

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 235**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2010 E 10761756 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2417984**

54 Título: **Procedimiento para el tratamiento de un tumor sanguíneo que utiliza el anticuerpo anti-TIM-3**

30 Prioridad:

10.04.2009 US 168428 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2016

73 Titular/es:

KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (50.0%)

1-6-1, Ohtemachi Chiyoda-ku

Tokyo 100-8185, JP y

KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

TAKANAYAGI, SHINICHIRO;

INAGAKI, YOSHIMASA;

AKASHI, KOICHI y

KIKUSHIGE, YOSHIKANE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 571 235 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el tratamiento de un tumor sanguíneo que utiliza el anticuerpo anti-TIM-3.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente para el tratamiento o el diagnóstico de un cáncer mieloide, especialmente la leucemia mielógena aguda (AML), que comprende un anticuerpo contra la proteína TIM-3 humana (otro nombre: HAVCR2) como principio activo.

10

Antecedentes de la técnicaRespecto a tumores malignos:

15 Un tumor maligno (cáncer) es la principal causa de muerte en Japón y el número de pacientes crece cada año, por lo que existe una fuerte necesidad de desarrollo de un fármaco y de un procedimiento terapéutico de elevadas eficacia y seguridad. Entre los ejemplos de causas de formación de un tumor maligno se incluyen una mutación del ADN causada por radiación, los rayos ultravioleta y diversas sustancias carcinogénicas. Los estudios sobre los tumores malignos se han centrado en identificar estos cambios genéticos en el ámbito de la biología molecular. En consecuencia, se considera que la transformación tumorigénica es inducida por la acumulación de un gran número de mutaciones y similares. Se ha demostrado con un modelo de línea celular y similar que algunas mutaciones decisivas se encuentran conectadas directamente a la transformación tumorigénica. Con respecto a la leucemia como una de las enfermedades objeto de la invención, se han identificado y clasificado muchas anomalías cromosómicas. En muchos casos, se observa una translocación del cromosoma y los genes asociados a la translocación ya han sido identificados en la translocación principal del cromosoma. Mediante análisis funcionales de los genes relacionados con la translocación, se ha descubierto que estos genes se relacionan con la aparición de la leucemia.

25

Respecto a las células troncales ("stem cells") de cáncer:

30

Por otra parte, desde hace mucho tiempo se ha propuesto una hipótesis denominada de células troncales de cáncer desde la perspectiva de la biología celular, que afirma que la célula troncal es el origen de un tumor maligno de manera similar al tejido normal. Se define célula troncal como una célula que presenta la capacidad de autorrenovación y pluripotencialidad y que generalmente se divide en célula troncal totipotente y célula troncal de tejido. La célula troncal de tejido es el origen de tejidos específicos y órganos, tales como el sistema sanguíneo, el hígado, el sistema nervioso y similares y se encuentra presente a una frecuencia extremadamente baja. Entre ellos, el estudio de la célula troncal hematopoyética se encuentra en el estadio más avanzado. Se ha informado de que puede reconstituirse un sistema hematopoyético durante un periodo de tiempo prolongado mediante el trasplante de una célula troncal hematopoyética en un ratón en el que se ha destruido el sistema hematopoyético con una dosis letal de radiación (referencia no de patente nº 1). A diferencia de las células troncales normales, los estudios sobre las células troncales de cáncer han ido por detrás durante mucho tiempo ya que no se ha identificado su verdadera naturaleza. Sin embargo, en 1997 Dick *et al.* identificaron por primera vez una célula troncal de cáncer en la leucemia mielocítica aguda (referencia no de patente nº 2). Posteriormente, se ha informado de la presencia de células troncales de cáncer en diversos tumores malignos. En resumen, las células troncales de cáncer se encuentran presentes a una frecuencia de varios puntos porcentuales o menos del tumor completo y la presencia de ellas es rara, al igual que las células troncales normales. Se considera que las células remanentes que forman el tumor son células precursoras de tumor en las que la capacidad de proliferación es limitada o son células tumorales.

35

40

45

A partir de dichos informes, se ha demostrado que la jerarquía se encuentra presente tanto en tumores como en tejido normal, y la célula troncal de cáncer que reside en esta parte superior (origen) presenta una fuerte capacidad de formación de tumores. Basándose en lo anteriormente expuesto, se considera que el inicio de la aparición de tumores malignos es un cambio de una célula troncal normal a una denominada célula troncal de cáncer por la adición de varias mutaciones.

50

Características y problemas terapéuticos de las células troncales de cáncer:

55

Al resumir muchos informes se considera que las células troncales de cáncer mantienen diversas características que presentan las células troncales normales. Entre los ejemplos de las similitudes se incluyen la rareza de la célula, un microambiente (nicho) en el que existen las células troncales, la expresión de un gen de resistencia a múltiples fármacos, el ciclo celular y similares.

60

En particular, las características de que las células troncales de cáncer expresan un grupo de genes de resistencia a múltiples fármacos y de que se encuentran en la etapa estacionaria del ciclo celular de manera similar a las células troncales normales podrían convertirse en un problema terapéutico considerable. Un gen de resistencia a múltiples fármacos BCRP es una bomba que perjudica la eficacia del fármaco al descargar diversos agentes antitumorales al exterior de las células, y se ha informado de un procedimiento para recoger células troncales que utiliza dicha

65

actividad (referencia no de patente nº 3). Además, la célula troncal se encuentra en un estado de "hibernación" con el fin de seguir proporcionando células durante toda su vida (referencia no de patente nº 4) y presenta una sensibilidad reducida a muchos agentes antitumorales y a la radiación (referencias no de patente nº 5 y nº 6). Basándose en las características anteriormente indicadas, se considera que la célula troncal de cáncer rara que muestra resistencia a la terapia es una causa de recurrencia tumoral.

Respecto al fármaco de diana molecular:

Son tres cursos principales de tratamiento de un tumor maligno: la terapia con agentes antitumorales, la terapia de radiación y la escisión. El tratamiento del tumor sanguíneo se encuentra limitado a la terapia con agentes tumorales y a la terapia de radiación, y tal como se ha indicado anteriormente, la célula troncal de cáncer puede presentar una resistencia a dichos tratamientos. Otro problema es que los efectos secundarios son grandes, ya que estos dos tratamientos afectan a todo el cuerpo. Es un fármaco de diana molecular que se espera que sea un medio de resolución de dicho problema. Presenta el potencial de reducir los efectos secundarios al mostrar su eficacia farmacológica únicamente en la célula que expresa la molécula diana.

Entre los ejemplos de fármacos típicos del fármaco de diana molecular en el campo de las enfermedades sanguíneas se incluyen el imatinib y el rituximab. El imatinib presenta como diana un factor causante de leucemia denominado Bcr-Abl producido por una anomalía cromosómica (cromosoma de Philadelphia) que se observa en 95% de los pacientes de leucemia mieloide crónica (CML). El imatinib es un fármaco de bajo peso molecular que induce el suicidio de la célula de leucemia mediante la inhibición de la función de Bcr-Abl. El rituximab es un anticuerpo terapéutico que reconoce CD20 como molécula de superficie sobre una célula B y presenta un efecto antitumoral sobre el linfoma no de Hodgkin, un tumor maligno de los linfocitos B. Por otra parte, los fármacos de diana molecular para AML son pocos y sólo existe un agente ozogamicina gemtuzumab (Mylotarg) en el que un antibiótico caliqueamicina se une a un anticuerpo monoclonal contra CD33 conocido como antígeno de superficie celular de AML (referencia no de patente nº 7). Sin embargo, puede afirmarse que la utilización de Mylotarg se encuentra limitada porque Mylotarg puede utilizarse únicamente en el caso de que el paciente cumpla las cuatro limitaciones siguientes: una tasa de expresión de CD33 de 80% o superior, caso de recurrencia, edad de 60 o más, y resistencia a otras terapias químicas. Basándose en lo anteriormente expuesto, puede afirmarse que el descubrimiento de un nuevo gen diana y el desarrollo de un agente terapéutico para el mismo son invenciones importantes que conducen directamente a la posibilidad de terapia y a la expansión de las posibles elecciones.

Respecto a la forma de realización de fármacos de diana molecular:

Como forma de realización de fármacos de diana molecular, se han estudiado y desarrollado diversas sustancias, tal como un anticuerpo terapéutico, un fármaco de bajo peso molecular, un fármaco peptídico, una preparación de proteína biológica, tal como una citocina, un ARNip, un aptámero y similares. En el caso de que se utilice un anticuerpo como agente terapéutico, debido a su especificidad, resulta útil en el tratamiento de condiciones patológicas en las que un antígeno específico tumoral muestra una propiedad de diferentes células. El anticuerpo se une a un antígeno específico tumoral que es una proteína que se expresa sobre la superficie celular y actúa eficazmente sobre dichas células. El anticuerpo presenta una característica de semivida en sangre prolongada y elevada especificidad para su antígeno y también resulta particularmente útil como agente antitumoral. Por ejemplo, en el caso de que un anticuerpo presente como diana un antígeno específico tumoral, puede esperarse que el anticuerpo administrado se acumule en el tumor y ataque de esta manera la célula tumoral mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) basado en el sistema inmunológico. Además, mediante la unión a una sustancia radioactiva, una sustancia citotóxica y similar, a un anticuerpo, resulta posible transferir un agente eficientemente a la parte tumoral y de esta manera permitir la acción sobre la misma. Simultáneamente, ya que puede reducir la cantidad del agente que alcanza otros tejidos no específicos, también puede esperarse una reducción de los efectos secundarios. La terminación o regresión del crecimiento del tumor puede esperarse por la actividad del anticuerpo acumulado en el tumor selectivamente. La administración del anticuerpo podrá seleccionarse de entre anticuerpos que presenta actividad agonista en el caso de que el antígeno específico tumoral presente una actividad de inducción de muerte celular, o que presente actividad de neutralización, en el caso de que el antígeno específico tumoral se relacione con el crecimiento y la supervivencia de las células. Debido a las características anteriormente indicadas, se considera que los anticuerpos resultan adecuados para la aplicación como agentes antitumorales.

Respecto a los anticuerpos terapéuticos:

En la preparación de anticuerpos original, se utilizó un ratón como el animal que debía inmunizarse. Sin embargo, la utilización de anticuerpos de ratón como fármacos *in vivo* se encuentra limitada por un gran número de razones. Un anticuerpo de ratón que puede reconocerse como sustancia foránea en el cuerpo humano puede inducir una respuesta denominada de "anticuerpos humanos antirratón", es decir, una respuesta HAMA (referencia no de patente nº 8). Además, la región Fc del anticuerpo de ratón no resulta eficaz para estimular la citotoxicidad del complemento o celular humana.

Como uno de los enfoques para evitar dichos problemas se ha desarrollado un anticuerpo quimérico (solicitud de

patente EP nº 120694, solicitud de patente EP nº 125023). El anticuerpo quimérico contiene partes de anticuerpos derivados de dos o más especies (región variable de anticuerpo de ratón, región constante de anticuerpo humano y similares). Un punto ventajoso de dicho anticuerpo quimérico es que mantiene las características de un anticuerpo de ratón pero puede estimular la citotoxicidad del complemento o celular humana ya que presenta Fc humano. Sin embargo, es conocido que dicho anticuerpo quimérico induce además una respuesta de "anticuerpos humanos anti-quiméricos", es decir, una respuesta "HACA" (referencia no de patente nº 9).

Además, se ha desarrollado un anticuerpo recombinante en el que sólo se han sustituido algunas partes del anticuerpo: regiones determinantes de complementariedad ("RDC") (referencias de patente nº 1 y nº 2). Mediante la utilización de una técnica de injertación de RDC se genera un anticuerpo que comprende una RDC de ratón y un marco de región variable y una región constante humanos, denominado "anticuerpo humanizado" (referencia no de patente nº 10).

Respecto a TIM-3:

La familia del gen TIM comprende ocho genes en ratones y tres genes en el ser humano, y estos genes se localizan en el cromosoma 11 y en la región génica 5q33, respectivamente (documento no de patente nº 11). Estas regiones génicas es conocido que están relacionadas con enfermedades autoinmunitarias y enfermedades alérgicas. La proteína TIM es una proteína transmembranal de tipo I que presenta un dominio variable de inmunoglobulina (IgV) estructuralmente conservado y un dominio de mucina. Se considera que la proteína TIM se expresa específicamente sobre los linfocitos T y regula directamente la actividad de los linfocitos T, aunque hay informes recientes de la expresión de la proteína TIM-3 en las células presentadoras de antígeno y sobre sus funciones (documento no de patente nº 12). Según el análisis de la estructura cristalina, la proteína TIM presenta una estructura de proteína conservada y presenta un sitio de unión a ligando en el dominio IgV.

Se ha identificado TIM-3 como una molécula que se expresa específicamente sobre las células Th1 de ratón y no sobre las células Th2 (documento no de patente nº 13). En los ratones, mediante la unión de TIM-3 a su ligando, la galectina 9, se induce la apoptosis en una célula Th1 de ratón, se inhibe la respuesta de Th1 y seguidamente se induce tolerancia periférica. En el ser humano, de manera similar al ratón, TIM-3 se expresa selectivamente sobre las células Th1, así como las células fagocíticas, tales como macrófagos y células dendríticas. Se encuentra que la reducción de la expresión de TIM-3 humano por el ARNip o la inhibición por un anticuerpo bloqueante incrementa la secreción de interferón- γ (IFN- γ) a partir de linfocitos T positivos para CD4. Lo anterior apoya la función inhibidora de TIM-3 en los linfocitos T humanos. El análisis de las muestras clínicas de pacientes de enfermedad autoinmunitaria no mostró expresión de TIM-3 en las células positivas para CD4. En particular, el nivel de expresión de TIM-3 es inferior y la secreción de IFN- γ es superior en los clones de linfocitos T derivados del líquido cerebroespinal de los pacientes con esclerosis múltiple que los niveles en clones derivados de personas sanas normales (documento no de patente nº 14).

Existen informes sobre la relación entre TIM-3 y enfermedades alérgicas y/o asma (documentos de patente nº 3 y nº 4). Sin embargo, la relación entre TIM-3 y cáncer hematológico se da a conocer únicamente en el informe sobre el análisis de micromatrices de las células troncales hematopoyéticas de pacientes de leucemia mieloide aguda y de células troncales hematopoyéticas normales (documento no de patente nº 15) y en muchos no se ha encontrado relación entre TIM-3 y el cáncer hematológico.

El documento de patente nº 5 proporciona composiciones que contienen un antígeno y una molécula de reconocimiento de TIM que pueden utilizarse para estimular una respuesta inmunológica.

El documento de patente nº 6 proporciona composiciones para fomentar o reducir el tráfico de los linfocitos T a un tejido diana basadas en el descubrimiento de que TIM-3 se expresa preferentemente sobre la superficie de las células Th1.

El documento de patente nº 7 da a conocer una nueva isoforma de procesamiento de TIM-3 que codifica una forma soluble de TIM-3.

El documento no de patente nº 16 da a conocer que, basándose en los nuevos avances en la secuenciación de ADN de nueva generación y la proteómica, se está poniendo de manifiesto que los procesos reguladores que se producen después de la transcripción del ARNm desempeñan un papel sustancial en el control de las abundancias de las proteínas en el estado de equilibrio.

Listado de referencias

Documentos de patente:

Documento de patente nº 1: solicitud de patente GB nº GB2188638A
Documento de patente nº 2: patente US nº 5.585.089
Documento de patente nº 3: documento nº WO96/27603

Documento de patente nº 4: documento nº WO2003/063792
 Documento de patente nº 5: documento nº WO2005/097211
 Documento de patente nº 6: documento nº WO2003/063792
 Documento de patente nº 7: documento nº WO2005/033144

Documentos no de patente:

Documento no de patente nº 1: Osawa M. *et al.*, *Science* 273:242-5, 1996.
 Documento no de patente nº 2: Bonnet D. y Dick J.E., *Nat. Med.* 3:730-7, 1997.
 Documento no de patente nº 3: Goodell M.A. *et al.*, *J. Exp. Med.* 183:1797-806, 1996.
 Documento no de patente nº 4: Yamazaki S. *et al.*, *EMBO J.* 25:3515-23, 2006.
 Documento no de patente nº 5: Ishikawa F. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 25:1315-21, 2007.
 Documento no de patente nº 6: Bao S. *et al.*, *Nature* 444:756-60, 2006.
 Documento no de patente nº 7: Bernstein I.D., *Leukemia* 14:474-475, 2000.
 Documento no de patente nº 8: Schiffetal, *Canc. Res.* 45:879-885, 1985.
 Documento no de patente nº 9: Bruggemann *et al.*, *J. Exp. Med.* 170:2153-2157, 1989.
 Documento no de patente nº 10: Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327, 1988.
 Documento no de patente nº 11: Hafler D.A. *et al.*, *J. Exp. Med.* 205:2699-701, 2008.
 Documento no de patente nº 12: Anderson A.C. *et al.*, *Science* 318:1141-3, 2007.
 Documento no de patente nº 13: Monney L. *et al.*, *Nature* 415:536-41, 2002.
 Documento no de patente nº 14: Koguchi K. *et al.*, *J. Exp. Med.* 203:1413-8, 2006.
 Documento no de patente nº 15: Majeti R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 13 de feb. de 2009. PMID: 19218430.
 Documento no de patente nº 16: Vogel C. *et al.*, *Nature Reviews Genetics* 13(4):227-232.

Sumario de la invención

Problemas técnicos

Como problema de un procedimiento de tratamiento convencional para un tumor maligno, pueden indicarse los tres problemas siguientes: en primer lugar, los efectos secundarios afectan a todo el cuerpo producidos por el agente antitumoral, la terapia de radiación o similar; en segundo lugar, la posibilidad de recaída del tumor se incrementa debido a las células troncales de cáncer raras remanentes que muestran resistencia al tratamiento, y en tercer lugar, existen pocos fármacos con diana molecular entre los fármacos en el campo de los tumores hematológicos.

El primer objetivo de la presente invención es proporcionar un agente para la prevención, diagnóstico o tratamiento de diversos tumores hematológicos mediante el desarrollo de una sustancia antitumoral que se una selectivamente y ataque una célula tumoral maligna en la que se expresa TIM-3.

El segundo objetivo de la presente invención es proporcionar la utilización de la molécula de TIM-3 basándose en el resultado de que TIM-3 se expresa en una célula tumoral sanguínea.

Tal como se ha indicado anteriormente, existen altas expectativas de una nuevo fármaco de diana molecular para un tumor sanguíneo, incluyendo la leucemia, y se considera que el descubrimiento de una nueva molécula diana y la utilización de la misma conducirán al desarrollo de métodos de tratamiento seguros y eficaces. Debido a que un anticuerpo originalmente presenta especificidad de reconocimiento, resulta útil como medio para el reconocimiento molecular. Por lo tanto, los presentes inventores han realizado un estudio intensivo de la expresión de TIM-3 humano en tumores sanguíneos y la preparación de un anticuerpo contra TIM-3 humano y, como resultado, han encontrado utilidad en TIM-3 como diana para el tratamiento.

Solución a los problemas

Como soluciones a los problemas anteriormente indicados, para el primer problema la presente invención proporciona la utilización de un agente de tratamiento que presenta como diana una molécula que se expresa a nivel elevado en una célula de cáncer en comparación con una célula normal. Mediante la utilización de dicha molécula resulta posible un tratamiento en el que la eficacia del fármaco sobre las células de cáncer es elevada y los efectos adversos sobre las células normales son pequeños. Por otra parte, el segundo problema puede resolverse mediante la utilización como diana de una molécula que se expresa en una célula troncal de cáncer. El tercer problema puede resolverse con un agente de tratamiento que cumpla los dos puntos anteriormente indicados, ya que se incrementa el número de opciones de procedimiento de tratamiento en los que se utiliza un fármaco con diana molecular.

La presente invención proporciona un nuevo fármaco de diana molecular para el tratamiento de un tumor hematológico mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal humano contra TIM-3 que es un gen de expresión elevada en un tumor maligno, atacando de esta manera una célula de tumor maligno, incluyendo una célula troncal de cáncer.

La presente invención puede resumirse de la manera siguiente.

- (1) Un anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 para la utilización en un procedimiento de prevención o tratamiento de un tumor hematológico en un sujeto que presenta una célula que expresa TIM-3 en la médula ósea o en la sangre periférica, en el que la célula es una fracción celular seleccionada de entre (a) a (c) a continuación: (a) Lin(-)CD34(+)CD38(-), (b) Lin(-)CD34(+)CD38(+), y (c) Lin(-)CD34(-), en el que el anticuerpo anti-TIM-3 es un anticuerpo con actividad de ADCC y/o actividad de CDC, y en el que el tumor hematológico es leucemia mielocítica aguda (AML), síndromes mielodisplásicos (MDS) o leucemia mieloide crónica (CML).
- (2) Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 para la utilización en un procedimiento de prevención o tratamiento de un tumor hematológico en un sujeto que presenta una célula que expresa TIM-3 en la médula ósea o en sangre periférica, en el que la célula es una fracción celular seleccionada de entre (a) a (c) a continuación: (a) Lin(-)CD34(+)CD38(-), (b) Lin(-)CD34(+)CD38(+) y (c) Lin(-)CD34(-), en el que el anticuerpo anti-TIM-3 es un anticuerpo con actividad de ADCC y/o actividad de CDC, y en el que el tumor hematológico es AML, MDS o CML.
- (3) Utilización de un anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 para la preparación de una composición para la prevención o el tratamiento de un tumor hematológico en un sujeto que presenta una célula que expresa TIM-3 en la médula ósea o en sangre periférica, en el que la célula es una fracción celular seleccionada de entre (a) a (c) a continuación: (a) Lin(-)CD34(+)CD38(-); (b) Lin(-)CD34(+)CD38(+), y (c) Lin(-)CD34(-), en el que el anticuerpo anti-TIM-3 es un anticuerpo con actividad de ADCC y/o de CDC, y en el que el tumor sanguíneo es AML, MDS o CML.
- (4) Utilización de un anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 en un procedimiento para detectar un tumor hematológico, comprendiendo el procedimiento la utilización del anticuerpo anti-TIM-3 para reconocer una célula que expresa TIM-3 en una muestra de médula ósea o de sangre periférica derivada de un sujeto, en el que la célula es una fracción celular seleccionada de entre (a) a (c) a continuación: (a) Lin(-)CD34(+)CD38(-), (b) Lin(-)CD34(+)CD38(+) y (c) Lin(-)CD34(-), en el que el anticuerpo anti-TIM-3 es un anticuerpo con actividad de ADCC y/o de CDC, y en el que el tumor hematológico es AML, MDS o CML.
- (5) El anticuerpo para la utilización según (1), la composición para la utilización según (2), o la utilización según (3) o (4), en el que el tumor hematológico es recurrente y/o resistente ("refractory").

Efecto ventajoso de la invención

Es conocido que TIM-3 es un gen que controla funciones inmunitarias *in vivo*. En la presente invención, los inventores aplican la naturaleza recién descubierta de TIM-3, es decir, la expresión del mismo en tumores hematológicos, para establecer un uso del agente en el tratamiento o en el diagnóstico y además del gen como diana para el aislamiento de células tumorales mediante la utilización de sustancias antitumorales (preferentemente el anticuerpo anti-TIM-3) con diana en células que expresan TIM-3.

Actualmente, se han desarrollado algunos fármacos con diana molecular en el campo de los tumores hematológicos. Sin embargo, algunos de ellos presentan como diana las células troncales de cáncer. Por ejemplo, el fármaco de tratamiento de la AML, el Mylotarg, presenta como diana una proteína CD33 (Bernstein, *Leukemia* 14:474-475, 2000). Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, presenta limitaciones tales como el nivel de expresión de CD33, la recurrencia, la edad y la resistencia a la terapia química.

En la sección de Ejemplos de la presente invención, se observa citotoxicidad del anticuerpo anti-TIM-3 sobre las células que expresan TIM-3 o sobre las células primarias de AML. Esta actividad sugiere efectos terapéuticos en diversas enfermedades hematológicas del anticuerpo anti-TIM-3.

Breve descripción de los dibujos

- [Figura 1] La figura 1 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de AML (M0).
- [Figura 2] La figura 2 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de AML (M1).
- [Figura 3] La figura 3 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de AML (M2).
- [Figura 4] La figura 4 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la

molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de AML (M3).

[Figura 5] La figura 5 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de AML (M4).

[Figura 6] La figura 6 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de AML (M5).

[Figura 7] La figura 7 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de AML (M6).

[Figura 8] La figura 8 representa un resultado de un ensayo citotóxico de células primarias de AML utilizando un anticuerpo policlonal anti-TIM-3.

[Figura 9] La figura 9 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de MDS.

[Figura 10] La figura 10 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de CML.

[Figura 11] La figura 11 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) derivadas de un paciente de CML.

[Figura 12] La figura 12 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) y Lin(-)CD34(+)CD38(+) derivadas de un paciente de AML en recaída.

[Figura 13] La figura 13 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células de médula ósea Lin(-)CD34(+)CD38(-) y Lin(-)CD34(+)CD38(+) derivadas de un paciente normal sano.

[Figura 14] La figura 14 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre las células sanguíneas periféricas normales derivadas de una persona normal sana.

[Figura 15] La figura 15 representa un resultado del análisis de citometría de flujo multicolor de la expresión de la molécula de TIM-3 humana sobre líneas celulares humanas.

[Figura 16] La figura 16 representa un resultado del ensayo de ADCC de la línea celular de AML utilizando anticuerpo policlonal anti-TIM-3. La ordenada muestra la tasa de lisis específica.

[Figura 17] La figura 17 representa un resultado del ensayo de CDC de la línea celular de AML utilizando anticuerpo policlonal anti-TIM-3.

Modo de poner en práctica la invención

(Descripción detallada de formas de realización deseables especificadas)

Los títulos de las secciones se utilizarán en la presente memoria únicamente con el propósito de organización y no deben interpretarse como limitativos de la materia principal que se describe.

(Descripción general)

La presente invención proporciona un agente para la prevención, el diagnóstico o el tratamiento de tumores malignos en los que las células que expresan TIM-3 son la diana.

En una forma de realización específica, el anticuerpo presenta una actividad de unión a una molécula de TIM-3 y puede inducir la reducción o la eliminación de una célula que expresa TIM-3 por parte del sistema inmunológico centrado principalmente en las células efectoras.

El anticuerpo se refiere a un control funcional de las células que expresan TIM-3 e induce la supervivencia, el crecimiento, el reposo, la muerte celular o similares.

- 5 El anticuerpo se refiere a un control funcional de las células que expresan TIM-3 e incrementa o reduce el nivel de producción de las citocinas o del interferón secretado por las células.

(TIM-3)

- 10 La familia del gen TIM consiste de ocho genes en el ratón y tres genes en el ser humano, y se localizan en el cromosoma 11 y en la región génica 5q33. Estas regiones génicas es conocido que están relacionadas con enfermedades autoinmunitarias y enfermedades alérgicas. La proteína TIM es una proteína transmembranal de tipo I que presenta un dominio variable de inmunoglobulina (IgV) estructuralmente conservado y un dominio de mucina.

- 15 Además, se informa de que un ligando conocido de TIM-3, la galectina-9, se expresa sobre los leucocitos periféricos y el tejido linfoide en el ser humano (Wada J. *et al.*, J. Biol. Chem. 272:6078-86, 1997). Es conocido que la galectina-9 humana se une a la proteína transportadora de GLUT-2 y diversos oligosacáridos diferentes de TIM-3 (Nagae M. *et al.*, J. Mol. Biol. 375:119-35, 2008).

- 20 Además, TIM-3 también se denomina HAVCR2. TIM-3 incluye TIM-3 de mamífero (tal como de primate y humano). Por lo tanto, el anticuerpo anti-TIM-3 de la presente invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia de TIM-3 de mamífero, tal como TIM-3 humano. La secuencia de TIM-3, tal como la TIM-3 humana, incluye variantes polimórficas. Un ejemplo no específico de la TIM-3 humana de longitud completa incluye la secuencia indicada a continuación:

MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWG
KGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNGLDFRKGDVSLTIENVTLADSGI
YCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDFTAAPRMLTTRGHGPAET
QTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIF
GALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIEENVYEVE
EPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP (SEC ID n° 1)

(Anticuerpo)

- 30 El anticuerpo se utiliza en el sentido más amplio e incluye un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo multivalente, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo un anticuerpo biespecífico) y también fragmentos de anticuerpo, con la condición de que estos muestren la actividad biológica deseada.

- 35 El anticuerpo contiene una secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura. Además, el anticuerpo incluye además una forma modificada y una forma variante, tal como sustituciones dentro o fuera de una región constante, una región determinante de complementariedad (RDC) o una región de marco (RM) de una secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura del anticuerpo, y similar. En una forma de realización específica, la sustitución incluye una sustitución de aminoácido conservadora.

- 40 Además, el anticuerpo incluye además una subsecuencia de la secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura. En una forma de realización específica, la subsecuencia se selecciona de entre Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv de enlace disulfuro (sdFv) y VL o VH.

- 45 Además, el anticuerpo incluye además un dominio heterogéneo. En una forma de realización específica, el dominio heterogéneo incluye una etiqueta, un marcaje detectable o un agente citotóxico.

- Entre los ejemplos del anticuerpo se incluyen un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal y cualquier isotipo o subclase de los mismos. En una forma de realización específica, el anticuerpo anteriormente indicado es un isotipo de IgG (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA, IgM, IgE o IgD. El anticuerpo "monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se basa en un único clon, incluyendo un clon de eucariota, un clon de procariota o un clon de fago, obtenido a partir de un único clon, incluyendo un clon de eucariota, un clon de procariota o un clon de fago, o inducido a partir de un único clon, incluyendo un clon de eucariota, un clon de procariota o un clon de fago. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el anticuerpo "monoclonal" es una sustancia estructuralmente definida y no un procedimiento por el que se produce.

Las expresiones anticuerpo de TIM-3, anti-TIM-3 y anticuerpo anti-TIM-3 se refieren a un anticuerpo que se une

específicamente a TIM-3. La unión específica se refiere a que es selectiva para el epítipo que se presenta en TIM-3. La unión específica puede distinguirse de la unión no específica utilizando un ensayo conocido del campo técnico (por ejemplo la inmunoprecipitación, ELISA, la citometría de flujo y la transferencia western).

En el caso de que la totalidad o una parte de los epítipos de antígeno a los que se une específicamente un anticuerpo anti-TIM-3 se encuentren presentes en proteínas diferentes, existe la posibilidad de que dicho anticuerpo pueda unirse a las diferentes proteínas. Por lo tanto, existe la posibilidad de que el anticuerpo de TIM-3 se una específicamente a otras proteínas que presentan una homología de secuencia o estructural elevada para el epítipo de TIM-3 dependiendo de la homología de secuencia o estructural del epítipo de TIM-3. De acuerdo con lo anterior, existe la posibilidad de que el anticuerpo de TIM-3 se una a una proteína diferente en el caso de que se encuentre presente un epítipo con suficiente homología de secuencia o estructural en la proteína diferente.

El anticuerpo de TIM-3 incluye anticuerpos aislados y purificados. El anticuerpo de la invención que incluye un anticuerpo de TIM-3 aislado o purificado humano.

La expresión "(haber sido) aislado" que se utiliza como modificador de una composición se refiere a que la composición se prepara manualmente o se separa de otro u otros componentes en el medio *in vivo* presente naturalmente, generalmente mediante una o más etapas o procedimientos de manipulación. En general, una composición separada de esta manera no contiene sustancialmente uno o más materiales con los que se asocia normalmente en la naturaleza, tales como una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y membranas celulares. Debido a ello, la composición aislada se separa de otros componentes biológicos en las células del organismo en el que se encuentra naturalmente la composición, o del medio artificial en el que se produce (por ejemplo mediante síntesis o cultivo celular). Por ejemplo, puede obtenerse un anticuerpo de TIM-3 aislado a partir de un animal en el que se produce el anticuerpo (por ejemplo mamíferos no transgénicos o mamíferos transgénicos (tales como roedores (ratón), ungulados (vacas) y similares)) y se separa de otros polipéptidos y ácidos nucleicos. De acuerdo con lo anterior, se considera que el suero que contiene un anticuerpo obtenido de dicho animal ha sido aislado. La expresión "(haber sido) aislado" no excluye formas físicas alternativas y, por ejemplo, un anticuerpo aislado podría incluir subsecuencias de anticuerpo, y formas quimerizadas, multimerizadas o derivatizadas.

La expresión "(haber sido) purificado" que se utiliza como modificador de una composición se refiere a una composición libre de la mayoría o sustancialmente la mayoría de los materiales con los que típicamente se encuentra asociado naturalmente. En general, un anticuerpo purificado se obtiene a partir de los componentes que generalmente se presentan en el medio del anticuerpo. Debido a lo anterior, se considera que un sobrenadante de anticuerpo que se ha separado de una mezcla de cultivo celular de un hibridoma productor de anticuerpo ha sido purificado. De acuerdo con lo anterior, la expresión "(haber sido) purificado" no requiere una pureza absoluta y es específica del contexto. Además, la composición que "(ha sido) purificada" puede agruparse con otra u otras moléculas. Debido a lo anterior, la expresión "(ha sido) purificada" no excluye las combinaciones de la composición. La pureza puede determinarse mediante un procedimiento apropiado opcional, tal como la espectrometría de UV, la cromatografía (por ejemplo HPLC, fase gaseosa), la electroforesis en gel (por ejemplo la tinción de plata o de Coomassie), el análisis de secuencias (peptídicas y de ácidos nucleicos) y similares.

La proteína y ácido nucleico que "(ha sido) purificado" incluyen una proteína y un ácido nucleico que han sido obtenidos mediante un procedimiento estándar de purificación. Además, una proteína y un ácido nucleico obtenidos mediante expresión de recombinación en una célula hospedadora y la síntesis química también se encuentran comprendidos en dicha expresión. Además, la expresión "(haber sido) purificado" también puede referirse a una composición en la que el nivel de contaminantes es inferior al nivel que resulta aceptable por una agencia reguladora para la administración en el ser humano o en animales no humanos, tal como la Food and Drug Administration (FDA).

El anticuerpo anti-TIM-3 incluye además uno que puede unirse específicamente a TIM-3 expresada sobre la célula. En una forma de realización específica, el anticuerpo anti-TIM-3 puede unirse específicamente a células de tumor hematológico que expresan TIM-3 (células de AML, células de CML, células de síndromes mielodisplásicos (MDS), células de LLC, células de mieloma múltiple o de diversos linfomas, tales como el linfoma de linfocitos B, el linfoma de linfocitos T y el linfoma de linfocitos NK), linfocitos T cooperadores (por ejemplo células Th1 y células Th17), células presentadoras de antígeno (tales como las células dendríticas, los monocitos, los macrófagos y los subtipos de los mismos (por ejemplo células estrelladas hepáticas, osteoclastos, microglía, macrófagos intraepidérmicos, macrófagos alveolares (fagocitos alveolares)) o TIM-3 expresado en una célula transfectada con el gen TIM-3.

Entre los ejemplos de anticuerpo anti-TIM-3 se incluyen un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en la secuencia de aminoácidos de la región extracelular de TIM-3. En las formas de realización específicas, el anticuerpo anti-TIM-3 ejemplificativo se une específicamente a tres epítipos en TIM-3 según se decidan mediante el ensayo de bloqueo cruzado. Una secuencia ejemplificativa no específica de la región extracelular de TIM-3 humano es la siguiente:

MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWG
KGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGI
YCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDFTAAPRMLTTRGHGPAET
QTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATR (SEC ID n° 2)

Entre los ejemplos del anticuerpo anti-TIM-3 se incluyen un anticuerpo que puede unirse a TIM-3 existente sobre uno o más tipos de células in vivo, células en cultivo primarias aisladas, células subcultivadas, células en cultivo y células inmortalizadas. Entre los ejemplos específicos de tipos celulares específicos que pueden expresar TIM-3 se incluyen las células de AML, otras células de tumor hematológico (tales como células de CML, células de LLA, células de LLC, células de MDS, células de mieloma múltiple, diversas células de linfoma (por ejemplo linfomas de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de linfocitos NK y similares)) y células no de tumores hematológicos. Entre los ejemplos de células no de tumores hematológicos se incluyen los monocitos, las células dendríticas, los macrófagos, los linfocitos T cooperadores, los linfocitos citolíticos naturales, las células progenitoras mieloides y las células progenitoras linfoides. TIM-3 puede expresar en una célula que originalmente no expresa TIM-3 mediante transfección o transformación utilizando el ácido nucleico codificante de TIM-3. El anticuerpo anti-TIM-3 que puede unirse a TIM-3 puede unirse a uno o más transfectantes o transformantes que expresan o producen TIM-3.

En la presente memoria, las células de AML, las células de CML, las células de LLA, las células de LLC, las células de MDS, las células de mieloma múltiple, diversas células de linfoma, tales como el linfoma de linfocitos B, el linfoma de linfocitos T, el linfoma de linfocitos NK, incluyendo las células troncales de cáncer de las mismas.

La célula troncal de cáncer es una de las poblaciones de células que constituyen el tumor y está representada por la célula mioide Linaje(-)CD34(+)CD38(-). Otros nombres conocidos correspondientes a enfermedad son célula troncal tumoral, célula troncal de leucemia y similares.

Entre las células de tumor hematológico, las células de leucemia obtenidas de médula ósea de un paciente de leucemia (tales como células troncales de leucemia y células blásticas) pueden fraccionarse según un antígeno de diferenciación (marcador de linaje) y un marcador de superficie celular, tal como CD34 y CD38. La mayoría de las células troncales de leucemia residen en fracción celular Linaje(-)CD34(+)CD38(-). Por otra parte, la célula blástica se identifica morfológicamente. Aunque es una célula Linaje(-)CD34(+)CD38(+), también existe en diversos grupos celulares, incluyendo las fracciones celulares Linaje(-)CD34(+)CD38(-) y Linaje(-)CD34(-).

El anticuerpo de TIM-3 incluye un anticuerpo que se une a TIM-3 y modula la función o la actividad de TIM-3 *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo en un sujeto). En la memoria, el término "modular" y las variaciones gramaticales del mismo utilizadas en relación a la actividad o la función de TIM-3 se refieren a que la actividad o función de TIM-3 resulta detectablemente afectada, modificada o alterada. De acuerdo con lo anterior, el anticuerpo de TIM-3 que modula la actividad o la función de TIM-3 es un anticuerpo que proporciona influencia, modificación o alteración, de manera que puede detectarse una o más actividades o funciones de TIM-3, y dicha actividad o función de TIM-3 puede incluir, por ejemplo, la unión de TIM-3 a un ligando de TIM-3, una transducción de señales mediada por TIM-3 o una respuesta celular mediada por TIM-3 o una respuesta celular que puede modularse con TIM-3, o la actividad o función de otro TIM-3 indicado en la memoria, o en otro sitio, es comúnmente conocido o puede ser conocido.

Entre los ejemplos de diversas actividades y funciones de TIM-3 no limitadas que pueden modularse se incluyen la transducción de señales mediada por TIM-3 o la respuesta celular mediada por TIM-3, la respuesta celular que puede modularse mediante TIM-3, la proliferación celular o la expansión celular (por ejemplo células de AML, células de CML, células de LLA, células de LLC, células de MDS, células de mieloma múltiple, células de diversos linfomas, tales como linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T y linfomas de linfocitos NK, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides), la supervivencia celular o la muerte celular, tal como la apoptosis (por ejemplo células de AML, células de CML, células de LLA, células de LLC, células de MDS, células de mieloma múltiple, diversas células de linfoma, tales como los linfomas de linfocitos B, los linfomas de linfocitos T y los linfomas de linfocitos NK, monocitos, macrófagos, linfocitos T cooperadores, linfocitos citolíticos naturales, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides), citocinas (por ejemplo Th1, Th2 y citocinas no Th1/Th2) y la expresión o producción de interferón, la expresión o producción de proteína antiapoptosis o de proteína proapoptosis, el tratamiento, la supresión o la mejora de un trastorno, enfermedad, condición fisiológica, condición patológica o síntoma de los mismos. Las citocinas específicas que deben modularse no se encuentran limitadas y entre los ejemplos se incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-14, IL-16, IL-17, IL-23, IL-26, FNT- α e interferón γ (in vitro o in vivo). Las proteínas antiapoptosis y las proteínas proapoptosis específicas no se encuentran limitadas y entre los ejemplos se incluyen Bcl-xL, Bcl-2, Bad, Bim y Mcl-1.

Por lo tanto, entre los ejemplos del anticuerpo anti-TIM-3 descrito en la presente memoria se incluyen un anticuerpo que modula una o más transducciones de señales mediadas por TIM-3 o una respuesta celular mediada por TIM-3, una respuesta celular que puede ser inducida por TIM-3, la proliferación celular (por ejemplo células de AML, células de CML, células de LLA, células de LLC, células de MDS, células de mieloma múltiple, células de diversos linfomas,

tales como linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T y linfomas de linfocitos NK, monocitos, macrófagos, linfocitos T cooperadores, linfocitos citolíticos naturales, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides), supervivencia o apoptosis celular (por ejemplo células de AML, células de CML, células de LLA, células de LLC, células de MDS, células de mieloma múltiple, células de diversos linfomas, tales como linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T y linfomas de linfocitos NK, monocitos, macrófagos, linfocitos T cooperadores, linfocitos citolíticos naturales, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides), la expresión o producción de citocinas (por ejemplo Th1, Th2 y citocinas no Th1/Th2, IL-17, IL-23 e IL-26) e interferón (por ejemplo Th1, Th2 y no Th1/Th2, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-14, IL-16, IL-17, IL-23, IL-26, FNT- α , interferón γ y GM-CSF (*in vivo* o *in vitro*) y similares), la expresión de proteína antiapoptosis o de proteína proapoptosis (por ejemplo Bcl-xL, Bcl-2, Bad, Bim y Mcl-1), el tratamiento, la supresión o la mejora de un trastorno, enfermedad, condición fisiológica, condición patológica o síntoma. En formas de realización específicas, el anticuerpo anti-TIM-3 de la presente invención puede modular la expansión o la supervivencia de las células de AML, algunas otras células de tumor hematológico (por ejemplo células de CML, células de LLA, células de LLC, células de MDS, células de mieloma múltiple o células de diversos linfomas, tales como linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T y linfomas de linfocitos NK), el crecimiento o la supervivencia de células no tumorales hematológicas, tales como monocitos, células dendríticas, macrófagos, linfocitos T cooperadores, linfocitos citolíticos naturales, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides, y reduce, elimina o disminuye células de AML, células de CML, células de LLA, células de LLC, células de MDS, células de mieloma múltiple y células de diversos linfomas, tales como linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T y linfomas de linfocitos NK.

El anticuerpo de TIM-3 incluye una forma modificada, tal como un producto de sustitución (por ejemplo un producto de sustitución de aminoácidos) que también se denomina "variante", un producto de adición, un producto de delección (por ejemplo una subsecuencia o fragmento) o similares. Dichas formas de anticuerpo modificadas y variantes conservan por lo menos una función o actividad parcial del anticuerpo de TIM-3 mostrado por la invención, tal como la unión a TIM-3, o la modulación de la actividad o función (por ejemplo la transducción de señales) de TIM-3. De acuerdo con lo anterior, el anticuerpo de TIM-3 modificado puede conservar la capacidad de modular, por ejemplo, por lo menos la unión parcial de TIM-3 o una o más funciones o actividades de TIM-3 (por ejemplo la transducción de señales, la respuesta celular y similares).

Según la presente memoria, el término "alterar" ("modificar") y las variaciones gramaticales del mismo se refieren a que la composición deriva de una composición de referencia. Las proteínas, ácidos nucleicos y otras composiciones alterados pueden presentar actividades más altas o más bajas que una proteína, ácido nucleico u otra composición no modificada de referencia, o pueden presentar una función diferente de una proteína, ácido nucleico u otra composición no modificada de referencia.

Dicho anticuerpo que contiene una sustitución de aminoácido puede estar codificado por un ácido nucleico.

El término "identidad" o "idéntico" se refiere a que dos o más sustancias referenciadas son iguales. De acuerdo con lo anterior, en el caso de que dos secuencias de proteína (por ejemplo anticuerpos de TIM-3) sean idénticos, presentan la misma secuencia de aminoácidos por lo menos dentro de las regiones o porción referenciada. La expresión "región idéntica" se refiere a una región idéntica de dos o más sustancias referenciadas. De esta manera, en el caso de que dos secuencias de proteína sean idénticas a lo largo de una o más regiones de secuencia, presentan identidad dentro de las regiones. La expresión "identidad sustancial" se refiere a que una molécula está estructural o funcionalmente conservada, de manera que la molécula presenta, o se predice que presenta, una función o actividad por lo menos parcial de una o más funciones o actividades de molécula de referencia o región relevante/correspondiente o una porción de la molécula de referencia con la que comparte identidad. De esta manera, los polipéptidos que presentan identidad sustancial (por ejemplo anticuerpos de TIM-3) presentan, o se predice que presentan, por lo menos una parte de la actividad o función del polipéptido referenciado (por ejemplo el anticuerpo de TIM-3). Por ejemplo, en una forma de realización específica, se considera que un anticuerpo de TIM-3 que presenta una o más modificaciones (por ejemplo sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos) que conservan una actividad o función por lo menos parcial del anticuerpo de TIM-3 no modificado, presenta una identidad sustancial respecto al anticuerpo de TIM-3 de referencia.

Debido a las variaciones entre proteínas estructuralmente relacionadas y entre proteínas funcionalmente relacionadas, la cantidad de identidad de secuencia puede variar respecto a lo requerido para conservar funciones de la proteína, actividad de la proteína, función de la región, o actividad de la región. En el caso de las proteínas, puede conservarse una actividad o función mediante la presencia de meramente 30% de la identidad de secuencia de aminoácidos, aunque en general se encuentra presente una identidad superior a 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% respecto a la secuencia de referencia. El grado de identidad entre dos secuencias puede confirmarse utilizando un programa informático o un algoritmo matemático convencionalmente conocido del campo técnico. En dicho algoritmo, que calcula la proporción de identidades de secuencia (homologías), en general, se incluye consideración de los huecos y no correspondencias de secuencia a lo largo de la región de comparación. Por ejemplo, el algoritmo de recuperación BLAST (por ejemplo BLAST 2.0) (por ejemplo ver Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990, disponible públicamente de NCBI) presenta los parámetros de recuperación ilustrativos siguientes: no correspondencia -2; inicio de hueco: 5; elongación de hueco: 2. En la comparación de secuencias de polipéptido, típicamente se utiliza el algoritmo BLASTP en combinación con una matriz de puntuación, tal como PAM100,

PAM250, BLOSUM62, BLOSUM50. También se utiliza FASTA (por ejemplo FASTA2 y FASTA3) y similares, y el programa de comparación de secuencias SSEARCH para determinar el grado de identidad (Pearson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Pearson, *Methods Mol. Bio.* 132:185, 2000; y Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 147:195, 1981). Se ha desarrollado además un programa para determinar la similitud estructural entre proteínas utilizando el mapeado topológico basado en Delaunay (Bostick *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:320, 2003).

Una "sustitución conservadora" es una sustitución de un aminoácido por un residuo biológica, química o estructuralmente similar. La similitud biológica se refiere a que una actividad biológica, tal como la actividad de unión de TIM-3, no resulta destruida por la sustitución. La similitud estructural se refiere a que los aminoácidos presentan cadenas laterales de longitud similar (por ejemplo alanina, glicina y serina) o presentan un tamaño similar. La similitud química se refiere a que los residuos presentan la misma carga o ambos son hidrófilos o hidrófobos. Entre los ejemplos específicos se incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina y metionina, por otro residuo, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo, tal como la sustitución de arginina por lisina, la sustitución de ácido glutámico por ácido aspártico, o la sustitución de glutamina por asparagina, y la sustitución de serina por treonina.

Además, entre los ejemplos de anticuerpo modificado se incluyen miméticos peptídicos que presentan uno o más D-aminoácidos sustituidos por L-aminoácidos (y una mezcla de los mismos), análogos estructurales y funcionales, tales como aminoácidos sintetizados o no naturales o análogos de aminoácido, y formas derivatizadas de los mismos. Entre los ejemplos de modificación se incluyen una estructura cíclica, tal como un enlace amida extremo-con-extremo entre el extremo amino-terminal y carboxi-terminal de la molécula o un enlace disulfuro intramolecular o intermolecular.

Entre los ejemplos no limitativos específicos adicionales de modificaciones de aminoácidos se incluyen secuencias parciales (subsecuencias) y fragmentos de TIM-3. Entre las subsecuencias y fragmentos ejemplificativos de TIM-3 se incluyen una parte de la secuencia de TIM-3 al que se une el anticuerpo de TIM-3 ejemplificativo de la invención. Además, la subsecuencia y fragmento ejemplificativos de TIM-3 incluyen una región de inmunogenicidad, tal como una parte de TIM-3, a la que se une el anticuerpo de TIM-3 ejemplificativo de la invención.

La subsecuencia y fragmento de anticuerpo de TIM-3 puede presentar una afinidad de unión igual al anticuerpo de longitud completa, una especificidad de unión igual a la del anticuerpo de longitud completa o una o más actividades o funciones iguales a las del anticuerpo de longitud completa, tal como la función o la actividad de un anticuerpo antagonista o agonista de TIM-3. Las expresiones "subsecuencia funcional" y "fragmento funcional" en el caso de la referencia al anticuerpo se refieren a una parte del anticuerpo que conserva una o más funciones o actividades del anticuerpo de referencia de longitud completa, tal como por lo menos una parte de la función o actividad del anticuerpo de TIM-3. Por ejemplo, una subsecuencia de anticuerpo que se une a TIM-3 o a un fragmento de TIM-3 se considera una subsecuencia funcional.

La subsecuencia y fragmento de anticuerpo pueden combinarse. Por ejemplo, una subsecuencia de VL o VH puede conectarse mediante una secuencia conectora y puede formar de esta manera un cuerpo quimérico VL-VH. Puede conectarse una combinación de subsecuencias de Fv de cadena sencilla (scFv) mediante una secuencia conectora y de esta manera pueden formar un cuerpo quimérico scFv-scFv. La subsecuencia y fragmento de anticuerpo de TIM-3 incluyen un anticuerpo de cadena sencilla o región variable sola o en combinación con la totalidad o una parte de otra subsecuencia del anticuerpo de TIM-3.

La subsecuencia y fragmento de anticuerpo pueden prepararse mediante hidrólisis del anticuerpo mediante su proteólisis, por ejemplo mediante una digestión con pepsina o papaína del anticuerpo completo. La subsecuencia y fragmento de anticuerpo obtenidos mediante corte enzimático con pepsina proporciona un fragmento 5S representado por F(ab')₂. Este fragmento puede cortarse adicionalmente utilizando un agente reductor tiol para formar un fragmento monovalente 3.5S Fab'. Alternativamente, el corte enzimático con pepsina produce directamente dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.036.945 y nº 4.331.647, y Edelman *et al.*, *Methods Enzymol.* 1:422, 1967). Pueden utilizarse otros métodos de corte de un anticuerpo, tales como la separación de la cadena pesada para formar un fragmento monovalente cadena ligera-cadena pesada, el corte adicional del fragmento u otro procedimiento enzimático o químico.

Puede prepararse una proteína y un anticuerpo, así como una subsecuencia de los mismos, utilizando un procedimiento genético. La tecnología incluye un gen total o parcial codificante de una proteína o un anticuerpo expresado en una célula hospedadora, tal como una célula COS o de E. coli. Una célula hospedadora recombinante sintetiza la secuencia total o una subsecuencia, tal como scFv (tal como Whitlow *et al.*, en: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97, 1991; Bird *et al.*, *Science* 242:423, 1988, y patente US nº 4.946.778). Puede prepararse un Fv de cadena sencilla y un anticuerpo siguiendo el procedimiento descrito en las patentes US nº 4.946.778 y nº 5.258.498; Huston *et al.*, *Methods Enzymol.* 203:46, 1991; Shu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995, 1993; y Skerra *et al.*, *Science* 240:1038, 1988.

La forma modificada incluye una secuencia derivatizada, tal como aminoácidos en los que los grupos amino libres forman un grupo hidrocloreuro de amina, un grupo p-toluenosulfonilo y un grupo carbobenzoxi; los grupos carboxi

libres que forman una sal o éster de metilo y éster de etilo, y los grupos hidroxilo libres forman derivados O-acilo u O-alquilo, y derivados de aminoácidos presentes naturalmente, tales como 4-hidroxiprolina (derivado de la prolina), 5-hidroxilisina (derivado de la lisina), homoserina (derivado de la serina), ornitina (derivado de la lisina) y similares. La modificación puede llevarse a cabo utilizando un procedimiento conocido convencionalmente del campo técnico (por ejemplo la mutagénesis por delección o inserción específica de sitio basada en PCR, la modificación y mutagénesis químicas, el entrecruzamiento y similares).

Los productos de adición y los productos de inserción se encuentran incluidos en las formas modificadas de la proteína (por ejemplo el anticuerpo), ácido nucleico y otras composiciones. Por ejemplo, la adición puede ser un enlace covalente o no covalente con cualquier tipo de molécula de proteína (por ejemplo un anticuerpo), ácido nucleico u otras composiciones. En general, la adición y la inserción confieren una función o actividad diferente.

Los polipéptidos de fusión (quiméricos) o secuencias de ácidos nucleicos se encuentran incluidas en el producto de adición y el producto de inserción, y éstas son secuencias que presentan una o más moléculas que generalmente no se encuentran presentes en la secuencia nativa (de tipo salvaje) de referencia unidas covalentemente a la secuencia anteriormente indicada. Un ejemplo específico es una secuencia de aminoácidos de otra proteína (por ejemplo un anticuerpo) para producir una proteína multifuncional (por ejemplo un anticuerpo multiespecífico).

Además, el anticuerpo puede incluir un producto quimérico o de fusión en el que uno o más dominios adicionales se unen covalentemente al mismo con el fin de alterar una función o actividad diferente o complementaria. Entre los ejemplos del anticuerpo se incluyen un producto quimérico o de fusión que no se encuentra presente naturalmente y en el que dos o más secuencias de aminoácidos se encuentran unidas entre sí.

Puede insertarse una secuencia conectora entre la proteína (por ejemplo un anticuerpo), el ácido nucleico u otra composición y el producto de adición o el producto de inserción (por ejemplo un dominio heterólogo) de manera que las dos sustancias mantengan por lo menos una parte de una función o actividad diferente. La secuencia conectora puede presentar una o más propiedades que pueden acelerar cualquiera de los dominios o pueden llevar a cabo una reacción mutua con cualquiera de los dominios, y dichas características incluyen la imposibilidad de formar una estructura flexible y una estructura secundaria ordenada o una propiedad hidrófoba o una propiedad de carga. Entre los ejemplos de los aminoácidos que se encuentran generalmente en las regiones de proteína flexibles se incluyen glicina, asparagina y serina. También pueden utilizarse otros aminoácidos prácticamente neutros, tales como retonina y alanina, en la secuencia del conector. La longitud de la secuencia del conector puede modificarse (por ejemplo ver la patente US nº 6.087.329). El conector incluye además agentes de entrecruzamiento químico y agentes de unión (agentes de conjugación), tales como un derivado sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCG, sulfo-SMPB), suberato de disuccinimidilo (DSS), glutarato de disuccinimidilo (DSG) y tartrato de disuccinimidilo (DST).

Entre los ejemplos adicionales de la adición se incluyen cualquiera de entre glucosilación, ácido graso, lípido, acetilación, fosforilación, amidación, formilación, ubiquitinación y derivatización con un grupo protector o de bloqueo y un gran número de modificaciones químicas. Otras sustituciones y posibilidades podrán ser fácilmente entendidas por el experto en la materia.

Dicha secuencia modificada puede prepararse utilizando técnicas de ADN recombinante que median en la expresión celular o en la traducción *in vitro*. Las secuencias polipeptídicas y de ácidos nucleicos también pueden prepararse mediante un procedimiento conocido convencionalmente del campo técnico, tal como la síntesis química utilizando un sintetizador automático de péptidos (ver, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los anticuerpos modificados y variantes, tales como los productos de sustitución, los productos de adición de subsecuencias y similares, pueden mantener una actividad detectable del anticuerpo de TIM-3. En una forma de realización, el anticuerpo modificado presenta la actividad de unión a la molécula de TIM-3 e induce la reducción o la eliminación de las células de expresión de TIM-3 por un sistema inmunológico centrado principalmente en una célula efectora. El anticuerpo modificado se refiere al control funcional de las células que expresan TIM-3 e induce la supervivencia, el crecimiento, el reposo, la muerte celular y similares de las células. La muerte celular incluye la apoptosis, la necrosis, la autofagia y similares.

Se describe además un procedimiento no celular (por ejemplo en una solución o mediante una fase sólida) y un procedimiento celular (por ejemplo *in vivo* o *in vitro*) para cribar, detectar e identificar TIM-3. Estos métodos pueden llevarse a cabo en una solución *in vitro* utilizando un biomaterial o muestra e *in vivo*, por ejemplo utilizando una muestra de una célula de origen animal (por ejemplo un linfocito). El procedimiento puede comprender una etapa de puesta en contacto de un biomaterial o muestra con un anticuerpo de unión a TIM-3 bajo condiciones que permitan la unión del anticuerpo a TIM-3 y una etapa de ensayo de unión del anticuerpo a TIM-3. La presencia de TIM-3 se detecta mediante la unión del anticuerpo a TIM-3. TIM-3 puede encontrarse presente en una célula o tejido. El biomaterial o muestra anteriormente indicado puede obtenerse un analito de mamífero.

La expresión "puesta en contacto" utilizada en relación a la composición, tal como una proteína (por ejemplo un anticuerpo de TIM-3), un material, una muestra o un tratamiento se refiere a una interacción directa o indirecta entre la composición (por ejemplo un anticuerpo de TIM-3) y otra sustancia referenciada. Entre los ejemplos específicos de

la interacción directa se incluyen la unión. Entre los ejemplos específicos de interacción indirecta se incluyen un caso en el que la composición actúa sobre una molécula intermediaria y esta molécula intermediaria a continuación actúa sobre la sustancia referenciada. De acuerdo con lo anterior, por ejemplo poner en contacto una célula (por ejemplo un linfocito) con el anticuerpo de TIM-3 incluye el anticuerpo que se une a la célula (por ejemplo mediante la unión a TIM-3) o permitir que el anticuerpo actúe sobre una sustancia intermediaria, seguido de la acción de dicha sustancia intermediaria sobre la célula.

Las expresiones "someter a ensayo" y "medir" y las variaciones gramaticales de los mismos se utilizan como sinónimas en la memoria y se refieren a la medición cualitativa y a la medición cuantitativa o a ambas, la medición cualitativa y la medición cuantitativa. En el caso de que estas expresiones se utilicen en relación a la unión, incluyen cualesquiera medios de evaluar la cantidad relativa, la afinidad o la especificidad de unión, incluyendo diversos métodos que se describen en la memoria y que son convencionalmente conocidos del campo técnico. Por ejemplo, la unión del anticuerpo de TIM-3 a TIM-3 puede someterse a ensayo o medirse mediante un ensayo de citometría de flujo.

(Preparación de anticuerpo)

La memoria describe un procedimiento para preparar un anticuerpo de TIM-3 humano que presenta una citotoxicidad positiva para TIM-3. El procedimiento puede comprender administrar una región extracelular de TIM-3 humana conjugada con una proteína recombinante Fc humana o una célula con un gen TIM-3 introducido, en animales capaces de expresar la inmunoglobulina humana (por ejemplo ratones transgénicos o vacas transgénicas); cribar el animal para la expresión de un anticuerpo anti-TIM-3 humano, seleccionar un animal que produce el anticuerpo anti-TIM-3 humano, aislar el anticuerpo a partir del animal seleccionado y decidir si el anticuerpo anti-TIM-3 humano presenta o no actividad antagonista de TIM-3.

La proteína TIM-3 adecuada para la preparación de anticuerpos puede producirse mediante uno cualquiera de entre diversas técnicas estándares de purificación de proteínas y de expresión recombinante. Por ejemplo, la secuencia de TIM-3 puede prepararse mediante técnicas estándares de síntesis de péptidos, tales como la síntesis en fase sólida. Con el fin de facilitar la purificación de la proteína expresada o sintetizada, una parte de la proteína puede contener una secuencia de aminoácidos, tal como una etiqueta FLAG, una etiqueta de T7, una secuencia polihistidina o similares. La proteína se expresa en el interior de las células y puede purificarse. La proteína puede expresarse mediante un método de recombinación como parte de una proteína grande adicional (por ejemplo una fusión o producto quimérico). La forma de realización de TIM-3 adecuada para generar una respuesta inmunológica incluye subsecuencias de TIM-3, tal como un fragmento inmunogénico. Las formas de realización adicionales de TIM-3 incluyen una célula que expresa TIM-3, una preparación que contiene TIM-3 o un extracto o fracción celular y un TIM-3 parcialmente purificado.

El procedimiento para preparar un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal es convencionalmente conocido del campo técnico. Por ejemplo, TIM-3 o su fragmento inmunogénico utilizado para inmunizar un animal mediante la conjugación opcional con un portador, tal como hemocianina de lapa americana (HLA) u ovalbúmina (por ejemplo BSA) o la mezcla con un adyuvante, tal como adyuvante de Freund completo o incompleto. Tras el aislamiento de una célula de bazo derivada de un animal inmunizado que responde a TIM-3, puede fusionarse con una célula de mieloma utilizando técnicas de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas pueden cribarse para reactividad con TIM-3 o con un fragmento inmunogénico de la misma.

El animal que puede inmunizarse incluye los primates, el ratón, la rata, el conejo, la cabra, la oveja, la vaca y el cobaya. La inmunización inicial y cualquier inmunización opcionalmente posterior puede llevarse a cabo mediante vía intravenosa, vía intraperitoneal, vía intramuscular o vía subcutánea. Además, con el fin de incrementar la respuesta inmunológica, el antígeno puede conjugarse con otra proteína, tal como ovalbúmina, hemocianina de lapa americana (HLA), tiroglobulina y toxoide tetánico, o puede mezclarse con un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund y similar. La inmunización inicial y cualquier inmunización opcional posterior puede llevarse a cabo mediante vía intraperitoneal, vía intramuscular, vía intraocular o vía subcutánea. La inmunización puede llevarse a cabo a la misma concentración o a una concentración diferente de una preparación de TIM-3 y a intervalos regulares o irregulares.

El animal incluye aquellos que están modificados genéticamente para incluir loci humanos y puede prepararse un anticuerpo humano utilizando los mismos. Los ejemplos de animales transgénicos con uno o más genes de inmunoglobulina humana se describen, por ejemplo, en la patente US nº 5.939.598 y en los documentos nº WO02/43478 y nº WO02/092812. Mediante la utilización de la técnica convencional del hibridoma, se aíslan células de bazo a partir de ratones inmunizados que presentan altos respondedores al antígeno y se fusionan con la célula de mieloma. Puede obtenerse un anticuerpo monoclonal que se une a TIM-3.

El procedimiento para producir un anticuerpo policlonal humano y un anticuerpo monoclonal humano se describe adicionalmente (ver, por ejemplo, Kuroiwa *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 20:889, 2002; documentos nº WO98/24893, nº WO92/01047, nº WO96/34096, nº WO96/33735; patentes US nº 5.413.923, nº 5.625.126, nº 5.633.425, nº 5.569.825, nº 5.661.016, nº 5.545.806, nº 5.814.318, nº 5.885.793, nº 5.916.771 y nº 5.939.598.

El término "humano" en el caso de que se utilice en referencia a un anticuerpo se refiere a que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo es una secuencia de aminoácidos completamente humana, es decir, las regiones variables de la cadena pesada humana y de la cadena ligera humana y de la región constante humana. De acuerdo con lo anterior, la totalidad de los aminoácidos son aminoácidos humanos o se encuentran presentes en el anticuerpo humano. Un anticuerpo que es un anticuerpo no humano puede convertirse en un anticuerpo completamente humano mediante la sustitución de los residuos aminoácidos no humanos por los residuos aminoácidos que se encuentran presentes en el anticuerpo humano. Los residuos aminoácidos que se encuentran presentes en el anticuerpo humano, el mapa de la región CDR y los residuos de consenso del anticuerpo humano son bien conocidos del campo técnico (ver, por ejemplo, Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4a edición, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1987; Chothia y Lesk, 1987). Una secuencia de consenso de la VH humana subgrupo III basada en la investigación realizada con 22 secuencias de VH humana III conocidas como secuencia objetivo y una secuencia de consenso de cadena k de VL humana subgrupo I basada en la investigación realizada con 30 secuencias conocidas de cadena k I humana como las secuencias objetivo se describen en Padlan, *Mol. Immunol.* 31:169, 1994, y en Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991. De acuerdo con lo anterior, el anticuerpo humano incluye un anticuerpo en el que uno o más residuos aminoácidos han sido sustituidos por uno o más aminoácidos existentes en otro anticuerpo humano opcional.

Entre los ejemplos del anticuerpo anti-TIM-3 se incluyen anticuerpos preparados utilizando un procedimiento conocido del campo técnico, tal como la injertación de CDR (patente EP nº 239.400, documento nº WO91/09967, y patentes US nº 5.225.539, nº 5.530.101 y nº 5.585.089), la remodelación o la reconstrucción de la superficie (patentes EP nº 592.106 y nº 519.596; Padlan, *Molecular Immunol.* 28:489, 1991; Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7:805, 1994; Roguska *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:969, 1994) y el barajado de cadenas (patente US nº 5.565.332). Con el fin de producir un anticuerpo humanizado, se ha utilizado una secuencia de consenso humana (Padlan, *Mol. Immunol.* 31:169, 1994, y Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991) (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992, y Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623, 1993).

El término "humanizado" en el caso de que se utilice en relación a un anticuerpo se refiere a que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo presenta uno o más residuos aminoácidos no humanos (por ejemplo de ratón, rata, cabra, conejo y similar) de región determinante de complementariedad (RDC) que se unen específicamente a un antígeno deseado en una molécula aceptora de inmunoglobulina humana y uno o más residuos aminoácidos humanos (residuos aminoácidos que están flanqueados por CDR) en la región marco (RM) de Fv. El anticuerpo denominado "primatizado" se encuentra dentro del significado de "humanizado", excepto en que los residuos aminoácidos de la molécula aceptora de inmunoglobulina humana y de la región marco pueden ser residuos aminoácidos de cualquier primate (por ejemplo de mono, gibón, gorila, chimpancé, orangután o macaco) además de cualesquiera residuos humanos. Los residuos de la RM humana de inmunoglobulina pueden sustituirse por los residuos no humanos correspondientes. De acuerdo con lo anterior, por ejemplo con el fin de alterar, generalmente para mejorar, la afinidad o la especificidad del antígeno, los residuos en la CDR o en la región marco humana pueden sustituirse por residuos de la CDR o de la región marco del anticuerpo donante. El anticuerpo humanizado puede contener residuos que pueden no encontrarse en el anticuerpo humano ni en la CDR o en la secuencia marco donante. Por ejemplo, puede predecirse que la sustitución de la RM en una posición particular que no puede encontrarse en el anticuerpo humano o anticuerpo no humano donante podría mejorar la afinidad de unión del anticuerpo humano específico en dicha posición. Las sustituciones de marco y de CDR del anticuerpo basadas en el modelaje molecular son convencionalmente conocidas del campo técnico, por ejemplo mediante el modelaje de la interacción de los residuos de la CDR y del marco con el fin de identificar los residuos de marco importantes para la unión de antígeno y la comparación entre secuencias para identificar los residuos de marco no habituales en la posición específica (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.585.089, y Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323, 1988).

Los anticuerpos quiméricos se encuentran incluidos en el anticuerpo de TIM-3. Según la presente memoria, el término "quimérico" y las variaciones gramaticales del mismo en el caso de que se utilice en relación a anticuerpos se refiere a que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo contiene una o más porciones que se derivan de dos o más especies diferentes, a que se obtiene o se aísla a partir de dos o más especies diferentes o a que se basa en dos o más especies diferentes. Por ejemplo, una parte del anticuerpo puede ser humana (por ejemplo la región constante) y otra porción del anticuerpo puede ser no humana (por ejemplo, una región variable de cadena pesada de ratón o de cadena ligera de ratón). De acuerdo con lo anterior, un ejemplo del anticuerpo quimérico incluye un anticuerpo en el que la porción diferente del anticuerpo se deriva de una especie diferente. A diferencia del anticuerpo humanizado o primatizado, el anticuerpo quimérico puede presentar una secuencia de una especie diferente en una región arbitraria del anticuerpo.

El procedimiento para producir un anticuerpo quimérico es conocido en el campo técnico (tal como Morrison, *Science* 229:1202, 1985; Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214, 1986; Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125:191, 1989; patentes US nº 5.807.715, nº 4.816.567 y nº 4.816.397). Por ejemplo, en Munro, *Nature* 312:597, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312:604, 1984; Sharon *et al.*, *Nature* 309:364, 1984; Morrison *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:6851, 1984; Boulianne *et al.*, *Nature* 312:643, 1984; Capon *et al.*, *Nature* 337:525, 1989; y Trautnecker *et al.*, *Nature* 339:68, 1989, un anticuerpo quimérico en el que una región variable de anticuerpo derivada de una especie se sustituye por una región variable de anticuerpo derivada de otra especie.

Además, el anticuerpo anti-TIM-3 puede prepararse mediante la técnica del hibridoma, la técnica recombinante y al técnica de expresión fágica, y una combinación de las mismas (ver las patentes US nº 4.902.614, nº 4.543.439 y nº 4.411.993, y también ver *Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn y Bechtol *et al.*, 1980, y Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, segunda edición, 1988).

El anticuerpo humano anti-TIM-3 humano de la invención se produjo utilizando ratones con transferencia de cromosoma (ratones KM (marca comercial)) inmunizados con diversas formas de la forma soluble de proteínas TIM-3 humanas recombinantes o cepas celulares que expresaban TIM-3 (documentos nº WO02/43478 y nº WO02/092812, e Ishida *et al.*, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting, resumen, 2000)). El anticuerpo humano antihumano no puede teñir una línea celular parental no transfectada pero sí puede teñir una línea celular establemente transfectada con TIM-3 humana, tal como células Jurkat-TIM-3 y células L929-TIM-3.

El anticuerpo puede presentar una secuencia de cadena ligera κ o una secuencia de cadena ligera λ , la longitud completa de cualquiera de ellas tal como se encuentran presentes en el anticuerpo existente naturalmente, una mezcla de los mismos (es decir, un producto de fusión de secuencia de cadena κ y secuencia de cadena λ) y subsecuencias/fragmentos de los mismos. Las moléculas de anticuerpo presentes naturalmente contiene dos cadenas ligeras κ o dos cadenas ligeras λ .

Además, el anticuerpo de TIM-3 humano incluye un anticuerpo que se une específicamente a TIM-3 y no inhibe o evita la unión del anticuerpo de rata anti-TIM-3 humano 344823 (fabricado por R&D Systems, nº de catálogo MAB2365 o FAB2365P).

Además, el anticuerpo anti-TIM-3 humano incluye un anticuerpo que se une específicamente a TIM-3 e inhibe la unión del otro anticuerpo anti-TIM-3 humano o no inhibe la unión de los otros anticuerpos anti-TIM-3 humano.

El procedimiento para producir un anticuerpo que se une específicamente a TIM-3 puede proporcionarse de la manera siguiente. El procedimiento puede incluir la administración de un TIM-3 humano, subsecuencia o fragmento (tal como una región extracelular de TIM-3) conjugado con proteína recombinante Fc humana en un animal capaz de expresar inmunoglobulina humana (por ejemplo ratones transgénicos o vacas transgénicas); cribar el animal para la expresión de anticuerpo de TIM-3 humano; seleccionar un animal que produce un anticuerpo de TIM-3 humano; aislar un anticuerpo a partir del animal seleccionado. Mediante la utilización de dicho procedimiento puede determinarse si el anticuerpo anti-TIM-3 humano presenta actividad antagonista o agonista de TIM-3.

La memoria describe además métodos para producir anticuerpos de TIM-3 humanos que inhiben o evitan la unión de TIM-3 a ligando de TIM-3 (TIM-3L). El procedimiento puede incluir la administración de TIM-3, una subsecuencia o fragmento (tal como la región extracelular de TIM-3) conjugado con proteína recombinante Fc humana en un animal capaz de expresa inmunoglobulina humana (por ejemplo un ratón transgénico o una vaca transgénica); cribar el animal para la expresión de anticuerpo de TIM-3 humano; seleccionar un animal que produce un anticuerpo de TIM-3 humano; aislar un anticuerpo a partir del animal seleccionado. Mediante la utilización de dicho procedimiento puede determinarse si el anticuerpo de TIM-3 humano inhibe o evita la unión de TIM-3 a ligando de TIM-3 (TIM-3L).

Como procedimiento para el control de la actividad efectora del anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 de la invención, entre los ejemplos se incluyen un procedimiento que controla la cantidad de fucosa (también denominada fucosa nuclear) que se une a N-acetilglucosamina (GlcNAc) mediante enlace α -1,6 en un extremo reductor de una cadena sacárida de tipo complejo unida a N que se encuentra unida a asparagina (Asn) en la posición 297 de una región Fc de un anticuerpo (documentos nº WO2005/035586, nº WO2002/31140, nº WO00/61739), un procedimiento en el que se controla mediante la modificación de los residuos aminoácidos de la región Fc del anticuerpo, y similares. La actividad efectora puede controlarse mediante la aplicación de cualquiera de dichos métodos al anticuerpo monoclonal anti-TIM-3.

La actividad efectora se refiere a una actividad dependiente de anticuerpos inducida mediante la región Fc del anticuerpo, y se conoce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad de ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (actividad de CDC), fagocitosis dependiente de anticuerpos (actividad de FDA) por fagocitos tales como macrófagos y células dendríticas, y similares.

Mediante el control del contenido de fucosa nuclear de la cadena sacárida de tipo complejo unida N-ligada de Fc del anticuerpo, puede incrementarse o reducirse la actividad efectora del anticuerpo. Como procedimiento para reducir el contenido de la fucosa que se une a la cadena sacárida de tipo complejo N-ligada que se une a Fc del anticuerpo, puede mencionarse la defucosilación. La defucosilación es la expresión de un anticuerpo utilizando una célula CHO a partir de la que se delecta el gen α 1,6-fucosa-transferasa y puede obtenerse un anticuerpo al que no se encuentra unida la fucosa. El anticuerpo al que no se encuentra unido la fucosa presenta una actividad de ADCC elevada. Por otra parte, como procedimiento para incrementar el contenido de fucosa que se une a la cadena sacárida de tipo complejo N-ligada al que se encuentra unido Fc del anticuerpo, puede obtenerse el anticuerpo al que se encuentra unido la fucosa mediante la expresión del anticuerpo utilizando una célula hospedadora en la que

se introduce un gen α 1,6-fucosa-transferasa. El anticuerpo al que se encuentra unido la fucosa presenta una actividad de ADCC más baja que la del anticuerpo al que no se encuentra unido la fucosa.

Además, la actividad de ADCC y la actividad de CDC puede incrementarse o reducirse mediante la modificación de los residuos aminoácidos de Fc de un anticuerpo. Por ejemplo, la actividad de CDC del anticuerpo puede incrementarse mediante la utilización de la secuencia de aminoácidos de la región Fc indicada en el documento nº US2007/0148165. Además, la actividad de ADCC o la actividad de CDC puede incrementarse o reducirse llevando a cabo la modificación de aminoácido indicada en las patentes US nº 6.737.056, nº 7.297.775 y nº 7.317.091.

Además, un anticuerpo en el que se controla la actividad efectora del anticuerpo puede obtenerse mediante la utilización de los métodos anteriormente indicados en combinación en un anticuerpo.

El ácido nucleico puede presentar diversas longitudes. La longitud del ácido nucleico codificante del anticuerpo de TIM-3 de la presente invención o subsecuencia del mismo generalmente presenta entre aproximadamente 100 y 600 nucleótidos, o cualquier valor o intervalo numérico comprendido dentro del intervalo anteriormente indicado: 100 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 350, 350 a 400, 400 a 450, 450 a 500, 500 a 550 o 550 a 600 nucleótidos de longitud, o cualquier valor o intervalo numérico o valor comprendido dentro o que comprende dicha longitud en los intervalos anteriormente indicados. Entre los ejemplos de longitud del ácido nucleico que se hibrida específicamente con el ácido nucleico codificante del anticuerpo de TIM-3 de la presente invención o subsecuencia del mismo se incluye de manera general 10 a 20, 20 a 30, 30 a 50, 50 a 100, 100 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 400, 400 a 500, 500 a 600 nucleótidos o cualquier valor o intervalo numérico comprendido en los intervalos anteriormente indicados.

Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refieren a por lo menos dos o más pares de bases (nucleótidos) de ácidos ribonucleicos o desoxirribonucleicos unidos mediante enlaces fosfoéster o similares. El ácido nucleico incluye polinucleótidos y polinucleósidos. El ácido nucleico incluye una molécula única, una doble molécula, una triple molécula, una molécula circular o una molécula lineal. Entre los ejemplos del ácido nucleico se incluyen ARN, ADN, ADNc, un ácido nucleico genómico, un ácido nucleico existente naturalmente y un ácido nucleico no natural, tal como un ácido nucleico sintético, aunque no se encuentran limitados. Los ácidos nucleicos y polinucleótidos cortos (por ejemplo de 10 a 20, 20 a 30, 30 a 50 o 50 a 100 nucleótidos) se denominan comúnmente "oligonucleótidos" o "sondas" de ADN de cadena sencilla o de doble cadena.

El ácido nucleico puede prepararse utilizando diversas técnicas estándares de clonación y técnicas de síntesis química. Entre los ejemplos de las técnicas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la amplificación de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con dianas de ADN genómico o ADNc utilizando cebadores (por ejemplo una mezcla de cebadores degenerados) que pueden hibridarse con una secuencia codificante de anticuerpos. Además, el ácido nucleico también puede prepararse mediante síntesis química (por ejemplo síntesis de fosfoamidita en fase sólida) o la transcripción a partir de un gen. La secuencia preparada puede expresarse en una célula (por ejemplo una célula hospedadora, tal como una levadura, bacteria o eucariota (una célula animal o de mamífero o vegetal) después de traducirse *in vitro* o clonarse en un plásmido y después amplificarse.

El vector es un vehículo que puede manipularse mediante inserción o incorporación de un ácido nucleico. Entre los ejemplos del vector se incluyen un vector plásmido, un vector virus, un vector procariota (bacteria) y un vector eucariota (planta, hongo, mamífero). El vector puede utilizarse para la expresión *in vitro* o *in vivo* de un ácido nucleico. Dicho vector se denomina "vector de expresión" resulta útil para la transferencia de un ácido nucleico, incluyendo un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de TIM-3 o su subsecuencia o fragmento y la expresión de una proteína codificada, *in vitro* (por ejemplo en una solución o sobre una fase sólida) o por una célula o *in vivo* en un sujeto.

Además, el vector también puede utilizarse para la manipulación de ácidos nucleicos. Para la manipulación genética, un ácido nucleico insertado puede transcribirse o traducirse utilizando un "vector de clonación" *in vitro* (por ejemplo en una solución o sobre una fase sólida), en una célula o *in vivo* en un sujeto.

En general, el vector contiene un origen de replicación para la amplificación en una célula *in vitro* o *in vivo*. Pueden incluirse elementos de control tales como un elemento de control de la expresión presente en el vector, con el fin de facilitar la transcripción y la traducción, en caso necesario.

Un vector puede incluir un marcador de selección. El "marcador de selección" es un gen que permite la selección de una célula que contiene el gen. La expresión "selección positiva" se refiere al procedimiento de selección de una célula que contiene el marcador de selección, debido a una selección positiva. La resistencia a fármaco es un ejemplo del marcador de selección positiva, y una célula que contiene el marcador sobrevivirá en el medio de cultivo que contiene el fármaco y una célula que no contenga el marcador morirá. Entre los ejemplos del marcador de selección se incluyen genes de resistencia a fármaco, tales como neo, que proporcionan resistencia a G418; *hygr*, que proporciona resistencia a la higromicina; puro, que proporciona resistencia a la puromicina, y similares. Entre

otros marcadores de selección positiva se incluyen genes que permiten la identificación o cribado de una célula que contiene el marcador. Entre los ejemplos de estos genes se incluyen un gen de proteína fluorescente (PFG y cromóforo de tipo PFG, luciferasa), gen *lacZ*, gen de fosfatasa alcalina y un marcador de superficie, tal como CD8. La expresión "selección negativa" se refiere a un procedimiento para eliminar células que contienen marcadores de selección negativa mediante exposición a una gente de selección negativa apropiado. Por ejemplo, una célula que contiene un gen de timidina cinasa del virus del herpes simple (VHS-tk) (Wigler *et al.*, Cell 11:223, 1977) es sensible al fármaco ganciclovir (GANC). De manera similar, el gen *gpt* provoca que una célula sea sensible a la 6-tioxantina.

El vector virus incluye aquellos que se basan en retrovirus (un lentivirus que infecta no sólo células en división sino también células que no están en división), virus espumoso (patentes US nº 5.624.820, nº 5.693.508, nº 5.665.577, 6.013.516 y nº 5.674.703; documentos nº WO92/05266 y nº WO92/14829), adenovirus (patentes US nº 5.700.470, nº 5.731.172 y nº 5.928.944), virus adenoasociado (VAA) (patente US nº 5.604.090), un vector virus herpes simple (patente US nº 5.501.979), un vector sistema citomegalovirus (CMV) (patente US nº 5.561.063), reovirus, genoma de rotavirus, virus 40 del simio (SV40) o virus del papiloma (Cone *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6349, 1984; Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, editado por Gluzman, 1982; Sarver *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1:486, 1981; patente US nº 5.719.054). Los adenovirus infectan eficientemente una célula en replicación lenta y/o terminalmente diferenciada y pueden utilizarse dirigidos a células en replicación lenta y/o células diferenciadas terminalmente. Entre los ejemplos adicionales de vectores víricos útiles para la expresión se incluyen parvovirus, virus Norwalk, coronavirus, paramixovirus y rabdovirus, togavirus (virus Sindbis y virus del bosque de Semliki) y virus de la estomatitis vesicular (VEV).

Un vector que comprende un ácido nucleico puede expresarse al conectar el ácido nucleico con elementos de expresión de manera que funcione. La expresión "conectado de manera que funcione" (ligado de manera funcional) se refiere a que una relación física o funcional entre los elementos a los que se hace referencia permite que operen del modo pretendido. De acuerdo con lo anterior, el ácido nucleico "ligado funcionalmente" a un elemento de control de la expresión se refiere a que el elemento de control modula la transcripción de los ácidos nucleicos y, según resulte apropiado, la traducción del producto de transcripción.

La expresión "elemento de control de la expresión" o "secuencia de control de la expresión" se refiere a un polinucleótido que influye sobre la expresión de un ácido nucleico ligado funcionalmente. Los promotores e intensificadores son ejemplos específicos no limitativos de elementos y secuencias de control de la expresión. El "promotor" es una región reguladora del ADN de acción en cis que puede iniciar la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos cadena abajo (en dirección 3'). En el promotor está incluido un nucleótido que acelera el inicio de la transcripción. El intensificador regula también la expresión de los ácidos nucleicos aunque actúa a cierta distancia del sitio de inicio de la transcripción del ácido nucleico al que se encuentra ligado funcionalmente. En el caso de que el intensificador se encuentre presente en el extremo 5' o 3' del ácido nucleico, así como también dentro del ácido nucleico (por ejemplo el intrón o secuencia codificante), funciona adicionalmente el intensificador. Entre los ejemplos adicionales de elemento de control de la expresión se incluyen una secuencia líder una secuencia de pareja de fusión, un elemento de sitio interno de entrada ribosómica (SIER) para preparar el mensaje multigénico o policistrónico, la señal de procesamiento del intrón, el mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción dentro del marco del ARNm y la señal de poliadenilación, que produce la poliadenilación correcta del producto de transcripción de interés, y codones de parada.

Entre los ejemplos del elemento de control de la expresión se incluyen un elemento "constitucional" en el que la transcripción de un ácido nucleico ligado funcionalmente se produce en ausencia de señales o estímulos. El elemento de control de la expresión que confiere la expresión en respuesta a una señal o estímulo y que incrementa o reduce la expresión del ácido nucleico ligado funcionalmente es "ajustable". El elemento ajustable que incrementa la expresión del ácido nucleico ligado funcionalmente en respuesta a una señal o estímulo se denomina "elemento inducible". El elemento ajustable que reduce la expresión del ácido nucleico ligado funcionalmente en respuesta a una señal o estímulo se denomina "elemento represor" (es decir, la señal reduce la expresión, y la expresión se incrementa al eliminar la señal o en caso de no hallarse presente).

Entre los ejemplos del promotor constitucional para la expresión bacteriana se incluyen un promotor inductor, tal como T7 y pL, plac, ptrp y ptac (promotor híbrido ptrp-lac) del bacteriófago λ y similares. Para los sistemas de células de insecto, puede utilizarse un promotor constitucional o inducible (por ejemplo ecdisona). El promotor constitucional para las levaduras incluye un promotor inductor tal como ADH, LEU2, GAL y similares (ver, por ejemplo, Ausubel *et al.*, en: *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 2, capítulo 13, Greene Publish. Assoc. y Wiley InterScience edition, 1988; Grant *et al.*, en: *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987; Wu y Grossman, Acad. Press, N.Y., 1987; Glover, *DNA Cloning*, vol. 11, capítulo 3, IRL Press, Wash., D.C., 1986; Bitter, en: *Methods in Enzymology* 152:673-684, 1987, editado por Berger y Kimmel, Acad. Press, N.Y., y Strathern *et al.*, *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, editado por Cold Spring Harbor Press, vol. 1 y vol. 11, 1982).

Para la expresión en mamíferos, puede utilizarse un promotor constitucional derivado de un virus o de otro origen. Por ejemplo, pueden utilizarse promotores inducibles derivados del CMV, SV40 o de una secuencia repetida terminal larga (RTL) vírica, o del genoma de una célula de mamífero (por ejemplo el promotor IIA de metalotioneína, el promotor de choque térmico, el elemento de respuesta de esteroide/hormona tiroidea/ácido retinoico) o virus de

mamífero (por ejemplo promotor tardío adenovírico, RTL de virus del cáncer de mama de ratón).

Entre los ejemplos de elemento de control de la expresión se incluye un elemento que se encuentra activo en un tejido o tipo celular específico, y dicho elemento se denomina "elemento de control de la expresión específico de tejido". En general, un elemento de control de la expresión específico de tejido es más activo en células o tipos de tejido específicos, y ello se debe a que este elemento de control de la expresión específico de tejido resulta reconocido por una proteína activadora de la transcripción que está activa en las células o tipos de tejido específicos o por otro factor de transcripción, en comparación con otras células o tipos de tejido. Son ejemplos específicos no limitativos de dicho elemento de control de la expresión, la hexoquinasa II, COX-2, la α -fetoproteína, el antígeno carcinoembrionario, DE3/MUC1, el antígeno específico prostático, C-erbB2/neu, el polipéptido estimulante de la secreción de insulina dependiente de glucosa (PIG), la transcriptasa inversa telomerasa y un promotor tal como el promotor sensible a la hipoxia.

Se describe una célula hospedadora transformada o transfectada con un ácido nucleico o vector de TIM-3. Entre los ejemplos de células hospedadoras se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, células procarióticas y células eucarióticas, tales como bacterias, hongos (levaduras) y células vegetales, de insecto y de animal (por ejemplo de mamíferos tales como primates, seres humanos y similares). Entre los ejemplos no limitativos de célula transformada se incluyen una bacteria transformada con un ácido nucleico de bacteriófago recombinante, un vector de expresión de ácido nucleico plasmídico o cosmídico, una levadura transformada con un vector de expresión de levadura recombinante, una célula vegetal infectada con un vector de expresión vírico recombinante (por ejemplo el virus del mosaico de la coliflor, VMC; el virus del mosaico del tabaco, VMT) o transformada con un vector de expresión plásmido recombinante (por ejemplo el plásmido Ti); una célula inestable infectada por un vector de expresión virus recombinante (por ejemplo baculovirus), y una célula animal infectada por un vector de expresión virus recombinante (por ejemplo retrovirus, adenovirus, virus Vaccinia) o una célula animal transformada manipulada para la expresión estable. Una célula CHO es un ejemplo no limitativo de una célula hospedadora de mamífero que expresa un anticuerpo de TIM-3 y una subsecuencia y fragmento del mismo. La célula hospedadora puede ser una pluralidad o población de células de una cepa aislada de célula primaria, una célula secundaria aislada o una célula subcultivada, o una línea celular establecida o un cultivo celular inmortalizado.

La expresión "estar transformado" o "estar transfectado" utilizada en referencia a una célula (por ejemplo una célula hospedadora) o un organismo se refiere a un cambio de gen en una célula tras la incorporación de una molécula exógena, tal como una proteína o un ácido nucleico (por ejemplo un transgén) en la célula. De acuerdo con lo anterior, la célula "transfectada" o "transformada" es una célula en la que se introduce la molécula exógena de manera artificial, por ejemplo utilizando técnicas de ADN recombinante o progenie de la misma.

El ácido nucleico o proteína puede transfectarse o transformarse (expresarse) en la célula o progenie de la misma estable o temporalmente. La proteína introducida puede ser expresada mediante el cultivo de la célula o mediante transcripción del ácido nucleico. Debido a que existe la posibilidad de que se produzca una mutación durante la replicación, existe el caso de que progenie de la célula transfectada o transformada no sea idéntica a la célula parental.

En general, se utiliza un vector en la transfección o transformación celular. El vector puede incluirse en una partícula vírica o vesícula y opcionalmente puede adaptarse a las demandas de tipos celulares específicos mediante la inclusión de una proteína sobre la superficie de la partícula o vesícula que se une a un ligando o receptor celular diana. De acuerdo con lo anterior, puede utilizarse una célula como diana mediante la preparación de la partícula vírica o vesícula misma o la proteína de superficie vírica, con el propósito de la transfección o transformación *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por lo tanto, el vector incluye técnicas de administración *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* de vectores víricos y no víricos en una célula, tejido u órgano.

Además, la introducción de un ácido nucleico en una célula diana (por ejemplo una célula hospedadora) también puede llevarse a cabo mediante un procedimiento convencionalmente conocido en el campo técnico, tal como el choque osmótico (por ejemplo con fosfato de calcio), la electroporación, la microinyección, la fusión celular y similares. La introducción de un ácido nucleico y un polipéptido *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* también pueden llevarse a cabo utilizando otras técnicas. Por ejemplo, puede utilizarse una sustancia polimérica, tal como un poliéster, ácido poliámico, hidrogel, polivinilpirrolidona, acetato de etileno-vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina o copolímero de láctido/glicólido, copolímero de poliláctido/glicólido, o copolímero de etileno-acetato de vinilo y similares. El ácido nucleico puede incluirse en una microcápsula utilizando una hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina o microcápsula de poli(metacrilato de metilo), o un sistema coloidal, respectivamente, mediante una técnica de coacervado o mediante polimerización interfacial. El sistema de dispersión coloidal incluye un sistema basado en un complejo de polímeros, nanocápsula, microesfera, perlas y lípidos (emulsión de tipo aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas, liposomas y similares).

El liposoma para introducir diversas composiciones en las células es convencionalmente conocido en el campo técnico, y por ejemplo se incluyen en las mismas fosfatidilcolina, fosfatidilserina, lipofectina y DOTAP (por ejemplo las patentes US nº 4.844.904, nº 5.000.959, nº 4.863.740 y nº 4.975.282, y GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md.). También se conocen lípidos catiónicos anfífilos basados en piperazina que resultan útiles en la terapia génica (ver,

por ejemplo, la patente US nº 5.861.397). También se conoce un sistema de lípidos catiónicos (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.459.127). En la presente memoria, la sustancia polimérica, microcápsulas y sistema de dispersión coloidal (liposomas y similares) se denominan colectivamente "vesícula".

Además, son ejemplos de técnicas adecuadas que pueden utilizarse en el procedimiento para anticuerpos, la purificación por afinidad, la purificación en gel no modificado, la HPLC o la RP-HPLC, la exclusión por tamaño, la purificación en columna de proteína A y una combinación opcional de dichas técnicas. Puede determinarse el isotipo del anticuerpo anti-TIM-3 utilizando un ensayo ELISA y, por ejemplo, puede identificarse la Ig humana utilizando anticuerpo anti-Ig humana adsorbido por Ig de ratón.

La afinidad de unión puede determinarse a partir de las tasas de asociación (K_a) y de disociación (K_d). La constante de afinidad de equilibrio KD es la proporción K_a/K_d . Las tasas de asociación (K_a) y de disociación (K_d) pueden medirse utilizando la resonancia del plasmón superficial (RPS) (Rich y Myska, Curr. Opin. Biotechnol. 11:54, 2000; Englebienne, Analyst. 123:1599, 1998). La instrumentación y los métodos para la detección y monitorización en tiempo real de la tasa de asociación son convencionalmente conocidas y se encuentran disponibles comercialmente (BiaCore 2000, Biacore AB, Uppsala, Suecia, y Malmqvist, Biochem. Soc. Trans. 27:335, 1999). El valor de KD puede definirse como la concentración de anticuerpo de TIM-3 requerida para saturar la mitad de los sitios de unión (50%) sobre TIM-3.

(Composición farmacéutica)

Los anticuerpos pueden incluirse en una composición farmacéutica. En una forma de realización, un anticuerpo comprende un portador farmacéuticamente aceptable, un estabilizador o un relleno y se prepara en forma de solución acuosa o en forma de preparación liofilizada. Típicamente se utiliza una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para la isotonicidad de la preparación farmacéutica. Entre los ejemplos del portador, estabilizador o relleno aceptable se incluyen una solución tampón, tal como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, y similares; un polipéptido de bajo peso molecular (inferior a 10 en número de residuos); una proteína, tal como albúmina sérica, gelatina, inmunoglobulina y similares; un polímero hidrófilo, tal como polivinilpirrolidona; un aminoácido, tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina y similares; un monosacárido, tal como glucosa, manosa, dextrina y similares, disacáridos y otros carbohidratos; un agente quelante, tal como EDTA y similares; sacáridos, tales como sacarosa, manitol, trehalosa, sorbitol y similares; un contraión formador de sal, tal como sodio y similares; un antioxidante, incluyendo metionina y ácido ascórbico; un complejo metálico (por ejemplo un complejo de Zn-proteína); un antiséptico (cloruro de octadecil-dimetilbencil-amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil- o propil-parabeno; catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol) y/o surfactantes no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM, polietilenglicol (PEG) y similares (uso terapéutico de sustancias antitumorales con diana en células que expresan TIM-3).

Las sustancias antitumorales con diana en células que expresan TIM-3 son anticuerpos anti-TIM-3. El anticuerpo de la invención está destinado a la utilización en el tratamiento o la prevención de enfermedades que pueden considerarse para el tratamiento mediante la unión o el reconocimiento de células de tumor hematológico que expresan TIM-3 (células de AML, células de CML, células de MDS). Entre los ejemplos de enfermedad para las que se examina el uso terapéutico se incluyen una enfermedad sanguínea, especialmente un tumor hematológico, en el que se observa la expresión de TIM-3 en la médula ósea o en sangre periférica. Son enfermedades específicas: la leucemia mielocítica aguda (AML), la leucemia mielocítica crónica (CML) y el síndrome mielodisplásico (MDS). Basándose en la clasificación FAB (clasificación franco-americano-británica), que puede determinar qué estadio de la célula durante el curso de la diferenciación en las diversas células sanguíneas de la célula troncal hematopoyética causa la transformación tumorigénica, la leucemia mielocítica aguda se clasifica en los tipos de enfermedad M0 (leucemia mieloblástica de tipo microdiferenciación), M1 (leucemia mieloblástica no diferenciada), M2 (leucemia mieloblástica diferenciada), M3 (leucemia promielocítica aguda), M4 (leucemia mielomonocítica), M5 (leucemia monocítica), M6 (eritroleucemia), M7 (leucemia megacariocítica) y subtipos de las mismas.

El procedimiento que comprende la administración de un anticuerpo anti-TIM-3 y una sustancia antitumoral con diana en una célula que expresa TIM-3 puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento aceptable. En una forma de realización específica, se administran en un sujeto local, regional o sistémicamente.

Además, respecto al anticuerpo de TIM-3 o la sustancia antitumoral con diana en la célula que expresa TIM-3 para el tratamiento de las enfermedades anteriormente indicadas también puede considerarse la combinación con otros agentes terapéuticos adecuados para la misma enfermedad (típicamente un agente quimioterapéutico) o administrarse en combinación con radioterapia.

Entre los ejemplos de otros agentes terapéuticos adecuados se incluyen un agente quimioterápico tal como citarabina (Ara-C), un agente antitumoral del sistema de la antraciclina (típicamente daunorrubicina (DNR), idarubicina (IDA) y similares, un agente terapéutico inductor de diferenciación tal como el ácido trans-retinoico (ATRA), el ácido arsenioso y Am80 (tamibaroteno), gemtuzumab-ozogamicina (conjugado de ozogamicina y anticuerpo anti-CD33), topotecán, fludarabina, ciclosporina, mitoxantrona (MIT), interferón e imatinib, aunque sin

limitarse a los mismos, y también incluye una combinación con un procedimiento terapéutico considerado clínicamente eficaz.

Los mamíferos (por ejemplo el ser humano) se encuentran incluidos en el sujeto que puede tratarse mediante la invención. En una forma de realización específica, es un sujeto que es un candidato de tumor sanguíneo o que ha recibido tratamiento del tumor sanguíneo, un sujeto que es un candidato de tumor sanguíneo y en quien se detectan células que expresan TIM-3, un sujeto con la posibilidad de que se produzca una respuesta celular mediada por TIM-3 o que ha recibido tratamiento de la respuesta celular mediada por TIM-3, un sujeto que es un candidato de tumor maligno mielocítico o que ha recibido tratamiento del tumor maligno mielocítico o un sujeto que es un candidato de leucemia mielocítica aguda o que ha recibido tratamiento de la leucemia mielocítica aguda.

Según dicha memoria, los términos "tratar", "tratando", "tratamiento" y las variaciones gramaticales de los mismos se refieren a un protocolo, plan, procedimiento o procedimiento mejorado que se lleva a cabo en cada sujeto con el que resulta deseable obtener un efecto fisiológico un buen resultado en el paciente. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el procedimiento de la invención incluye un tratamiento y un procedimiento de tratamiento que produce una mejora o efecto beneficioso medible, en particular en un trastorno, enfermedad, patología, condición de una enfermedad o síntoma en un sujeto dado. La mejora medible o efecto beneficioso es objetivo o subjetivo, una mejora transitoria o a largo plazo de cualquiera de los trastornos, enfermedades, condiciones fisiológicas, condiciones de una enfermedad o síntomas, o una reducción de la aparición, gravedad, duración o frecuencia de síntomas adversos relacionados o causados por trastornos, enfermedades, condiciones fisiológicas, o condiciones de una enfermedad o estado. Existe la posibilidad de que su efecto no se manifieste siempre inmediatamente, sino que la mejora o efecto beneficioso en un sujeto dado se observe algo después pasado un tiempo, de manera que se produzca la estabilización o mejora en un sujeto dado.

En la memoria, el término "recurrencia" se refiere a la condición en la que los síntomas se agravan o un sujeto entra en un estado de no remisión después de que la terapia ha funcionado una vez o ha inducido la remisión en términos hematológicos. La "remisión" en la leucemia se refiere a las condiciones en las que no se observa en sangre periférica ningún blastocito de célula de leucemia. El estado de remisión propuesto en la leucemia mieloide aguda fue definido por la NIH (ver Cheson B.D. *et al.*, Journal of Clinical Oncology 8:813-819). Además, el término "refractario" se refiere a la condición en la que no se observan en un sujeto los efectos del tratamiento.

(Antagonista)

Entre los anticuerpos se incluyen además aquellos que afectan a una función o actividad de TIM-3. En formas de realización particulares, un anticuerpo inhibe o impide la unión de ligando de TIM-3 a TIM-3; inhibe o impide la unión de ligando de TIM-3 a las células; modula la señalización celular mediada por TIM-3 (por ejemplo inhibe o impide); modula la respuesta celular mediada por TIM-3. En aspectos particulares, una respuesta celular mediada por TIM-3 comprende la proliferación de células que expresan TIM-3, la estimulación de la producción de citocinas, tales como IFN γ y la potenciación de la inmunidad tumoral.

(Utilización de anticuerpo agonista)

Entre los anticuerpos se incluyen además aquellos que afectan a una función o actividad de TIM-3. En formas de realización particulares, un anticuerpo mimetiza la unión de ligando de TIM-3 a TIM-3; modula (por ejemplo fomenta o potencia) la transducción de señales mediada por TIM-3 o modula la respuesta celular mediada por TIM-3. La respuesta de las células que expresan TIM-3 induce la parada del crecimiento de la célula que expresa TIM-3, controlando la producción de las citocinas y similares.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el significado generalmente evidente para el experto en la materia a la que se refiere la invención. Pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en las operaciones o exámenes de la invención, aunque los descritos en la presente memoria son métodos y materiales adecuados.

Ejemplos

(Ejemplo 1. Preparación de células de médula ósea y de sangre periférica)

La provisión de los analitos de pacientes y voluntarios sanos se llevó a cabo bajo la autorización del comité ético del Kyushu University Hospital. Las células de médula ósea se recogieron mediante aspirado de médula ósea de un paciente de leucemia o síndrome mielodisplásico y un voluntario sano. Se recogió la sangre periférica mediante recolección de sangre intravenosa de un voluntario sano. La sangre periférica con células troncales movilizadas se recogió de un paciente con indicación de trasplante de células troncales de sangre periférica autólogas (un caso de un paciente con recaída de un linfoma de linfocitos B de células grandes difuso tras entrar en remisión completa tras quimioterapia y que presenta sensibilidad a la quimioterapia). Concretamente, tras completar la quimioterapia (terapia de dosis masiva de ciclofosfamida (CY) o terapia de dosis masiva de VP-16 (etopósido)), las células troncales de sangre periférica se movilaron mediante la administración de una preparación de G-CSF (Filgrastim),

GRAN® (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) y se recogieron utilizando una aféresis estándar. Para el experimento se utilizó una porción de células mononucleares recogidas para confirmar la existencia de células positivas para CD34. A este respecto, la dosis y programa de fármacos siguieron el protocolo estándar cubierto por la compañía de seguros.

Se añadió heparina a las células recogidas para evitar la coagulación. Tras la dilución de cada analito con PBS, se aplicó sobre Ficoll-Plaques Plus (GE Healthcare). Se separaron las células mononucleares del suero y las plaquetas mediante centrifugación a 1.700 rpm durante 30 minutos (no se aplicó freno). Se recogió el límite que contenía PBMC y se lavó utilizando un medio de tinción. Tras la suspensión con el medio de tinción nuevamente, se mezclaron las células con solución de Türk y después se contaron. Las células se resuspendieron utilizando 100 µl del medio de tinción por cada 1×10^6 células. Para teñir las células troncales hematopoyéticas normales y las células precursoras, se llevó a cabo una selección positiva de las células positivas para CD34 utilizando el kit Indirect CD34 MicroBead (Miltenyi Biotec) tras la separación de células mononucleares anteriormente indicada y después se añadió medio de tinción, proporcionando un volumen final de 100 µl.

(Ejemplo 2. Tinción y métodos de análisis de células hematopoyéticas normales de médula ósea y células troncales tumorales)

Las células se tiñeron con 2 µl de un anticuerpo anti-CD34 humano (fabricado por Becton Dickinson & Co. (en lo sucesivo denominado BD), nº de cat. 340441), 20 µl de anticuerpo anti-CD38 humano (fabricado por CALTAG, nº de cat. MHCD3815), 2 µl de anticuerpo anti-CD90 humana (fabricado por BD, nº de cat. 555595) o 20 µl de anticuerpo anti-TIM-3 (fabricado por R&D Systems, 344823) como los anticuerpos primarios a 4°C durante 40 minutos. A continuación, se añadió PBS para el lavado y la suspensión obtenida se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos. Tras descartar el sobrenadante, se añadieron a lo anterior 100 µl del medio de tinción. Las células obtenidas se tiñeron mediante la adición de 5 µl de cada uno de los anticuerpos anti-linaje humano como anticuerpo secundario (anti-CD3 humano (fabricado por BD, nº de cat. 555341), CD4 (fabricado por BD, nº de cat. 555348), CD8 (fabricado por BD, nº de cat. 555636), CD10 (fabricado por BD, nº de cat. 555376), CD19 (fabricado por BD, nº de cat. 555414), CD20 (fabricado por BD, nº de cat. 555624), CD11b (fabricado por BD, nº de cat. 555389), CD14 (fabricado por Beckman Coulter, nº de cat. A07765), CD56 (fabricado por BD, nº de cat. 555517) y GPA (fabricado por BD, nº de cat. 559944) y 5 µl de estreptoavidina-APC-Cy7 (fabricado por BD, nº de cat. 554063) a 4°C durante 40 minutos. Tras lavar con PBS, las células obtenidas se resuspendieron en medio de tinción que contenía PI. El análisis y separación de los analitos se llevó a cabo mediante FACS Aria (BD).

(Ejemplo 3. Expresión de molécula TIM-3 humana en tumor sanguíneo humano)

La expresión de la molécula TIM-3 humana en tumor sanguíneo humano se examinó utilizando los métodos de los Ejemplos 1 y 2.

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivada de un paciente de AML (M0) Lin(-)CD34(+)CD38(-), Lin(-)CD34(+)CD38(+) y Lin(-)CD34(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 1 y en la Tabla 1. En los pacientes con AML (M0), se observó la expresión de TIM-3 en uno de los dos casos. De acuerdo con lo anterior, el presente ejemplo demostró la utilidad de TIM-3 como diana terapéutica para las células AML (M0).

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivadas de paciente de AML (M1) Lin(-)CD34(+)CD38(-), Lin(-)CD34(+)CD38(+) y Lin(-)CD34(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 2 y en la Tabla 1. En los pacientes con AML (M1), se observó la expresión de TIM-3 en la totalidad de los nueve casos. De acuerdo con lo anterior, el presente ejemplo demostró la utilidad de TIM-3 como diana terapéutica para las células de AML (M1).

[Tabla 1]

Pt	FAB	Anormalidad citogenética	% de células TIM-3(+)		
			Lin(-)CD34(+)CD38(-)	Lin(-)CD34(+)CD38(+)	Lin(-)CD34(-)
AML1	M2	t(8;21)	89,4	85,7	45
AML2	M2	46XY	49,7	94,7	44,6
AML3	M4	46XY	86	84,4	82,4
AML4	M2	46XX	83,3	90,6	81,8
AML5	M0		4,2	1,1	4,4
AML6	M2		77,5	82,9	30
AML7	M5		66,7	58,4	82,2
AML8	M2		60,6	89	62,1
AML9	M2		96,5	91	64

AML10	M4		99,6	98,5	71,2
AML11	M3	PML/RARa	1,6	22,7	52,2
AML12	M1	46XY	64,4	73,5	36,7
AML13	M2	t(8;21)	65,7	69	43,9
AML14	M1		26,6	23,3	19
AML15	M1		50,3	69,1	50,8
AML16	M4	inv 16	93,7	94,2	30,1
AML17	M2		91,2	93,5	36,1
AML18	M5		2,3	37,7	80,3
AML19	M6		18	34,6	37,6
AML20	M1	Flt3-ITD+	74	76,3	32
AML21	M1	Flt3-ITD+	82,2	90,5	85
AML22	M1		97,2	98	93,1
AML23	M2		94,2	94,7	40
AML24	M0		97,8	99,4	69,6
AML25	M1		38,8	65,8	33
AML26	M1		72,5	83,1	34,9
AML27	M4	Flt3-ITD+	84,9	90,1	78
AML28	M1		74,6	77,7	33,4
AML29	M2		98,3	99,1	79,2
AML30	M6		35,5	53,6	24,5
AML31	M4		56,1	68,5	77,7

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivadas de pacientes de AML (M2) Lin(-)CD34(+)CD38(-), Lin(-)CD34(+)CD38(+) y Lin(-)CD34(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 3 y en la Tabla 1. En los pacientes con AML (M2), se observó la expresión de TIM-3 en la totalidad de los diez casos. De acuerdo con lo anterior, el presente ejemplo demostró la utilidad de TIM-3 como diana terapéutica para las células de AML (M2).

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivadas de pacientes de AML (M3) Lin(-)CD34(+)CD38(-), Lin(-)CD34(+)CD38(+) y Lin(-)CD34(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 4 y en la Tabla 1. En los pacientes con AML (M3), se observó la expresión de TIM-3 en un caso. De acuerdo con lo anterior, el presente ejemplo demostró la utilidad de TIM-3 como diana terapéutica para las células de AML (M3).

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivadas de pacientes de AML (M4) Lin(-)CD34(+)CD38(-), Lin(-)CD34(+)CD38(+) y Lin(-)CD34(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 5 y en la Tabla 1. En los pacientes con AML (M4), se observó la expresión de TIM-3 en la totalidad de los cinco casos. De acuerdo con lo anterior, el presente ejemplo demostró la utilidad de TIM-3 como diana terapéutica para las células de AML (M4).

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivadas de pacientes de AML (M5) Lin(-)CD34(+)CD38(-), Lin(-)CD34(+)CD38(+) y Lin(-)CD34(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 6 y en la Tabla 1. En los pacientes con AML (M5), se observó la expresión de TIM-3 en la totalidad de los dos casos. De acuerdo con lo anterior, el presente ejemplo demostró la utilidad de TIM-3 como diana terapéutica para las células de AML (M5).

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivadas de pacientes de AML (M6) Lin(-)CD34(+)CD38(-), Lin(-)CD34(+)CD38(+) y Lin(-)CD34(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 7 y en la Tabla 1. En los pacientes con AML (M6), se observó la expresión de TIM-3 en la totalidad de los dos casos. De acuerdo con lo anterior, el presente ejemplo demostró la utilidad de TIM-3 como diana terapéutica para las células de AML (M6).

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivadas de pacientes de MDS (M2) Lin(-)CD34(+)CD38(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 9. En los pacientes con MDS, se observó la expresión de TIM-3 en la totalidad de los siete casos.

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivadas de pacientes de CML Lin(-)CD34(+)CD38(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 10. En los pacientes con CML se observó la expresión de TIM-3 en la totalidad de los dos casos.

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de médula ósea derivadas de pacientes de LLA Lin(-)CD34(+)CD38(-), Lin(-)CD34(+)CD38(+) y Lin(-)CD34(-) se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 11. En el paciente con LLA no se observó la expresión de TIM-3 en un caso.

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células Lin(-)CD34(+)CD38(-) y Lin(-)CD34(+)CD38(+) derivadas de pacientes con AML recurrente se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados típicos en la figura 12. En los pacientes con AML recurrente, se observó la expresión de TIM-3 en células troncales de leucemia Lin(-)CD34(+)CD38(-) y células de AML Lin(-)CD34(+)CD38(+).

(Ejemplo 4. Expresión de la molécula TIM-3 humana en células sanguíneas normales humanas)

Los procedimientos fueron los mismos que para la preparación de células de médula ósea y de sangre periférica en el Ejemplo 1 y para la tinción de células de médula ósea hematopoyética normal y células troncales tumorales, y el procedimiento de análisis, que en el Ejemplo 2.

La expresión de la molécula TIM-3 en células Lin(-)CD34(+)CD38(-) y en células Lin(-)CD34(+)CD38(+) derivadas de médula ósea y células troncales de sangre periférica movilizadas de voluntarios sanos se examinó mediante análisis de citometría de flujo multicolor. Se muestran los resultados en la figura 13. No se observó expresión de TIM-3 en las células Lin(-)CD34(+)CD38(-)CD90(+), que es una fracción de células troncales hematopoyéticas normales.

Además, se observó que TIM-3 se expresaba parcialmente en células progenitoras linfoides comunes (PLC), en células progenitoras mieloides comunes (PMC) y en células progenitoras de granulocitos-monocitos (PGM), pero que no se expresaba en células progenitoras de megacariocitos-eritroides (PME).

La expresión de la molécula TIM-3 humana en células de sangre periférica normal derivada de voluntarios sanos se examinó mediante análisis de citometría de flujo. De acuerdo con la preparación de las células de médula ósea y sanguíneas periféricas del Ejemplo 1, las células se tiñeron utilizando 2 µl de anticuerpo anti-CD3 (fabricado por BD, nº de cat. 555339), 2 µl de anticuerpo anti-CD14 (fabricado por BD, nº de cat. 555413), 10 µl de anticuerpo anti-CD19 (fabricado por BD, nº de cat. 555399) y 20 µl de anticuerpo anti-TIM-3 (fabricado por R&D Systems, 344823) a 4°C durante 40 minutos. Tras lavar con el medio de tinción, las células se resuspendieron con medio de tinción con adición de PI. Los analitos se analizaron mediante FACSAria (BD).

Se muestran los resultados en la figura 14. Se observó la clara expresión de TIM-3 en monocitos. También se observó la expresión de TIM-3 en una parte de los linfocitos T CD3-positivos. No se observó su expresión en los granulocitos ni en los linfocitos B.

(Ejemplo 5. Expresión de TIM-3 en las líneas celulares)

La expresión de TIM-3_h en las líneas celulares humanas se analizó mediante citometría de flujo

Las células en cultivo se recolectaron mediante pipeteado y se concentraron mediante centrifugación. Tras el lavado con el medio de tinción, se llevó a cabo el bloqueo utilizando IgG humana (fabricada por SIGMA, concentración final: 1 mg/ml). Las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 humano marcado con PE (R&D Systems) y se dejaron en reposo a 4°C durante 30 minutos. Tras añadir 7-AAD (BD Biosciences) y el lavado con el medio de tinción, las células resultantes se resuspendieron en el medio de tinción y se analizaron con el instrumento FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company). Se muestran los resultados en la figura 15. Se observó la expresión de TIM-3 en las células RPMI-8226 derivadas de mieloma múltiple y en células ARH7, en células Daudi derivadas de linfoma de linfocitos B y en células SR-786 derivadas de linfoma de linfocitos T y en células NK-92 derivadas de linfoma. Además, también se observó la expresión de TIM-3 en células KG-1 derivadas de AML.

Por este motivo se demostró la posibilidad de que se expresase TIM-3 en el mieloma múltiple y en el AML y se demostró que el anticuerpo anti-TIM-3 humano resultaba útil como agente terapéutico para estas enfermedades.

(Ejemplo 6. Preparación de proteína de fusión de Fc humana de forma soluble de TIM-3 humana extracelular y forma soluble de proteína TIM-3 humana extracelular)

La proteína se preparó siguiendo el procedimiento siguiente.

(Clonación molecular de ADNc de TIM-3_h)

Se amplificó ADNc de TIM-3_h a partir de ADNc derivado de leucocitos (panel MTC humano de CLONTECH) mediante PCR utilizando ExTaq (Takara Bio Co. Ltd.). Como dispositivo de PCR, se utilizó el sistema de PCR 9700 de GeneAmp (Applied Biosystems, en lo sucesivo, el dispositivo de PCR es el mismo en la presente memoria). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción en tres etapas a 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos, en 40 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores de PCR utilizados fueron los siguientes:

TIM-3 Fw2: 5'-GCCACCATGTTTTCACATCTTCCCTT-3' (SEC ID nº 3)

TIM-3 Re2:5'-CTATGGCATTGCAAAGCGAC-3' (SEC ID nº 4)

Los productos de PCR obtenidos de esta manera se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). Se visualizó el ADN mediante tinción con bromuro de etidio. Se recortó una banda aproximadamente en 0,9 kb y se extrajo utilizando el gel Wizard SV y Sistema PCR Clean-Up. A continuación, se mezclaron 4,5 µl del ADN extraído con 0,5 µl de vector pGEM-T Easy (Promega) y se ligaron utilizando el kit de ligación TaKaRa. Con respecto a la transformación, la muestra de ligación y una célula competente DH10B se mezclaron y se extendieron sobre una placa LB (que contenía X-gal y ampicilina). La comprobación de la inserción del vector pGEM-T Easy se llevó a cabo mediante PCR directa de las colonias utilizando LA Taq (Takara Bio Co. Ltd.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción en tres etapas a 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos en 35 ciclos y después se llevó a cabo una reacción a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEC ID nº 5)
SP6: 5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3' (SEC ID nº 6)

Los productos de PCR obtenidos de esta manera se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Utilizando una colonia a partir de la que se obtuvo la amplificación a aproximadamente 1,2 kb, se determinó la secuencia de nucleótidos mediante un procedimiento de secuenciación directa. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un sistema de PCR 9700 GeneAmp (Applied Biosystems) utilizando el kit de secuenciación en ciclo BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) (en lo sucesivo, el reactivo o dispositivo de análisis de secuenciación del ADN es el mismo en la presente memoria). Como cebadores de PCR se utilizaron T7 y SP6. Como analizador de secuencias se utilizó el analizador de ADN ABI 3700XL (Applied Biosystems) (en lo sucesivo, el dispositivo de análisis de secuenciación del ADN es el mismo en la presente memoria). Se seleccionó un clon que presentaba la misma secuencia de la región codificante de número de acceso de GenBank NM_032782 y se extrajo su ADN plasmídico mediante el procedimiento Miniprep.

(Preparación del vector de expresión de TIM-3_h)

Para la preparación del vector de expresión de TIM-3_h, se utilizó el clon en el que el extremo 5'-terminal del ADNc del TIM-3 humano se encontraba en el lado T7 del sitio de clonación del vector pGEM-T Easy. El ADN del plásmido TIM-3_h/pGEM-T Easy y del vector pMCs-IGRetrovirus (Cosmobio) se digirió con NotI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). Se visualizó el ADN mediante tinción con bromuro de etidio. Se recortaron las bandas en aproximadamente 0,9 kb y 5 kb y se extrajeron utilizando el gel Wizard SV y el sistema PCR Clean-Up, respectivamente. A continuación, se mezclaron 4,5 µl del ADN de TIM-3_h extraído con 0,5 µl del vector de ADN pMCs-IG y se ligaron utilizando el kit de ligación TaKaRa. Con respecto a la transformación, la muestra de ligación y una célula competente DH10B se mezclaron y se llevó a cabo la extensión sobre una placa LB (que contenía ampicilina). Se llevó a cabo la comprobación de la inserción mediante PCR directa de las colonias utilizando LA Taq (Takara Bio Co. Ltd.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción en tres etapas a 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 15 segundos y 72°C durante 45 segundos en 35 ciclos y después se llevó a cabo una reacción a 72°C durante 2 minutos.

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

pMCs-Fw: 5'-TCAAAGTAGACGGCATCGCAG-3' (SEC ID nº 7)
TIM-3 Re1: 5'-GCATTGCAAAGCGACAAC-3' (SEC ID nº 8)

Los productos de PCR obtenidos de esta manera se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. A partir de una colonia en la que se había obtenido la amplificación en aproximadamente 1,1 kb, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el procedimiento Miniprep. Se encontró que el ADN purificado de TIM-3_h/plásmido pMC-IG presentaba la misma secuencia que la región codificante del número de acceso de GenBank NM_032782, mediante el análisis de secuenciación del ADN. Los cebadores utilizados para el análisis de secuenciación del ADN fueron los siguientes:

pMCs-Fw: 5'-TCAAAGTAGACGGCATCGCAG-3' (SEC ID nº 9)
TIM-3_h Fw1: 5'-ACTCTGGAGCAACCATCA-3' (SEC ID nº 10)

Con el fin de confirmar la expresión de la proteína TIM-3_h, el ADN de TIM-3_h/plásmido pMCs-IG se expresó transitoriamente en células 293T. Se utilizó FuGene6 (Roche) para la transfección. Dos días después, se recolectaron las células 293T y después se levaron con un medio de tinción (PBS que contenía SBF al 2% y NaN₃ al 0,05%) y se tiñeron con anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 humano marcado con PE (R&D Systems). Tras el lavado con medio de tinción, se añadió 7-AAD (BD Biosciences) y después las células obtenidas se analizaron con FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company). Como resultado, la expresión de la proteína TIM-3_h a partir del vector TIM-3_h/pMCs-IG.

(Preparación de células con expresión estable de TIM-3_h)

Se introdujeron los vectores de expresión TIM-3_h/pMCs-IG o EmptyMCs-IG y VSV-G en células 293gp. Para la transfección se utilizó FuGene6 (Roche). Tres días después, se recolectó el sobrenadante de cultivo y se eliminaron los contaminantes utilizando un filtro de 0,45 µm (Millipore). Tras la centrifugación (6000xg, 4°C durante 7 horas), se disolvió el precipitado con medio IMDM (Invitrogen). La solución concentrada de retrovirus y la solución de protamina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; concentración final: 100 µg/ml) se añadieron al medio de las células EoL-1 y células Jarkat. Tras varios pases, se separaron las células infectadas GFP-positivas presentes en el medio de cultivo y se recolectaron con un FACSaria. Tras varios pases adicionales, las células infectadas GFP-positivas en el medio de cultivo se separaron y se recolectaron nuevamente con FACSaria. Tras varios pases, se confirmó la expresión de TIM-3 mediante el procedimiento de citometría de flujo, utilizando anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 marcado con PE.

(Preparación de vector de expresión de proteína de fusión de proteína Fc humana y forma soluble de TIM-3 humano extracelular)

Se amplificó un ADNc codificante de la región extracelular de TIM-3 humana mediante la utilización de un procedimiento de PCR y etiqueta FLAG y una secuencia de Fc humana se fusionaron con el mismo cadena abajo (TIM-3_s-FLAG-Fc/pTracerCMV).

El ADNc codificante de la región extracelular de TIM-3 humano se amplificó mediante la utilización de un procedimiento de PCR utilizando el plásmido TIM-3_h/pMCs-IG como molde y ADN polimerasa HS PrimeSTAR® (Takara Bio Co. Ltd.). Con respecto a la PCR, se llevó a cabo una reacción en dos etapas a 98°C durante 10 segundos y 68°C a 40 segundos en 20 ciclos. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

pMCs-Fw: 5'-TCAAAGTAGACGGCATCGCAG-3' (SEC ID nº 11)
TIM3ED-FcReXba: 5'-TTTTCTAGATCTGATGGTTGCTCCAGA-3' (SEC ID nº 12)

Los productos de PCR obtenidos de esta manera se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). Se visualizó el ADN mediante tinción con bromuro de etidio. Se recortó una banda de aproximadamente 0,6 kb y el ADN se extrajo utilizando el gel Wizard SV y el sistema PCR Clean-Up. El ADN purificado de esta manera se digirió con EcoRI y XbaI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). Se recortó una banda en aproximadamente 0,9 kb y el ADN se extrajo utilizando el gel Wizard SV y el sistema PCR Clean-Up. El ADN obtenido se mezcló con el vector pTracer-CMV-FLAG-Fc humano (un plásmido en el que se ha insertado FLAG y la región Fc de la IgG humana entre el sitio XbaI y el sitio ApaI del pTracer-CMV modificado [fabricado por Invitrogen]), que había sido cortado utilizando los mismos enzimas del ADN purificado, y se ligó utilizando el kit de ligación TaKaRa. Con respecto a la transformación, la muestra de ligación y una célula competente DH10B se mezclaron y se extendieron sobre una placa LB (que contenía ampicilina). Se llevó a cabo la comprobación de la inserción mediante PCR directa de las colonias utilizando LA Taq (Takara Bio Co. Ltd.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción en tres etapas a 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 15 segundos y 72°C durante 40 segundos, en 35 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEC ID nº 13)
TIM3ED-FcReXba: 5'-TTTTCTAGATCTGATGGTTGCTCCAGA-3' (SEC ID nº 14)

Los productos de PCR obtenidos de esta manera se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). Se visualizó el ADN mediante tinción con bromuro de etidio. Se extrajo un ADN plasmídico mediante el procedimiento Miniprep de una colonia en la que se había llevado a cabo una amplificación en aproximadamente 0,7 kb. Se encontró mediante un análisis de secuenciación del ADN que el ADN plasmídico TIM-3-FLAG-Fc/pTracerCMV purificado presentaba una secuencia idéntica a la región correspondiente del número de acceso de GenBank NM_032782. Los cebadores utilizados para el análisis de secuenciación del ADN fueron los siguientes:

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEC ID nº 15)
TIM-3_h Fw1: 5'-ACTCTGGAGCAACCATCA-3' (SEC ID nº 16)

La secuencia de la inserción (a partir del sitio de reconocimiento EcoRI siguiente hasta inmediatamente antes del sitio de reconocimiento ApaI) era la siguiente:

GATTGCCACCATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCT
 GCTACTACTTACAAGGTCCTCAGAAGTGAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAG
 AATGCCTATCTGCCCTGCTTCTACACCCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGC
 CCGTCTGCTGGGGCAAAGGAGCCTGTCCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGT
 GCTCAGGACTGATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTA
 AATGGGGATTTCCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAATGTGACTC
 TAGCAGACAGTGGGATCTACTGCTGCCGGATCCAAATCCCAGGCATAATGAAT
 GATGAAAAATTTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAGGTCACCCCTG
 CACCGACTCGGCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCAC
 CAGGGGACATGGCCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTCCCTGATAT
 AAATCTAACACAAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGATTGG
 CCAATGACTTACGGGACTCTGGAGCAACCATCAGATCTAGAGCAGACTACAA
 GGACGACGATGACAAGACTAGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC
 AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCC
 AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG
 ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
 CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA
 GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
 CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGCGGAGTGGGAGAGCAAT
 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA
 CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATGA (SEC ID nº 17)

(Preparación de vector de expresión de forma soluble de región extracelular de TIM-3 humana)

- 5 Un ADNc codificante de la región extracelular de la TIM-3 humana se amplificó mediante la utilización de un procedimiento de PCR, se conectó una etiqueta FLAG al mismo cadena abajo (TIM-3_s-FLAG/pEF6 Myc_HisC).

10 El ADNc codificante de la región extracelular de la TIM-3 humana se amplificó mediante la utilización de un procedimiento de PCR utilizando el plásmido TIM-3_h/pGEM-T Easy como molde y la ADN polimerasa PrimeSTAR®HS (Takara Bio Co. Ltd.). Con respecto a la PCR, se llevó a cabo una reacción en dos etapas a 98°C durante 10 segundos y a 68°C durante 30 segundos, en 25 ciclos. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

TIM-3 Fw2: 5'-GCCACCATGTTTTACATCTTCCCTT-3' (SEC ID nº 18)

TIM3ED-FLAG4aa: 5'-GTCCTGTAGTCTCTGATGGTTGCTCCAGA-3' (SEC ID nº 19)

- 15 Utilizando 2 µl del producto de PCR obtenido como molde, se amplificó el ADN mediante la utilización de LA taq (Takara Bio Co. Ltd.) mediante un procedimiento de PCR. Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción en tres etapas a 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos, y después una reacción a 72°C durante 2 minutos, en 16 ciclos. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

TIM-3 Fw2: 5'-GCCACCATGTTTTACATCTTCCCTT-3' (SEC ID nº 20)

C-FLAG-NotR2: 5'-AAAAGCGGCCGCTCACTTGTCTGTCATCGTCCTTGTAGTC-3' (SEC ID nº 21)

Los productos de PCR obtenidos de esta manera se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). Se visualizó el ADN mediante tinción con bromuro de etidio. Se recortó una banda en aproximadamente 0,6 kb y se extrajo utilizando el gel Wizard SV y el sistema PCR Clean-Up. A continuación, se mezclaron 4 µl del ADN extraído con 0,5 µl del vector pGEM-T Easy (Promega) y se ligaron utilizando el kit de ligación Quick Ligation (TM) (New England Biolabs). Con respecto a la transformación, la muestra de ligación y una célula competente DH10B se mezclaron y se extendieron sobre una placa LB (que contenía X-gal y ampicilina). La comprobación de la inserción del vector pGEM-T Easy se llevó a cabo mediante PCR directa de las colonias utilizando LA Taq (Takara Bio Co. Ltd.). La comprobación de la inserción del vector pGEM-T Easy se llevó a cabo mediante PCR directa de las colonias utilizando LA Taq (Takara Bio Co. Ltd.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción en tres etapas de 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos, en 38 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEC ID nº 22)
SP6: 5'-CATACGATTTAGGTGACACTATA-3' (SEC ID nº 23)

Los productos de PCR obtenidos de esta manera se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). Se visualizó el ADN mediante tinción con bromuro de etidio. Utilizando una colonia en la que se había obtenido la amplificación en aproximadamente 0,8 kb, se determinó la secuencia de nucleótidos mediante un procedimiento de secuenciación directa. Como cebadores de PCR se utilizaron T7 y SP6. Se extrajo mediante el procedimiento Miniprep un clon que contenía la misma secuencia que la región codificante de número de acceso de GenBank NM_032782 y su ADN plasmídico.

Para la preparación del vector de expresión para expresar la forma soluble de la región extracelular de TIM-3 humano, se utilizó el clon en el que el extremo 5'-terminal del ADNc de la TIM-3 humana se encontraba en el lado de T7 del sitio de clonación del vector pGEM-T Easy. Se digirió el ADN plasmídico de TIM-3_h/GEM-T Easy y pEF6Myc_HisC (Invitrogen) con NotI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se recortaron las bandas en aproximadamente 0,6 kb y 5 kb y se extrajeron utilizando un gel Wizard SV y el sistema PCR Clean-Up, respectivamente. A continuación, se mezclaron 4 µl del ADNc de TIM-3_s extraído, con 0,5 µl del vector de ADN pEF6 Myc_HisC y se ligaron utilizando el kit QuickLigation (TM) (New England Biolabs). Con respecto a la transformación, se mezcló la muestra de ligación y una célula competente DH10B y se extendieron sobre una placa LB (que contenía ampicilina). Se llevó a cabo la comprobación de la inserción mediante PCR directa de las colonias utilizando LA Taq (Takara Bio Co. Ltd.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción en tres etapas: a 95°C durante 15 segundos, a 56°C durante 15 segundos y a 72°C durante 60 segundos, en 38 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

TIM-3 Fw/2: 5'-GCCACCATGTTTTACATCTTCCCTT-3' (SEC ID nº 24)
BCH-R: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' (SEC ID nº 25)

A partir de una colonia en la que se había conseguido una amplificación en aproximadamente 0,8 kb, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el procedimiento Miniprep.

Se confirmó mediante un análisis de secuenciación del ADN que el ADN plasmídico purificado TIM-3_s-FLAG/pEF6 Myc_HisC presentaba una secuencia idéntica a la región correspondiente del número de acceso de GenBank NM_032782. Los cebadores utilizados para el análisis de secuenciación del ADN eran los siguientes:

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEC ID nº 26)
BGH-R: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' (SEC ID nº 27)

La secuencia de la inserción (desde el sitio de reconocimiento NotI siguiente hasta inmediatamente antes del sitio de reconocimiento NotI) era la siguiente:

GGGAATTCGATTGCCACCATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCT
GCTGCTGCTGCTACTACTTACAAGGTCCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAG
GTCGGTCAGAATGCCTATCTGCCCTGCTTCTACACCCCAGCCGCCCCAGGGA
ACCTCGTGCCCGTCTGCTGGGGCAAAGGAGCCTGTCCTGTGTTTGAATGTGG
CAACGTGGTGCTCAGGACTGATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGA
TACTGGCTAAATGGGGATTTCCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGA
ATGTGACTCTAGCAGACAGTGGGATCTACTGCTGCCGGATCCAAATCCCAGG
CATAATGAATGATGAAAAATTTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGCCAAG
GTCACCCCTGCACCGACTCGGCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTCCAAGGA
TGCTTACCACCAGGGGACATGGCCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCC
TCCCTGATATAAATCTAACACAAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGAC
TCTAGATTGGCCAATGACTTACGGGACTCTGGAGCAACCATCAGAGACTACA
AGGACGATGACGACAAGTGA (SEC ID n° 28)

(Preparación de proteína de fusión de Fc humana y forma soluble de TIM-3 humana extracelular y forma soluble de TIM-3 humana extracelular).

5 Se purificaron los ADN plasmídicos de TIM-3_s-FLAG-Fc/pTracerCMV y TIM-3_s-FLAG/pEF6 Myc_HisC utilizando el kit QIAGEN Plasmid Maxi.

10 Se utilizaron células HEK293F como célula hospedadora para la expresión. Se cultivaron las células HEK293F bajo agitación en medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen) (37°C, 5% de CO₂).

15 Se utilizó el procedimiento de PEI para la introducción génica. Se pesó polietilenimina (Linear, PM: 25.000, fabricada por Polysciences) y se disolvió en PBS (1 g/l), ajustando el pH a aproximadamente 7,0 con HCl. La solución obtenida se agitó durante 1 hora y después se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm, MILLEX-GV (Millipore). A continuación, se mezcló 1 mg del ADN plasmídico purificado con 20 ml de Opti-Pro SFM (Invitrogen), obteniendo Solución A. Se preparó Solución B mediante la mezcla de 2,5 ml de solución de PEI (1 g/l) con 20 ml de Opti-Pro SFM (Invitrogen). Tras mezclar Solución A y Solución B y dejar en reposo durante 10 minutos, a la solución obtenida se añadió 1 l de células 293F (1.000.000 células por cada 1 ml). Tras seis días, se recolectó el sobrenadante celular y se utilizó para la purificación de proteínas.

20 La purificación de la proteína de fusión de Fc humana y forma soluble de TIM-3 humana extracelular y la forma soluble de proteína TIM-3 humana se llevó a cabo mediante el procedimiento siguiente. El sobrenadante de cultivo que contenía la proteína de fusión de Fc humana y forma soluble de TIM-3 humana extracelular y la forma soluble de proteína TIM-3 se recolectaron mediante centrifugación 6 días después de la transfección y se pasaron a través de un filtro (950 ml). La solución obtenida se diluyó 5 veces con solución salina tamponada con Tris (TBS), se preparó una columna anti-LFAG utilizando gel de afinidad de agarosa anti-FLAG M2 (Sigma) y la solución se aplicó a la misma utilizando una bomba HiLoad P-50 (Pharmacia Biotech). La elución se llevó a cabo utilizando el péptido FLAG (Sigma) siguiendo el manual. El eluido se fraccionó en 8 fracciones; cada fracción se sometió a SDS-PAGE (gradiente de gel MultiGel II Mini 10/20%, Cosmo Bio Co., Ltd.) bajo condiciones reductoras y se llevó a cabo la tinción de plata y transferencia western. Se utilizó el reactivo de tinción de plata "Daiichi" (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) para la tinción de plata. Se utilizó un anticuerpo anti-FLAG M2 (sigma) y anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con fosfatasa alcalina para la transferencia western. Las fracciones en las que se encontró la proteína de interés se concentraron utilizando Amicon Ultra-4 10K (Millipore) y se llevó a cabo la cromatografía de filtración en gel utilizando Superdex 200 gp (GE Healthcare). Tras el fraccionamiento, cada fracción se sometió a SDS-PAGE (gradiente de gel MultiGel II Mini 10/20%; Cosmo Bio Co., Ltd.) bajo condiciones reductoras y después se llevó a cabo la tinción de plata y transferencia western. Se utilizó el reactivo de tinción de plata "Daiichi" (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) en la tinción de plata. En la transferencia western se utilizó el anticuerpo M2 anti-FLAG (Sigma) y un anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con fosfatasa alcalina. Las fracciones en las que se había observado la proteína de interés se concentraron utilizando un instrumento Amicon Ultra-4 10K (Millipore) y se lavaron con PBS. Llevando a cabo la esterilización mediante filtración utilizando un filtro de membrana MILLEX-GV (Millipore) con un tamaño de poro de 0,22 µm, se obtuvo una proteína de fusión de Fc humana y la forma soluble de TIM-3 humana extracelular, y la forma soluble de la TIM-3 humana extracelular. Como resultado del ensayo de Limulus utilizando el kit Limulus ES-II Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), no se detectó endotoxina en la proteína de fusión de Fc humana y forma soluble de TIM-3 humana extracelular, y la forma soluble de la TIM-3 humana extracelular. Con respecto a la concentración de la proteína de fusión de Fc humana y forma soluble de TIM-3 humana extracelular, y la forma soluble de la TIM-3

humana extracelular, se midió la absorbancia a 280 nm y se calculó 1 mg/ml como una DO de 1,4.

(Ejemplo 7. Ensayo de citotoxicidad de la línea celular que expresa TIM-3 utilizando anticuerpo policlonal anti-TIM-3)

Con respecto a la citotoxicidad celular mediada por un anticuerpo, se midió citotoxicidad para las células diana (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, en lo sucesivo ADCC) en presencia de un anticuerpo utilizando células mononucleares derivadas de sangre periférica humanas (en lo sucesivo PBMC) como efector.

Se utilizó como anticuerpo anticuerpo policlonal anti-TIM-3 derivado de cabra (R&D Systems, AF2365). Además, a modo de control negativo se utilizó IgG derivada de cabra (fabricada por Sigma, 15256-10MG).

Con respecto al método, brevemente, se cultivaron células diana en presencia de PBMC y se midió la lisis de las células diana por un anticuerpo.

Concretamente, como célula diana, se cultivaron separadamente células Jurkat transfectadas con TIM-3 y células EoL-1 transfectadas con TIM-3, con cromato sódico marcado con el isótopo radioactivo ^{51}Cr ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, fabricado por Perkin Elmer Corp., NEZ030S) a 37°C durante 1 hora en presencia de 5% de CO_2 para marcar las células diana con ^{51}Cr . Tras lavar las células diana marcadas, tres veces con medio RPMI-1640 que contenía SBF al 10%, a fin de eliminar el exceso de ^{51}Cr , las células se suspendieron en el medio (40.000 células/ml) y después se dispensaron a razón de 50 μl /pocillo en una placa de 96 pocillos. Se suspendieron las PBMC en el medio (4.000.000 células/ml) y se dispensaron a razón de 50 μl /pocillo en la placa (proporción efector/diana=100). Se suspendió un anticuerpo en el medio y se añadieron 50 μl de la suspensión obtenida a la placa (concentración final: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para el cultivo a 37°C durante 4 horas en presencia de 5% de CO_2 . Como anticuerpo se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra anti-TIM-3 humana (fabricado por R&D Systems) y como control negativo se utilizó IgG de cabra (fabricado por Sigma). Las PBMC, utilizadas como efectoras, se derivaron de sangre periférica humana sana.

Con respecto a la tasa de lisis de las células diana, se midió la cantidad de ^{51}Cr en el cromato sódico liberado al medio debido a la lisis de las células. Es decir, tras centrifugar la placa, se transfirió el sobrenadante en porciones de 50 μl a una placa de 96 pocillos recubierta con líquido de centelleo (Lumaplate-TM, fabricada por Perkin-Elmer Corp.) y después se secó a 56°C durante 2 horas. Se selló la placa (TopSeal-A, fabricada por Packard Instrument Co., Inc.) y se midió utilizando un lector de microplacas (TopCount, fabricado por Perkin-Elmer Corp.).

Se muestran los resultados en la figura 16. Con respecto a la prueba de significancia, mediante la comparación con la IgG de cabra utilizando la prueba t de Student estándar, se consideró que aquellos con un nivel de significancia (p) de 0,05 o inferior era significativamente diferentes.

En comparación con el control de IgG derivado de ser humano, se encontró que el anticuerpo policlonal anti-TIM-3 mostraba una tasa de lisis significativamente incrementada de las células diana, tal como se muestra posteriormente. Por este motivo, se demostró que el anticuerpo policlonal anti-TIM-3 presentaba ADCC sobre las células que expresaban TIM-3. De acuerdo con lo anterior, el ejemplo demuestra la posibilidad de tratamiento en la que la eliminación de las células positivas para TIM-3 utilizando la ADCC podría resultar de eficacia farmacológica.

Además, como citotoxicidad sobre las células diana, se midió la citotoxicidad dependiente del complemento (en lo sucesivo, CDC) en presencia del complemento y un anticuerpo.

Con respecto al método, brevemente, se incorporó cromo radioactivo (^{51}Cr) en el citoplasma de las células diana y después se midió la cantidad de ^{51}Cr liberado al medio de cultivo por la muerte celular como la cantidad de radiación Y.

Concretamente, se suspendieron 10^6 células de EoL-1 transfectadas con TIM-3 o células Jurkat transfectadas con TIM-3 como células diana en 15 μl de suero bovino fetal (SBF), mezclados con 50 μl (37 MBq/ml) de cromato sódico marcado con ^{51}Cr (fabricado por Perkin-Elmer Corp., en lo sucesivo denominado ^{51}Cr) y se cultivaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, el ^{51}Cr no incorporado en las células se eliminó repitiendo la etapa, que consistió de la adición de 10 ml del medio, la centrifugación y el descarte del medio, en tres ocasiones.

Con respecto a la CDC, se mezclaron 2.000 células EoL-1 transfectadas con TIM-3 marcada con ^{51}Cr con 25% concentración final de complemento derivado de suero de conejo joven (fabricado por Cedarlane, CL3441) y el anticuerpo, a las diferentes concentraciones (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de concentración final). En una placa de 96 pocillos de fondo en U, se ajustó el volumen total de líquido mezclado a 150 μl y se cultivó a 37°C durante 2 horas en presencia de 5% de CO_2 . Además, como control se añadió a lo anterior 0,33% concentración final de Triton-X100. Tras el cultivo, la placa se centrifugó para precipitar las células. Se transfirieron cincuenta μl del sobrenadante a una placa de 96 pocillos que contenía solución de centelleo en polvo (LumaplateTM-96, fabricado por Packard Instrument Co., Inc.) y la placa se secó a 56°C durante 2 horas. Tras confirmar que se había secado, se selló la placa (TopSeal TM-A: microplacas de 96 pocillos fabricadas por Packard Instrument Co., Inc.) y se midió la cantidad de radiación y utilizando un contador de centelleo (TopCount, fabricado

por Packard Instrument Co., Inc.).

Se calculó una tasa de lisis específica dividiendo el valor obtenido a partir de la resta de la dosis de rayos y a una concentración de anticuerpo de 0 µg/ml del valor de cada pocillo, por el valor del pocillo al que se había añadido Triton-X100 (la tasa de lisis específica se considera del 100%). Se muestran los resultados en la figura 17. Se encontró que el anticuerpo policlonal de TIM-3 mostraba citotoxicidad en las células diana de una manera dependiente de la concentración. De acuerdo con lo anterior, el ejemplo muestra la posibilidad de tratamiento en el que la eliminación de las células positivas para TIM-3 utilizando la ADCC podría resultar de eficacia farmacológica.

(Ejemplo 8. Ensayo de toxicidad de células primarias de AML por anticuerpos policlonales anti-TIM-3)

Respecto a la citotoxicidad mediada por un anticuerpo, como citotoxicidad para las células diana, se midió la citotoxicidad dependiente del complemento (en lo sucesivo CDC) en presencia del complemento y un anticuerpo.

Respecto al procedimiento, brevemente, se cultivaron las células diana en presencia de un complemento y se midió la reducción de la viabilidad celular debida al anticuerpo.

Como anticuerpo se utilizó anticuerpo policlonal anti-TIM-3 derivado de cabra, y como anticuerpo de control negativo, se utilizó IgG derivada de cabra (fabricada por Sigma, 15256-10MG).

Concretamente se suspendieron células de AML primaria procedentes de un paciente como células diana, en medio RPMI-1640 que contenía SFB al 10% y se dispensaron 1.000.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos (462,5 µl/pocillo). A la célula se añadieron 12,5 µl/pocillo (concentración final de 2,5%) de complemento derivado de suero de conejo joven (fabricado por Cedarlane, CL3441). Tras añadir 25 µl de anticuerpo policlonal anti-TIM-3 derivado de cabra (0,2 mg/ml) (concentración final: 10 µg/ml), las células se cultivaron a 37°C durante 3 horas en presencia de 5% de CO₂.

Se evaluó la proporción de células muertas mediante citometría de flujo con tinción de anexina V. Tras lavar con PBS, las células se suspendieron en 50 µl de tampón de unión de anexina V (fabricado por BD) nuevamente y se tiñeron a temperatura ambiente durante 10 minutos mediante la adición de PI y anexina V-FITC (fabricado por BD). Tras diluir con 200 µl de tampón de unión de anexina V (fabricado por BD), se analizó la muestra mediante FACSARIA (fabricado por BD). La proporción entre células Anexina V(+)PI(-) y células PI(+) en el total de células de AML se consideró la proporción de células muertas.

Se muestran los resultados en la figura 8. Con respecto a la prueba de significancia, mediante la comparación con la IgG derivada de ser humano utilizando la prueba t de Student estándar, se consideró que aquellos que presentaban un nivel de significancia (p) de 0,05 o inferior eran significativamente diferentes.

En comparación con el control de IgG derivado de ser humano, se encontró un incremento significativo en la proporción de células muertas a vivas con el anticuerpo policlonal anti-TIM-3. De esta manera se demostró que el anticuerpo presentaba una CDC sobre las células de AML primarias TIM-3-positivas. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el ejemplo demuestra la posibilidad de tratamiento en el que la eliminación de las células de AML primarias resultaría de eficacia farmacológica.

Aplicabilidad industrial

La invención puede proporcionar un procedimiento de tratamiento que comprende la administración de un anticuerpo anti-TIM-3 en un sujeto que es un candidato de tumor sanguíneo en el que TIM-3 se expresa en la fracción celular Lin(-)CD34(+)CD38(-) de la médula ósea o de la sangre periférica o en un sujeto que ha recibido tratamiento para un tumor sanguíneo.

Texto libre de listado de secuencias

SEC ID nº 3: cebador TIM-3 Fw2
SEC ID nº 4: cebador TIM-3 Re2
SEC ID nº 5: cebador de T7
SEC ID nº 6: cebador SP6
SEC ID nº 7: cebador pMCs-Fw
SEC ID nº 8: cebador TIM-3 Re1
SEC ID nº 9: cebador pMCs-Fw
SEC ID nº 10: cebador TIM-3_h Fw1
SEC ID nº 11: cebador pMCs-Fw
SEC ID nº 12: cebador TIM3ED-FcReXba
SEC ID nº 13: cebador de T7
SEC ID nº 14: cebador TIM3ED-FcReXba
SEC ID nº 15: cebador de T7

SEC ID nº 16: cebador TIM-3_h Fw1

SEC ID nº 17: Inserción (desde el sitio de reconocimiento EcoRI siguiente inmediatamente antes del sitio de reconocimiento ApaI)

5

SEC ID nº 18: cebador TIM-3 Fw2

SEC ID nº 19: cebador TIM3ED-FLAG4aa

SEC ID nº 20: cebador TIM-3 Fw2

SEC ID nº 21: cebador C-FLAG-NotR2

10

SEC ID nº 22: cebador de T7

SEC ID nº 23: cebador SP6

SEC ID nº 24: cebador TIM-3 Fw2

SEC ID nº 25: cebador BGH-R

SEC ID nº 26: cebador de T7

15

SEC ID nº 27: cebador BGH-R

SEC ID nº 28: inserción (desde el sitio de reconocimiento NotI siguiente inmediatamente antes del sitio de reconocimiento NotI)

20

Listado de secuencias

<110> Kyowa Hakko Kirin Co., LtdKyushu University, National University Corp

<120> Procedimiento para el tratamiento de los tumores sanguíneos que utiliza los anticuerpos anti-TIM-3

25

<130> 1001P12040

<150> US 61/168,428

<151> 2009-04-10

30

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.3

35

<210> 1

<211> 301

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 571 235 T3

<400> 1

Met	Phe	Ser	His	Leu	Pro	Phe	Asp	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	1	5	10	15
Leu	Leu	Thr	Arg	Ser	Ser	Glu	Val	Glu	Tyr	Arg	Ala	Glu	Val	Gly	Gln	20	25	30	
Asn	Ala	Tyr	Leu	Pro	Cys	Phe	Tyr	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn	Leu	35	40	45	
Val	Pro	Val	Cys	Trp	Gly	Lys	Gly	Ala	Cys	Pro	Val	Phe	Glu	Cys	Gly	50	55	60	
Asn	Val	Val	Leu	Arg	Thr	Asp	Glu	Arg	Asp	Val	Asn	Tyr	Trp	Thr	Ser	65	70	75	80
Arg	Tyr	Trp	Leu	Asn	Gly	Asp	Phe	Arg	Lys	Gly	Asp	Val	Ser	Leu	Thr	85	90	95	
Ile	Glu	Asn	Val	Thr	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Cys	Cys	Arg	Ile	100	105	110	
Gln	Ile	Pro	Gly	Ile	Met	Asn	Asp	Glu	Lys	Phe	Asn	Leu	Lys	Leu	Val	115	120	125	
Ile	Lys	Pro	Ala	Lys	Val	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Arg	Gln	Arg	Asp	Phe	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Phe	Pro	Arg	Met	Leu	Thr	Thr	Arg	Gly	His	Gly	Pro	Ala	145	150	155	160
Glu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Ser	Leu	Pro	Asp	Ile	Asn	Leu	Thr	Gln	Ile	165	170	175	

ES 2 571 235 T3

Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
180 185 190

Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly
195 200 205

Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe
210 215 220

Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile
225 230 235 240

Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu
245 250 255

Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr
260 265 270

Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln
275 280 285

Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
290 295 300

<210> 2

<211> 200

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
20 25 30

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
35 40 45

Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
50 55 60

Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
65 70 75 80

Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
85 90 95

ES 2 571 235 T3

Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
100 105 110

Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
115 120 125

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

Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
145 150 155 160

Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
165 170 175

Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
180 185 190

Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg
195 200

<210> 3
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 3
gccacatgt ttccatct tccctt 26

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 4
ctatggcatt gcaaagcgac 20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
taatacgact cactataggg 20

<210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 6
 catacgattt aggtgacact atag 24

 5 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> cebador

 <400> 7
 tcaaagtaga cggcacgcga g 21

 15 <210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> cebador

 <400> 8
 gcattgcaaa gcgacaac 18
 25
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador

 <400> 9
 35 tcaaagtaga cggcacgcga g 21

 <210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 45 <400> 10
 actctggagc aaccatca 18

 <210> 11
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 55
 <400> 11
 tcaaagtaga cggcacgcga g 21

 <210> 12
 60 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 65 <223> cebador

<400> 12
 ttttctagat ctgatggttg ctccaga 27

 5 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> cebador

 <400> 13
 taatacgact cactataggg 20

 15 <210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> cebador

 <400> 14
 ttttctagat ctgatggttg ctccaga 27
 25
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador

 <400> 15
 taatacgact cactataggg 20

 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 45 <400> 16
 actctggagc aaccatca 18

 <210> 17
 <211> 1336
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> inserción
 55

ES 2 571 235 T3

<400> 17
gattgccacc atgtttttcac atcttccctt tgactgtgtc ctgctgctgc tgctgctact 60
acttacaagg tcctcagaag tggaatacag agcggagggtc ggtcagaatg cctatctgcc 120
ctgcttctac accccagccg cccagggaa cctcgtgcc gtctgctggg gcaaaggagc 180
ctgtcctgtg tttgaatgtg gcaacgtggt gctcaggact gatgaaagg atgtgaatta 240
ttggacatcc agatactggc taaatgggga tttccgcaa ggagatgtgt ccctgacct 300
agagaatgtg actctagcag acagtgggat ctactgctgc cggatccaaa tcccaggcat 360
aatgaatgat gaaaaattta acctgaagtt ggtcatcaaa ccagccaagg tcacccctgc 420
accgactcgg cagagagact tcaactgcgc ctttccaagg atgcttacca ccaggggaca 480
tggcccagca gagacacaga cactggggag cctccctgat ataaatctaa cacaaatata 540
cacattggcc aatgagttac gggactctag attggccaat gacttacggg actctggagc 600
aaccatcaga tctagagcag actacaagga cgacgatgac aagactagtg aaaaaactca 660
cacatgccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga cgtcagctt tcctcttccc 720
cccaaaacc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gctggtggt 780
ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gctggtggt 840
gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag 900
cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc 960
caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg 1020
agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag 1080
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgaggagt gggagagcaa 1140
tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccctg ctggactccg acggtctctt 1200
cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc 1260
atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacag cagaagagcc tctccctgtc 1320
tccgggtaaa tgatga 1336

<210> 18
5 <211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> cebador

<400> 18
gccaccatgt tttcacatct tccctt 26

15 <210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 19
25 gtcctttag tctctgatgg ttgctccaga 30

<210> 20
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 20
 10 aaaagcggcc gctcacttgt cgtcacgtc ctgtagtc 39
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 20 taatacgact cactataggg 20
 <210> 22
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 22
 catacgattt aggtgacact atag 24
 <210> 23
 35 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 23
 gccaccatgt ttccacatct tccctt 26
 45 <210> 24
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 24
 55 tagaaggcac agtcgagg 18
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador
 <400> 25
 65 taatacgact cactataggg 20

<210> 26
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 10
 <400> 26
 tagaaggcac agtcgagg 18
 <210> 27
 <211> 645
 <212> ADN
 15
 <213> Artificial
 <220>
 <223> inserción
 20
 <400> 27
 gggaattcga ttgccacccat gttttcacat cttccctttg actgtgtcct gctgctgctg 60
 ctgctactac ttacaaggtc ctcagaagtg gaatacagag cggagggtcgg tcagaatgcc 120
 tatctgcctt gcttctacac cccagccgcc ccagggaacc tcgtgcccgt ctgctggggc 180
 aaaggagcct gtcctgtggt tgaatgtggc aacgtggtgc tcaggactga tgaaagggat 240
 gtgaattatt ggacatccag atactggcta aatggggatt tccgcaaagg agatgtgtcc 300
 ctgaccatag agaatgtgac tctagcagac agtgggatct actgctgccg gatccaaatc 360
 ccaggcataa tgaatgatga aaaatttaac ctgaagttgg tcatcaaacc agccaaggtc 420
 acccctgcac cgactcggca gagagacttc actgcagcct ttccaaggat gcttaccacc 480
 aggggacatg gcccagcaga gacacagaca ctggggagcc tccctgatat aaatctaaca 540
 caaatatcca cattggccaa tgagttacgg gactctagat tggccaatga cttacggggac 600
 tctggagcaa ccatcagaga ctacaaggac gatgacgaca agtga 645

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 para la utilización en un procedimiento para prevenir o tratar un tumor sanguíneo en un sujeto que presenta una célula que expresa TIM-3 en la médula ósea o la sangre periférica,
5 en el que la célula es una fracción celular seleccionada de entre los (a) a (c) siguientes:

 (a) Lin(-)CD34(+)CD38(-);
 (b) Lin(-)CD34(+)CD38(+); y
 (c) Lin(-)CD34(-);
10 en el que el anticuerpo anti-TIM-3 es un anticuerpo que presenta una actividad de ADCC y/o una actividad de CDC; y en el que el tumor sanguíneo es la leucemia mielocítica aguda (AML), el síndrome mielodisplásico (MDS) o la leucemia mieloide crónica (CML).
- 15 2. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 para la utilización en un procedimiento para prevenir o tratar un tumor sanguíneo en un sujeto que presenta una célula que expresa TIM-3 en la médula ósea o en la sangre periférica,
20 en la que la célula es una fracción celular seleccionada de entre los (a) a (c) siguientes:

 (a) Lin(-)CD34(+)CD38(-);
 (b) Lin(-)CD34(+)CD38(+); y
 (c) Lin(-)CD34(-);
25 en la que el anticuerpo anti-TIM-3 es un anticuerpo que presenta una actividad de ADCC y/o una actividad de CDC; y en la que el tumor sanguíneo es AML, MDS o CML.
3. Utilización de un anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 para la preparación de una composición para prevenir o tratar un tumor sanguíneo en un sujeto que presenta una célula que expresa TIM-3 en la médula ósea o en la sangre periférica,
30 en la que la célula es una fracción celular seleccionada de entre los (a) a (c) siguientes:

 (a) Lin(-)CD34(+)CD38(-);
 (b) Lin(-)CD34(+)CD38(+); y
 (c) Lin(-)CD34(-);
35 en la que el anticuerpo anti-TIM-3 es un anticuerpo que presenta una actividad de ADCC y/o una actividad de CDC; y en la que el tumor sanguíneo es AML, MDS o CML.
- 40 4. Utilización de un anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 en un procedimiento para detectar un tumor sanguíneo, comprendiendo dicho procedimiento utilizar el anticuerpo anti-TIM-3 para reconocer una célula que expresa TIM-3 en una muestra de médula ósea o de sangre periférica derivada de un sujeto,
45 en la que la célula es una fracción celular seleccionada de entre los (a) a (c) siguientes:

 (a) Lin(-)CD34(+)CD38(-);
 (b) Lin(-)CD34(+)CD38(+); y
 (c) Lin(-)CD34(-);
50 en la que el anticuerpo anti-TIM-3 es un anticuerpo que presenta una actividad de ADCC y/o una actividad de CDC; y en la que el tumor sanguíneo es AML, MDS o CML.
- 55 5. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, composición para la utilización según la reivindicación 2, o utilización según la reivindicación 3 o 4, en el/la que el tumor sanguíneo es recurrente y/o resistente.

Fig. 1

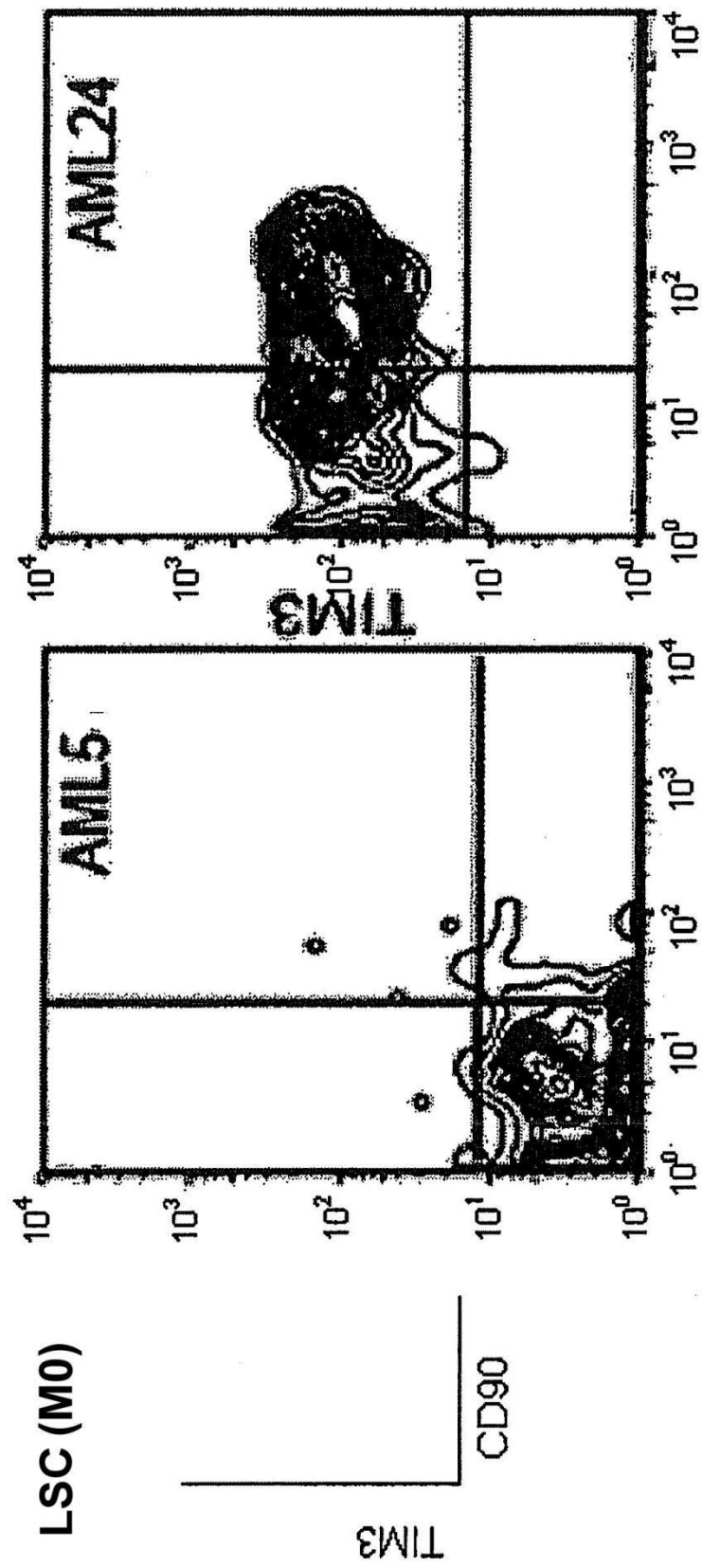


Fig. 2

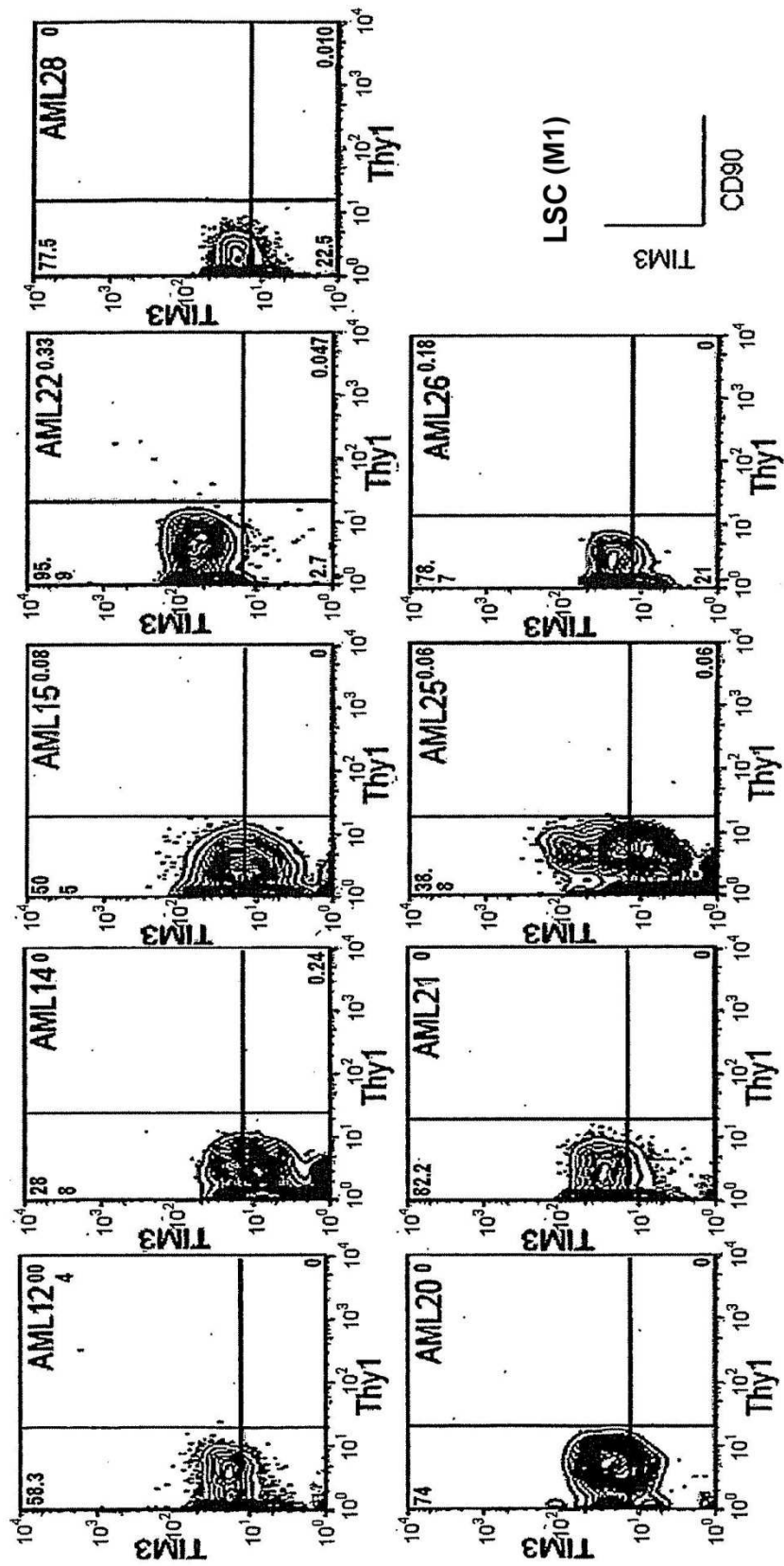


Fig. 3

LSC (M2)

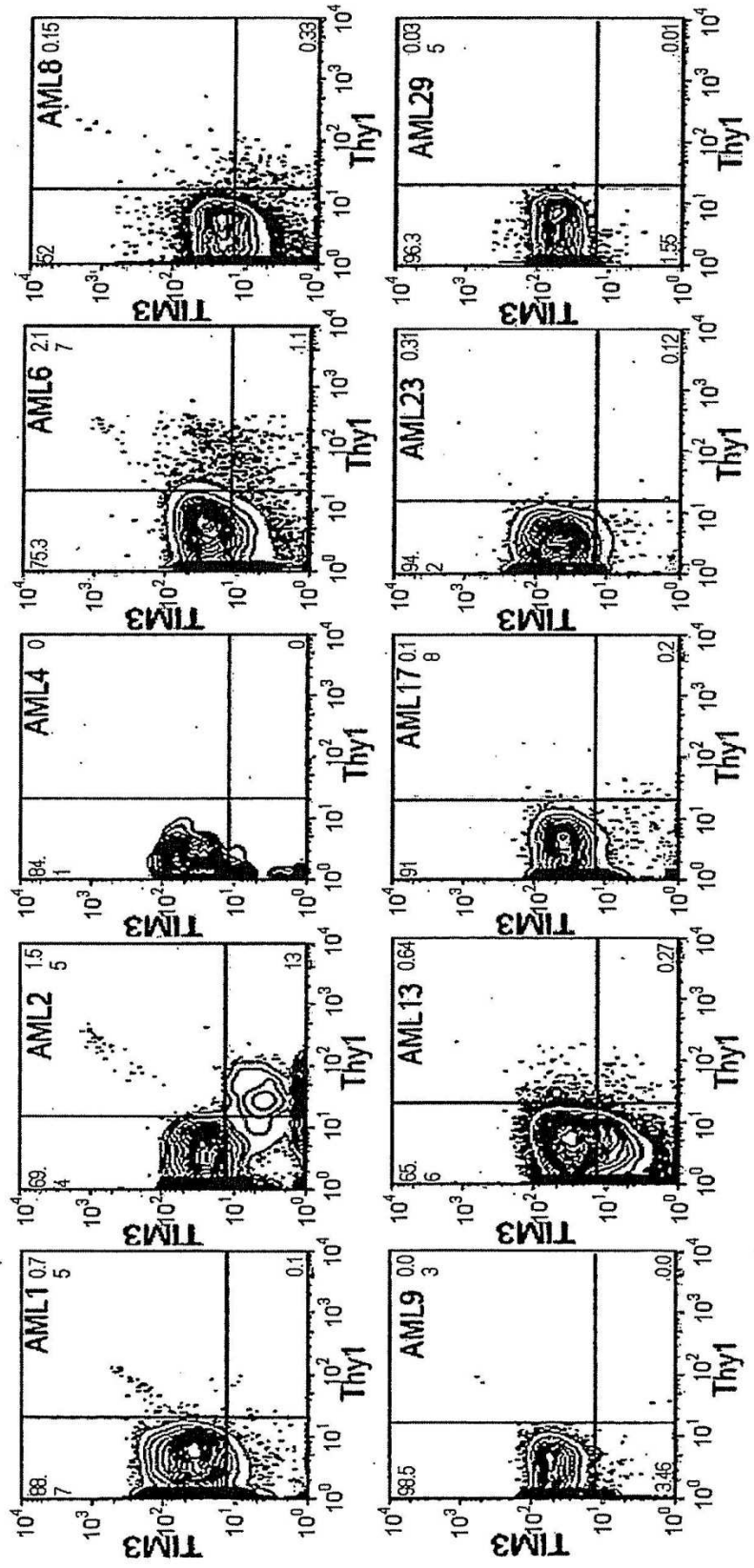
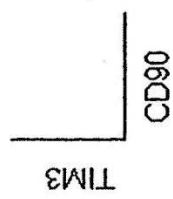


Fig. 4

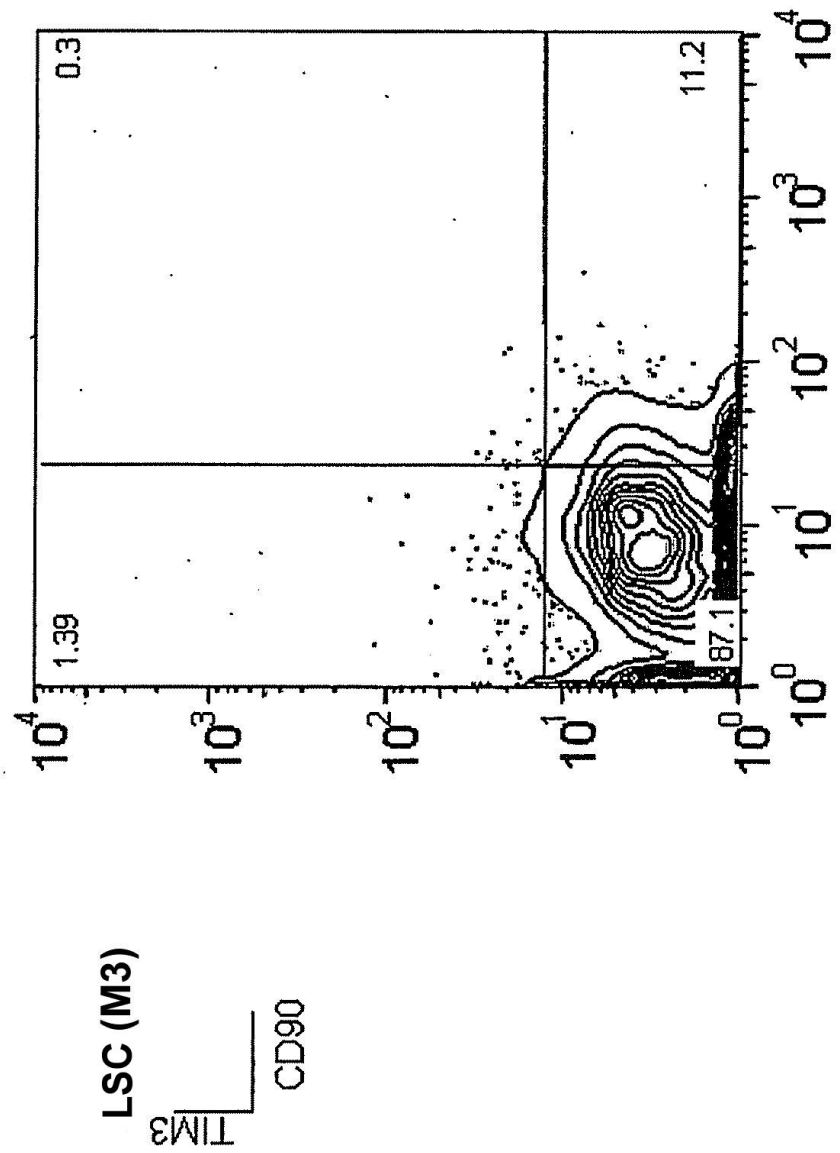


Fig. 5

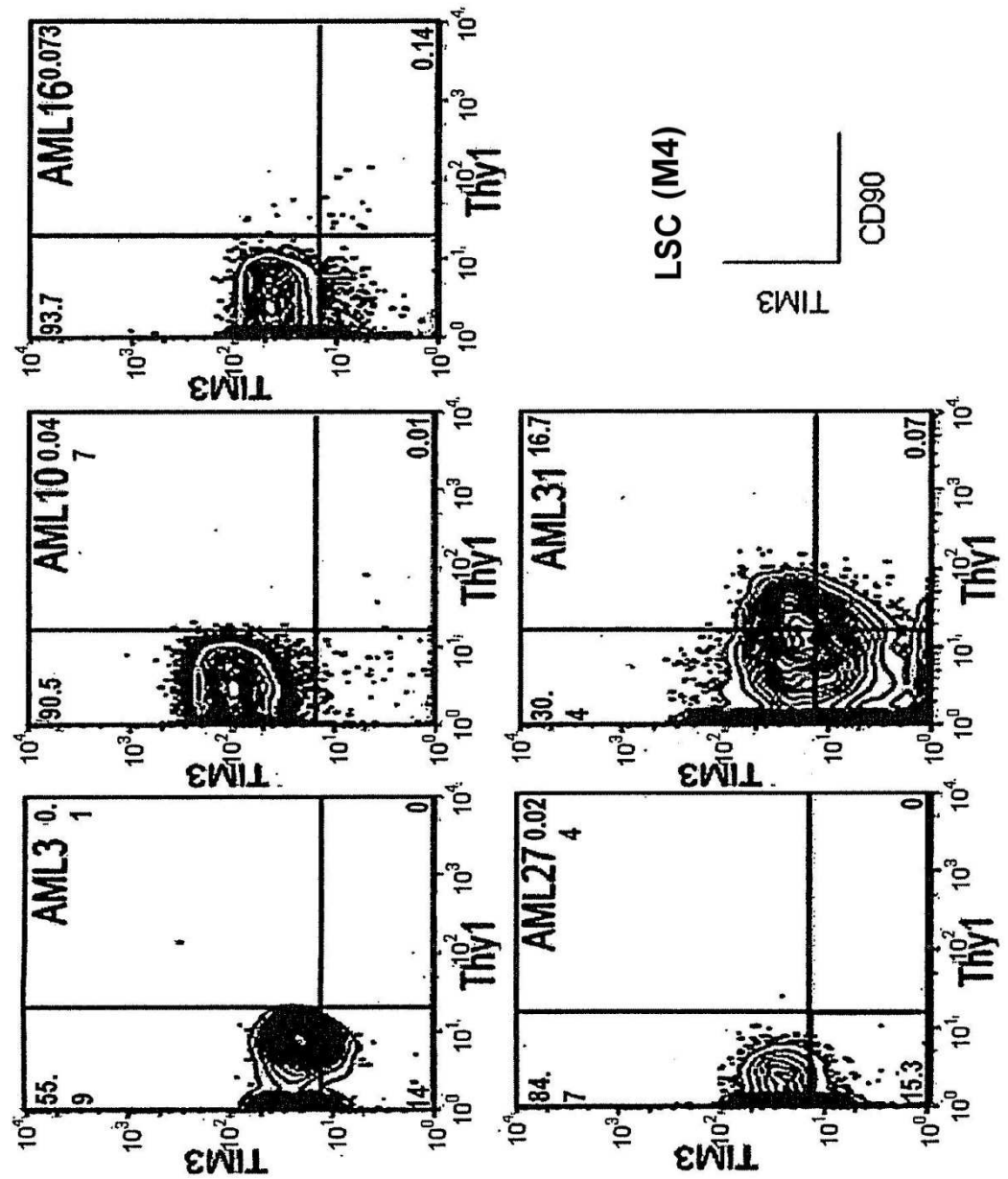


Fig. 6

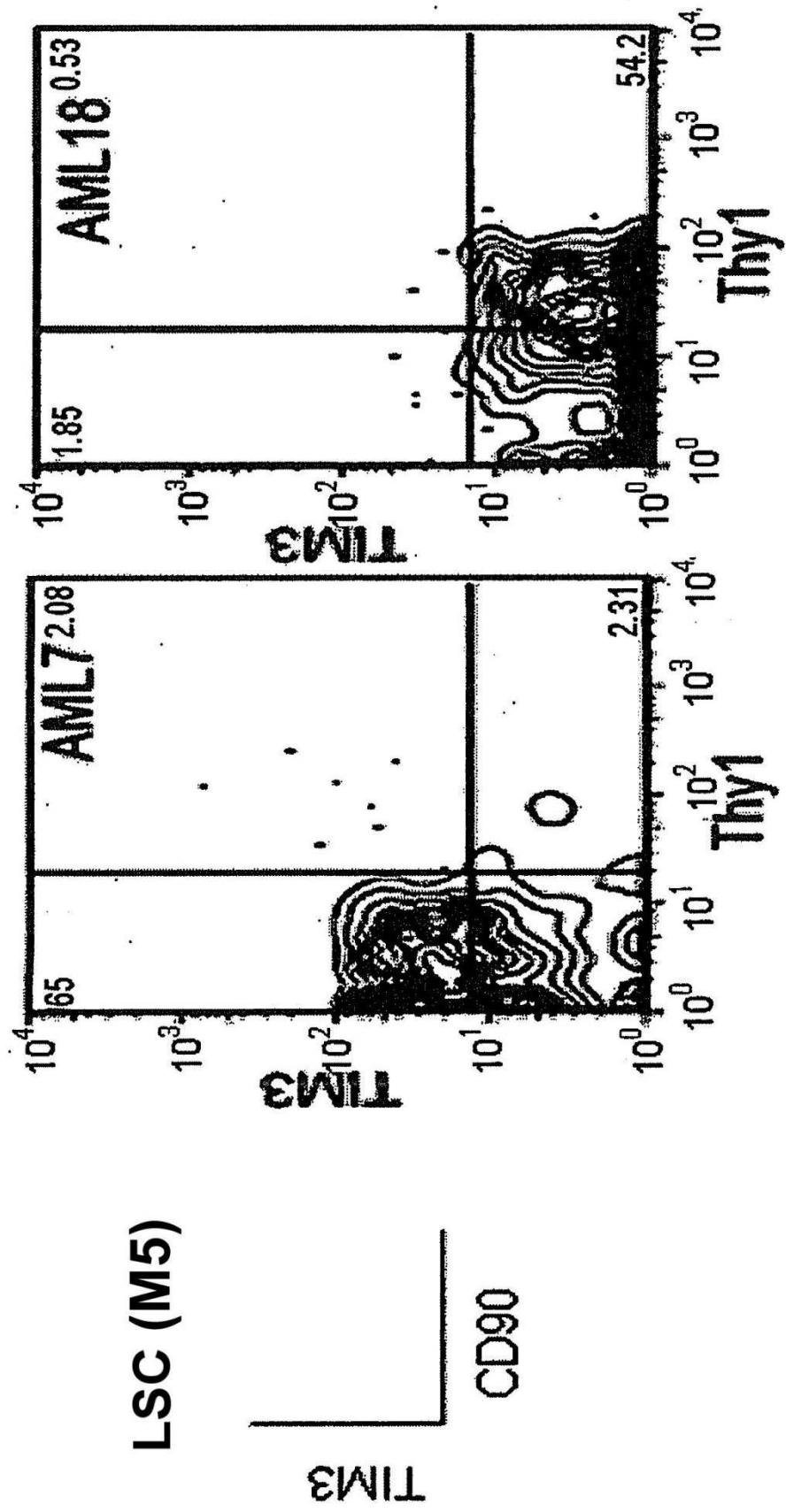


Fig. 7

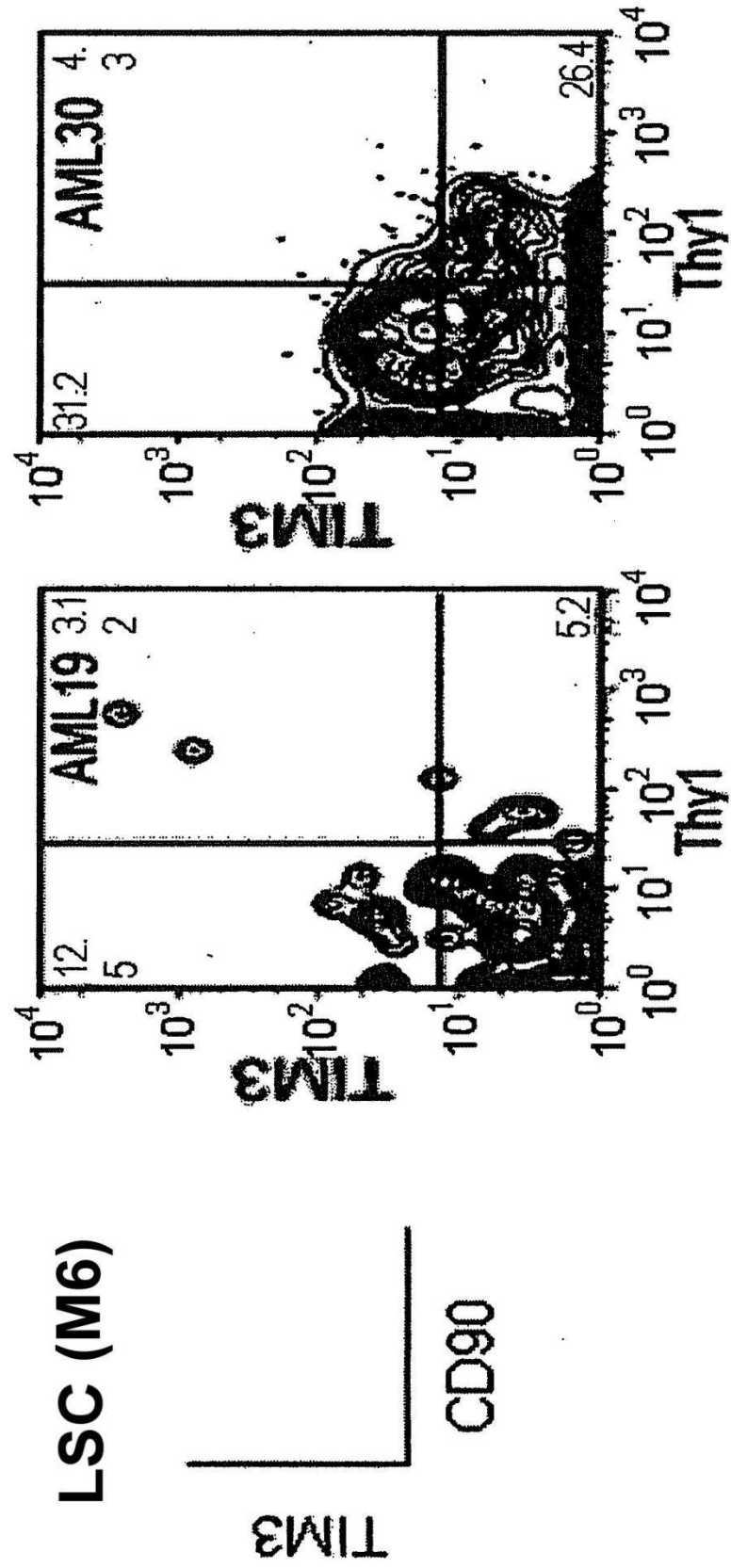


Fig. 8

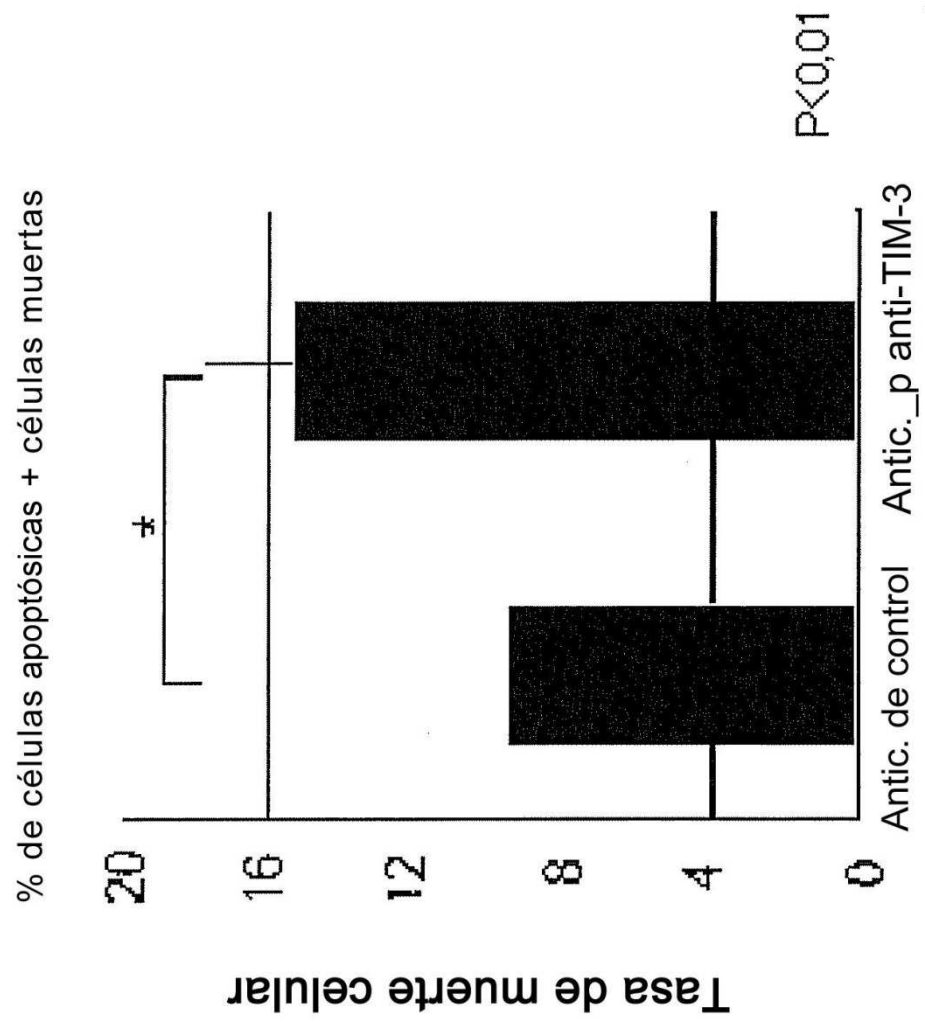


Fig. 10

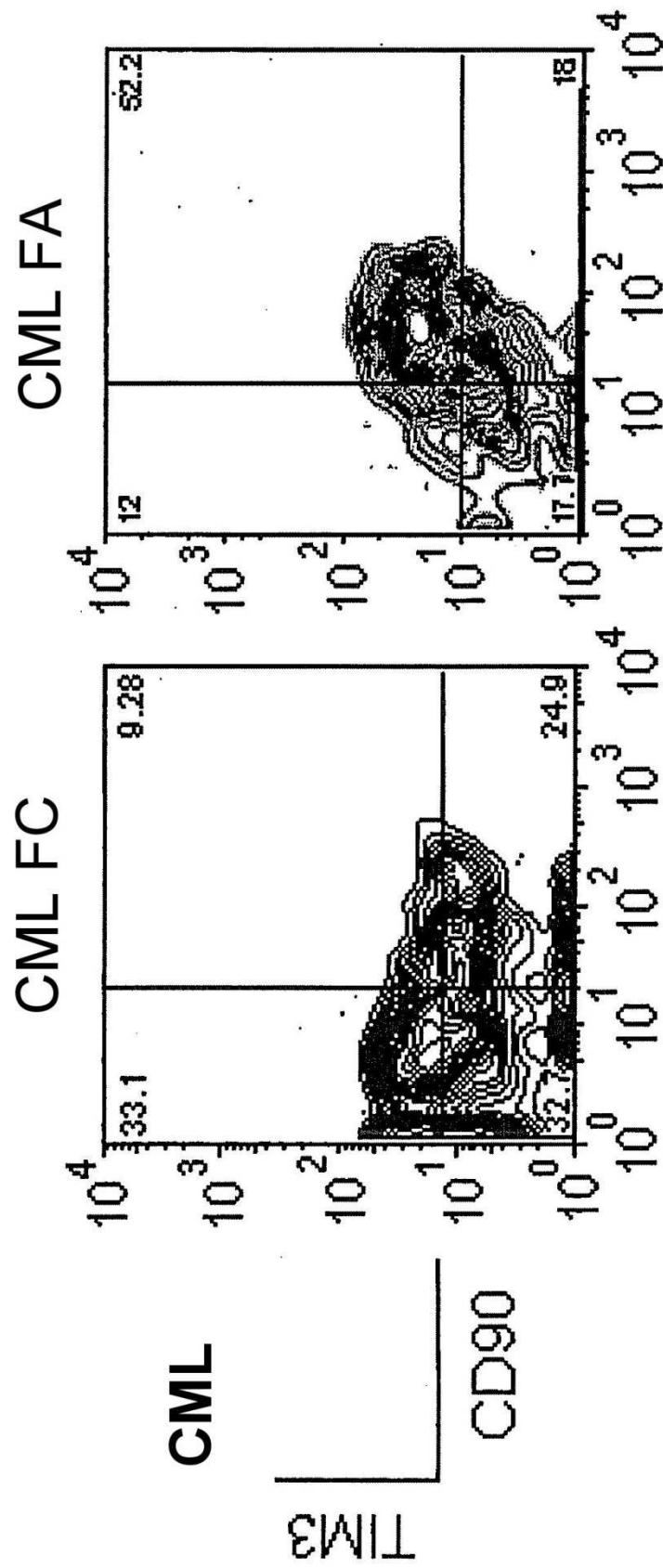


Fig. 11

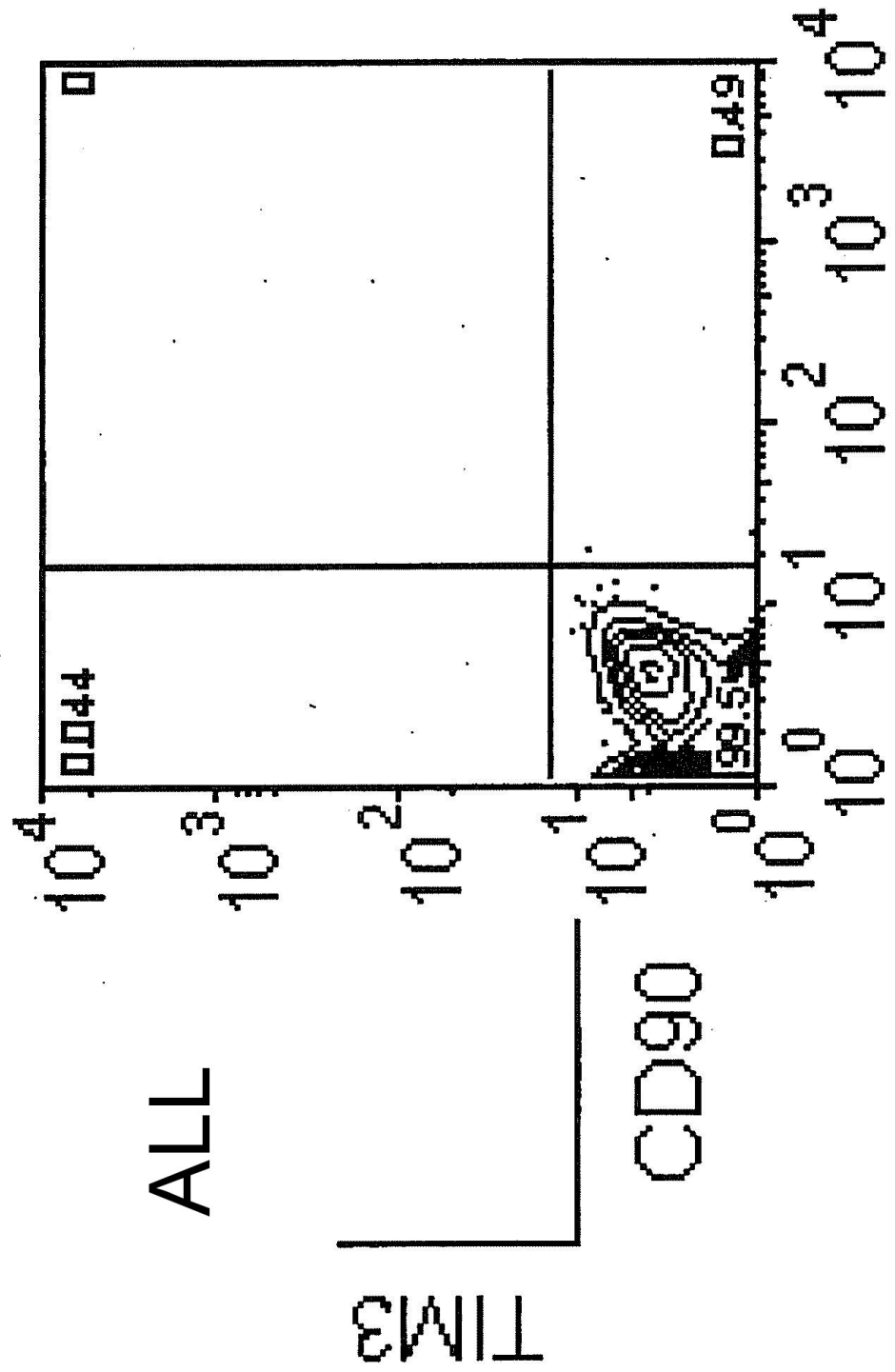


Fig. 12

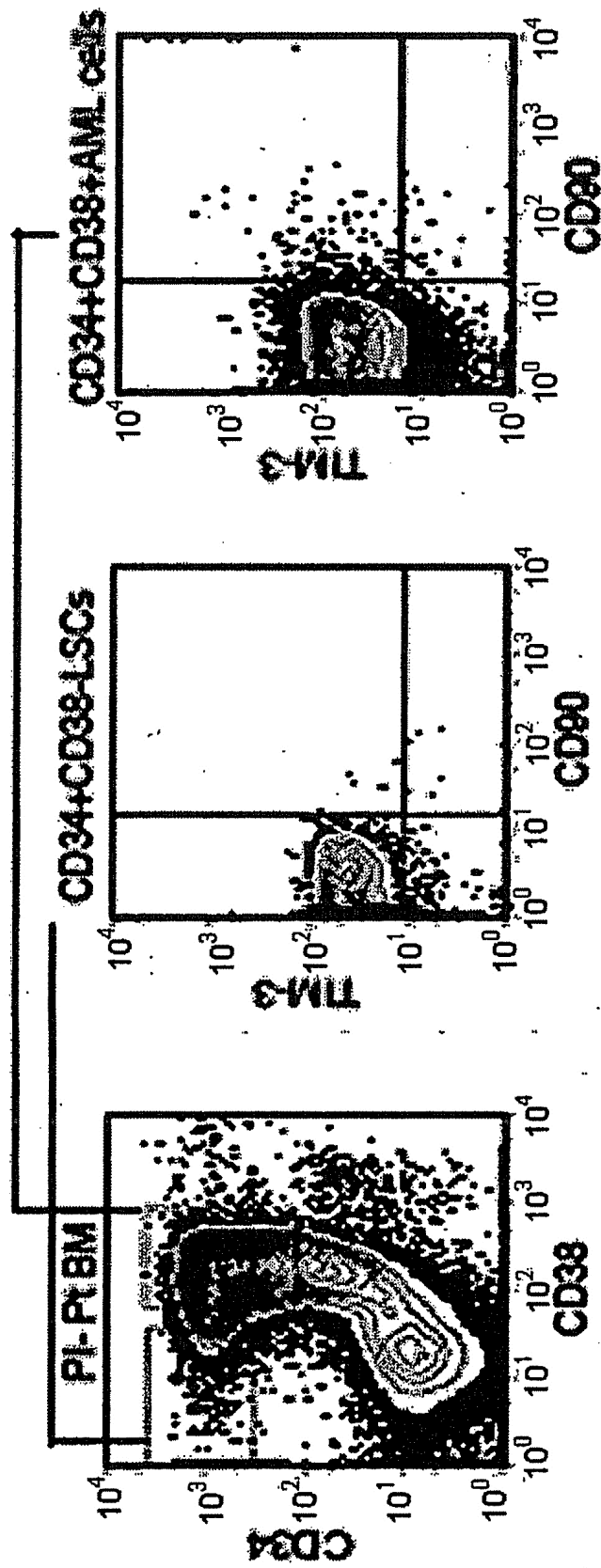


Fig. 13

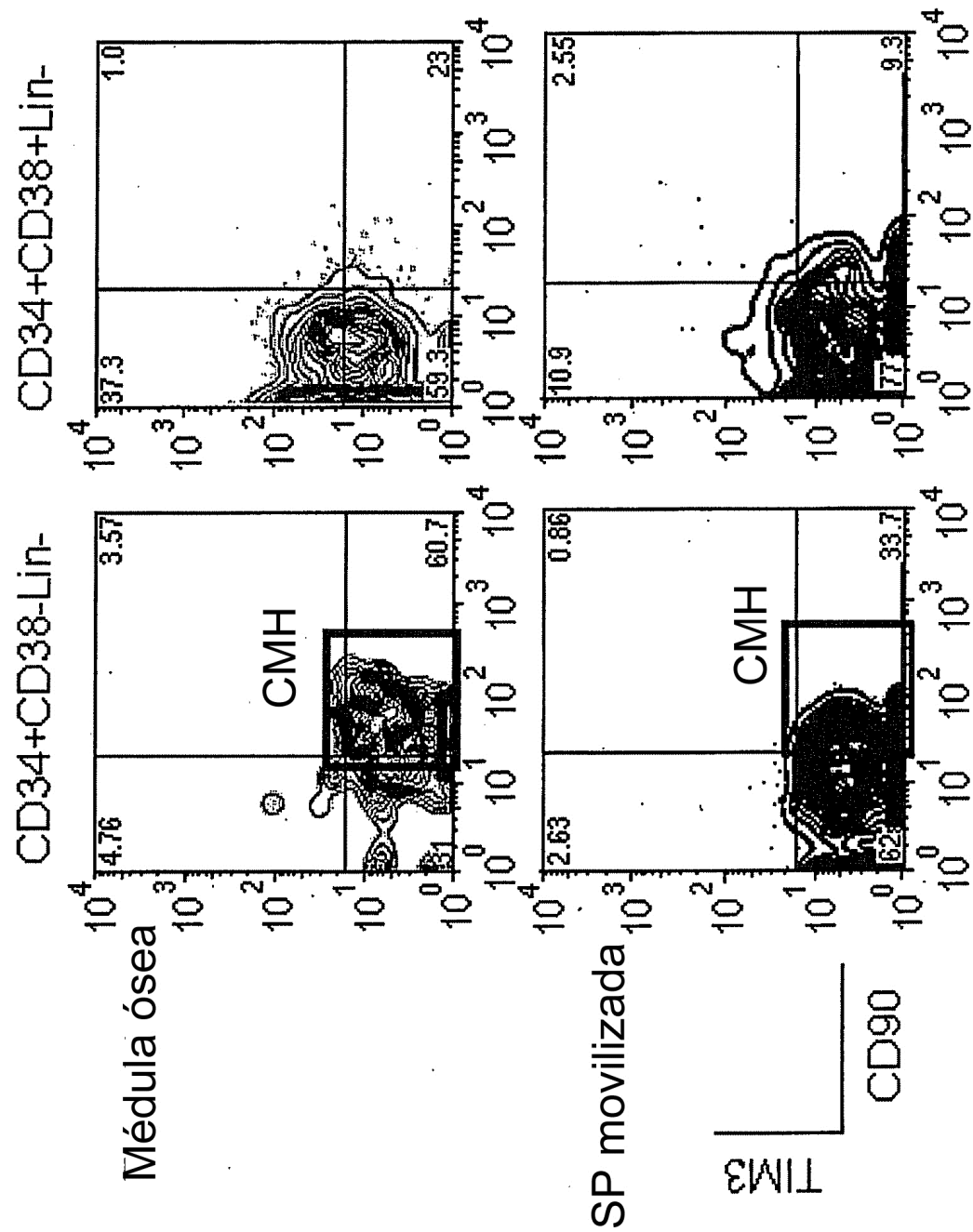


Fig. 14

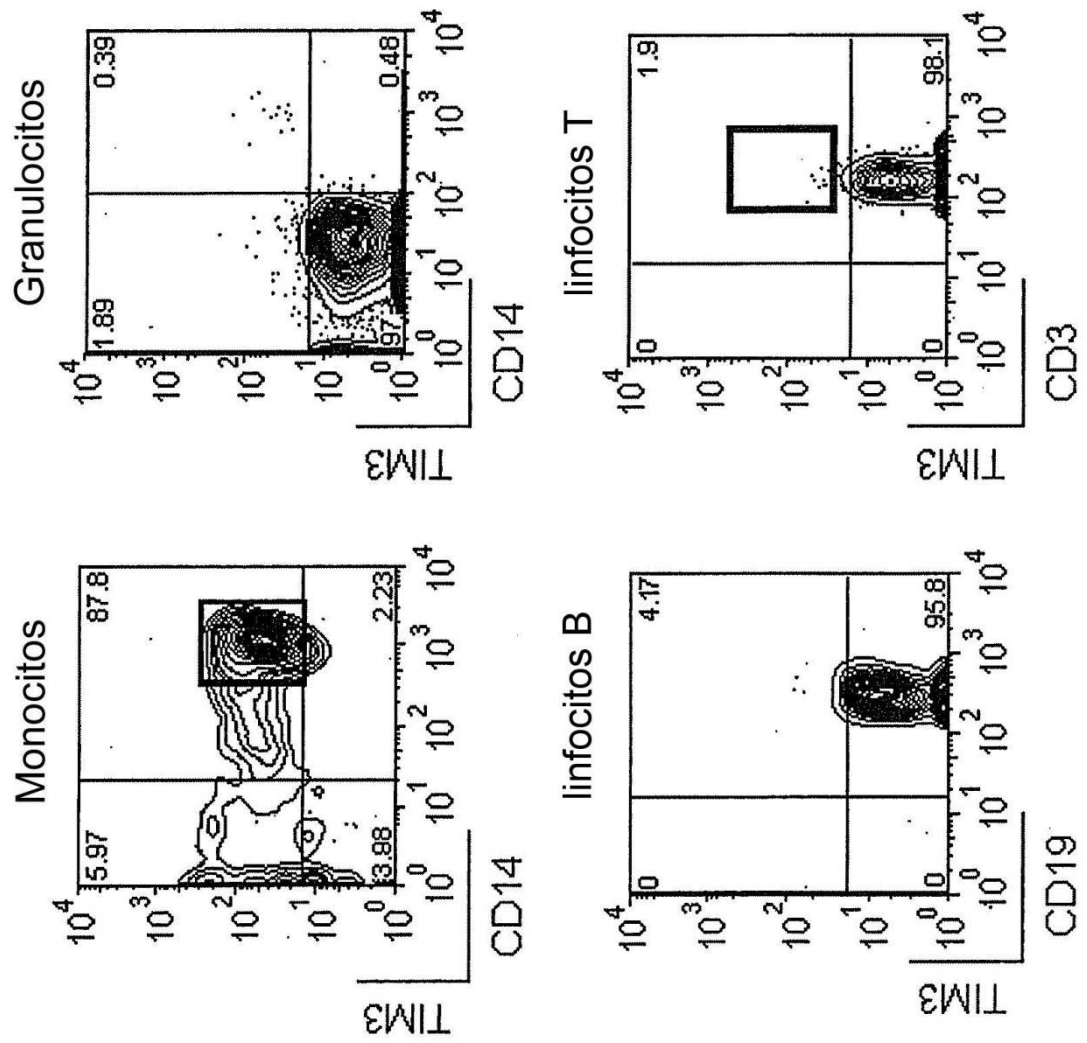


Fig. 15

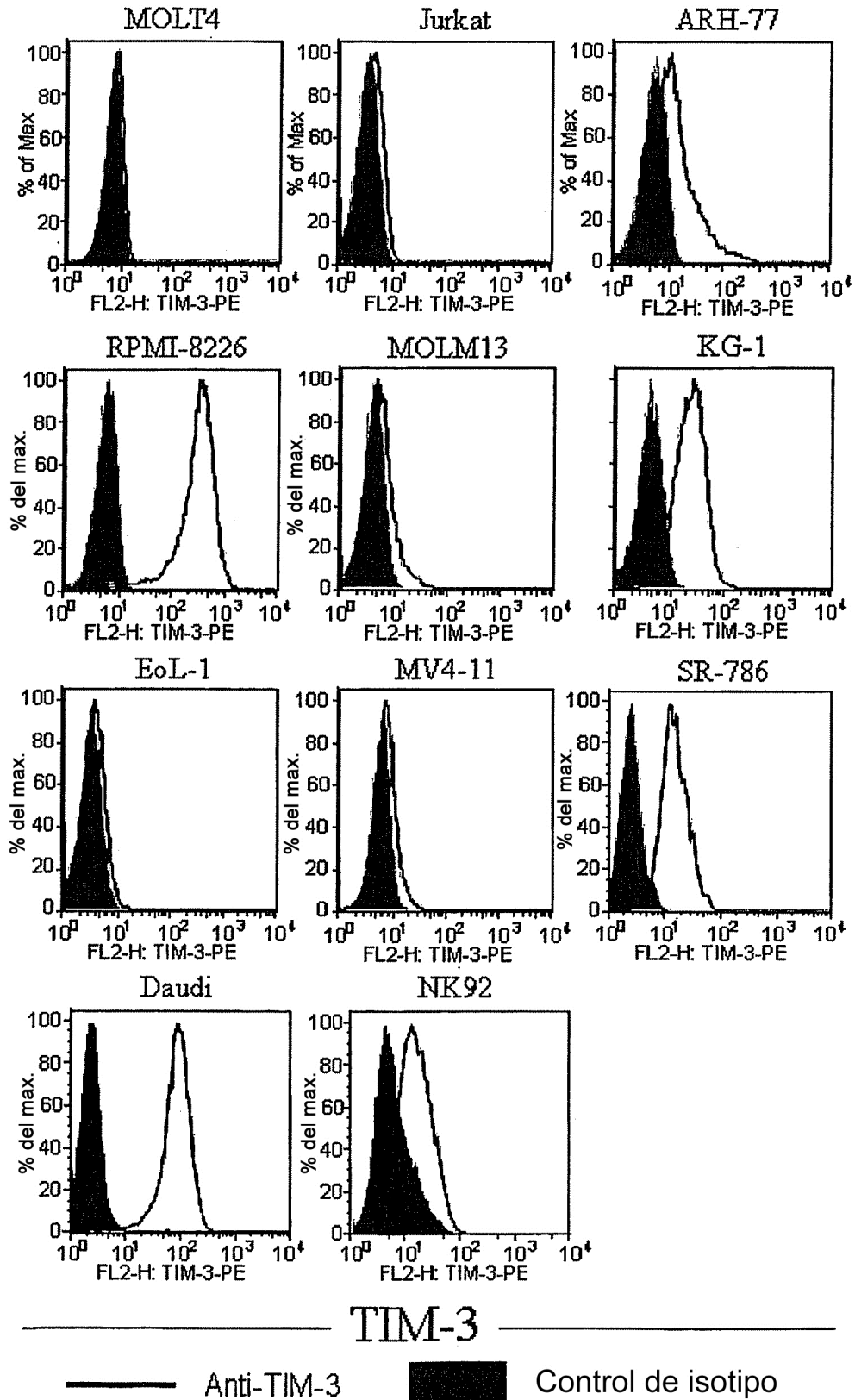


Fig. 16

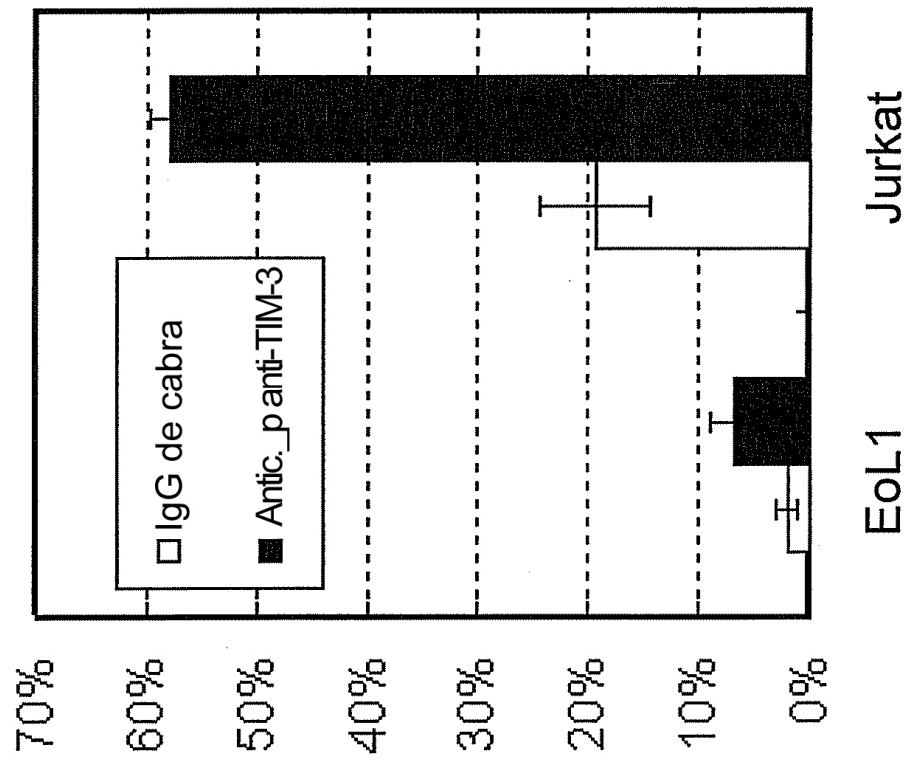


Fig. 17

