстрины.

Составы для парентерального введения антитела включают готовые стерильные растворы для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как готовые лиофилизированные порошки для смешивания с растворителем непосредственно перед применением, в том числе таблетки для подкожного введения, готовые стерильные суспензии для введения, стерильные сухие нерастворимые готовые продукты для смешивания с основой непосредственно перед применением; и стерильные эмульсии. Указанные растворы могут быть водными или неводными.

Подходящие для внутривенного введения носители включают физиологический солевой раствор или забуференный фосфатом солевой раствор (ФСБ), растворы, содержащие загущающие и солюбилизирующие агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, а также их смеси.

Содержащие антитело смеси для местного применения получают согласно описаниям для локального и системного введения. Итоговая смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсии или т.п., и может быть введена в состав кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, пасты, пен, аэрозолей, составов для орошения, спреев, суппозиторий, повязок, дермальных пластырей или любых других составов, подходящих для местного введения.

Антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, может быть введено в состав аэрозоля для местного применения, например, путем ингаляции (см., например, патенты США № 4044126, 4414209 и 4364923, где описаны аэрозоли для доставки стероида, подходящего для лечения воспалительных заболеваний, в частности, астмы, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылки). Указанные составы для введения в дыхательные пути могут находиться в форме аэрозоля или раствора для небулайзера, или в форме сверхтонкого порошка для инсуффляций, отдельного или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы состава, согласно одному варианту реализации, имеют диаметр менее 50 мкм, согласно одному варианту реализации - менее 10 мкм.

Антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, может быть введено в состав для локального или местного применения или нанесения, например, местного нанесения на кожу и слизистые оболочки, например, глаз, в форме гелей, кремов и лосьонов; для нанесения на глаза, или для интраокулярного или интраспинального применения. Местное введение осуществляют при чрескожной доставке, а также при введении в глаза или слизистые оболочки, или при ингаляционной терапии. Могут также вводиться назальные растворы антитела, отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Трансдермальные пластыри, в том числе ионтофоретические и электрофоретические устройства,

хорошо известны специалистам в данной области техники, и могут применяться для введения антитела. Например, такие пластыри описаны в патентах США № 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5860957, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтическая композиция, содержащая антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой лиофилизированный порошок, который может быть восстановлен для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Он может также быть восстановлен и введен в твердый состав или гель. Указанный лиофилизированный порошок получают путем растворения антитела, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный лиофилизированный порошок является стерильным. Указанный растворитель может содержать вспомогательное вещество, которое повышает стабильность, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из указанного порошка. Вспомогательные вещества, подходящие для применения, включают, не ограничиваясь перечисленными, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Растворитель может также содержать буфер, например, цитрат, фосфат натрия или калия или другой такой буфер, известный специалистам в данной области техники, обеспечивающий, согласно одному варианту реализации, значения pH около нейтральных. Последующие стерилизующая фильтрация раствора и лиофилизация в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, обеспечивают получение требуемого состава. Согласно одному варианту реализации итоговый раствор распределяют по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон содержит одну дозу или несколько доз соединения. Лيوфилизированный порошок может храниться в подходящих условиях, например, при температуре от приблизительно 4°C до комнатной. Восстановление указанного лиофилизированного порошка водой для инъекций обеспечивает получение состава для парентерального введения. Для восстановления лиофилизированного порошка его добавляют в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество может быть определено эмпирически.

Антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанные в настоящем документе, и другие композиции, предложенные согласно настоящему изобретению, могут также быть введены в состав для нацеливания на конкретную ткань, рецептор или другую область организма индивида, подлежащего лечению. Многие такие способы нацеливания хорошо известны специалистам в данной области техники. Все такие способы нацеливания предусмотрены настоящим изобретением для применения в предложенных композициях. Неограничивающие примеры способов нацеливания, приведены, например, в патентах США № 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно конкретному варианту реализации антитело, описанное в настоящем документе, нацелено на опухоль.

Композиции для применения при введении *in vivo* могут быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через, например, мембраны для стерилизующей фильтрации.

6.4. Способы применения и применение.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения индивида с применением антител против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе. Лечение любого заболевания или расстройства у индивида, при котором может быть благоприятным ингибирование функции TIM-3 (например, TIM-3 человека), может проводиться с применением антител против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе. Антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе, в частности, подходят для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям, и, соответственно, могут применяться в качестве иммунотерапии для индивидов, страдающих раком. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека) или содержащей его фармацевтической композиции согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения рака у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антитела или фармацевтической композиции согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело или фармацевтическая композиция согласно описанию в настоящем документе для применения в способе лечения рака или инфекционного заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело или фармацевтическая композиция согласно описанию в настоящем документе для применения в качестве медикамента. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение антитела или фармацевтической композиции согласно описанию в настоящем документе для получения медикамента для лечения рака или инфекционного заболевания.

Виды рака, лечение которых может проводиться с применением антител против TIM-3 (например, TIM-3 человека) или фармацевтических композиций согласно описанию в настоящем документе вклю-

чают, без ограничения, солидную опухоль, гематологический рак (например, лейкоз, лимфому, миелому, например, множественную миелому) и метастатический очаг. Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой солидную опухоль. Примеры солидных опухолей включают злокачественные новообразования, например, саркомы и карциномы, например, аденокарциномы различных систем органов, такие как поражающие легкие, молочную железу, яичники, лимфоидную ткань, ЖКТ (например, ободочную кишку), анус, половые органы и мочеполовые пути (например, почки, уретерий, клетки мочевого пузыря, предстательную железу), глотку, ЦНС (например, головного мозга, нервные или глиальные клетки), голову и шею, кожу (например, меланому) и поджелудочную железу, а также аденокарциномы, которые включают злокачественные новообразования, такие как рак ободочной кишки, рак прямой кишки, почечноклеточную карциному, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого), рак тонкого кишечника и рак пищевода. Указанный рак может представлять собой рак на ранней, промежуточной, поздней стадии, или метастатический рак. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак ассоциирован с повышенной активностью PD-1 (например, повышенной экспрессией PD-1).

Согласно одному варианту реализации указанный рак выбран из рака легкого (например, аденокарциномы рака или немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) (например, НМРЛ с плоскоклеточной и/или неплоскоклеточной гистологией, или аденокарциномы НМРЛ)), меланомы (например, распространенной меланомы), рака почки (например, почечноклеточной карциномы), рака печени (например, почечноклеточной карциномы), миеломы (например, множественной миеломы), рака предстательной железы, рака молочной железы (например, рака молочной железы, не экспрессирующего один, два или все из рецепторов эстрогена, рецепторов прогестерона или Her2/неу, например, рака молочной железы с тройным негативным фенотипом), рака яичников, рака ободочной и прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи (например, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКСКГШ)), рака анального канала, гастроэзофагеального рака (например, плоскоклеточной карциномы пищевода), мезотелиомы, рака носоглотки, рака щитовидной железы, рака шейки матки, эпителиального рака, перитонеального рака; или лимфопролиферативного заболевания (например, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания).

Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой НМРЛ. Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой почечноклеточную карциному. Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой рак яичников. Согласно конкретному варианту реализации указанный рак яичников представляет собой рефрактерный к платине рак яичников.

Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой гематологический рак, например, лейкоз, лимфому или миелому. Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой лейкоз, например, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) или лейкоз ворсистых клеток. Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой лимфому, например В-клеточную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому из активированных В-клеток (АВС-типа), диффузную В-крупноклеточную лимфому из В-клеток зародышевого центра (ГСВ-типа), мантийноклеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рецидивирующую неходжкинскую лимфому, рефрактерную неходжкинскую лимфому, возвратную фолликулярную неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфоплазмочитарную лимфому или экстранодальную лимфому маргинальной зоны. Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой миелому, например, множественную миелому.

Согласно другому варианту реализации указанный рак выбран из карциномы (например, распространенной или метастатической карциномы), меланомы или карциномы легкого, например, немелкоклеточной карциномы легких.

Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой рак легкого, например, аденокарциному легкого, немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого.

Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой меланому, например распространенную меланому. Согласно одному варианту реализации указанный рак представляет собой распространенную или неоперабельную меланому, не отвечающую на другие виды терапии. Согласно другим вариантам реализации указанный рак представляет собой меланому с мутацией BRAF (например, мутацией BRAF V600). Согласно другим дополнительным вариантам реализации указанное антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе вводят после лечения антителом против CTLA-4 (например, ипилимумабом) с применением или без применения ингибитора BRAF (например, вемурафениба или дабрафениба).

Согласно другому варианту реализации указанный рак представляет собой гепатокарциному, например, распространенную гепатокарциному, сопровождаемую или не сопровождаемую вирусной инфекцией, например, хроническим вирусным гепатитом.

Согласно другому варианту реализации указанный рак представляет собой рак предстательной железы, например, распространенный рак предстательной железы.

Согласно еще одному варианту реализации указанный рак представляет собой миелому, например, множественную миелому.

Согласно еще одному варианту реализации указанный рак представляет собой раковое заболевание почек, например, почечноклеточную карциному (ПКК) (например, метастатический ПКК, светлоклеточную почечноклеточную карциному (СПКК) или папиллярную почечноклеточную карциному).

Согласно еще одному варианту реализации указанный рак выбран из рака легкого, меланомы, рака почки, рака молочной железы, рака ободочной и прямой кишки, лейкоза или метастатического очага рака.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ предотвращения или лечения инфекционного заболевания у индивида, включающий введение указанному индивиду эффективного количества антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека) или содержащей его фармацевтической композиции согласно описанию в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены способы предотвращения и/или лечения инфекции (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, микотической инфекции, протозойной инфекции или паразитарной инфекции). Инфекция, предотвращение и/или лечение которой проводят в соответствии с указанными способами, может быть вызвана инфекционным агентом, идентифицированным в настоящем документе. Согласно конкретному варианту реализации антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, или содержащая его композиция представляет собой единственный активный агент, который вводят индивиду. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, или содержащую его композицию применяют в комбинации с противoinфекционным вмешательством (например, противовирусными, антибактериальными, антимикотическими или противогельминтными средствами) для лечения инфекционных заболеваний. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания, при этом указанное антитело или указанная фармацевтическая композиция необязательно представляет собой единственный активный агент, который вводят индивиду, или указанное антитело или указанную фармацевтическую композицию применяют в комбинации с противoinфекционным вмешательством.

Инфекционные заболевания, предотвращение и/или лечение которых может проводиться с применением антител против TIM-3 (например, TIM-3 человека) или фармацевтических композиций согласно описанию в настоящем документе, вызывают инфекционные агенты, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, бактерии, паразиты, грибы, простейшие и вирусы. Согласно конкретному варианту реализации инфекционное заболевание, лечение и/или предотвращение которого проводят с применением антител против TIM-3 (например, TIM-3 человека) или фармацевтических композиций согласно описанию в настоящем документе, вызывает вирус. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, предотвращение и/или лечение которых может проводиться в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, вызываемые вирусом гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, вирусом гриппа (например, гриппа А или гриппа В), вирусом ветряной оспы, аденовирусом, вирусом простого герпеса I типа (HSV-I), простого герпеса II типа (HSV-II), вирусом чумы рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, папилломавирусом, паповавирусом, цитомегаловирусом, эхиновирусом, арбовирусом, хунта-вирусом, вирусом Коксаки, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори, вирусом краснухи, полиовирусом, вирусом натуральной оспы, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом иммунодефицита человека I типа (ВИЧ-I), вирусом иммунодефицита человека II типа (ВИЧ-II) и агентами вирусных заболеваний, таких как вирусный менингит, энцефалит, лихорадка денге или натуральная оспа.

Бактериальные инфекции, предотвращение и/или лечение которых может проводиться, включают инфекции, вызываемые *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызываемые бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*), предотвращение и/или лечение которых может проводиться в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, вызываемые *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S.pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), *Bacillus anthracis* (сибирская язва); столбняк; заболевания, вызываемые *Streptococcus*, *Staphylococcus*, микобактериями; коклюш, холеру, чуму, дифтерию; заболевания, вызываемые хламидиями, *S.aureus* и легионеллами.

Протозойные заболевания или протозойные инфекции, вызываемые простейшими, предотвращение и/или лечение которых может проводиться в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, лейшманиоз, кокцидиоз, трипаносомоз, шистосомоз или малярию. Паразитарные заболевания или паразитарные инфекции, вызываемые паразитами, предотвращение и/или лечение которых может проводиться в соответствии со способами, описанными в

настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, вызываемые хламидиями и риккетсиями.

Микотические заболевания или микотические инфекции, предотвращение и/или лечение которых может проводиться в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, вызванные инфекциями *Candida*, зигомикоз, вызванный *Candida* мастит, прогрессирующий диссеминированный трихоспороноз с латентной трихоспоронемией, диссеминированный кандидоз, легочный паракокцидиомикоз, легочный аспергиллез, пневмоцистную пневмонию, криптококковый менингит, кокцидиодный менингоэнцефалит и цереброспинальный васкулит, инфекцию *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, микозы придаточных пазух носа, вызванный *Aspergillus fumigatus* эндокардит, дисхондроплазию большеберцовой кости, вызванный *Candida glabrata* вагинит, орофарингеальный кандидоз, хроническую гранулематозную болезнь с X-сцепленным типом наследования, дерматофитию стоп, кожный кандидоз, микотический плацентит, диссеминированный трихоспороноз, аллергический бронхолегочный аспергиллез, микозный кератит, инфекцию *Cryptococcus neoformans*, микотический перитонит, инфекцию *Curvularia geniculata*, стафилококковый эндофтальмит, споротрихоз и дерматофитию.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы дополнительно включают введение дополнительного терапевтического агента указанному индивиду. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтическое средство, радиотерапевтическое средство или нацеленный на контрольную точку агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный химиотерапевтический агент представляет собой гипометилирующий агент (например, азацитидин). Согласно некоторым вариантам реализации указанный нацеленный на контрольную точку агент выбран из группы, состоящей из антитела-антагониста против CTLA-4, антитела-антагониста против PD-L1, антитела-антагониста против PD-L2, антитела-антагониста против PD-1, антитела-антагониста против TIM-3, антитела-антагониста против LAG-3, антитела-антагониста против CEACAM1, антитела-агониста против CD137, антитела-антагониста против TIGIT, антитела-антагониста против VISTA, антитела-агониста против GITR и антитела-агониста против OX40.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе согласно настоящему изобретению, отличающемся тем, что указанный способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического агента указанному индивиду. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому агенту для применения в качестве медикамента. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению; и (b) дополнительному терапевтическому агенту для применения в способе лечения рака. Согласно дополнительному варианту реализации настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или составному набору, содержащему (a) антитело и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению; и (b) дополнительный терапевтический агент. Согласно одному варианту реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтическое средство, радиотерапевтическое средство или нацеленный на контрольную точку агент.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против PD-1 применяют в способах согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой ниволумаб, также известный как BMS-936558 или MDX1106, разработанный Bristol-Myers Squibb. Согласно некоторым вариантам указанное антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб, также известный как ламбролизумаб или MK-3475, разработанный Merck & Co. Согласно некоторым вариантам указанное антитело против PD-1 представляет собой пидилизумаб, также известный как CT-011, разработанный CyteTech. Согласно некоторым вариантам указанное антитело против PD-1 представляет собой MEDI0680, также известный как AMP-514, разработанный Medimmune. Согласно некоторым вариантам указанное антитело против PD-1 представляет собой PDR001, разработанный Novartis Pharmaceuticals. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-1 представляет собой REGN2810, разработанный Regeneron Pharmaceuticals. Согласно некоторым вариантам указанное антитело против PD-1 представляет собой PF-06801591, разработанный Pfizer. Согласно некоторым вариантам указанное антитело против PD-1 представляет собой BGB-A317, разработанный BeiGene. Согласно некоторым вариантам указанное антитело против PD-1 представляет собой TSR-042, разработанный AnaptysBio и Tesaro. Согласно некоторым вариантам указанное антитело против PD-1 представляет собой SHR-1210, разработанный Hengrui.

Дополнительные неограничивающие примеры антител против PD-1, которые могут применяться в способах лечения согласно описанию в настоящем документе, описаны в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в настоящий документ полностью посредством ссылки для любых целей: патент США № 6808710; патент США № 7332582; патент США № 7488802; патент США № 8008449; патент США № 8114845; патент США № 8168757; патент США № 8354509; патент США № 8686119; патент США № 8735553; патент США № 8747847; патент США № 8779105; патент США №

8927697; патент США № 8993731; патент США № 9102727; патент США № 9205148; публикация США № US 2013/020262 3 A1; публикация США № US 2013/0291136 A1; публикация США № US 2014/0044738 A1; публикация США № US 2014/0356363 A1; публикация США № US 2016/0075783 A1; и РСТ-публикация WO 2013/033091 A1; РСТ-публикация WO 2015/036394 A1; РСТ-публикация WO 2014/179664 A2; РСТ-публикация WO 2014/209804 A1; РСТ-публикация WO 2014/206107 A1; РСТ-публикация WO 2015/058573 A1; РСТ-публикация WO 2015/085847 A1; РСТ-публикация WO 2015/200119 A1; РСТ-публикация WO 2016/015685 A1; и РСТ-публикация WO 2016/020856 A1.

Согласно некоторым вариантам реализации в способах согласно описанию в настоящем документе применяют антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой атезолизумаб, разработанный Genentech. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой дурвалумаб, разработанный Astra-Zeneca, Celgene и Medimmune. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой авелумаб, также известный как MSB0010718C, разработанный Merck Serono и Pfizer. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой MDX-1105, разработанный Bristol-Myers Squibb. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело против PD-L1 представляет собой AMP-224, разработанный Amplimmune и GSK.

Неограничивающие примеры антител против PD-L1, которые могут применяться в способах лечения согласно описанию в настоящем документе, описаны в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в настоящий документ полностью посредством ссылки для любых целей: патент США № 7943743; патент США № 8168179; патент США № 8217149; патент США № 8552154; патент США № 8779108; патент США № 8981063; патент США № 9175082; публикация США № US 2010/02 03 05 6 A1; публикация США № US 2003/0232323 A1; публикация США № US 2013/0323249 A1; публикация США № US 2014/0341917 A1; публикация США № US 2014/0044738 A1; публикация США № US 2015/0203580 A1; публикация США № US 2015/0225483 A1; публикация США № US 2015/0346208 A1; публикация США № US 2015/0355184 A1; и РСТ-публикация WO 2014/100079 A1; РСТ-публикация WO 2014/022758 A1; РСТ-публикация WO 2014/055897 A2; РСТ-публикация WO 2015/061668 A1; РСТ-публикация WO 2015/109124 A1; РСТ-публикация WO 2015/195163 A1; РСТ-публикация WO 2016/000619 A1; и РСТ-публикация WO 2016/030350 A1.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с соединением, нацеленным на иммуномодулирующий фермент или ферменты, такие как ИДО (индоламин-(2,3)-диоксигеназа) и/или TDO (триптофан 2,3-диоксигеназа). Соответственно, согласно одному варианту реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой соединение, нацеленное на иммуномодулирующий фермент или ферменты, такое как ингибитор индоламин-(2,3)-диоксигеназы (ИДО). Согласно некоторым вариантам реализации такое соединение выбрано из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corp; см., например, заявку WO 2010/005958, включенную в настоящий документ полностью посредством ссылки), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимод (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). Согласно одному варианту реализации указанное соединение представляет собой эпикадостат. Согласно другому варианту реализации указанное соединение представляет собой F001287. Согласно другому варианту реализации указанное соединение представляет собой индоксимод. Согласно другому варианту реализации указанное соединение представляет собой NLG919. Согласно конкретному варианту реализации антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с ингибитором ИДО для лечения рака. Ингибитор ИДО согласно описанию в настоящем документе для применения в лечении рака представлен в виде твердой лекарственной формы фармацевтической композиции такой как таблетка, пилюля или капсула, при этом указанная фармацевтическая композиция включает ингибитор ИДО и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Соответственно, антитело согласно описанию в настоящем документе и ингибитор ИДО согласно описанию в настоящем документе могут быть введены по отдельности, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. Согласно одному варианту реализации указанное антитело вводят парентерально, а указанный ингибитор ИДО вводят перорально. Согласно конкретным вариантам реализации указанный ингибитор выбран из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corporation), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). Эпикадостат был описан в РСТ-публикации WO 2010/005958, которая включена в настоящий документ посредством ссылки полностью для любых целей. Согласно одному варианту реализации указанный ингибитор представляет собой эпикадостат. Согласно другому варианту реализации указанный ингибитор представляет собой F001287. Согласно другому варианту реализации указанный ингибитор представляет собой индоксимод. Согласно другому варианту реализации указанный ингибитор представляет собой NLG919.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с вакциной. Указанная вакцина может представлять собой, например, пептидную вакцину, ДНК-вакцину или РНК-вакцину. Согласно

некоторым вариантам реализации указанная вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока или вакцину против патогена на основе белка теплового шока. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с вакциной согласно описанию в WO 2016/183486 (например, вакциной, содержащей по меньшей мере один синтетический пептид, содержащий специфическую для рака мутацию, присутствующую в раке у указанного индивида), включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно конкретному варианту реализации антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока. Белки теплового шока (HSP) представляют собой семейство высококонсервативных белков, которые широко распространены у всех видов. В результате теплового шока или других форм стресса, в том числе воздействия токсинов, окислительного стресса или глюкозной депривации, может происходить выраженная индукция значительно более высоких уровней их экспрессии. На основании молекулярной массы было классифицировано пять семейств: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. HSP доставляют иммуногенные пептиды через путь перекрестной презентации в антигенпрезентирующих клетках (АПК), таких как макрофаги и дендритные клетки (ДК), что приводит к активации Т-клеток. HSP функционируют в качестве шаперонов-носителей опухолеассоциированных антигенных пептидов, образующих комплексы, способные индуцировать опухолеспецифический иммунитет. При высвобождении из погибающих опухолевых клеток комплексы HSP-антиген поглощают антигенпрезентирующие клетки (АПК), при этом указанные антигены процессируются в пептиды, которые связывают молекулы МНС класса I и класса II, что приводит к активации противоопухолевых CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток. Иммунитет, вызываемый комплексами HSP, происходящими из опухолевых составов, направлен специфически против уникального репертуара антигенных пептидов, экспрессируемого раком у каждого индивида. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и (b) вакцине для применения в качестве медикамента, например, для применения в способе лечения рака. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или составному набору, содержащему (а) антитело и/или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению; и (b) вакцину. Согласно одному варианту реализации указанная вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока. Согласно одному варианту реализации указанная вакцина представляет собой вакцину против патогена на основе белка теплового шока.

Комплекс пептида и белка теплового шока (HSPPC) представляет собой белково-пептидный комплекс, состоящий из белка теплового шока в нековалентном комплексе с антигенными пептидами. HSPPC вызывают как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ. Согласно конкретному варианту реализации указанный антигенный пептид или пептиды проявляют антигенность в отношении рака, лечение которого проводится. HSPPC эффективно захватываются АПК через мембранные рецепторы (в основном CD91) или при связывании с Toll-подобными рецепторами. Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию АПК с продукцией хемокинов и цитокинов, что ведет к активации естественных киллерных клеток (NK), моноцитов, и опосредованному Th1 и Th-2 иммунному ответу. Согласно некоторым вариантам реализации HSPPC, применяемые в способах согласно описанию в настоящем документе, содержат один или более белков теплового шока из семейств стрессовых белков hsp60, hsp70 или hsp90 в комплексе с антигенными пептидами. Согласно некоторым вариантам реализации HSPPC содержат hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, калретикулин; или комбинации из двух или более перечисленных белков.

Согласно конкретному варианту реализации указанный комплекс пептида и белка теплового шока (HSPPC) содержит рекомбинантные белки теплового шока (например, hsp70 или hsc70) или их пептид-связывающий домен в комплексе с рекомбинантными антигенными пептидами. Рекомбинантные белки теплового шока могут быть получены с применением технологии рекомбинантной ДНК, например, с использованием последовательности hsc70 человека согласно источникам: Dworniczak and Mirault, *Nucleic Acids Res.* 15:5181-5197 (1987), а также № доступа в GenBank P11142 и/или Y00371, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности Hsp70 соответствуют описанию в источниках: Hunt and Morimoto *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (19), 6455-6459 (1985), а также № доступа GenBank P0DMV8 и/или M11717, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Антигенные пептиды могут также быть получены с применением методов рекомбинантной ДНК, известных в данной области техники.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенные пептиды содержат модифицированную аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации указанная модифицированная аминокислота содержит посттрансляционную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации указанная модифицированная аминокислота содержит миметик посттрансляционной модификации. Согласно некоторым вариантам реализации указанная модифицированная аминокислота представляет собой Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая была фосфорилирована по гидроксильной группе или аминогруппе.

пе боковой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации указанная модифицированная аминокислота представляет собой миметик аминокислоты Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая была фосфорилирована по гидроксильной группе или аминогруппе боковой цепи.

Согласно конкретному варианту реализации антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с комплексом пептида и белка теплового шока (HSPPC), например, комплексом пептида и белка теплового шока-96 (HSPPC-96), для лечения рака. HSPPC-96 содержит белок теплового шока (Hsp) размером 96 кДа, gp96, в комплексе с антигенными пептидами. HSPPC-96 представляет собой средство для иммунотерапии рака, полученное из опухоли индивида, и содержит антигенный "отпечаток" указанного рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанный "отпечаток" содержит уникальные антигены, которые присутствуют только в специфических раковых клетках указанного конкретного индивида, и инъекция указанной вакцины предназначена для того, чтобы стимулировать иммунную систему указанного индивида распознавать и атаковать любые клетки, несущие специфический "отпечаток" рака. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в комбинации с комплексом пептида и белка теплового шока (HSPPC) для применения в качестве медикамента и/или для применения в способе лечения рака.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный HSPPC, например, HSPPC-96, получают из опухолевой ткани индивида. Согласно конкретному варианту реализации указанный HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли того типа рака или его метастаз, лечение которого проводится. Согласно другому конкретному варианту реализации указанный HSPPC (например, HSPPC-96) аутологичен для индивида, лечение которого проводится. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухолевая ткань представляет собой некротическую опухолевую ткань. Согласно некоторым вариантам реализации для режима вакцины используют по меньшей мере 1 грамм (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 граммов) некротической опухолевой ткани. Согласно некоторым вариантам реализации после хирургической резекции некротическую опухолевую ткань замораживают до применения при приготовлении вакцины. Согласно некоторым вариантам реализации указанный HSPPC, например, HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани с применением методик очищения, фильтруют и получают инъецируемую вакцину. Согласно некоторым вариантам реализации индивиду вводят 6-12 доз указанного HSPPC, например, HSPPC-96. Согласно таким вариантам реализации дозы указанного HSPPC, например, HSPPC-96, могут вводиться еженедельно при введении первых 4 доз, а затем один раз в две недели при введении 2-8 дополнительных доз.

Дополнительные примеры HSPPC, которые могут применяться в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представлены в следующих патентах и патентных заявках, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки: патенты США № 6391306, 6383492, 6403095, 6410026, 6436404, 6447780, 6447781 и 6610659.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против TIM-3 согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с адъювантом. В зависимости от контекста лечения могут применяться различные адъюванты. Неограничивающие примеры подходящих адъювантов включают, не ограничиваясь перечисленными, полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), монтанид (Montanide ISA, неполный адъювант Seppic), адъювантную систему Риби (RAS), Titer Max, мурамил-пептиды, адъювантный состав SAF (Syntex Adjuvant Formulation), квасцы (гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия), адъюванты с солями алюминия, адъюванты Gerbu®, абсорбированный на нитроцеллюлозе антиген, инкапсулированный или захваченный антиген, 3 де-О-ацилированный монофосфориллипид A (3 D-MPL), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, лиганды Toll-подобного рецептора (TLR), лиганды маннан-связывающего лектина (MBL), агонисты STING, иммуностимулирующие комплексы, такие как сапонины, Quil A, QS-21, QS-7, ISCOMATRIX и другие. Другие адъюванты включают CpG-олигонуклеотиды и двунитевые молекулы РНК, такие как поли(А) и поли(У). Могут также применяться комбинации вышеперечисленных адъювантов. См., например, патенты США № 6645495; № 7029678; и № 7858589, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно одному варианту реализации применяемый согласно настоящему изобретению адъювант представляет собой QS-21 STIMULON.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против TIM-3 согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, содержащим TCR. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой растворимый TCR. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой клетку, экспрессирующую TCR. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, содержащим TCR, для применения в качестве медикамента и/или для применения в способе лечения рака.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против TIM-3 согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR). Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой T-клетку.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело против TIM-3 согласно описанию в настоящем документе вводят индивиду в комбинации с имитирующим TCR антителом. Согласно некоторым вариантам реализации указанное имитирующее TCR антитело представляет собой антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-МНС. Неограничивающие примеры имитирующих TCR антител приведены, например, в источниках: патент США № 9074000 и публикации США US 2009/0304679 A1 и US 2014/0134191 A1, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) и дополнительный терапевтический агент (например, химиотерапевтическое средство, радиотерапевтическое средство, нацеленный на контрольную точку агент, ингибитор ИДО, вакцина, адъювант, растворимый TCR, экспрессирующая TCR клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор клетка и/или имитирующее TCR антитело) могут быть введены по отдельности, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. Согласно одному варианту реализации антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) вводят парентерально, а ингибитор ИДО вводят перорально.

Антитело или фармацевтическая композиция, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены индивиду различными путями. Указанные пути включают, не ограничиваясь перечисленными, парентеральный, интраназальный, внутритрахеальный, пероральный, внутрикожный, местный, внутримышечный, внутривенный, внутривенный, интратекальный, внутриопухолевый, конъюнктивальный, внутриартериальный и подкожный. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитело или фармацевтическую композицию доставляют внутривенно. Также может быть использовано легочное введение, например, путем применения ингалятора или небулайзера, и состав с аэрозольным агентом для применения в виде спрея. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитело или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют подкожно или внутривенно. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитело или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют внутриартериально. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитело или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют внутрь опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитело или фармацевтическую композицию согласно описанию в настоящем документе доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

Количество антитела или композиции, эффективное при лечении и/или предотвращении состояния, зависит от природы заболевания, и может быть определено с применением стандартных клинических методик.

Точная доза для применения в композиции также зависит от маршрута введения, и серьезности инфекции или вызываемого ей заболевания, и должна выбираться на основании мнения лечащего врача с учетом обстоятельств для каждого индивида. Например, эффективные дозы могут также варьировать в зависимости от способа введения, целевого сайта, физиологического состояния пациента (в том числе, возраста, массы тела и состояния здоровья), от того, представляет ли собой пациент человека или животное, от других вводимых медикаментов, или от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, пациент представляет собой человека, но может также проводиться лечение не являющихся человеком млекопитающих, в том числе трансгенных млекопитающих. Дозировки для лечения титруют оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

Антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, может также применяться для анализа уровней белка TIM-3 (например, TIM-3 человека) в биологическом образце с применением классических иммуногистологических способов, известных специалистам в данной области техники, в том числе иммунологических анализов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализов с антителами известны в данной области техники и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки могут применяться для мечения антитела, описанного в настоящем документе. Как вариант, второе антитело, которое распознает антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанные в настоящем документе, может быть меченым и может применяться в комбинации с антителом против TIM-3 (например, TIM-3 человека) для детекции уровней белка TIM-3 (например, TIM-3 человека). Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению антитела согласно настоящему изобретению для детекции белка TIM-3 *in vitro* (например, TIM-3 человека) в биологическом образце. Согласно дополнительному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению антитела против TIM-3 согласно настоящему изобретению для анализа и/или детекции уровней белка TIM-3 (например, TIM-3 человека) в биологическом образце *in*

vitro, необязательно отличающемся тем, что указанное антитело против ТИМ-3 конъюгировано с радионуклидом или детектируемой меткой, и/или несет метку, описанную в настоящем документе, и/или отличающемся использованием иммуногистологического способа.

Подразумевается, что анализ уровня экспрессии белка ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) включает качественное или количественное измерение или расчет уровня белка ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) в первом биологическом образце, либо прямое (например, путем определения или расчета абсолютного уровня белка), либо относительное (например, путем сравнения с ассоциированным с заболеванием уровнем белка во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) в первом биологическом образце может быть измерен или рассчитан, и сравнен со стандартным уровнем белка ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека), при этом стандарт получен из второго биологического образца, происходящего от индивидуума, не страдающего указанным расстройством, или определен на основании средних уровней в популяции индивидуумов, не страдающих указанным расстройством. Как известно в данной области техники, после определения "стандартного" уровня полипептида ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) он может быть многократно использован в качестве стандарта для сравнения. Соответственно, согласно дополнительному варианту реализации настоящее изобретение относится к *in vitro* способу анализа и/или детекции уровней белка ТИМ-3, например, уровней белка ТИМ-3 человека, в биологическом образце, включающему качественное или количественное измерение или оценку уровня белка ТИМ-3, например, белка ТИМ-3 человека, в биологическом образце с применением иммуногистологического способа.

В настоящем документе термин "биологический образец" относится к любому биологическому образцу, полученному от индивида, из линии клеток, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующего ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека). Способы получения биоптатов тканей и жидкостей организма животных (например, человека) хорошо известны в данной области техники. Биологические образцы включают моноклеарные клетки периферической крови.

Антитело против ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека), описанное в настоящем документе, может применяться для прогностического применения, диагностики, мониторинга и скрининга, в том числе применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известного и стандартного для специалиста, основанного на настоящем описании. Анализы и наборы для прогнозирования, диагностики, мониторинга и скрининга для *in vitro* оценки и исследования статуса иммунной системы и/или иммунного ответа могут использоваться для предсказания, диагностики и мониторинга для исследования образцов пациента, включая отличающиеся, по имеющимся данным или предположительно, дисфункцией иммунной системы, или для исследования предполагаемого или требуемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину. Указанные оценка и исследование статуса иммунной системы и/или иммунного ответа также подходят для применения при определении пригодности пациента для клинического испытания лекарственного средства или для введения конкретного химиотерапевтического агента, радиотерапевтического агента или антитела, в том числе комбинаций перечисленного, в сравнении с другим агентом или антителом. Указанный тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже практикуется для применения антител против белка HER2 при раке молочной железы (HercerTest™, Dako), когда указанный анализ используют также для оценки терапии антителом Герцептином® у пациентов. Варианты применения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы, и радиовизуализацию иммунного ответа. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу против ТИМ-3 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к антителу против ТИМ-3 и/или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе предсказания, диагностики и/или мониторинга у индивида, страдающего или предположительно страдающего дисфункцией иммунной системы, и/или для исследования предполагаемого или требуемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к применению антитела против ТИМ-3 согласно настоящему изобретению для предсказания, диагностики и/или мониторинга у индивида, страдающего или предположительно страдающего дисфункцией иммунной системы, и/или для исследования предполагаемого или требуемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину путем анализа и/или детекции уровней белка ТИМ-3 человека в полученном от указанного индивида биологическом образце *in vitro*.

Согласно одному варианту реализации антитело против ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) может применяться при иммуногистохимическом исследовании образцов биопсии. Согласно одному варианту реализации указанный способ представляет собой способ для применения *in vitro*. Согласно другому варианту реализации антитело против ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) может применяться для детекции уровней ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) или уровней клеток, которые содержат ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) на поверхности мембран; указанные уровни могут быть затем связаны с определенными симптомами заболевания. Антитела против ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека), описанные в настоящем документе, могут нести детектируемую или функциональную метку, и/или могут быть конъюгированы с

радионуклидом или детектируемой меткой. При использовании флуоресцентных меток, для идентификации и количественного определения участников специфического связывания могут использоваться доступные в настоящее время способы микроскопического анализа и сортировки клеток с активацией флуоресценцией (FACS-анализ), или комбинация известных в данной области техники процедур, относящихся к обоим способам. Антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанные в настоящем документе, могут нести флуоресцентную метку или быть конъюгированы с флуоресцентной меткой. Примеры флуоресцентных меток включают, например, реакционные и конъюгированные зонды, например, аминкумарин, флуоресцеин и тexasский красный, красители Alexa Fluor, Cy-красители и красители DyLight. Антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) может нести радиоактивную метку или радионуклидом, или может быть конъюгировано с радиоактивной меткой или радионуклидом, таким как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . При использовании радиоактивных меток для идентификации и количественного определения специфического связывания антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека) с TIM-3 (например, TIM-3 человека) могут использоваться в настоящее время доступные процедуры подсчета, известные в данной области техники. В том случае, когда метка представляет собой фермент, детекция может осуществляться с применением любых современных колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методик, известных в данной области техники. Это может быть достигнуто путем приведения образца или контрольного образца в контакт с антителом против TIM-3 (например, TIM-3 человека) в условиях, позволяющих образование комплекса антитела и TIM-3 (например, TIM-3 человека). Любые образованные указанным антителом и TIM-3 (например, TIM-3 человека) комплексы детектируют и сравнивают в образце и в контроле. С учетом специфического связывания антител, описанных в настоящем документе, с TIM-3 (например, TIM-3 человека), указанные антитела могут применяться для специфической детекции экспрессии TIM-3 (например, TIM-3 человека) на поверхности клеток. Антитела, описанные в настоящем документе, могут также применяться для иммуноаффинного очищения TIM-3 (например, TIM-3 человека). Также настоящим изобретением предусмотрена система анализа, которая может быть представлена в форме тестового набора, набора или составного набора для количественного анализа объема присутствия, например, TIM-3 (например, TIM-3 человека) или комплексов TIM-3 (например, TIM-3 человека)/ лиганд TIM-3 (например, TIM-3 человека). Указанная система, тестовый набор, набор или составной набор может содержать меченый компонент, например, меченое антитело, и один или более дополнительных иммунохимических реагентов.

6.5. Полинуклеотиды, векторы и способы получения антител против TIM-3.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, содержащие последовательность нуклеотидов, кодирующую антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент (например, варибельную область легкой цепи и/или варибельную область тяжелой цепи), которое или который специфически связывается с антигеном TIM-3 (например, TIM-3 человека), и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, *E.coli* и клетках млекопитающих). В настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, содержащие последовательности нуклеотидов, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь любого из антител, предложенных согласно настоящему изобретению, а также векторы, содержащие такие последовательности полинуклеотидов, например, экспрессионные векторы для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

В настоящем документе "выделенные" полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты представляют собой полинуклеотид или молекулу нуклеиновой кислоты, которые были отделены от других молекул нуклеиновых кислот, присутствующих в естественном источнике (например, мыши или человеке) указанной молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может по существу не содержать другого клеточного материала или культуральной среды при получении с помощью рекомбинантных методик, или по существу не содержать химических предшественников или других химических веществ, если она химически синтезирована. Например, выражение "по существу не содержащий" включает составы с полинуклеотидом или молекулой нуклеиновой кислоты, содержащие менее чем приблизительно 15, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (в частности, менее чем приблизительно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновых кислот, химических предшественников и/или других химических веществ. Согласно конкретному варианту реализации молекула (или молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, описанное в настоящем документе, является выделенной или очищенной.

Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, содержащие последовательности нуклеотидов, кодирующие антитела, которые специфически связываются с полипептидом TIM-3 (например, TIM-3 человека) и содержат последовательность аминокислот согласно описанию в настоящем документе, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с полипептидом TIM-3 (например, TIM-3 человека) (например, дозозависимым образом) или связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, содер-

жащие последовательность нуклеотидов, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь антитела, описанного в настоящем документе. Указанные полинуклеотиды могут содержать последовательности нуклеотидов, кодирующие легкую цепь, содержащую FR и CDR VL антител, описанных в настоящем документе, (см., например, табл. 1), или последовательности нуклеотидов, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR и CDR VH антител, описанных в настоящем документе, (см., например, табл. 1).

Также согласно настоящему изобретению предложены полинуклеотиды, кодирующие антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), оптимизированное, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены сигнальных последовательностей на гетерологичные и элиминации элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека) или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH или домен VL), для рекомбинантной экспрессии путем введения изменений кодонов и/или элиминации ингибиторных областей в мРНК могут быть реализованы путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США № 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6794498, соответственно, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Например, могут быть мутированы потенциальные сайты сплайсинга и элементы нестабильности (например, богатые A/T или A/U элементы) в составе РНК без изменения аминокислот, кодируемых указанными последовательностями нуклеиновых кислот, для увеличения стабильности указанной РНК при рекомбинантной экспрессии. При указанных изменениях используют вырожденность генетического кода, например, используя альтернативный кодон для получения идентичной аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации может быть желательным изменение одного или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, аналогичной аминокислоты с химической структурой и свойствами, и/или функцией, аналогичными свойственным оригинальной аминокислоте. Такие способы могут увеличивать экспрессию антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека) или его фрагмента по меньшей мере 1-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно, 10-кратно, 20-кратно, 30-кратно, 40-кратно, 50-кратно, 60-кратно, 70-кратно, 80-кратно, 90-кратно или 100-кратно или более относительно экспрессии антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека), кодируемого полинуклеотидами, которые не были оптимизированы.

Согласно некоторым вариантам реализации оптимизированная последовательность полинуклеотидов, кодирующая антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH), может гибридизоваться с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной последовательности полинуклеотидов, кодирующей антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). Согласно конкретным вариантам реализации оптимизированная последовательность нуклеотидов, кодирующая антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, или его фрагмент, гибридизуется в условиях очень высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом с неоптимизированной последовательностью полинуклеотидов, кодирующей антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, или его фрагмент. Согласно конкретному варианту реализации оптимизированная последовательность нуклеотидов, кодирующая антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, или его фрагмент, гибридизуется в условиях гибридизации очень высокой жесткости, средней жесткости или меньшей жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной последовательности нуклеотидов, кодирующей антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, или его фрагмент. Информация относительно условий гибридизации приведена, например, в опубликованной заявке на патент США US 2005/0048549 (например, в параграфах 72-73), которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Указанные полинуклеотиды могут быть получены, а последовательность нуклеотидов указанных полинуклеотидов определена с применением любого способа, известного в данной области техники. Последовательности нуклеотидов, кодирующие антитела, описанные в настоящем документе, например, антитела, описанные в табл. 1, и модифицированные варианты указанных антител, могут быть определены с применением способов, хорошо известных в данной области техники, т.е. нуклеотидные кодоны, которые, как известно, кодируют конкретные аминокислоты, собирают таким образом, чтобы получить нуклеиновую кислоту, которая кодирует указанное антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, согласно описанию в источнике: Kutmeier G. et al., (1994), *BioTechniques* 17: 242-6, включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки), при этом, вкратце, задействован синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей указанное антитело, отжиг и лигирование указанных олигонуклеотидов, а затем амплификация лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

Как вариант, полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящем документе, может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с применением способов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и других способов молекулярного клонирования). Например, может быть выполнена ПЦР-амплификация с использованием синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами известной последовательности, с применением

геномной ДНК, полученной из гибридных клеток, продуцирующих представляющее интерес антитело. Такие способы ПЦР-амплификации могут применяться для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие способы ПЦР-амплификации могут применяться для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты могут быть клонированы в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, с получением химерных и гуманизированных антител.

В том случае, когда клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, недоступен, однако известна последовательность молекулы указанного антитела, кодирующая указанный иммуноглобулин нуклеиновая кислота может быть химически синтезирована или получена из подходящего источника (например, из библиотеки кДНК антител, или библиотеки кДНК, полученной из/нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли-А+РНК, выделенной из любой ткани или клетки, экспрессирующей указанное антитело, например, из гибридных клеток, выбранных для экспрессии антитела согласно описанию в настоящем документе) с помощью ПЦР-амплификации с применением синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами указанной последовательности, или с помощью клонирования с применением олигонуклеотидного зонда, специфического для конкретной генной последовательности, для идентификации, например, кДНК-клона из библиотеки кДНК, который кодирует указанное антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, могут затем быть клонированы в реплицируемые клонирующие векторы с применением любого способа, хорошо известного в данной области техники.

ДНК, кодирующая антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанные в настоящем документе, может быть легко выделена и секвенирована с применением стандартных процедур (например, с применением олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи указанных антител против TIM-3 (например, TIM-3 человека)). Гибридные клетки могут служить в качестве источника такой ДНК. После выделения указанная ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьян COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO от CHO GS System™ (Lonza)), или клетки миеломы, в иных условиях не продуцирующие иммуноглобулиновый белок, обеспечивая синтез антител против TIM-3 (например, TIM-3 человека) в указанных рекомбинантных клетках-хозяевах.

Для получения целых антител ПЦР-праймеры, включающие последовательности нуклеотидов VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, могут применяться для амплификации последовательностей VH или VL в клонах scFv. С применением методик клонирования, известных специалистам в данной области техники, ПЦР-амплифицированные домены VH могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например, константную область гамма-4 человека, и ПЦР-амплифицированные домены VL могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например, константные области каппа или лямбда человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанные векторы для экспрессии доменов VH или VL содержат промотор EF-1a, сигнал секреции, сайт клонирования для вариабельной области, константные домены и селективный маркер, такой как неомицин. Домены VH и VL могут также быть клонированы в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем векторами для конверсии тяжелой цепи и векторами для конверсии легкой цепи котрансфицируют линии клеток для получения стабильных или транзистентных линий клеток, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG, с применением методик, известных специалистам в данной области техники.

Указанная ДНК также может быть модифицирована, например, путем замены кодирующей последовательности последовательностями константных доменов тяжелых и легких цепей человека вместо последовательностей мыши, или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида или ее части.

Также предложены полинуклеотиды, которые гибридизуются с полинуклеотидами, которые кодируют антитело, описанное в настоящем документе, в условиях гибридизации высокой жесткости, средней или меньшей жесткости. Согласно конкретным вариантам реализации полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, гибридизуются в условиях гибридизации высокой жесткости, средней или меньшей жесткости с полинуклеотидами, которые кодируют домен VH и/или домен VL согласно настоящему изобретению.

Условия гибридизации были описаны в данной области техники и известны специалисту в данной области техники. Например, гибридизация в жестких условиях может включать гибридизацию со связанной с фильтром ДНК в бх хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при приблизительно 45°C с последующим одним или более промываниями в 0,2× SSC/0,1% SDS при приблизительно 50-65°C; гибридиза-

ция в очень жестких условиях может включать гибридизацию со связанной с фильтром нуклеиновой кислотой в $6\times$ SSC при приблизительно 45°C с последующим одним или более промываниями в $0,1\times$ SSC/0,2% SDS при приблизительно 68°C . Гибридизация в других жестких условиях известна специалистам в данной области техники и была описана, например, в источнике: Ausubel F.M. et al., eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 6.3.1-6.3.6, 2.10.3, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения предложены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантным способом) антитела, описанные в настоящем документе, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека), и родственные полинуклеотиды и экспрессионные векторы. В настоящем изобретении предложены векторы (например, экспрессионные векторы), содержащие полинуклеотиды, содержащие последовательности нуклеотидов, кодирующие антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека) или их фрагменты, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно, в клетках млекопитающих. Также согласно настоящему изобретению предложены клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии антител против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанных в настоящем документе (например, антитела человека или гуманизированного антитела). Согласно конкретному аспекту настоящего изобретения предложены способы получения антитела, описанного в настоящем документе, включающие экспрессию такого антитела в клетке-хозяине.

Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в настоящем документе (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела, или одноцепочечного антитела, описанного в настоящем документе), которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), включает конструирование экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, который кодирует указанное антитело. После того как был получен полинуклеотид, кодирующий молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела, или его фрагмент (например, переменные области тяжелых и/или легких цепей), описанные в настоящем документе, может быть получен вектор для получения молекулы антитела с помощью технологии рекомбинантной ДНК, с применением методик, хорошо известных в данной области техники. Соответственно, в настоящем документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего кодирующую последовательность нуклеотидов антитела или фрагмента антитела (например, легкой цепи или тяжелой цепи). Для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующие последовательности антитела или фрагмента антитела (например, легкой цепи или тяжелой цепи) и подходящие сигналы контроля транскрипции и трансляции, могут применяться способы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Указанные способы включают, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетической рекомбинации *in vivo*. Также предложены реплицируемые векторы, содержащие последовательность нуклеотидов, кодирующую молекулу антитела, описанную в настоящем документе, тяжелую или легкую цепь антитела, переменную область тяжелой или легкой цепи антитела или ее фрагмент, или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанную с промотором. Такие векторы могут, например, включать последовательность нуклеотидов, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные публикации WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464, которые включены в настоящий документ полностью посредством ссылки), и в такой вектор могут быть клонированы переменные области антитела для экспрессии целой тяжелой цепи, целой легкой цепи, или и целой тяжелой, и целой легкой цепей.

Экспрессионный вектор может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) с применением стандартных методик, и полученные клетки могут затем культивироваться с применением стандартных методик для получения антитела, описанного в настоящем документе, или его фрагмента. Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь, или ее фрагмент, или одноцепочечное антитело, описанное в настоящем документе, функционально связанные с промотором для экспрессии таких последовательностей в указанной клетке-хозяине. Согласно некоторым вариантам реализации для экспрессии двухцепочечных антител векторы, кодирующие и тяжелые, и легкие цепи индивидуально, могут быть коэкспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии целой молекулы иммуноглобулина, согласно подробному описанию ниже. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий и тяжелую цепь, и легкую цепь антитела, описанного в настоящем документе, или его фрагмент. Согласно конкретным вариантам реализации клетка-хозяин содержит два разных вектора; первый вектор содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, или его фрагмент, а второй вектор содержит полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе, или его фрагмент. Согласно другим вариантам реализации первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи анти-

тела, описанного в настоящем документе, или его фрагмент, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе. Согласно конкретным вариантам реализации тяжелая цепь/вариабельная область тяжелой цепи, экспрессируемая первой клеткой, связана с легкой цепью/вариабельной областью легкой цепи второй клетки с образованием антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена популяция клеток-хозяев, содержащая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельную область легкой цепи антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанного в настоящем документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанного в настоящем документе.

Различные системы хозяев и экспрессионных векторов могут быть использованы для экспрессии молекул антитела, описанного в настоящем документе (см., например, патент США № 5807715, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Такие системы экспрессии в хозяевах представляют собой основу, с помощью которой могут быть получены и затем очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, однако также представляют собой клетки, которые могут при трансформации или трансфекции подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями экспрессировать молекулу антитела, описанного в настоящем документе, *in situ*. Указанные системы включают, не ограничиваясь перечисленными, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидными ДНК или космидными ДНК экспрессионных векторов, содержащих кодирующие последовательности антител; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*) трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессионными векторами, содержащими кодирующие последовательности антител; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирусными), содержащими кодирующие последовательности антител; системы клеток растений (например, зеленых водорослей, таких как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, на основе вируса мозаики цветной капусты, CaMV; вируса табачной мозаики, TMV) или трансформированных рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например, Ti-плазмидой), содержащими кодирующие последовательности антител; или системы клеток млекопитающих (например, клеток COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NSO, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), несущих рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, происходящие из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлопротеиназы) или вирусов млекопитающих (например, поздний аденовирусный промотор; промотор вируса осповакцины 7,5K). Согласно конкретному варианту реализации клетки для экспрессии антител, описанных в настоящем документе, представляют собой клетки CHO, например клетки CHO от CHO GS System™ (Lonza). Согласно конкретному варианту реализации клетки для экспрессии антител, описанных в настоящем документе, представляют собой клетки человека, например, линии клеток человека. Согласно конкретному варианту реализации экспрессионный вектор для млекопитающих представлен pOptiVEC™ или pcDNA3.3. Согласно конкретному варианту реализации для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела, в частности, для экспрессии молекулы целого рекомбинантного антитела используют бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих). Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промоторный элемент немедленно-ранних генов цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную экспрессионную систему для антител (источники: Foecking M.K. & Hofstetter H. (1986) *Gene* 45: 101-5; и Cockett M.I. et al., (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, продуцируют клетки CHO или клетки NS0. Согласно конкретному варианту реализации экспрессия последовательностей нуклеотидов, кодирующих антитела, описанные в настоящем документе, специфически связывающиеся с TIM-3 (например, TIM-3 человека), регулирует конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифический промотор.

Для бактериальных систем может быть выбран ряд экспрессионных векторов, обеспечивающих преимущества в зависимости от предполагаемого использования экспрессируемой молекулы антитела. Например, если предполагается продуцирование больших количеств такого антитела для получения фармацевтических композиций молекулы антитела, может быть желательно использование векторов, направляющих экспрессию высоких уровней слитых белковых продуктов, которые легко очистить. Такие векторы включают, не ограничиваясь перечисленными, экспрессионный вектор *E.coli* pUR278 (Ruetter U. & Mueller-Hill B. (1983) *EMBO J.* 2: 1791-1794), где кодирующая последовательность антитела

может быть лигирована в вектор индивидуально внутри рамки считывания с кодирующей областью lac Z, так что продуцируется слитый белок; векторы pIN (Inouye S. & Inouye M. (1985) *Nuc. Acids Res.* 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509); и т.п., каждый из перечисленных источников включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Например, могут также применяться векторы pGEX для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). В целом, такие слитые белки растворимы и могут легко быть очищены из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с глутатион-агарозными гранулами подложки с последующей элюцией в присутствии свободного глутатиона. Конструируют векторы pGEX, включающие сайты протеазного расщепления тромбина или фактора Ха, так чтобы клонированный целевой генный продукт мог быть высвобожден из фрагмента GST.

В системе клеток насекомых в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов может применяться, например, вирус ядерного полиэдроза *Autographs californica* (AcNPV). Указанный вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующая последовательность антитела может быть клонирована индивидуально в несущественные области (например, ген полиэдрына) указанного вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрына).

В клетках-хозяевах млекопитающих может быть использован ряд экспрессионных систем на основе вирусов. В тех случаях, когда в качестве экспрессионного вектора используют аденовирус, представляющий интерес кодирующая последовательность антитела может быть лигирована в аденовирусный комплекс контроля транскрипции/трансляции, например поздний промотор и тройную лидерную последовательность. Указанный химерный ген может затем быть инсертирован в геном аденовируса путем рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Встраивание в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приводит к получению рекомбинантного вируса, жизнеспособного и способного к экспрессии молекулы антитела инфицированными хозяевами (например, см. источник: Logan J. & Shenk T. (1984) *PNAS* 81(12): 3655-9, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Для эффективной трансляции инсертированных кодирующих последовательностей антитела могут также быть необходимы специфические сигналы инициации. Указанные сигналы включают иницирующий кодон ATG и смежные последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен находиться в одной фазе с рамкой считывания требуемой кодирующей последовательности для обеспечения трансляции вставки целиком. Указанные экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть различного происхождения, как естественного, так и синтетического. Эффективность экспрессии может быть усилена включением подходящих транскрипционных энхансерных элементов, терминаторов транскрипции и т.п. (см., например, источник: Bitter G. et al., (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544, который включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Кроме того, может быть выбран штамм клеток-хозяев для модуляции экспрессии инсертированных последовательностей, или модификации и процессинга генного продукта специфическим требуемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функции белка. Разные клетки-хозяева обладают характерными специфическими механизмами посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Могут быть выбраны подходящие линии клеток или системы хозяев для обеспечения корректной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка. С этой целью могут применяться эукариотические клетки-хозяева, обладающие клеточными механизмами для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, не ограничиваясь перечисленными, клетки CHO, VERO, BHK, HeLa, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линия клеток миеломы мышей, не продуцирующая эндогенно какие-либо цепи иммуноглобулинов), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. Согласно некоторым вариантам реализации антитела против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанные в настоящем документе, продуцируют в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

Согласно конкретному варианту реализации антитела, описанные в настоящем документе, отличаются пониженным содержанием фукозы или отсутствием фукозы. Такие антитела могут быть получены с применением методик, известных специалисту в данной области техники. Например, указанные антитела могут быть экспрессированы в клетках с дефицитом фукозилирования или неспособных к фукозилированию. Согласно специфическому примеру для получения антител с пониженным содержанием фукозы могут применяться линии клеток с нокаутом обоих аллелей α 1,6-фукозилтрансферазы. Система Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, подходящей для применения при получении антител с пониженным содержанием фукозы.

Для долгосрочного высокопродуктивного продуцирования рекомбинантных белков могут быть получены клетки, отличающиеся стабильной экспрессией. Например, могут быть сконструированы линии клеток, стабильно экспрессирующие антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе. Согласно конкретным вариантам реализации клетка согласно настоящему изобре-

тению стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельную область легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи, которые связываются с образованием антитела, описанного в настоящем документе.

Согласно определенным аспектам вместо применения экспрессионных векторов, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК под контролем подходящих элементов контроля экспрессии (например, промоторных, энхансерных последовательностей, терминаторов транскрипции, сайтов полиаденилирования и т.п.), и селективируемым маркером. После введения чужеродных ДНК/полинуклеотида, сконструированные клетки могут расти 1-2 дня в обогащенной среде, после чего их перемещают в селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции, позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в хромосомы и расти с формированием очагов, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и размножены с получением линий клеток. Указанный способ может обеспечивать преимущество при применении для конструирования линий клеток, которые экспрессируют антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, или его фрагмент. Такие сконструированные линии клеток могут, в частности, подходить для применения при скрининге и оценке композиций, прямо или непрямо взаимодействующих с молекулой антитела.

Может применяться ряд систем селекции, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M. et al., (1977) Cell 11(1): 223-32), гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансферазы (Szybalska E.H. & Szybalski W. (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy I. et al., (1980) Cell 22(3): 817-23), в tk-, hgprrt- или aprt- клетках, соответственно; каждый из указанных источников полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Также в качестве основы для выбора может использоваться устойчивость к антиметаболитам за счет следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M. et al., (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K. et al., (1981) PNAS 78: 1527-31); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan R.C. & Berg P. (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu G.Y. & Wu C.H. (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P. (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan R.C. (1993) Science 260: 926-932; и Morgan R.A. & Anderson W.F. (1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; Nabel G.J. & Feigner P.L. (1993) Trends Biotechnol. 11(5): 211-5); и hyg, который придает устойчивость к гиромизину (Santerre R.F. et al., (1984) Gene 30(1-3): 147-56); каждый из указанных источников полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Для выбора требуемого рекомбинантного клона могут быть рутинным образом использованы способы, общеизвестные в области технологии рекомбинантной ДНК; такие способы описаны, например, в источниках: Ausubel F.M. et al., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieger M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); в главах 12 и 13 пособия: Dracopoli N.C. et al., (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); и в Colbere-Garapin F. et al., (1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14; каждый из указанных источников полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Уровни экспрессии молекулы антитела могут быть увеличены путем векторной амплификации (см. обзорную информацию в источнике: Bebbington C.R. & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987), включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки). При применении амплифицируемого маркера в векторной системе, экспрессирующей антитело, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, обеспечивает увеличение числа копий указанного маркерного гена. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, продуцирование указанного антитела также увеличивается (источник: Crouse G.F. et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3: 257-66, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Указанная клетка-хозяин может быть котрансфицирована двумя или более экспрессионными векторами, описанными в настоящем документе, при этом первый вектор кодирует происходящий из тяжелой цепи полипептид, а второй вектор кодирует происходящий из легкой цепи полипептид. Указанные два вектора могут содержать идентичные селективируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепи. Указанные клетки-хозяева могут быть котрансфицированы разными количествами двух или более экспрессионных векторов. Например, клетки-хозяева могут быть трансфицированы указанными экспрессионными векторами в любом из следующих отношений первого экспрессионного вектора и второго экспрессионного вектора: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

Как вариант, может применяться единственный вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи. В таких ситуациях легкая цепь должна быть размещена перед тяжелой цепью, чтобы избежать избытка токсической свободной тяжелой цепи (источники: Proudfoot N.J. (1986) Nature 322: 562-565; и Köhler G. (1980) PNAS 77: 2197-2199, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Кодированные последовательности тяжелых и легких цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК. Экспрессионный вектор может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может

кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более, или количество в диапазоне 2-5, 5-10 или 10-20 генов/последовательностей нуклеотидов. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать, в указанном порядке: промотор, первый ген (например, тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе) и второй ген (например, легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе). В таком экспрессионном векторе транскрипцией обоих генов может управлять промотор, тогда как трансляция мРНК с первого гена может осуществляться за счет кэп-зависимого сканирующего механизма, а трансляция трансляция мРНК со второго гена может осуществляться за счет кэп-независимого механизма, например, IRES.

После того как молекула антитела, описанного в настоящем документе, была продуцирована путем рекомбинантной экспрессии, она может быть очищена любым известным в данной области техники способом очищения молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, на основе аффинности в отношении специфического антигена после белка А, и эксклюзионной колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости, или с применением любой другой стандартной методики очищения белков. Кроме того, антитела, описанные в настоящем документе, могут быть слиты с гетерологичными последовательностями полипептидов, описанными в настоящем документе или другими известными в данной области техники, для облегчения очищения.

Согласно конкретным вариантам реализации антитела, описанное в настоящем документе, выделено или очищено. Как правило, выделенное антитело представляет собой антитело, по существу не содержащее других антител с отличающейся от указанного выделенного антитела антигенной специфичностью. Например, согласно конкретному варианту реализации, состав с антителом, описанным в настоящем документе, по существу не содержит клеточного материала и/или химических предшественников. Выражение "по существу не содержащий клеточного материала" включает составы с антителом, в которых указанное антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых оно выделено или в которых рекомбинантным способом продуцировано. Соответственно, антитело, по существу не содержащее клеточного материала, включает составы с антителом, содержащие менее чем приблизительно 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 или 0,1% (по сухой массе) гетерологичного белка (также называемого в настоящем документе "загрязняющим белком") и/или вариантов антитела, например, содержащих другие посттрансляционные модификации форм антитела или других отличающихся вариантов антитела (например, фрагментов антитела). При получении антитела рекомбинантным способом оно также в целом по существу не содержит культуральной среды, т.е. культуральная среда составляет менее чем приблизительно 20, 10, 2, 1, 0,5 или 0,1% от объема состава с белком. При получении антитела путем химического синтеза оно в целом по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, т.е. отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые вовлечены в синтез указанного белка. Соответственно, такие составы с антителом содержат менее чем приблизительно 30, 20, 10 или 5% (по сухой массе) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес антитела. Согласно конкретному варианту реализации антитела, описанные в настоящем документе, выделены или очищены.

Антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека), могут быть получены любым известным в данной области техники способом синтеза антител, например, химическим синтезом или с применением методик рекомбинантной экспрессии. В способах, описанных в настоящем документе, задействованы, если не указано иное, стандартные методики молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и связанных с ними областей в рамках данной области техники. Указанные методики описаны, например, в упоминаемых в настоящем документе источниках и подробно объясняются в литературе. См., например, источники: Maniatis T. et al., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (издание 1987 г. и ежегодные обновления); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (издание 1987 г. и ежегодные обновления) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B. et al., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно конкретному варианту реализации антитела, описанное в настоящем документе, представляет собой антитело (например, рекомбинантное антитело), полученное, экспрессированное, созданное или выделенное любым способом, включающим создание, например, посредством синтеза, генетического конструирования последовательностей ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации такое антитело содержит последовательности (например, последовательности ДНК или последовательности аминокислот), в природе отсутствующие в составе репертуара антител зародышевой линии животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации указанный способ реализуют *in vitro*. Согласно определенному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела, которое специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека), включающий экспрессию (например, экспрессию рекомбинантным способом) указанного антитела с применением клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящем документе (например, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в настоящем документе). Согласно конкретному варианту реализации указанная клетка представляет собой выделенную клетку. Согласно конкретному варианту реализации в указанную клетку были введены экзогенные полинуклеотиды. Согласно конкретному варианту реализации указанный способ дополнительно включает этап очищения антитела, полученного из указанной клетки или клетки-хозяина.

Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, главу 11 в руководстве: "Короткие протоколы молекулярной биологии" (Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel F.M. et al., eds., John Wiley and Sons, New York, включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Моноклональные антитела могут быть получены с применением широкого спектра методик, известных в данной области техники, в том числе с применением гибридомной и рекомбинантной технологий, в также технологии фагового дисплея, или их комбинации. Например, моноклональные антитела могут быть получены с применением гибридомных методик, в том числе известных в данной области техники и описанных, например, в источниках: Harlow E. & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling G.J. et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Термин "моноклональное антитело" в настоящем документе не ограничено антителами, продуцированными с применением гибридомной технологии. Например, моноклональные антитела могут быть получены рекомбинантным способом из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

Согласно конкретным вариантам реализации "моноклональное антитело" в настоящем документе представляет собой антитело, продуцированное единственной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), при этом указанное антитело специфически связывается с TIM-3 (например, TIM-3 человека) по оценке, например, результатов ELISA или другого анализа связывания антигена или конкурентного анализа связывания, известного в данной области техники, или описанного в разделе примеров в настоящем документе. Согласно конкретным вариантам реализации моноклональное антитело может представлять собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или мультивалентное (например, бивалентное) антитело. Согласно конкретным вариантам реализации моноклональное антитело представляет собой моноспецифическое или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело). Моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, могут, например, быть получены гибридомным способом согласно описанию в источнике: Kohler G. & Milstein C. (1975) *Nature* 256: 495, включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки, или могут, например, быть выделены из фаговых библиотек, например, с применением методик согласно описанию в настоящем документе. Другие способы получения клональных линий клеток и экспрессируемых таким образом моноклональных антител хорошо известны в данной области техники (см., например, главу 11 в руководстве: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel F.M. et al., выше).

Способы получения специфических антител и скрининга на специфические антитела с применением гибридомной технологии являются рутинными и хорошо известны в данной области техники. Например, согласно гибридомному способу, мышь или другое подходящее животное-хозяина, например, овцу, козу, кролика, крысу, хомяка или макака, иммунизируют для получения лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, специфически связывающиеся с белком (например, TIM-3 (например, TIM-3 человека)), использованным для иммунизации. Как вариант, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с применением подходящего агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридомной клетки (источник: Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки). Кроме того, для иммунизации животного может применяться техника RIMMS ("repetitive immunization, multiple sites" "повторная иммунизация в нескольких сайтах") (источник: Kilpatrick KE et al., (1997) *Hybridoma* 16:381-9, включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Согласно некоторым вариантам реализации мыши (или другие животные, такие как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяки или собаки) могут быть иммунизированы антигеном (например, TIM-3 (например, TIM-3 человека)), и после того как детектирован иммунный ответ, например детектированы

антитела, специфические в отношении указанного антигена, в сыворотке мыши, селезенки мышей собирают и выделяют спленоциты. Затем спленоциты сливают с применением хорошо известных методик с любыми подходящими клетками миеломы, например, клетками линии SP20, доступными в Американской коллекции типовых культур (ATCC®) (Манассас, Виргиния), с образованием гибридом. Гибридомы выбирают и клонируют путем ограниченных разведений. Согласно некоторым вариантам реализации собирают лимфатические узлы иммунизированных мышей и сливают с клетками миеломы NS0.

Полученные таким образом гибридомные клетки высевают и культивируют в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (ГГФТ или ГФТ), культуральная среда для гибридом, как правило, включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), вещества, предотвращающие рост дефицитных по ГГФТ клеток.

Согласно специфическим вариантам реализации задействованы клетки миеломы, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильное получение высоких уровней антитела выбранными антитело-продуцирующими клетками, и чувствительны к среде, такой как среда HAT. К таким линиям клеток миеломы относятся линии миеломы мыши, такие как линия клеток NS0, или клетки, происходящие из опухолей мышей MOPC-21 и MPC-11, доступные в Клеточном центре института Солка (Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Диего, Калифорния, USA), и клетки SP-2 или X63-Ag8.653, доступные в Американской коллекции типовых культур, Роквилл, Мэриленд, США. Также были описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для получения моноклональных антител человека (источники: Kozbor D. (1984) J. Immunol. 133: 3001-5; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки).

Анализируют продуцирование моноклональных антител, направленных против TIM-3 (например, TIM-3 человека), в культуральной среде, где растут гибридомные клетки. Связывающую специфичность моноклональных антител, продуцированных гибридомными клетками, определяют с применением способов, известных в данной области техники, например, иммунопреципитации, или в анализе связывания *in vitro*, таком как радиоиммунологический анализ (РИА) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA).

После идентификации гибридомных клеток, продуцирующих антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны могут быть субклонированы с помощью процедур ограниченного разведения и культивированы стандартными способами (Goding J.W. (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, выше). Подходящие культуральные среды для указанной цели включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, гибридомные клетки могут быть культивированы *in vivo* в виде асцитных опухолей в организме животного.

Моноклональные антитела, секретируемые указанными субклонами, подходящим способом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с применением стандартных процедур очищения иммуноглобулинов, таких как, например, очищение на сефарозе с белком А, хроматография с гидроксиапатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Антитела, описанные в настоящем документе, включают фрагменты антител, распознающие специфический TIM-3 (например, TIM-3 человека), и могут быть получены с применением любой методики, известной специалистам в данной области техники. Например, Fab- и F(ab')₂-фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина, с использованием таких ферментов, как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения F(ab')₂-фрагментов). Fab-фрагмент соответствует одному из двух идентичных "плечей" молекулы антитела, и содержит полную легкую цепь, спаренную с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент содержит два антигенсвязывающих "плеча" молекулы антитела, соединенные дисульфидными связями в шарнирной области.

Кроме того, антитела, описанные в настоящем документе, могут также быть получены с применением различных способов фагового дисплея, известных в данной области техники. В способах фагового дисплея функциональные домены антитела экспонируются на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их последовательности полинуклеотидов. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек кДНК пораженных тканей человека или мыши). ДНК, кодирующую домены VH и VL, рекомбинируют с scFv-линкером с помощью ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Указанный вектор вводят в *E. coli* с помощью электропорации и инфицируют *E. coli* хелперным фагом. Фаг для применения в указанных способах представляет собой, как правило, нитевидный фаг, в том числе - fd и M13, а домены VH и VL обычно рекомбинантным способом сливают с геном III или с геном VIII указанного фага. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с конкретным антигеном, может быть выбран или идентифицирован с применением антигена, например, меченого антигена или антигена, связанного или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры способов фагового дисплея, которые могут применяться для получения антител, описанных в настоящем документе, включают описан-

ные в источниках: Brinkman U. et al., (1995) *J. Immunol. Methods* 182: 41-50; Ames R.S. et al., (1995) *J. Immunol. Methods* 184: 177-186; Kettleborough C.A. et al., (1994) *Eur J. Immunol.* 24: 952-958; Persic L. et al., (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton D.R. & Barbas C.F. (1994) *Advan. Immunol.* 57: 191-280; PCT-заявка PCT/GB91/001134; международные публикации WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и патенты США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно описанию в перечисленных выше источниках после выбора фага кодирующие области антитела из указанного фага могут быть выделены и использованы для получения целых антител, в том числе антител человека, или любого другого требуемого антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессированы в любом требуемом хозяине, в том числе в клетках млекопитающих, клетках насекомых, клетках растений, дрожжей и бактерий, например, согласно приведенному ниже описанию. Могут также быть использованы методики рекомбинантного получения фрагментов антител, таких как Fab-, Fab'- и F(ab')₂-фрагменты, с применением способов, известных в данной области техники, таких как описанные в источниках: PCT-публикация WO 92/22324; Mullinax R.L. et al., (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H. et al., (1995) *Am. J. Reprod. Immunol.* 34: 26-34; и Better M. et al., (1988) *Science* 240: 1041-1043, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации для получения целых антител могут применяться ПЦР-праймеры, включающие последовательности нуклеотидов VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL с матрицы, например, клонов scFv. С использованием методик клонирования, известных специалистам в данной области техники, ПЦР-амплифицированные домены VH могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область VH, а ПЦР-амплифицированные домены VL могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константную область VL, например, константные области каппа или лямбда человека. Домены VH и VL могут также быть клонированы в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем векторами для конверсии тяжелой цепи и векторами для конверсии легкой цепи котрансфицируют линии клеток с получением стабильных или транзистентных линий клеток, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG, с применением методик, известных специалистам в данной области техники.

Химерное антитело представляет собой молекулу антитела, разные части которого происходят из разных молекул иммуноглобулинов. Например, химерное антитело может содержать вариабельную область моноклонального антитела мыши или крысы, слитую с константной областью антитела человека. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. См., например, источники: Morrison S.L. (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison S.L. (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies S.D. et al., (1989) *J. Immunol. Methods* 125: 191-202; и патенты США № 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Гуманизированное антитело способно к связыванию с заранее заданным антигеном и содержит каркасную область, по существу имеющую последовательность аминокислот иммуноглобулина человека, и области CDR, по существу имеющие последовательность аминокислот иммуноглобулина, не принадлежащего человеку (например, иммуноглобулина мыши). Согласно конкретным вариантам реализации гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулинов (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Указанное антитело также может включать область CH1, шарнир, области CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из иммуноглобулинов любого класса, в том числе IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, в том числе IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Гуманизированные антитела могут быть получены с применением различных методик, известных в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, прививки CDR (европейский патент EP 239400; международная публикация WO 91/09967; и патенты США 5225539, 5530101 и 5585089), "виниринга" или "модификации поверхности" (европейские патенты EP 592106 и EP 519596; Padlan E.A. (1991) *Mol. Immunol.* 28(4/5): 489-498; Studnicka G.M. et al., (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; и Roguska M.A. et al., (1994) *PNAS* 91: 969-973), перестановки цепей (патент США № 5565332), и методик, описанных, например, в патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации WO 93/17105; в источниках: Tan P. et al., (2002) *J. Immunol.* 169: 1119-25; Caldas C. et al., (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V. et al., (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M. et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272(16): 10678-84; Roguska M.A. et al., (1996) *Protein Eng.* 9(10): 895-904; Couto J.R. et al., (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto J.R. et al., (1995) *Cancer Res.* 55(8): 1717-22; Sandhu J.S. (1994) *Gene* 150(2): 409-10 и Pedersen J.T. et al., (1994) *J. Mol. Biol.* 235(3): 959-73, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. См. также опубликованную заявку на патент США US 2005/0042664 A1 (от 24 февраля 2005 г.), которая включена в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Были описаны способы получения мультиспецифических (например, биспецифических) антител, см., например, патенты США №7951917; 7183076; 8227577; 5837242; 5989830; 5869620; 6132992 и 8586713, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Однодоменные антитела, например, антитела, в которых отсутствуют легкие цепи, могут быть получены с применением способов, хорошо известных в данной области техники. См. источники: Riechmann L. & Muyldermans S. (1999) *J. Immunol.* 231: 25-38; Nuttall S.D. et al., (2000) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1(3): 253-263; Muyldermans S., (2001) *J. Biotechnol.* 74(4): 277-302; патент США № 6005079; и международные публикации WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Кроме того, антитела, которые специфически связываются с антигеном TIM-3 (например, TIM-3 человека), могут, в свою очередь, быть использованы для получения антиидиотипических антител, которые "имитируют" антиген с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. См., например, источники: Greenspan N.S. & Bona C.A. (1989) *FASEB J.* 7(5): 437-444; и Nissinoff A. (1991) *J. Immunol.* 147(8): 2429-2438, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно конкретным вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело, которое связывается с тем же эпитопом TIM-3 (например, TIM-3 человека), что и антитело против TIM-3 (например, TIM-3 человека), описанное в настоящем документе, представляет собой антитело человека. Согласно конкретным вариантам реализации описанное в настоящем документе антитело, которое конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) связывание любого из антител, описанных в настоящем документе, с TIM-3 (например, TIM-3 человека), представляет собой антитело человека. Антитела человека могут быть получены с применением любого способа, известного в данной области техники. Например, могут быть использованы трансгенные мыши, неспособные экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, однако способные экспрессировать гены иммуноглобулинов человека. В частности, комплексы генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов человека могут быть введены случайным образом или посредством гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши. Как вариант, варибельная область, константная область и D-область человека могут быть введены в эмбриональные стволовые клетки мыши помимо генов тяжелых и легких цепей человека. Функциональность генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов мыши может быть устранена отдельно или одновременно с введением иммуноглобулиновых локусов человека посредством гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготное удаление области J_H предотвращает продуцирование эндогенных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и микроинъектируют в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем химерных мышей скрещивают для получения гомозиготного потомства, экспрессирующего антитела человека. Трансгенных мышей обычным образом иммунизируют выбранным антигеном, например, полным антигеном или частью антигена (например, TIM-3 (например, TIM-3 человека)). Моноклональные антитела, направленные против указанного антигена, могут быть получены от иммунизированных трансгенных мышей с применением стандартной гибридомной технологии. Трансгены иммуноглобулинов человека, которые несут трансгенные мыши, проходят реаранжировку при дифференцировке В-клеток, а затем подвергаются переключению класса и соматическим мутациям. Соответственно, применение такой техники позволяет получать терапевтически полезные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор указанной технологии получения антител человека приведен в источнике: Lonberg N. & Huszar D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки. Подробное описание указанной технологии получения антител человека и моноклональных антител человека, а также протоколы для получения таких антител приведены, например, в международных публикациях WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735; и патентах США № 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598, каждый(ая) из которых включен(а) в настоящий документ полностью посредством ссылки. Примеры мышей, способных продуцировать антитела человека, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки, включают Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; патенты США № 6075181 и 6150184), HuAb-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; патенты США № 5545806 и 5569825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) и KM Mouse™ (Medarex/Kirin).

Антитела человека, которые специфически связываются с TIM-3 (например, TIM-3 человека), могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, в том числе способами фагового дисплея, описанными выше, с применением библиотек антител, происходящих из последовательностей иммуноглобулинов человека. См. также патенты США №4444887, 4716111 и 5885793; и международные публикации WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741, каждый(ая) из которых включен (а) в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела человека могут быть получены с применением гибридом мыши-человека. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр (EBV), могут быть слиты с клетками миеломы мыши с получением гибридом мыши-человека, секретирующих моноклональные антитела человека, и может быть проведен скрининг указанных гибридом мыши-человека для определения гибридом, секретирующих моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с целевым антигеном (например, TIM-3 (например,

ТИМ-3 человека)). Такие способы известны и описаны в данной области техники, см., например, источники: Shinmoto H et al., (2004) Cytotechnology 46: 19-23; Naganawa Y et al., (2005) Human Antibodies 14: 27-31, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

6.6. Наборы.

Также предложены наборы, содержащие одно или более антител, описанных в настоящем документе, или содержащую их фармацевтическую композицию, или их конъюгаты. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложен фармацевтический комплект или набор, содержащий один или более контейнеров, наполненных одним или более из ингредиентов фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, например, одним или более антителами, предложенными в настоящем изобретении. Согласно некоторым вариантам реализации указанные наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и любой профилактический или терапевтический агент, такой как описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанные наборы могут содержать Т-клеточный митоген, такой как, например, фитогемагглютинин (ФГА) и/или форбол-миристан-ацетат (ФМА); или стимулирующее TCR-комплекс антитело, такое как антитело против CD3 и антитело против CD28. С таким контейнером или контейнерами может быть необязательно ассоциировано уведомление в форме, установленной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, отражающее одобрение указанным органом производства, применения или продажи для введения человеку.

Также предложены наборы, которые могут применяться согласно вышеописанным способам. Согласно одному варианту реализации набор содержит антитело, описанное в настоящем документе, предпочтительно, очищенное антитело, в одном или более контейнерах. Согласно конкретному варианту реализации наборы, описанные в настоящем документе, содержат по существу выделенный антиген ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) в качестве контроля. Согласно другому конкретному варианту реализации наборы, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат контрольное антитело, которое не вступает в реакцию с антигеном ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека). Согласно другому конкретному варианту реализации наборы, описанные в настоящем документе, содержат один или более элементов для детекции связывания антитела с антигеном ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) (например, антитело может быть конъюгировано с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое распознает первое антитело, может быть конъюгировано с детектируемым субстратом). Согласно конкретным вариантам реализации набор, предложенный согласно настоящему изобретению, может включать полученный рекомбинантным способом или химически синтезированный антиген ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека). Включенный в указанный набор антиген ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) может также быть присоединен к твердой подложке. Согласно более конкретному варианту реализации способ детекции в вышеописанном наборе включает твердую подложку, к которой присоединен антиген ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека). Такой набор может также включать неприсоединенное меченое репортером антитело против человека или мыши/крысы. Согласно указанному варианту реализации связывание антитела с антигеном ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) может быть детектировано по связыванию указанного меченого репортером антитела. Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к применению набора согласно настоящему изобретению для *in vitro* анализа и/или детекции антигена ТИМ-3 (например, ТИМ-3 человека) в биологическом образце.

7. Примеры

Приведенные в указанном разделе (т.е. разделе 7) примеры служат для иллюстрации, а не для ограничения.

7.1. Пример 1. Получение и определение характеристик новых антител против ТИМ-3 человека.

В указанном примере описано получение и определение характеристик антител, которые связываются с Т-клеточным иммуноглобулином и доменом 3 муцина (ТИМ-3) человека. В частности, в указанном примере описано получение антител человека, которые специфически связываются с ТИМ-3 человека и ингибируют функцию ТИМ-3 человека.

В некоторых из описанных ниже исследований активность антител против ТИМ-3 согласно настоящему изобретению сравнивали с активностью референсного антитела против ТИМ-3 rab1944w или Hum11. Получали антитело rab1944w на основе переменных областей антитела 8213 HV0LV0, описанных в патенте США № 8552156 (включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки). Последовательности rab1944w приведены в табл. 7. Антитело rab1944w экспрессировали в виде антитела IgG₁, содержащего мутацию N297A в Fc-области в соответствии с системой нумерации EU. Антитело Hum11 получали на основе переменных областей антитела ABTIM3-hum11, описанного в патентной публикации США US 2015/0218274 (включенной в настоящий документ полностью посредством ссылки). Последовательности Hum11 приведены в табл. 7. Антитело Hum11 экспрессировали в виде антитела IgG₄, содержащего мутацию S228P в Fc-области в соответствии с системой нумерации EU.

Таблица 7. Последовательности референсных антител против TIM-3

SEQ ID	Описание	Последовательность аминокислот
NO:		
80	VH pab1944w	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPSNGRTNYNEKFKTRVTITADTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGYYLYFDYWGQGLTVTVSS
81	VL pab1944w	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGIRINIGWYQQKP GKAPKLLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCVQYGQFPWTFGQGTKLEIK
89	Полноразмерная тяжелая цепь pab1944w (IgG ₁ N297A)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPSNGRTNYNEKFKTRVTITADTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGYYLYFDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHENHHTQKS LSLSPG
90	Полноразмерная легкая цепь pab1944w (IgG ₁ N297A)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGIRINIGWYQQKP GKAPKLLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCVQYGQFPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
82	VH Hum11	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGDIYPNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARVGGAFPMQDYWGQGTITVTVSS
83	VL Hum11	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVEYYGTSIMQWY QQKPGKAPKLLIYAASNVESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCQQSRKDPSTFGGGTKVEIK
91	Полноразмерная тяжелая цепь Hum11 (IgG ₄ S228P)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGDIYPNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARVGGAFPMQDYWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

		SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSLG
92	Полноразмерная легкая цепь Hum11 (IgG ₄ S228P)	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVEYYGTSIMQWY QQKPGKAPKLLIYAASNVESGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYFCQQSRKDPSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

7.1.1. Получение антител против TIM-3 с применением технологии Retrocyte Display™.

Получение библиотеки Retrocyte Display™ описано в настоящем документе. Для получения вставок для библиотеки экстрагировали тотальную РНК фенол-хлороформом из сортированных методом FACS положительных по CD19 В-лимфоцитов человека. Указанную тотальную РНК использовали для синтеза первой цепи кДНК с применением набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit от Fermentas (номер по каталогу (Кат.№) K1621 и K1622). Вариабельные области антител амплифицировали с кДНК с применением ПЦР и клонировали в ретровирусные экспрессионные векторы (pCMA). Указанные конструкции затем использовали для трансдукции клеток-предшественников В-клеток мыши для экспрессии антител на поверхности с применением технологии Retrocyte Display™.

Проводили скрининг полученной согласно описанию выше библиотеки Retrocyte Display™ с рекомбинантным TIM-3 человека и рекомбинантным TIM-3 яванского макака, что позволило идентифицировать два антитела, названные rab2085 и rab2088. Информация о последовательностях вариабельных областей rab2085 и rab2088 обобщена в табл. 4. Антитела rab2085 и rab2088 экспрессировали в виде антител IgG₁ и проводили их анализ согласно описанию ниже.

7.1.2. Связывание антител против TIM-3 с экспрессирующими TIM-3 клетками.

Антитела rab2085 и rab2088 тестировали на связывание с экспрессирующими TIM-3 клетками с применением проточной цитометрии. Вкратце, клетки мыши 1624-5 дикого типа или клетки 1624-5, сконструированные для экспрессии TIM-3 человека, инкубировали с блокатором Fc-рецептора мыши (BD Pharmingen, кат. №553142) для снижения неспецифического связывания. После промывывания клетки окрашивали антителом против TIM-3 или изотипическим контрольным антителом и анализировали на FACSCalibur (BD Biosciences). Как rab2085, так и rab2088 демонстрировали связывание с клетками 1624-5, экспрессирующими TIM-3 человека, но не с клетками 1624-5 дикого типа (фиг. 1).

7.1.3. Анализ селективности антител против TIM-3.

Оценивали селективность rab2085 и rab2088 в отношении TIM-3 на представителях семейства TIM-1 и TIM-4 с применением технологии суспензионных микрочипов. Микросферы Luminex® соединяли с рекомбинантным TIM-3 Fc человека (R&D Systems, кат. №2365-TM), рекомбинантным TIM-3 His человека (Sino Biological, кат. №10390-H08H), рекомбинантным TIM-3 Fc яванского макака (R&D Systems, кат. №7914-TM), рекомбинантным TIM-1 His человека (R&D Systems, кат. №1750-TM) или рекомбинантным TIM-4 His человека (R&D, кат. №2929-TM) посредством аминного сочетания с COOH на поверхности гранул. Очищенные rab2085, rab2088 и изотипическое контрольное антитело IgG₁ разводили в аналитическом буфере (Roche, кат. №11112589001) до концентраций 10 нг/мл, 100 нг/мл и 1000 нг/мл. Каждое разведение (25 мкл) инкубировали в темноте (20°C, 650 об/мин) с микросферами 1500 Luminex® в 5 мкл аналитического буфера в течение 1 ч в 96-луночных фильтровальных планшетах с половинным объемом лунок (Millipore, кат. №MABVN1250). Строили стандартные кривые с использованием 25 мкл стандарта IgG₁-каппа человека (Sigma, кат. №15154) в двух повторностях в серии разведений 1:3 (0,08-540 нг/мл). Детекцию проводили с применением 60 мкл антитела козы против человека IgG F(ab)₂ меченого R-фикоэритрином (2,5 мкг/мл; Jackson ImmunoResearch, кат. №109-116-097), и инкубировали в течение еще одного часа (20°C, 650 об/мин). Планшеты анализировали с применением системы Luminex® 200 (Millipore). В общей сложности учитывали по 100 гранул на лунку в объеме образца 48 мкл. Значения MFI ФЭ использовали для определения специфического или неспецифического связывания с рекомбинантными белками, указанными выше.

И rab2085 (фиг. 2А), и rab2088 (фиг. 2В) демонстрировали специфическое связывание с TIM-3 че-

ловека и яванского макака; при протестированных концентрациях наблюдалось отсутствие значимого связывания TIM-1 или TIM-4.

7.1.4. Оптимизация антител против TIM-3 с применением технологии Retrocyte Display™.

Антитела pab2085 и pab2088 содержат одинаковую тяжелую цепь. Для получения дополнительных антител против TIM-3 получали подбиблиотеку тяжелых цепей Retrocyte Display™ на основе тяжелых цепей pab2085 и pab2088 и комбинировали с более разнообразной библиотекой легких цепей. Проводили дополнительный скрининг указанной новой библиотеки Retrocyte Display™ на рекомбинантном TIM-3 человека и рекомбинантном TIM-3 яванского макака, что позволяло идентифицировать варианты с оптимизированной легкой цепью: pab2173, pab2174, pab2175, pab2176, pab2177, pab2178, pab2179, pab2180, pab2181, pab2182, pab2183, pab2184, pab2185, pab2186, pab2187, pab2188, pab2189, pab2190, pab2191 и pab2192. Информация о последовательностях переменных областей указанных вариантов с оптимизированной легкой цепью приведена в табл. 4. Указанные варианты с оптимизированной легкой цепью экспрессировали в виде антител, содержащих Fc-область IgG₁ дикого типа или вариант Fc-области IgG₁. В указанном варианте Fc-области IgG₁ не затронуты эффекторные функции Fc-области.

Антитело pab2188 с оптимизированной легкой цепью представляет собой антитело, содержащее замену T109S (т.е. замену треонина на серин в положении 109 относительно последовательности дикого типа) в соответствии с нумерацией по Kabat, в константном домене легкой цепи, что облегчает клонирование варибельной области внутрь рамки считывания в константной области. Указанная мутация представляет собой консервативную модификацию, не влияющую на связывание или функцию антитела. Также получали эквивалент дикого типа, названный pab2188w, который содержит треонин в положении 109 легкой цепи в соответствии с нумерацией по Kabat. Антитело pab2188w экспрессировали в виде антитела, содержащего Fc-область IgG₁ N297A.

7.1.5. Связывание антител против TIM-3 с экспрессирующими TIM-3 клетками.

Оценивали связывание указанных вариантов с оптимизированной легкой цепью с клетками, экспрессирующими TIM-3 человека или яванского макака, в проточно-цитометрическом анализе, аналогичном описанному выше. Все варианты демонстрировали связывание с клетками 1624-5 мыши, сконструированными для экспрессии TIM-3 человека (фиг. 3А и 3В) или TIM-3 яванского макака (фиг. 3С и 3D), однако не с клетками мыши 162 4-5 дикого типа (данные не показаны).

Связывание вариантов с оптимизированной легкой цепью с первичными Т-клетками человека сравнивали со связыванием исходного антитела pab2085. Вкратце, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), выделенные в градиенте фиколла из лейкоцитомоноцитарного слоя от здоровых доноров (Research Blood Components, LLC), обогащали по необработанным пан-Т-клеткам с применением разделения на основе магнитного поля (Miltenyi Biotec). Затем обогащенные популяции Т-лимфоцитов активировали связанным на планшете антителом против CD3 (SP34, 3 мкг/мл) и растворимым антителом против CD28 (CD28.1, 2 мкг/мл) в течение 3 дней в среде RPMI, с добавлением 10% инактивированной сыворотки ФБС, при 37°C и 5% CO₂. После активации клетки инкубировали с блокаторм Fc-рецептора человека в течение 15 мин при комнатной температуре для снижения неспецифического связывания (блокатор FcR, Biolegend). Антитела против TIM-3 или изотипические контрольные антитела IgG (12-точечная титрация дозы, от 10000 нг/мл до 0,06 нг/мл) добавляли в индивидуальные образцы и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Образцы двукратно промывали и коктейль антител, содержащий ФИТЦ-конъюгированное антитело против цепи каппа, а антитела также против CD3 (BV711, OKT3), против CD4 (BV605, OKT4) и против CD8a (PE, RPA-T8), все в концентрации 2,5 мкг/мл, разводили в буфере (ФСБ, 2 mM ЭДТК, 0,5% БСА, pH 7,2), добавляли в каждый образец и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Образцы двукратно промывали и анализировали на проточном цитометре LSRFortessa (BD Biosciences). Графики проточной цитометрии анализировали с применением комбинации программного обеспечения FACSDIVA и WENI Weasel.

Как показано на фиг. 4, все варианты с оптимизированной легкой цепью, протестированные в указанном исследовании, демонстрировали более сильное связывание с активированными CD8+ Т-клетками человека по сравнению с исходным антителом pab2085.

Далее, исследовали связывание антитела против TIM-3 pab2188 с первичными клетками яванского макака.

Криоконсервированные МКПК, выделенные из организма обезьян яванских макаков (Worldwide Primates, Inc.), размораживали, промывали и затем подвергали проточно-цитометрическому анализу. Перед инкубацией с антителом указанные клетки обрабатывали 10% сывороткой яванского макака (Abcam) в течение 15 минут при комнатной температуре для снижения неспецифического связывания. Антитела против TIM-3 или изотипические контрольные антитела IgG (10-точечная титрация дозы, от 20000 нг/мл до 0,6 нг/мл) добавляли в индивидуальные образцы и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Образцы двукратно промывали и коктейль антител, содержащий ФИТЦ-конъюгированное антитело против цепи каппа, а также антитело против CD11b (BV785, M1/70) в концентрации 2,5 мкг/мл, разведенные в буфере (ФСБ, 2 mM ЭДТК, 0,5% БСА, pH 7,2), добавляли в каждый образец и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Образцы двукратно промывали и анализировали на проточном цитометре LSRFortessa (BD Bio-

sciences). Графики проточной цитометрии анализировали с применением комбинации программного обеспечения FACS DIVA и WENI Weasel.

Как показано на фиг. 5, антитело против TIM-3 rab2188 связывало первичные миелоидные клетки яванского макака дозозависимым образом.

7.1.6. Лиганд-блокирующая активность антител против TIM-3.

Антитела против TIM-3 тестировали на способность блокировать связывание рекомбинантного TIM-3 человека или яванского макака с экспрессирующими фосфатидилсерин облученными клетками лимфомы мыши WR19L. Антитела против TIM-3 или изотипические контрольные антитела IgG (9-точечная титрация дозы, от 20000 до 70 нг/мл для человека; или 6-точечная титрация дозы, от 20000 до 625 нг/мл для яванского макака) инкубировали с рекомбинантным TIM-3 Fc человека (R&D Systems, №2365-TM) или рекомбинантным TIM-3 Fc яванского макака (R&D Systems, №7914-TM) (10 000 нг/мл) в 1× буфере для связывания аннексина-V (10 mM HEPES, коррекция pH до 7,4, 140 mM NaCl и 2,5 mM CaCl₂) в течение 30 мин при комнатной температуре. Клетки WR19L, облученные дозой 20 Гр и ресуспендированные в 1× буфере для связывания аннексина-V, добавляли в коктейль антител против TIM-3: TIM-3-Fc до итоговой плотности 1×10⁶ клеток/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 мин. Образцы однократно промывали и коктейль антител, содержащий ФЭ-конъюгированное антитело против Fc (разведение 1:100), а также краситель для определения жизнеспособности (Biolegend, канал для ближней инфракрасной области спектра; разведение 1:1000), разведенный в 1× буфере для связывания аннексина-V, добавляли в каждый образец и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем образцы однократно промывали в 1× буфере для связывания Аннексина-V, ресуспендировали в 150 мкл буфера (ФСБ, 2 mM ЭДТК, 0,5% БСА, pH 7,2) и анализировали на проточном цитометре LSRFortessa (BD Biosciences). Графики проточной цитометрии анализировали с применением FACS DIVA.

Антитела против TIM-3 rab2085 и rab2188 блокировали связывание рекомбинантного TIM-3 человека (фиг. 6A) и рекомбинантного TIM-3 яванского макака (фиг. 6B) с фосфатидилсеринем.

7.1.7. Эффект антител против TIM-3 на МКПК человека при стимуляции энтеротоксином стафилококка A (SEA).

Функциональную активность вариантов с оптимизированной легкой цепью в отношении первичных МКПК человека оценивали после стимуляции энтеротоксином стафилококка A (SEA). Вкратце, криоконсервированные МКПК человека (Research Blood Components) высевали с плотностью 1×10⁵ клеток/лунку в RPMI1640 с добавлением нормоцина (Normocin™, Invivogen, кат.№ant-nr) и 10% инактивированной нагреванием ФБС (Gibco, Invitrogen Corporation) в 96-луночный планшет с покрытой NUNC-DELTA поверхностью (NUNC™). Клетки культивировали в присутствии 5 мкг/мл антитела против PD-1 пембролизумаба (лот 7002688300, Myoderm), антитела против TIM-3 (10 мкг/мл) и суперантигена SEA (100 нг/мл, Toxin Technologies) в течение 6 дней при 37°C и 5% CO₂. Бесклеточный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Уровни ИФНγ определяли с применением AlphaLISA (Perkin Elmer).

В комбинации с антителом против PD-1 пембролизумабом варианты с оптимизированной легкой цепью усиливали продуцирование ИФНγ в указанном анализе с первичными МКПК человека (фиг. 7).

Функциональную активность rab2188w анализировали в анализе со стимуляцией SEA с применением модифицированного протокола. Криоконсервированные МКПК человека (Research Blood Components) высевали с плотностью 1×10⁵ клеток/лунку в RPMI1640 с добавлением нормоцина (Normocin™, Invivogen KaT.№ ant-nr) и 10% инактивированной нагреванием ФБС (Gibco, Invitrogen Corporation) в 96-луночный планшет с покрытой NUNC-DELTA поверхностью (NUNC™). Клетки культивировали в присутствии 5 мкг/мл антитела против PD-1 пембролизумаба (лот 7002688300, Myoderm), антитела против TIM-3 (10 мкг/мл) и суперантигена SEA (100 нг/мл, Toxin Technologies) в течение 9 дней при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки однократно промывали и повторно стимулировали свежими SEA и антителом на протяжении двух дней. Бесклеточный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Уровни ИФНγ определяли с применением AlphaLISA (Perkin Elmer).

Как показано на фиг. 8A-8F, антитело против TIM-3 rab2188w (IgG₁ N297A), по отдельности или в комбинации с антителом против PD-1 пембролизумабом, усиливало продуцирование ИФНγ в МКПК человека от нескольких доноров в указанном анализе со стимуляцией SEA.

7.2. Пример 2. Оптимизация антител против TIM-3 с применением мутагенеза в CDR.

Для повышения аффинности связывания антитело против TIM-3 rab2188w модифицировали с применением направленного мутагенеза остатков CDR переменных областей тяжелых и легких цепей. Вкратце, на основе исходного антитела rab2188w получали шесть библиотек фагового дисплея Fab, каждая из которых содержала область CDRH или CDRL, модифицированную с применением рандомизации вырожденных кодонов NNK. Фаговые библиотеки Fab подвергали отбору на основе аффинности в отношении рекомбинантных антигенов TIM-3 человека и яванского макака. Девять клонов, обозначенных как AM-1, AM-2, AM-3, AM-4, AM-5, AM-6, AM-7, AM-8 и AM-9, были выбраны на основании связывания и измерения скорости диссоциации. Информация о последовательностях переменных областей указан-

ных девяти клонов обобщена в табл. 4. Все указанные варианты включают легкую цепь rab2188w, но содержат мутации в CDR1 тяжелой цепи. AM-1 - AM-9 экспрессировали в виде полноразмерных антител, содержащих Fc-область IgG₁ N297A, и анализировали в экспериментах, описанных ниже.

7.2.1. Связывание антител против TIM-3 с экспрессирующими TIM-3 клетками.

Связывание антител AM-1 - AM-9 с клетками Jurkat, эктопически экспрессирующими TIM-3 человека, сравнивали со связыванием исходного антитела rab2188w в проточно-цитометрическом анализе. Как показано на фиг. 9A, все варианты связывались с экспрессирующими TIM-3 клетками Jurkat, а AM-2 и AM-6 демонстрировали более сильное связывание, чем исходное антитело rab2188w. Связывание AM-2 и AM-6 дополнительно анализировали с применением проточной цитометрии в линии клеток острого миелоидного лейкоза человека Kasumi-3 (ATCC® CRL-2725™), эндогенно экспрессирующих TIM-3 (фиг. 9B), а также CD8+ Т-клетках человека, стимулированных стафилококковым энтеротоксином А (SEA) (фиг. 9C), и CD8+ Т-клетках яванского макака, стимулированных SEA (фиг. 9D). В случае связывания с CD8+ Т-клетками человека, клетки МКПК человека, выделенные в градиенте фиколла из лейкоцитомоноцитарного слоя от здоровых доноров (Research Blood Components, LLC), активировали SEA (100 нг/мл) в течение 8 дней в среде RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФБС при 37°C и 5% CO₂. После активации клетки инкубировали с блокатром Fc-рецептора человека в течение 15 мин при комнатной температуре для снижения неспецифического связывания (блокатор FcR, Biolegend). Изотипические контрольные антитела против TIM-3 или IgG (12-точечная титрация дозы, от 10000 нг/мл до 0,06 нг/мл) добавляли в индивидуальные образцы и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Аналогичным образом, в случае связывания с CD8+ Т-клетками яванского макака, размораживали выделенные МКПК яванского макака из замороженных основных культур (Worldwide Primates Inc.) и активировали SEA (100 нг/мл) в течение пяти дней в среде RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием ФБС при 37°C и 5% CO₂. Активированные МКПК яванского макака инкубировали с комбинацией блока-тора Fc-рецептора человека (блокатор FcR, Biolegend) и сыворотки яванского макака (Abcam) в течение 15 минут при комнатной температуре для снижения неспецифического связывания. Конъюгированное с фикоэритрином антитело AM-2 или изотипическое контрольное антитело (Biolegend, ФЭ-конъюгация, б-точечная титрация дозы, от 10000 до 41 нг/мл) и коктейль антитела против CD4 (BV605, OKT4) и антитела против CD8a (ФЭ, SK1), каждое в концентрации 2,5 мкг/мл, разводили в буфере (ФСБ, 2 мМ ЭДТК, 0,5% БСА, pH 7,2), добавляли в каждый образец и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Образцы двукратно промывали и коктейль антител, содержащий ФИТЦ-конъюгированное антитело против каппа, а также антитела против CD3 (BV711, OKT3), против CD4 (BV605, OKT4) и против CD8a (ФЭ, RPA-T8), все в концентрации 2,5 мкг/мл, разводили в буфере (ФСБ, 2 мМ ЭДТК, 0,5% БСА, pH 7,2), добавляли в каждый образец и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Образцы двукратно промывали и анализировали на проточном цитометре LSRFortessa (BD Biosciences). Графики проточной цитометрии анализировали с применением комбинации программного обеспечения FACS DIVA и WENI Weasel. И AM-2, и AM-6 демонстрировали связывание с клетками Kasumi-3 (фиг. 9B) и активированными CD8+ Т-клетками человека (фиг. 9C). AM-2 также демонстрировало связывание с активированными CD8+ Т-клетками яванского макака (фиг. 9D).

Далее, в аналогичном анализе с помощью проточной цитометрии анализировали связывание с первичными миелоидными CD14+ клетками человека и яванского макака с применением конъюгированных с фикоэритрином (ФЭ) rab2188w, AM-2 или изотипического контрольного антитела. Вкратце, криоконсервированные МКПК, выделенные из организма человека или яванского макака (Worldwide Primates, Inc.), размораживали, промывали, а затем подвергали проточно-цитометрическому анализу. Перед инкубацией с антителами клетки обрабатывали 10% сывороткой яванского макака (Abcam, кат. № ab155109) в течение 15 минут при комнатной температуре для снижения неспецифического связывания. ФЭ-конъюгированные антитела против TIM-3 или изотипические контрольные антитела IgG (12-точечная титрация дозы, от 10000 нг/мл до 0,05 нг/мл для МКПК человека и от 100000 нг/мл до 0,5 нг/мл для МКПК яванского макака) добавляли в индивидуальные образцы в коктейле антител, содержащем антитело против CD14 (APC, M5E2) и обратимый маркер жизнеспособности Zombie Green™, а затем инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Дополнительные образцы оставляли для поправочного контроля для отдельных красителей (CD45-ФИТЦ, CD45-PE и CD45-APC; клон MB4-6D6, Miltenyi). Образцы двукратно промывали в буфере и анализировали на проточном цитометре LSRFortessa (BD Biosciences). Графики проточной цитометрии анализировали с применением комбинации программного обеспечения FACS DIVA и WENI Weasel. AM-2 демонстрировало более сильное связывание с CD14+ миелоидными клетками человека (фиг. 9E) и яванского макака (фиг. 9F), чем исходное антитело rab2188w.

7.2.2. Анализ селективности антител против TIM-3.

Селективность AM-2 и AM-6 в отношении TIM-3 оценивали с применением технологии суспензионных микрочипов. Микросферы Luminex® соединяли с рекомбинантным TIM-3 His человека (Sino Biological, № 10390-H08H), рекомбинантным TIM-3 Fc яванского макака (Sino Biological, № 90312-C02H), рекомбинантным TIM-3 Fc мыши (R&D Systems, № 1529-TM), рекомбинантным TIM-1 His человека (R&D Systems, № 1750-TM), рекомбинантным TIM-4 His человека (R&D, № 2929-TM), рекомбинантным

OX40 His человека (Sino Biological, №10481-H08H), рекомбинантным GITR Fc человека (R&D Systems, № 689-GR), рекомбинантным DR3 Fc человека (R&D Systems, № 943-D3) и рекомбинантным CD137 Fc человека (полученный собственными силами материал) посредством аминного сочетания с COOH на поверхности гранул. Очищенные rab2188w (IgG₁ N297A), AM-2 (IgG₁ N297A), AM-6(IgG₁ N297A) и изотипическое контрольное антитело IgG₁ N297A разводили в аналитическом буфере (Roche 11112589001) с титрованием дозы от 10000 до 0,1 нг/мл. Каждое разведение (25 мкл) инкубировали в темноте (20°C, 650 об/мин) с микросферами 1500 Luminex® в 5 мкл аналитического буфера в течение 1 ч в 96-луночных фильтровальных планшетах с половинным объемом лунок (Millipore, MABVN1250). Детекцию проводили с применением 60 мкл антитела козы против F(ab)₂ IgG человека, меченого R-фикоэритрином (2,5 мкг/мл; JIR 109-116-097), и инкубировали в течение еще одного часа (20°C, 650 об/мин). Планшеты анализировали с применением системы Luminex® 200 (Millipore). В общей сложности учитывали по 100 гранул на лунку в объеме образца 4–8 мкл. Значения MFI ФЭ использовали для определения специфического или неспецифического связывания с рекомбинантными белками.

Антитела против TIM-3 rab2188w (фиг. 10B), AM-2 (фиг. 10C) и AM-6(фиг. 10D) демонстрировали специфическое связывание с TIM-3 человека и яванского макака; при протестированных концентрациях не было детектировано значимого связывания с TIM-3 мыши, TIM-1 человека, TIM-4 человека, OX40 человека, GITR человека, DR3 человека или CD137 человека.

7.2.3. Лиганд-блокирующая активность антител против TIM-3.

Дополнительно анализировали способность антител против TIM-3 AM-2 и AM-6 блокировать связывание фосфатидилсерина с TIM-3 человека или яванского макака. Вкратце, антитела против TIM-3 или изотипические контрольные антитела IgG (10-точечная титрация дозы, 40000 нг/мл - 1000 нг/мл) инкубировали с рекомбинантным TIM-3-Fc человека (R&D Systems, #2365-TM) или рекомбинантным TIM-3-Fc яванского макака (R&D Systems, #7914-TM) (10000 нг/мл) в 1× буфере для связывания Аннексина-V (10 mM HEPES с коррекцией pH до 7,4, 140 mM NaCl и 2,5 mM CaCl₂) в течение 30 мин при комнатной температуре. Клетки WR19L, облученные дозой 20 Гр и ресуспендированные в 1× буфере для связывания Аннексина-V, добавляли в коктейль антител против TIM-3:TIM-3-Fc до итоговой плотности 1×10⁶ клеток/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 мин. Образцы однократно промывали; в каждый образец добавляли коктейль антител, содержащих ФЭ-конъюгированное антитело против Fc (разведение 1:100), а также краситель для определения жизнеспособности (Biolegend, канал для ближней инфракрасной области спектра; разведение 1:1000), разведенный в 1× буфере для связывания Аннексина-V, и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем образцы однократно промывали в 1× буфере для связывания Аннексина-V и анализировали на проточном цитометре LSRFortessa (BD Biosciences). Графики проточной цитометрии анализировали с применением FACS DIVA.

Как показано на фиг. 11A и 11B, антитела против TIM-3 rab2188w, AM-2 и AM-6 эффективно блокировали связывание TIM-3 человека или яванского макака с фосфатидилсерин-экспрессирующими клетками.

7.2.4. Эффект антител против TIM-3 на МКПК человека при стимуляции энтеротоксином стафилококка A (SEA).

Функциональную активность вариантов rab2188w анализировали с применением первичных МКПК человека, стимулированных энтеротоксином стафилококка A (SEA). Вкратце, криоконсервированные МКПК человека (Research Blood Components) высевали с плотностью 1×10⁵ клеток/лунку в RPMI1640 с добавлением нормоцина (Normocin™, Invivogen кат.№ant-nr) и 10% инактивированной нагреванием ФБС (Gibco, Invitrogen Corporation) в 96-луночные планшеты с покрытой NUNC-дельта поверхностью (NUNC™). Клетки культивировали в присутствии 5 мкг/мл антитела против PD-1 пембролизумаба (лот 7002688300, MyoDerm), антитела против TIM-3 (10 мкг/мл) и суперантигена SEA (100 нг/мл, Toxin Technologies) в течение 9 дней при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки однократно промывали и повторно стимулировали свежими SEA и антителом на протяжении двух дней. Бесклеточный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Уровни ИФНγ определяли с применением AlphaLISA (Perkin Elmer).

Как показано на фиг. 12A и 12B, многие варианты rab2188w, по отдельности или в комбинации с антителом против PD-1 пембролизумабом, усиливали продуцирование ИФНγ в МКПК человека от двух разных доноров.

7.2.5. Эффект антител против TIM-3 на продуцирование цитокинов инфильтрирующими опухоль лимфоцитами.

Дополнительно оценивали способность антител против TIM-3 стимулировать продуцирование цитокинов активированными первичными инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (ИОЛ), по отдельности или в комбинации с антителом против PD-1. Суспензии отдельных клеток из свежих опухолей мелкоклеточного рака легкого (HMPЛ) (стадия II), аденокарциномы желчного пузыря (стадия IV) или рака молочной железы (стадия II) (UMass Medical School, Вустер, Массачусетс) выделяли посредством механической микродиссекции. В некоторых случаях, в зависимости от уровня фиброза, было необходимо ферментативное расщепление (либеразы и ДНКазы-I, Roche). Клетки оставляли на 1 сутки в 96-луночных планшетах с покрытой NUNC-дельта поверхностью (NUNC™) в RPMI1640 с добавлением

нормоцина (Normocin™, Invivogen Кат. №ant-nr), рекомбинантного ИЛ-2 человека (20 Ед/мл, R&D Systems) и 10% инактивированной нагреванием ФБС (Gibco, Invitrogen Corporation) при плотности 5×10^4 клеток/лунку. На следующий день образцы центрифугировали и добавляли свежую культуральную среду, содержащую представляющие интерес антитела (антитела против TIM-3 в концентрации 20 мкг/мл и антитело против PD-1 пембролизумаб в концентрации 5 мкг/мл) и микрогранулы против CD3/CD28 (при отношении гранул к клеткам 1:1), до конечного объема 100 мкл и оставляли для инкубации в течение 3 дней при 37°C и 5% CO₂. Бесклеточный супернатант собирали и хранили при -80°C до анализа. Уровни ИФН γ и ФНО α определяли с применением AlphaLISA (Perkin Elmer).

Как показано на фиг. 13A-13F, антитела против TIM-3 усиливали продуцирование ИФН γ и ФНО α активированными первичными ИОЛ из опухолей НМРЛ, аденокарциномы желчного пузыря или рака молочной железы.

7.2.6. Интернализация антител против TIM-3 после связывания.

В указанном примере анализировали интернализацию антител против TIM-3 в клетках. В первой группе экспериментов интернализацию антитела против TIM-3 оценивали с применением α HFc-NC-DM1 (антитело против IgG Fc человека, конъюгированное с мейтансиноидом DM1 нерасщепляемым линкером, Moradec LLC). Указанный конъюгат вторичного антитела с лекарственным средством α HFc-NC-DM1 связывается с тестируемым антителом (например, антителом против TIM-3), что приводит к высвобождению нагрузки цитотоксического DM1 в цитоплазму клетки после интернализации. Во второй группе экспериментов интернализацию оценивали с применением антител против TIM-3 rab218 8w (IgG₁ N2 97A) и Hum11 (IgG₄ S228P), прямо конъюгированных с монометилауристатином E (MMAE). Для всех антител наблюдалось аналогичное отношение лекарственное средство:антитело ("drug-antibody ratio", DAR; изотипический контроль=3,5, rab2188w=4,0, Hum11=3,0), поддерживающие эквивалентный уровень доставки конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC) после интернализации. В третьей группе экспериментов интернализацию оценивали по субклеточной локализации белка TIM-3, меченого не проникающим в клетки флуоресцентным красителем.

Вкратце, Kasumi-3 (ATCC® CRL-2725™), клетки линии острого миелоидного лейкоза, эндогенно экспрессирующие TIM-3, и клетки линии Jurkat, сконструированные для сверхэкспрессии TIM-3, высевали в планшеты для культур тканей с белым дном с плотностью 2×10^4 на лунку. В первой группе экспериментов с применением конъюгата вторичного антитела и лекарственного средства α HFc-NC-DM1 к клеткам добавляли полученные 8-точечной титрацией дозы (от 3,333 до 1 нг/мл) либо антитела против TIM-3, либо изотипического контрольного антитела IgG совместно с α HFc-NC-DM1 (отношение к первичному антителу 1:1) до конечного объема 100 мкл/лунку. Клетки инкубировали с первичными антителами и конъюгатом вторичного антитела и лекарственного средства при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч.

Антитела против TIM-3 rab2188w (IgG₁ N297A), AM-2 (IgG₁ N297A), и AM-6(IgG₁ N297A) интернализировали TIM-3, экспрессируемые на клетках Jurkat (фиг. 14A) и клетках Kasumi-3 (фиг. 14B), в экспериментах с α HFc-NC-DM1 более эффективно, чем референсные антитела против TIM-3 Hum11 (IgG₄ S228P) и rab1944w (IgG₁ N297A), судя по большему снижению выживания клеток при широком диапазоне концентраций антител.

Во второй группе экспериментов антитела rab2188w (IgG₁ N297A) и Hum11 (референсное антитело, IgG₄ S228P) прямо конъюгировали с MMAE в аналогичных концентрациях, чтобы учесть потенциальные различия в предрасположенности конъюгата вторичного антитела и лекарственного средства (α HFc-NC-DM1) к связыванию разных Fc-областей антител. Полученные 9-точечной титрацией дозы (от 6,666 до 1 нг/мл) либо конъюгированного с MMAE антитела против TIM-3, либо конъюгированного с MMAE изотипического контрольного антитела IgG добавляли в клетки до конечного объема 100 мкл/лунку. Клетки инкубировали с конъюгированными антителами при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли по 90 мкл восстановленного Cell Titer Glo (Promega), и клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Итоговую люминесценцию регистрировали с применением инструмента Envision (Perkin Elmer).

Как показано на фиг. 14C, антитело rab2188w (IgG₁ N297A) индуцировало большее снижение выживания клеток, чем антитело Hum11 (референсное антитело, IgG₄ S228P), указывая на то, что наблюдаемый для конъюгата вторичного антитела и лекарственного средства эффект (например, показанный на фиг. 14A) был обусловлен потенциалом интернализации каждого из антител к TIM-3.

В третьей группе экспериментов интернализацию антител против TIM-3 анализировали с применением конфокальной флуоресцентной микроскопии на живых клетках. Клетки Jurkat, экспрессирующие слитый белок HaloTag-TIM-3, сначала инкубировали с 1 мкМ красителем для определения пролиферации Violet Proliferation Dye 450 (BD) в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂. После инкубации клетки промывали в ФБС и ресуспендировали в клеточной культуральной среде. Для детекции внеклеточного домена TIM-3 клетки Jurkat HaloTag-TIM-3 окрашивали не проникающим через мембраны лигандом HaloTag Alexa Fluor 488 (Promega, 1 мкМ) в течение 15 мин при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки ресуспендировали в свежей культуральной среде и высевали в 384-луночный микропланшет (15000 клеток/лунку) либо с антителом против TIM-3 AM-2 (IgG₁ N297A), либо с изотипическим контролем (каждое антитело в концен-

трации 10 мкг/мл). Изображения в реальном времени получали на микроскопе системы ImageXpress Micro Confocal High-Content (Molecular Devices) в контролируемых условиях среды (37°C и 5% CO₂); захват изображений производили каждые 30 мин на протяжении 3,5 часов. Анализ изображений проводили с применением программного обеспечения для анализа MetaXpress (Molecular Devices). Клетки Jurkat идентифицировали по каналу DAPI (Violet Proliferation Dye 450), а величину сигнала интернализированного TIM-3 на клетку количественно определяли по каналу ФИТЦ (HaloTag Alexa Fluor 488).

Как показано на фиг. 15, для клеток, инкубированных с антителом против TIM-3 AM-2, наблюдалось увеличение интернализации TIM-3 со временем по сравнению с клетками, инкубированными с изотипическим контрольным антителом. В частности, через 3,5 ч обработка антителом AM-2 приводила к удвоению процента положительных по TIM-3 клеток, демонстрируя бо'льшую интернализацию TIM-3 по сравнению с положительными по TIM-3 клетками, обработанными изотипическим контрольным антителом (а именно, 15,1% интернализацию относительно 7,2% интернализации, соответственно). Кроме того, сигнал интернализации, наблюдаемый в обработанных антителом AM-2 клетках, через 3,5 часа был значительно выше по сравнению с сигналом в клетках, обработанных изотипическим контрольным антителом ($p=0,00027$, односторонний Т-тест). Статистически значимое различие в нулевой точке времени отсутствовало ($p=0,91$, односторонний Т-тест).

7.3. Пример 3. Картирование эпитопов антител против TIM-3.

В указанном примере был охарактеризован эпитоп антител против TIM-3 pab2188 (вариант IgG₁), pab2187 (вариант IgG₁), и AM-2 (IgG₁ N297A).

7.3.1. Картирование эпитопов антител против TIM-3 с применением аланинового сканирования.

Связывающие характеристики антител против TIM-3 pab2188 (вариант IgG₁) и pab2187 (вариант IgG₁) оценивали с применением аланинового сканирования. Вкратце, систему QuikChange HT Protein Engineering System от Agilent Technologies (Кат. №G5901A) использовали для получения мутантов TIM-3 человека с заменами на аланин во внеклеточном домене. Указанные мутанты TIM-3 человека экспрессировали на поверхности предшественников В-клеток мыши 1624-5 с помощью ретровирусной трансдукции. Эффективность трансдукции или процент клеток, экспрессирующих TIM-3 человека, поддерживали на уровне ниже 5% для того, чтобы большинство клеток не экспрессировало два или более разных мутантов TIM-3.

После этого клетки, экспрессирующие мутанты TIM-3 человека с корректной укладкой, по оценке результатов связывания с поликлональным антителом против TIM-3 (R&D Systems, кат. №AF2365) при проточной цитометрии, выбирали для получения субпопуляции, экспрессировавшей мутанты TIM-3 человека, не связывающие моноклональное антитело против TIM-3 pab2188 (вариант IgG₁) или pab2187 (вариант IgG₁). Клетки, которые демонстрировали специфическое связывание с антителом, отделяли от популяции несвязывающихся клеток с помощью препаративной скоростной FACS-сортировки (FACSARIAII, BD Biosciences). Объединенные пулы клеток, способных или неспособных к реакции с антителом, повторно размножали в тканевой культуре; циклы направляемой антителом сортировки клеток и размножения в тканевой культуре повторяли до получения популяции клеток, явно детектируемо не способных к реакции с антителом против TIM-3 (pab2188 (вариант IgG₁) или pab2187 (вариант IgG₁)). Указанную популяцию клеток, неспособных к реакции с антителом против TIM-3 (pab2188 (IgG₁ вариант) или pab2187 (IgG₁ вариант)) подвергали последнему этапу сортировки по отдельным клеткам или общей сортировки. После нескольких дней размножения клетки, прошедшие сортировку по отдельным клеткам или общую сортировку, снова тестировали на связывание с поликлональным антителом против TIM-3 и отсутствие связывания с моноклональным антителом pab2188 (вариант IgG₁) или pab2187 (вариант IgG₁) с применением проточной цитометрии.

Для сопоставления фенотипа с генотипом проводили секвенирование нового поколения (NGS) прошедших общую сортировку клеток, экспрессирующих мутанты TIM-3 человека. Анализ последовательностей продемонстрировал, что клетки, способные к реакции с поликлональным антителом против TIM-3, но не с моноклональным антителом против TIM-3 pab2188 (вариант IgG₁) или pab2187 (вариант IgG₁), экспрессировали мутант TIM-3 человека, в котором произошла мутация в положении 40 с заменой Phe на Ala, в соответствии с нумерацией последовательности SEQ ID NO: 79.

7.3.2. Картирование эпитопов антител против TIM-3 с применением водородно-дейтериевого обмена (HDX) с масс-спектроскопией.

В первом исследовании взаимодействие pab2188 (вариант IgG₁) с TIM-3 человека исследовали с применением водородно-дейтериевого обмена (HDX) с масс-спектроскопией.

Для дегликозилирующей обработки 250 мкг химеры рекомбинантного TIM-3 /Fc человека (R&D Systems, кат. №2365-ТМ) инкубировали с 4 мкл ПНГазы F при 37°C в течение 3 часов. Химера TIM-3 /Fc человека содержит последовательность аминокислот, последовательности SEQ ID NO: 102, слитую с IgG₁ человека.

Для расщепления пепсином 6,9 мкг нативного или дегликозилированного химерного TIM-3 /Fc человека в 115 мкл контрольного буфера (50 mM фосфат, 100 mM хлорид натрия, pH 7,4) денатурировали путем добавления 115 мкл 4 M гуанидина гидрохлорида, 0,85 M буфера TCEP (итоговое значение pH 2,5)

и инкубации указанной смеси в течение 3 мин при 10°C. Затем указанную смесь подвергали расщеплению пепсином на колонке, используя заполняемую самостоятельно колонку с пепсином; полученные пептиды анализировали с применением системы СВЭЖХ-МС, состоящей из СВЭЖХ-системы Waters Acquity UPLC, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo). Пептиды разделяли на C8-колонке 50 мм×1 мм в 20,5-минутном градиенте 2-32% растворителя В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Идентификацию пептидов осуществляли посредством поиска по данным МС/МС с сопоставлением последовательности TIM-3 человека, используя программного обеспечения Mascot. Допуск по массе для ионов-предшественников и ионов продукта составлял 20 м.д. и 0,05 Да, соответственно.

10 мкл нативного или дегликозилированного химерного TIM-3 /Fc человека (6,9 мкг), 10 мкл нативного химерного TIM-3 /Fc человека и смесь антител (6,9 мкг: 12,9 мкг), или 10 мкл дегликозилированного химерного TIM-3 /Fc человека и смесь антител (6,9 мкг: 12,9 мкг) инкубировали с 105 мкл буфера для мечения с оксидом дейтерия (50 mM фосфат, 100 mM хлорид натрия, рD 7,4) в течение 0, 60, 300, 1800, 7200, 14400 и 28800 с. Дейтериевый обмен проводили либо при 10°C для нативного химерного TIM-3 /Fc человека и его комплекса с антителом, либо при 4°C для дегликозилированного химерного TIM-3 /Fc человека и его комплекса с антителом. Дейтериевый обмен останавливали путем добавления 115 мкл 4 М гуанидина гидрохлорида, 0,85 М буфера TCEP (итоговое значение pH 2,5). После остановки обмена образец подвергали расщеплению пепсином на колонке и проводили ЖХ-МС-анализ согласно описанию выше. Масс-спектры регистрировали в режиме "только МС". Для расчета включения дейтерия масс-спектры определенного пептида совмещали с пиками на экстракционных ионных хроматограммах и рассчитывали взвешенное среднее значение м/з. Увеличение массы относительно массы нативного пептида (0 минут) до средневзвешенной массы соответствует уровню включения дейтерия.

Покрытие последовательностей для нативного и дегликозилированного TIM-3 человека составляло 71,6 и 98,4%, соответственно. Для большинства пептидов TIM-3 человека наблюдались идентичные или аналогичные уровни дейтерия в присутствии или в отсутствие антитела против TIM-3 человека, однако для ряда пептидных сегментов было обнаружено значимо более низкое включение дейтерия при связывании антитела. И нативный, и дегликозилированный TIM-3 человека демонстрировали значимое снижение включения дейтерия при связывании с антителом против TIM-3 человека rab2188 (вариант IgG₁) в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в последовательности SEQ ID NO: 94 (VCWGKGACPVFECGNWL), а также в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в последовательности SEQ ID NO: 95 (RIQIPGIMND). Наиболее выраженное снижение включения дейтерия наблюдалось в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в последовательности SEQ ID NO: 93 (PVFECGN).

Далее, проводили исследование взаимодействия AM-2 (IgG₁ N297A) с TIM-3 человека с применением масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена, аналогично описанному выше исследованию. Вкратце, дегликозилированный химерный TIM-3/Fc человека инкубировали с оксидом дейтерия либо по отдельности, либо в комплексе с антителом против TIM-3 человека AM-2 (IgG₁ N297A). Дейтериевый обмен проводили при 10°C в течение 0, 60, 300, 1800, 7200 и 14400 с. Реакцию обмена останавливали низким pH; после остановки образцы подвергали расщеплению пепсином/протеазой XIII или протеазой XVIII на колонке, и проводили ЖХ-МС-анализ согласно описанию выше. Необработанные данные МС обрабатывали с применением HDX WorkBench, программного обеспечения для анализа МС-данных обмена Н/Д (источник: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012, 23 (9), 1512-1521, включен в настоящий документ полностью посредством ссылки). Уровни дейтерия вычисляли на основании средней разности масс дейтерированного пептида и его нативной формы (t₀).

Для дегликозилированного TIM-3 человека было достигнуто 100% покрытие последовательности. Антитело против TIM-3 AM-2 (IgG₁ N297A) демонстрировало паттерн связывания, аналогичный наблюдаемому для rab2188 (вариант IgG₁). В двух областях: первой, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в последовательности SEQ ID NO: 94 (VCWGKGACPVFECGNWL), и второй, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в последовательности SEQ ID NO: 96 (RIQIPGIMNDEKFNKL), наблюдалась выраженная защита от включения дейтерия при связывании дегликозилированного TIM-3 человека с антителом против TIM-3 AM-2 (IgG₁ N2 97A). Наиболее выраженное снижение наблюдалось в области, состоящей из последовательности аминокислот, представленной в последовательности SEQ ID NO: 93 (PVFECGN).

7.3.3. Картирование эпитопов антитела против TIM-3 с применением анализа Pepscan.

Измеряли связывание антитела против TIM-3 rab2188 (вариант IgG₁) с синтетическими родственными TIM-3 пептидными фрагментами, представленными в виде массива связанных на чипах пептидов. Анализ проводили в Pepscan Presto BV, Лелистад, Нидерланды. Вкратце, для реконструирования эпитопов TIM-3 человека синтезировали библиотеку пептидов. Аmino-функционализированную полипропиленовую подложку получали путем прививки фирменного гидрофильного полимерного состава и последующего проведения реакции с трет-бутилоксикарбонил-гексаметилендиамином (BocHMDA) с применением дициклогексилкарбодимида (DCC) с N-гидроксibenзотриазолом (HOBt) и последующим рас-

щеплением Вос-групп трифторуксусной кислотой (ТФК). Для синтеза пептидов на аминокислотной функционализированной твердой подложке использовали стандартный Fmoc-пептидный синтез со специальным образом модифицированными станциями дозирования жидкостей JANUS (Perkin Elmer). Синтез структурных миметиков проводили с применением принадлежащей Pepscan технологии CLIPS ("Chemically Linked Peptides on Scaffolds"). Технология CLIPS позволяет структурировать пептиды с получением одиночных петель, двойных петель, тройных петель, складчато-подобной укладки, спиралевидной укладки и комбинаций перечисленного. Связывание антитела с каждым из синтезированных пептидов тестировали в анализе ИФА ELISA на основе PEPSCAN. Пептидные чипы инкубировали с раствором первичного антитела в течение ночи при 4°C. После промывания пептидные чипы инкубировали с HRP-конъюгатом антитела козы против Ig человека (Southern Biotech, кат. №2010-05) в течение одного часа при 25°C. После промывания добавляли субстрат пероксидазы 2, 2'-азино-ди-3-этилбензтиазолин-сульфонат (ABTS) и 2 мкл/мл 3% H₂O₂. Через 1 ч развитие цвета измеряли и количественно определяли с помощью прибора с зарядовой связью (ПЗС) -камеры и системы обработки изображений.

Исследование Pepscan показало, что антитело против TIM-3 pab2188 (вариант IgG₁) распознавало отрезки TIM-3 человека, в том числе область, состоящую из последовательности аминокислот, представленной в последовательности SEQ ID NO: 99 (GKGACPVFE), и область, состоящую из последовательности аминокислот, представленной в последовательности SEQ ID NO: 100 (DFTAAFPFR).

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами реализации, описанными в документе. Так, различные модификации настоящего изобретения помимо описанных будут очевидны для специалистов в данной области техники после ознакомления с приведенным выше описанием и прилагаемыми чертежами. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все источники (например, публикации, или патенты, или патентные заявки), упоминаемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылок полностью и для любых целей в той же степени, как если бы было указано, что каждый индивидуальный источник (например, публикация, или патент, или патентная заявка) конкретно индивидуальным образом включен посредством ссылки полностью и для любых целей.

Другие варианты реализации входят в приведенную ниже формулу изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 человека, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂X₃X₄X₅S (SEQ ID NO: 48), где X₁ представляет собой R, S, A, G, K, M или T, X₂ представляет собой Q, S, A, G, R или T, X₃ представляет собой N, Y, G или Q, X₄ представляет собой A или Q, и X₅ представляет собой W, M, A, S или T;
- (b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;
- (c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
- (d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность X₁ASQSVX₂SSYLA (SEQ ID NO: 52),

где

- X₁ представляет собой R или G, и
- X₂ отсутствует или представляет собой S;
- (e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность X₁ASX₂RAT (SEQ ID NO: 53), где X₁ представляет собой D или G, и X₂ представляет собой N, S или T; и
- (f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQYGSSPX₁T (SEQ ID NO: 54), где X₁ представляет собой L или I.

2. Выделенное антитело по п.1, где

- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂NAWS (SEQ ID NO: 49), где X₁ представляет собой R или A; и X₂ представляет собой Q или R;
- (b) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂GQX₃S (SEQ ID NO: 50), где X₁ представляет собой K, M или G; X₂ представляет собой A или S; и X₃ представляет собой S или T;
- (c) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂QQAS (SEQ ID NO: 51), где X₁ представляет собой S, R, T или G; и X₂ представляет собой A, S, T или G;
- (d) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1 и 4-12;
- (e) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 13-16;

(f) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 17-21;

(g) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 22 и 23;

(h) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат последовательности аминокислот CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 4, 2 и 3; 5, 2 и 3; 6, 2 и 3; 7, 2 и 3; 8, 2 и 3; 9, 2 и 3; 10, 2 и 3; 11, 2 и 3; или 12, 2 и 3, соответственно;

(i) CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательности аминокислот CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно, последовательности SEQ ID NO: 13, 17 и 22; 14, 17 и 22; 15, 18 и 22; 14, 19 и 22; 14, 20 и 22; 14, 21 и 22; 16, 20 и 22; или 14, 17 и 23; и/или

(j) CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат последовательности 1, 2, 3, 14, 21 и 22; 4, 2, 3, 14, 21 и 22; 5, 2, 3, 14, 21 и 22; 6, 2, 3, 14, 21 и 22; 7, 2, 3, 14, 21 и 22; 8, 2, 3, 14, 21 и 22; 9, 2, 3, 14, 21 и 22; 10, 2, 3, 14, 21 и 22; 11, 2, 3, 14, 21 и 22; или 12, 2, 3, 14, 21 и 22, соответственно.

3. Выделенное антитело по п.1 или 2, где антитело содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, последовательности SEQ ID NO: 55; или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентична последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 24-35; и/или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, последовательности SEQ ID NO: 56; или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентичную последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 36-47.

4. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TIM-3 человека, где антитело содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 24-35; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 36-47;

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, 61 или 65, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69;

(c) вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 36; 24 и 38; 26 и 42; 24 и 42; 24 и 46; 24 и 43; 26 и 43; 26 и 46; 26 и 41; 24 и 41; 25 и 39; 24 и 47; 25 и 40; 26 и 47; 25 и 37; 25 и 45; 25 и 44; 25 и 46; 25 и 42; 25 и 41; 25 и 43; 25 и 47; 27 и 46; 28 и 46; 29 и 46; 30 и 46; 31 и 46; 32 и 46; 33 и 46; 34 и 46; или 35 и 46; или

(d) тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь и легкая цепь, соответственно, содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58 и 69, 61 и 69, 65 и 69.

5. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит:

(a) константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека, необязательно, где константная область тяжелой цепи представляет собой:

(i) вариант константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа, где указанный вариант константной области тяжелой цепи IgG человека связывается с Fc-γ-рецептором человека с аффинностью, более низкой по сравнению с аффинностью связывания константной области тяжелой цепи IgG человека дикого типа с рецептором Fcγ человека, необязательно, указанный Fc-γ-рецептор человека выбран из группы, состоящей из FcγRI, FcγRII и FcγRIII;

(ii) IgG₁, содержащий мутацию N297A в соответствии с системой нумерации EU, необязательно, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;

(iii) IgG₁, содержащий мутацию N297Q в соответствии с системой нумерации EU;

(iv) нефукозилированный IgG₁; и/или

(v) IgG₄, содержащий мутацию S228P в соответствии с системой нумерации EU, необязательно, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и/или

(b) константную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из легкой цепи к человека и легкой цепи λ человека, необязательно, где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

6. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело:

(a) (i) специфически связывается с вариантом белка TIM-3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 101 с более низкой аффинностью по сравнению со связыванием с белком дикого типа TIM-3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 79 или (ii) специфически не связывается с вариантом белка TIM-3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 101;

(b) связывается с остатком 40 из SEQ ID NO: 79;

(c) связывается с эпитопом, расположенным в пределах области TIM-3 человека, состоящим из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93;

(d) связывается с эпитопом, расположенным в пределах области TIM-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94;

(e) связывается с эпитопом, расположенным в пределах области TIM-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95;

(f) связывается с эпитопом, расположенным в пределах области TIM-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96;

(g) связывается с эпитопом, расположенным в пределах области TIM-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 97;

(h) связывается с эпитопом, расположенным в пределах области TIM-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 98;

(i) связывается с эпитопом, расположенным в пределах области TIM-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99; и/или

(j) связывается с эпитопом, расположенным в пределах области TIM-3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100.

7. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело:

(a) представляет собой антитело человека;

(b) является антагонистическим по отношению к TIM-3 человека;

(c) деактивирует, уменьшает или ингибирует активность TIM-3 человека;

(d) ингибирует связывание TIM-3 человека с фосфатидилсерином;

(e) индуцирует продукцию $IFN\gamma$ мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA); и/или

(f) индуцирует продукцию $IFN\gamma$ или $TNF\alpha$ инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), стимулированными анти-CD3 и анти-CD28 антителами.

8. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело конъюгировано с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином или радионуклидом.

9. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело конъюгировано с детектируемой меткой.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

11. Выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп. 1-9.

12. Выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела по любому из пп. 1-9.

13. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 11 или 12.

14. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая:

(a) полинуклеотид по п. 11 или 12;

(b) вектор по п. 13;

(c) полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи или тяжелую цепь или легкую цепь антитела по любому из пп. 1-9;

(d) первый полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп. 1-9 и второй полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела по любому из пп. 1-9;

(e) вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи или тяжелую цепь или легкую цепь антитела по любому из пп. 1-9; или

(f) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп. 1-9 и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи и легкую цепь антитела по любому из пп. 1-9.

15. Способ получения антитела, которое связывается с TIM-3 человека, где способ включает культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей:

(a) полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи или тяжелую цепь или легкую цепь антитела по любому из пп. 1-9;

(b) первый полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп. 1-9 и второй полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи или легкую цепь антитела по любому из пп. 1-9;

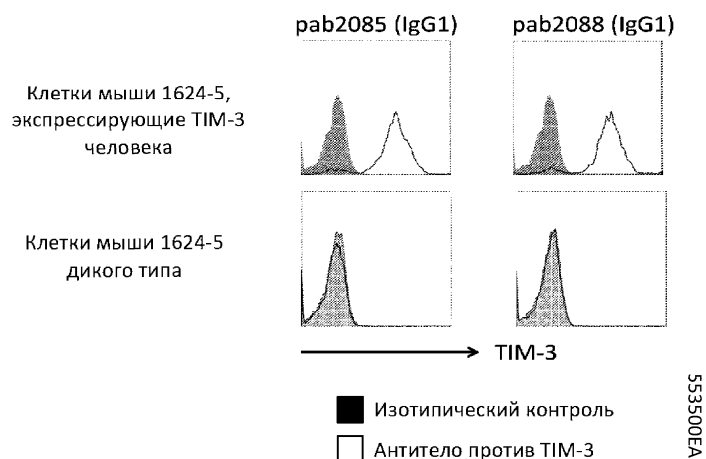
(c) вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи или тяжелую цепь или легкую цепь антитела по любому из пп. 1-9; или

(d) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь антитела по любому из пп. 1-9 и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи и легкую цепь антитела по любому из пп. 1-9, так, что экспрессируется полинуклеотид и продуцируется антитело.

16. Способ увеличения активации Т-клеток в ответ на антиген у индивида, где способ включает введение указанному индивиду эффективного количества выделенного антитела по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.10.

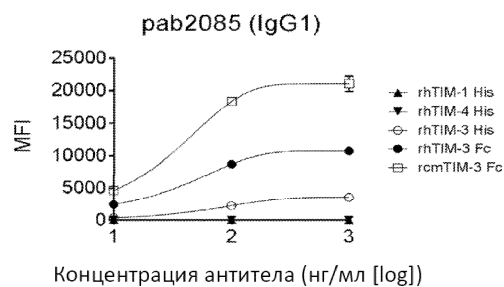
17. Способ лечения рака у индивида, где способ включает введение указанному индивиду эффективного количества выделенного антитела по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.10.

18. Способ лечения инфекционного заболевания у индивида, где способ включает введение указанному индивиду эффективного количества выделенного антитела по любому из пп.1-9 или фармацевтической композиции по п.10.

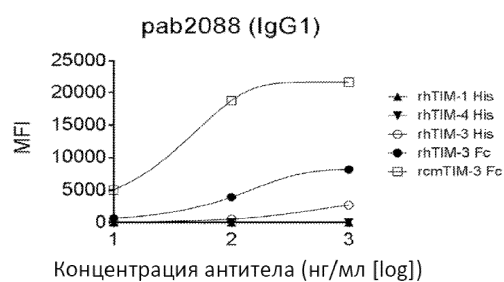


Фиг. 1

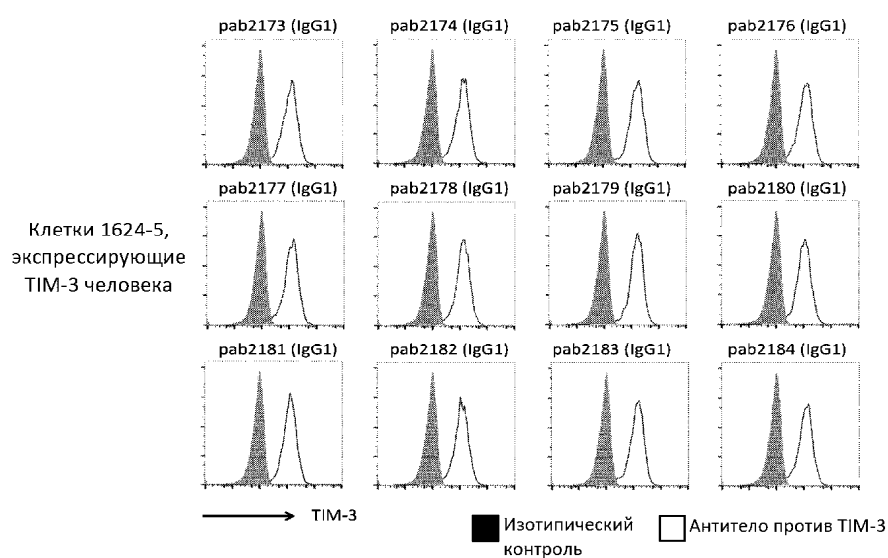
A



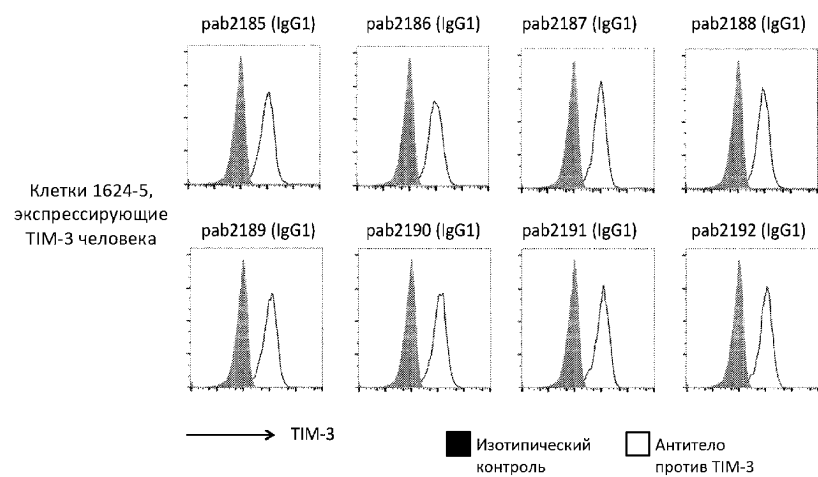
B



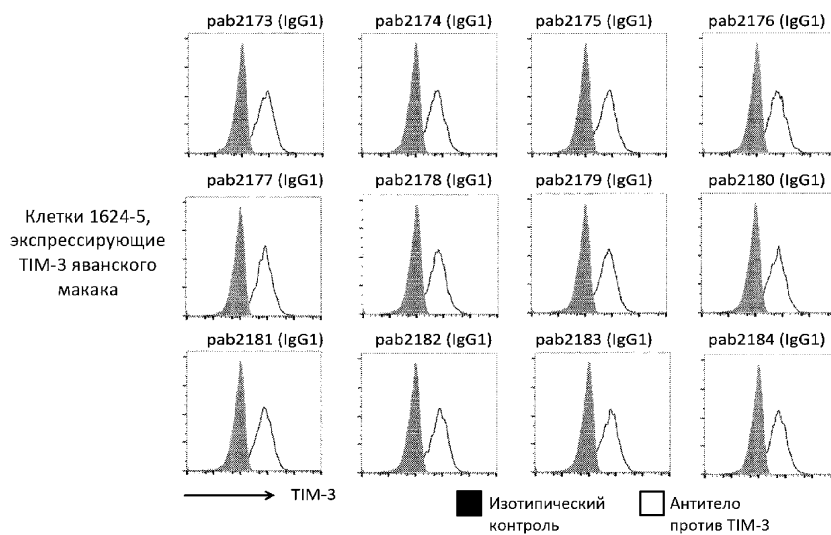
Фиг. 2А, В



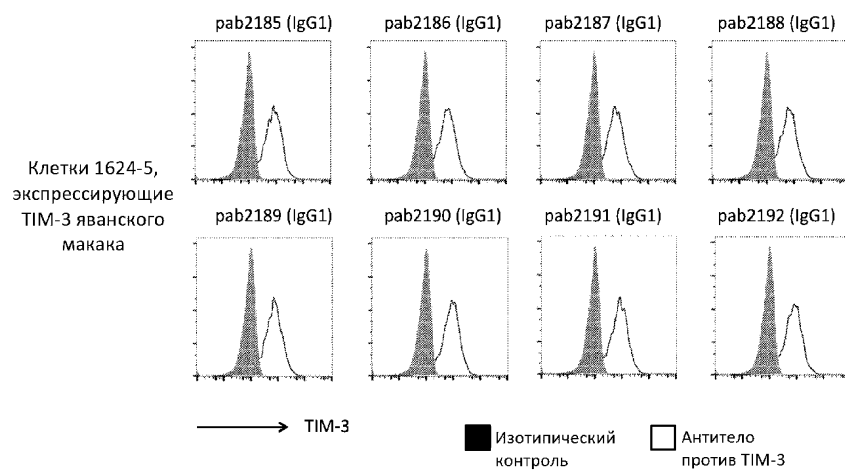
Фиг. 3А



Фиг. 3В

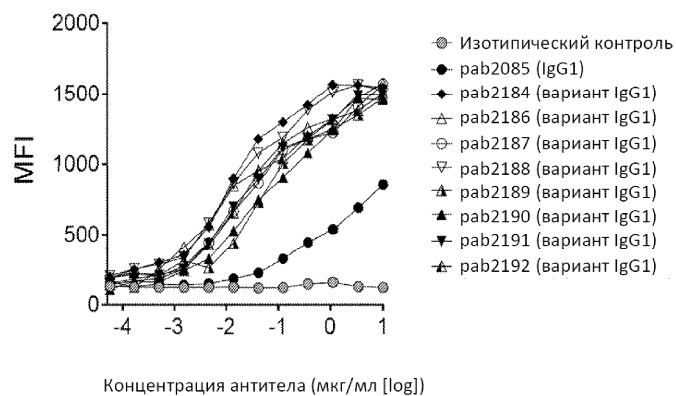


Фиг. 3С



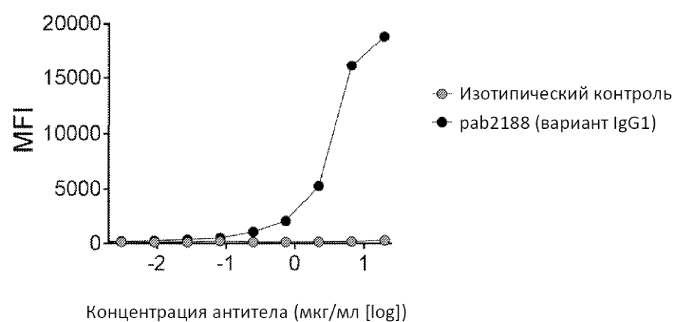
Фиг. 3D

Связывание с CD8+ Т-клетками человека



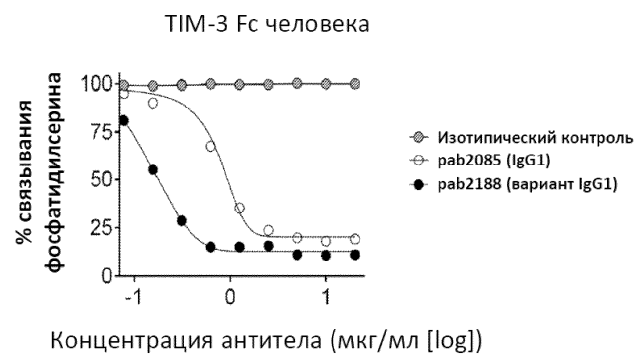
Фиг. 4

Связывание с миелоидными клетками яванского макака

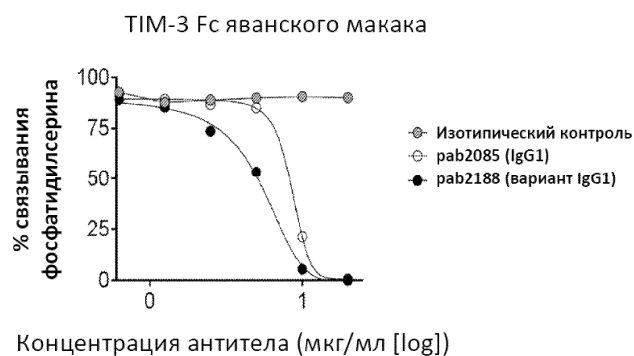


Фиг. 5

A

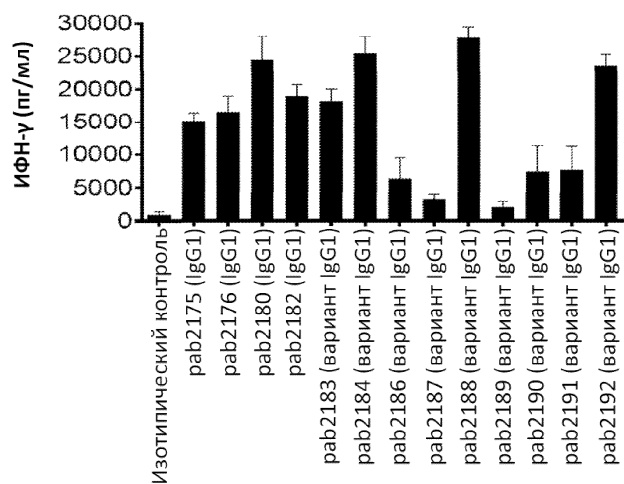


B

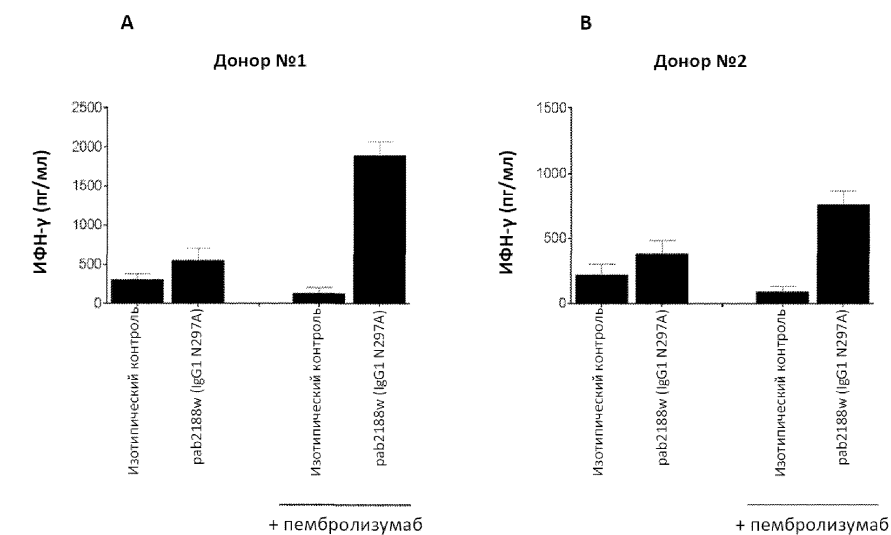


Фиг. 6А, В

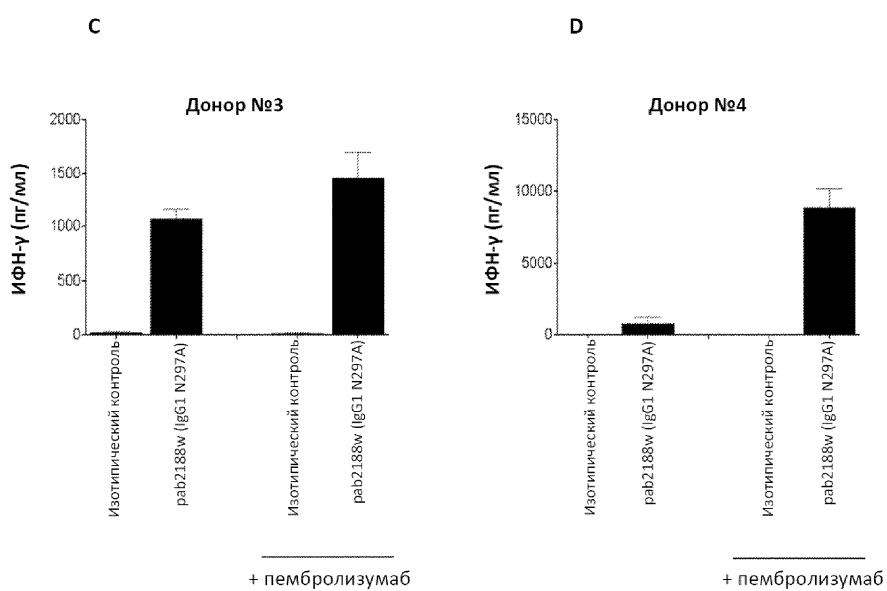
Анализ с SEA (+ пембролизумаб)



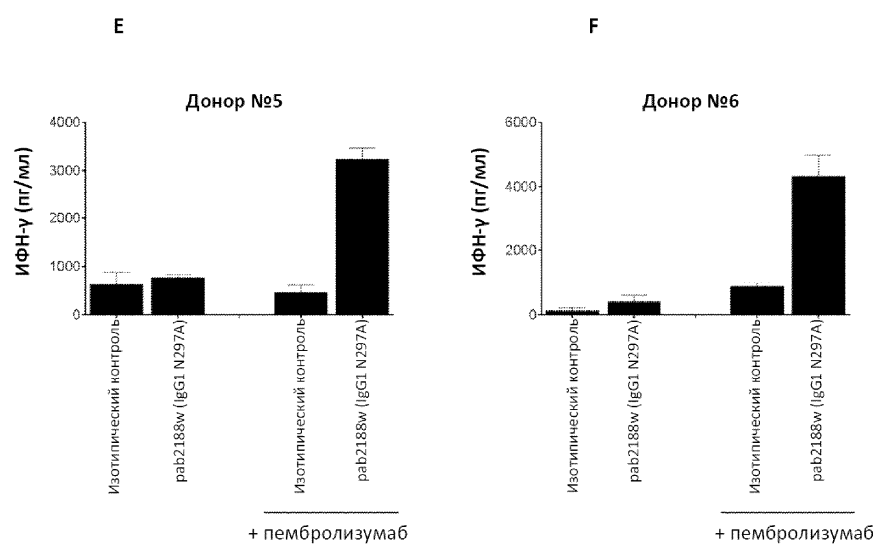
Фиг. 7



Фиг. 8А, В



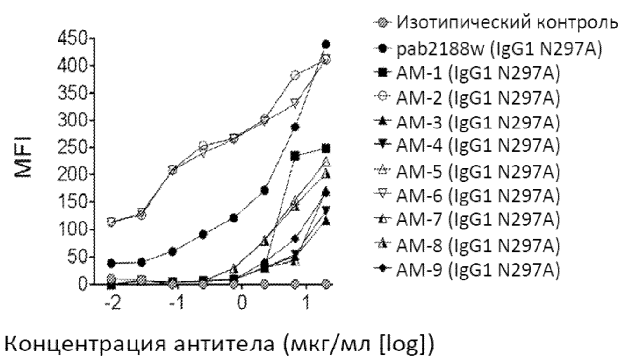
Фиг. 8С, D



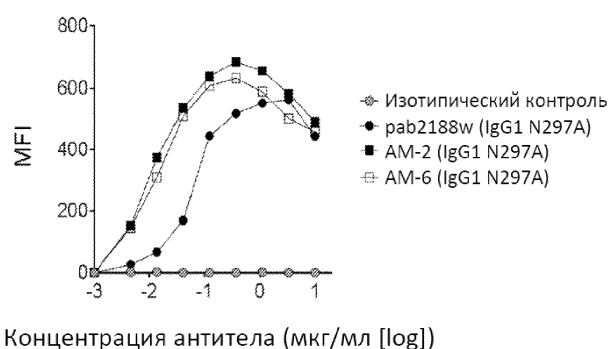
Фиг. 8Е, F

A

Связывание с клетками Jurkat,
экспрессирующими TIM-3

**B**

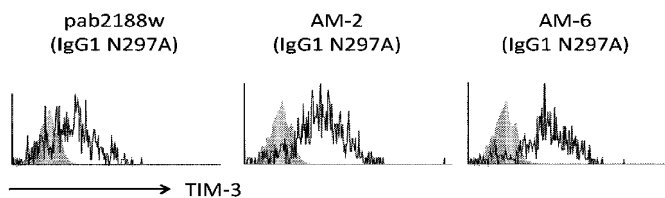
Связывание с клетками Kasumi-3



Фиг. 9A, B

C

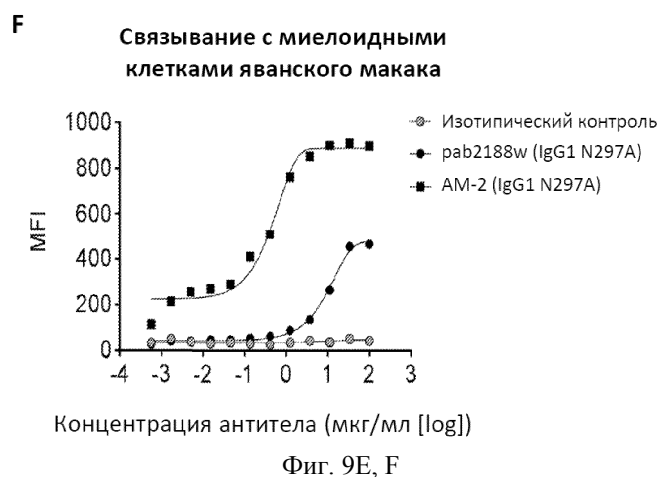
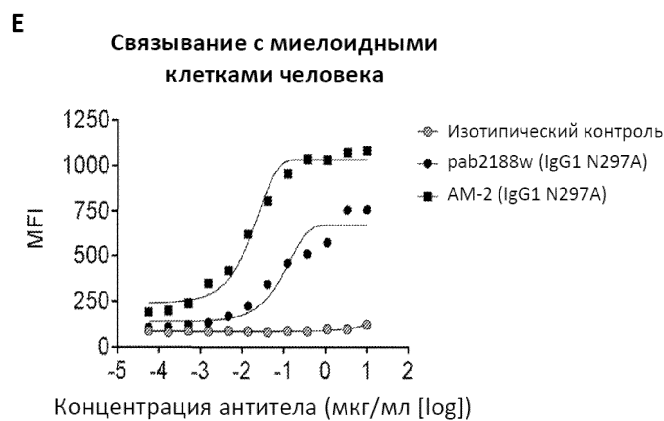
Связывание со стимулированными SEA CD8+ T-клетками человека

**D**

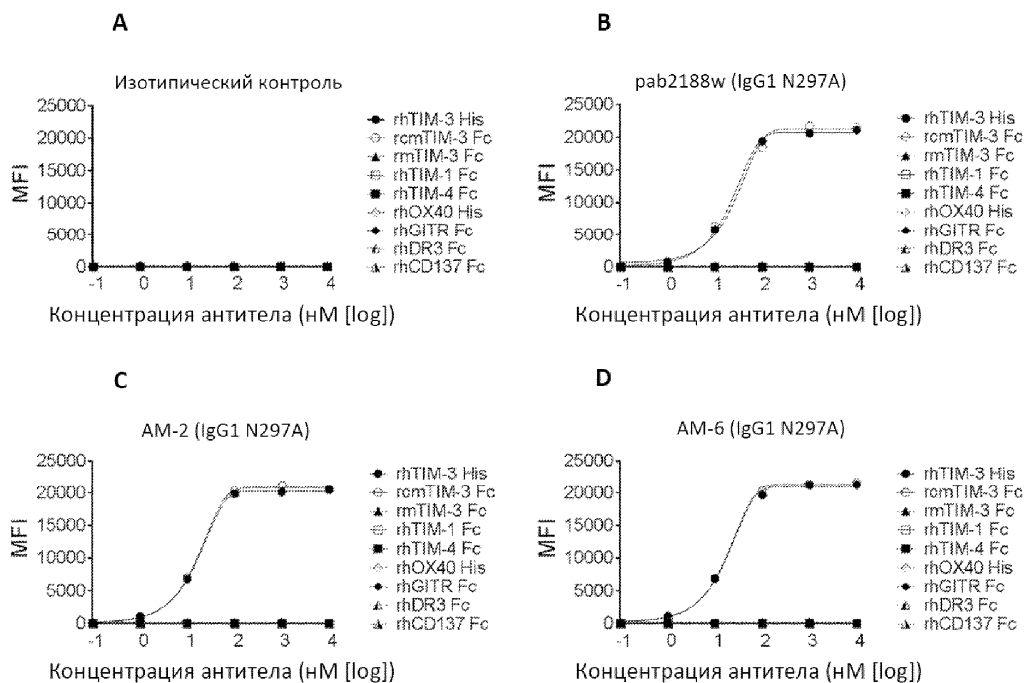
Связывание со стимулированными SEA CD8+ T-клетками яванского макака



Фиг. 9C, D

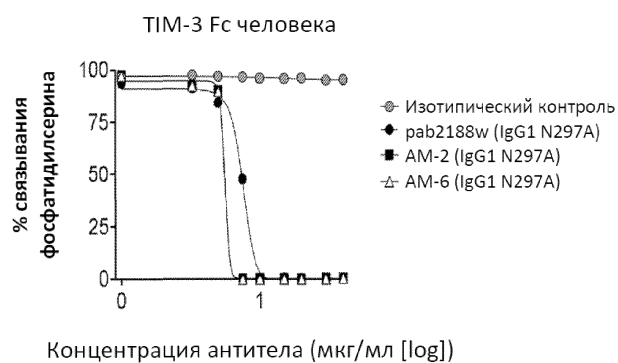


Фиг. 9E, F

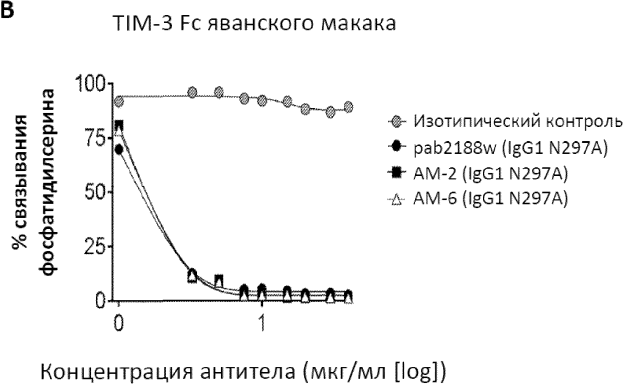


Фиг. 10A, B

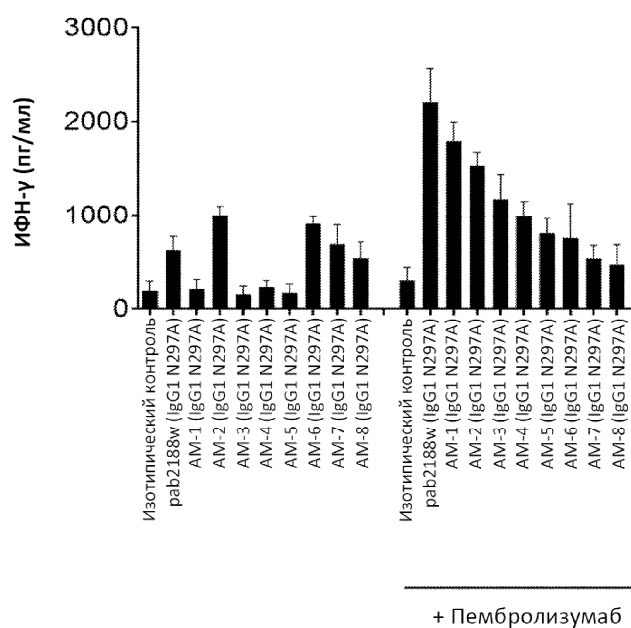
А



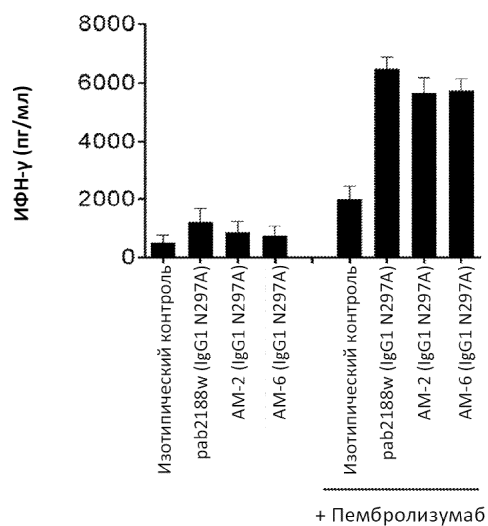
В



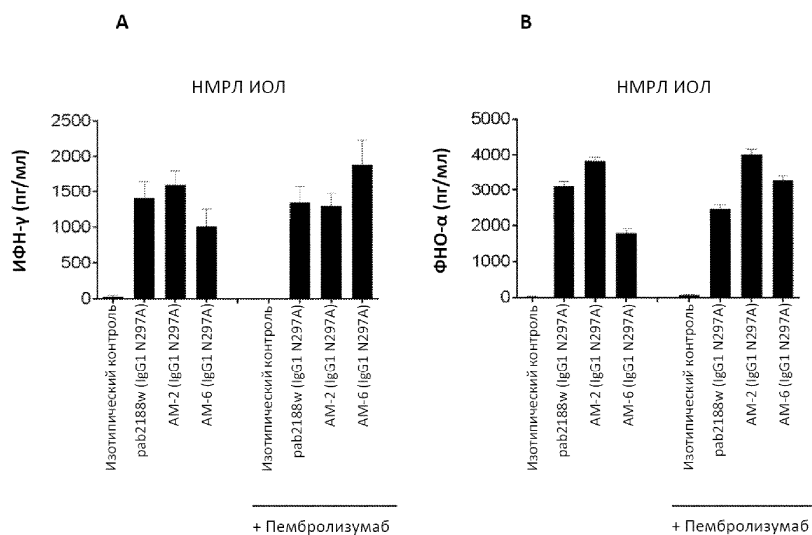
Фиг. 11А, В



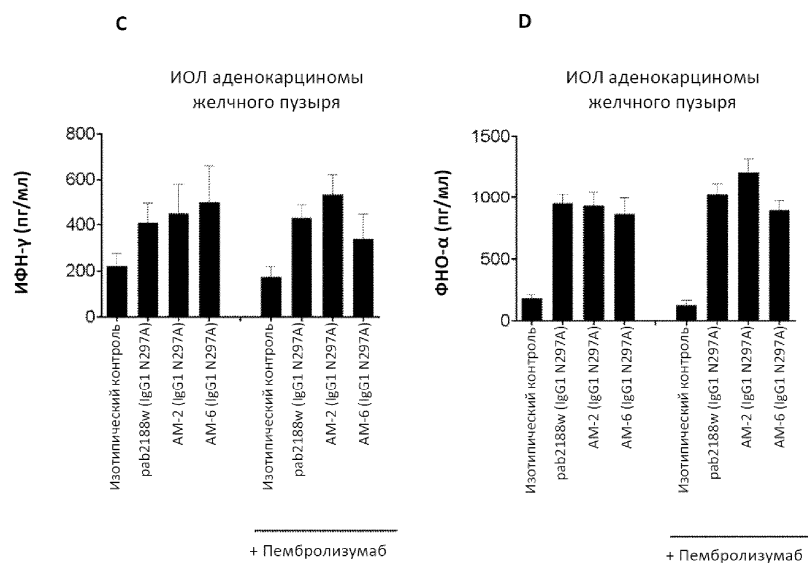
Фиг. 12А



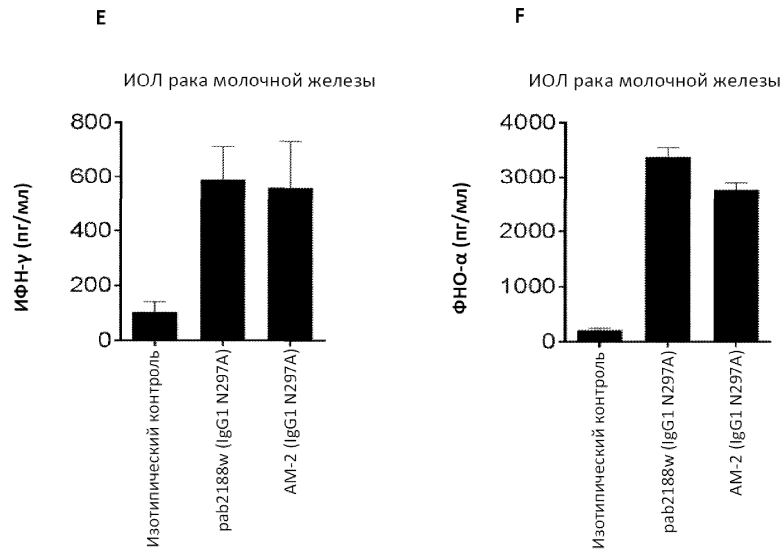
Фиг. 12В



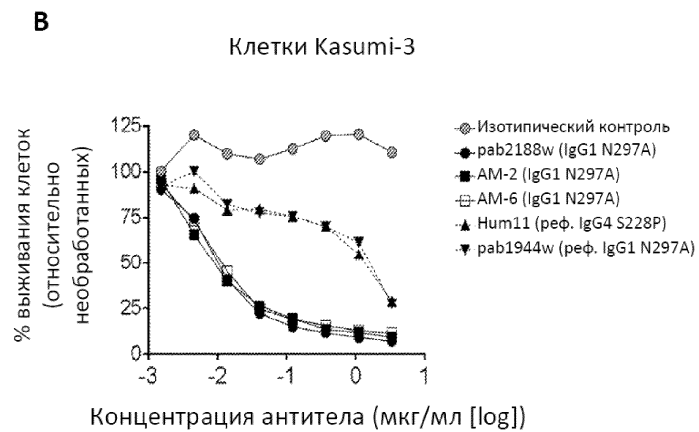
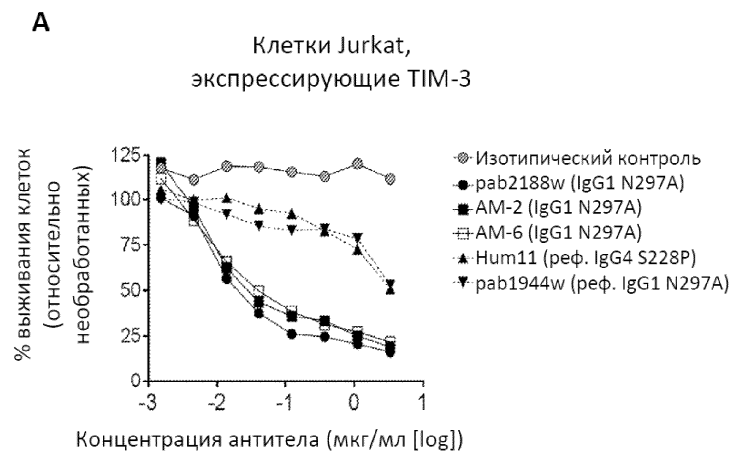
Фиг. 13А, В



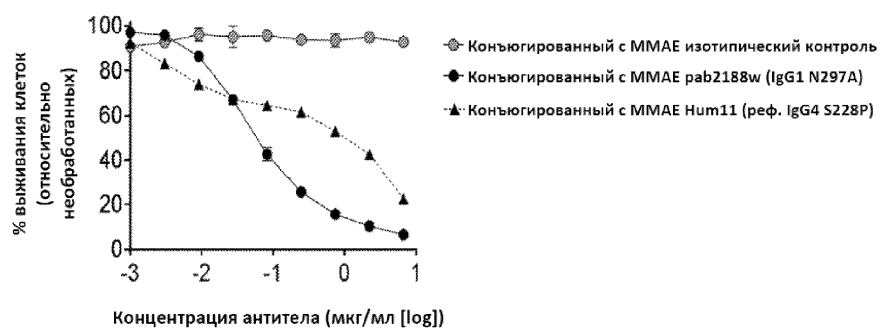
Фиг. 13С, В



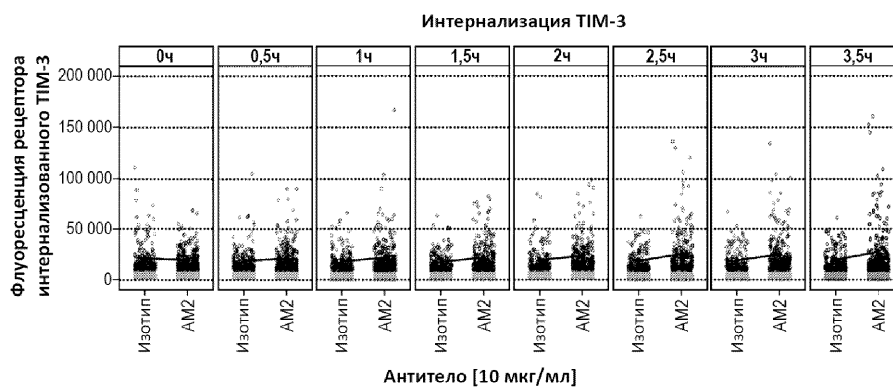
Фиг. 13Е, F



Фиг. 14А, В



Фиг. 14С



Фиг. 15

