

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 078**

51 Int. Cl.:

A61P 7/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2011 PCT/JP2011/063396**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11155607**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2011 E 11792564 (4)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2581113**

54 Título: **Anticuerpo anti-TIM-3**

30 Prioridad:

11.06.2010 US 353836 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.09.2018

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:

TAKAYANAGI, SHIN-ICHIRO;
TOMURA, HITOMI;
TAWARA, TOMONORI;
INAGAKI, YOSHIMASA;
KUBOTA, TSUGUO;
AKASHI, KOICHI y
KIKUSHIGE, YOSHIKANE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 682 078 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

Anticuerpo anti-TIM-3.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a la región extracelular de la molécula-3 que contiene dominio de inmunoglobulina de células T y de mucina (en adelante denominada "TIM-3") y que muestra citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (en adelante denominada "ADCC"), a un ADN que codifica el anticuerpo, a un vector que comprende el ADN, a un transformante obtenido mediante la transformación del vector, a un procedimiento para producir un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo utilizando el transformante, a un método *in vitro* para detectar o medir inmunológicamente una TIM-3 humana y a un anticuerpo monoclonal para la utilización en el tratamiento de un cáncer relacionado con una célula positiva para la TIM-3 humana.

15 **Antecedentes de la técnica**

La familia del gen de TIM-3 consiste en ocho genes en el ratón y en tres genes en el ser humano, y cada uno de dichos genes se encuentra localizado en el cromosoma 11 y en el cromosoma 5q33, respectivamente (documento no de patente nº 1). Es conocida la asociación de dichas regiones génicas con enfermedades autoinmunitarias y enfermedades alérgicas. La proteína TIM es una proteína transmembranaria de tipo I que presenta un dominio variable de inmunoglobulina (IgV) de estructura conservada y un dominio de mucina.

La proteína TIM se considera que se expresa específicamente sobre las células T y que regula directamente la actividad de las células T aunque hay publicaciones recientes sobre la expresión de la proteína TIM-3 en células presentadoras de antígenos y sobre sus funciones (documento no de patente nº 2). Según el análisis de la estructura cristalina, la proteína TIM presenta una estructura proteica conservada y presenta un sitio de unión a ligandos en el dominio IgV.

Se ha identificado TIM-3 como una molécula que se expresa específicamente sobre las células Th1 de ratón pero no sobre las células Th2 (documento no de patente nº 3). La secuencia de ADN, la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de TIM-3 se encuentran disponibles en bases de datos públicas, tales como GenBank número de acceso NM_032782 y NM_134250. También se conoce TIM-3 como HAVCR2.

En el ser humano, de manera similar al ratón, TIM-3 se expresa sobre las células T así como en células fagocíticas, tales como macrófagos y células dendríticas. La unión de TIM-3 a un ligando proteína (por ejemplo la galectina-9) puede inhibir la respuesta de Th1 mediante un mecanismo de inducción de apoptosis y, por lo tanto, conducir a la inducción de tolerancia periférica.

La reducción de la expresión de TIM-3 humana con ARNip o la inhibición de la TIM-3 humana mediante un anticuerpo bloqueante incrementa la secreción de interferón γ (IFN- γ) a partir de células T positivas para CD4, apoyando el papel de inhibidor de TIM-3 en las células T humanas. En los fagocitos, TIM-3 también funciona como receptor para el reconocimiento de las células apoptóticas.

El análisis de las muestras clínicas de pacientes de enfermedad autoinmunitaria no demostró expresión de TIM-3 en las células positivas para CD4. En particular, en los clones de células T derivados del líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple, el nivel de expresión de TIM-3 era más bajo y el nivel de secreción de IFN- γ era más alto que en los clones derivados de personas sanas normales (documento no de patente nº 4). Existen informes referidos a la relación entre TIM-3 y enfermedades alérgicas o asma (documentos de patente nº 1 y nº 2).

Según el análisis de micromatrices de células madre hematopoyéticas procedentes de pacientes de leucemia mieloide aguda (en adelante denominada "LMA") y de células madre hematopoyéticas normales, TIM-3 se expresa en las células madre de LMA y, por lo tanto, el análisis señala a la participación de TIM-3 en las neoplasias malignas hematológicas (documento no de patente nº 5 y documento de patente nº 3).

Entre los ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-TIM-3 establecidos hasta hoy se incluyen el anticuerpo monoclonal de arata anti-TIM-3 humano (clon 344823, fabricado por R&D Systems) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-TIM-3 humano (clon F38-2E2, fabricado por R&D Systems).

La literatura de patente nº 4 da a conocer usos terapéuticos de los moduladores de TIM-3.

La literatura de patente nº 5 da a conocer composiciones que contienen un antígeno y una molécula de reconocimiento de TIM y métodos de estimulación de una respuesta inmunológica mediante la administración de un antígeno y una molécula de reconocimiento de TIM.

Técnica relacionada

Literatura de patentes

- 5 Literatura de patente nº 1 WO96/27603
- Literatura de patente nº 2 WO2003/063792
- Literatura de patente nº 3 WO2009/091547
- Literatura de patente nº 4 WO2008/060617
- 10 Literatura de patente nº 5 WO2005/097211

Literatura no de patentes

- Literatura no de patentes nº 1 Hafler DA et al., JExp Med. 205: 2699-701 (2008)
- Literatura no de patentes nº 2 Anderson AC et al., Science 318: 1141-3 (2007)
- 15 Literatura no de patentes nº 3 Monney L et al., Nature 415: 536-41 (2002)
- Literatura no de patentes nº 4 Koguchi K et al., J Exp Med. 203: 1413-8 (2006)
- Literatura no de patentes nº 5 Majeti R et al., Proc Natl Acad Sci USA 2009 Mar 3; 106 (9): 3396-401.

Exposición de la invención

Problemas que debe resolver la invención

20 Sin embargo, no existe ningún informe de un anticuerpo monoclonal contra la TIM-3 humana que presente actividad de ADCC. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se una a la secuencia de aminoácidos o a la estructura tridimensional de la región extracelular de TIM-3 y exprese actividad de ADCC. Además, el objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-TIM-3 humano que presente una actividad de ADCC elevada mediante el cribado de un anticuerpo anti-TIM-3 humano que compita con el anticuerpo monoclonal o con el fragmento de anticuerpo del mismo.

30 Además, la presente invención proporcionar un hibridoma que produce el anticuerpo; un ADN que codifica el anticuerpo; un vector que comprende el ADN; un transformante obtenido mediante transformación del vector; un procedimiento para producir un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo utilizando el hibridoma o el transformante, y un agente diagnóstico o un agente terapéutico que utiliza el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo como principio activo.

Medios para resolver los problemas

40 Lo esencial de la presente invención se refiere a lo siguiente:

- 45 (1) Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a una región extracelular de la TIM-3 humana, en el que el anticuerpo muestra actividad de ADCC y es un anticuerpo monoclonal que comprende la VH de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 21 a 127 de la SEC ID nº 10.
- (2) El anticuerpo monoclonal indicado en (1), anteriormente, que es un anticuerpo recombinante.
- (3) Un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal indicado en (1) o (2), anteriormente.
- 50 (4) Un vector recombinante que comprende el ADN indicado en (3), anteriormente.
- (5) Un transformante que es una célula que expresa establemente el anticuerpo monoclonal indicado en (1) o (2), anteriormente, obtenible mediante la introducción del vector recombinante indicado en (4), anteriormente, en una célula hospedadora.
- 55 (6) Un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal indicado en (1) o (2), anteriormente, que comprende cultivar el transformante indicado en (5), anteriormente, en cultivo para formar y acumular el anticuerpo monoclonal indicado en (1) o (2), anteriormente, y recuperar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo a partir del cultivo.
- 60 (7) Un método in vitro para detectar o medir inmunológicamente una TIM-3 humana que comprende utilizar el anticuerpo monoclonal indicado en (1) o (2), anteriormente.
- 65 (8) El anticuerpo monoclonal indicado en (1) o (2), anteriormente, para la utilización en un método de terapia para una enfermedad relacionada con una célula positiva para la TIM-3 humana, en la que la enfermedad es un cáncer.

Efectos de la invención

5 El anticuerpo monoclonal de la presente invención reconoce específicamente la secuencia de aminoácidos o la estructura tridimensional de la región extracelular de la TIM-3 humana y se une a la región extracelular. La secuencia de aminoácidos o la estructura tridimensional de la región extracelular de la TIM-3 humana que es reconocida por el anticuerpo monoclonal de la presente invención es diferente de las reconocidas por los anticuerpos monoclonales anti-TIM-3 conocidos. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal de la presente invención presenta una actividad de ADCC más elevada. El anticuerpo monoclonal de la presente invención que se une específicamente a la región extracelular de la TIM-3 humana y presenta una actividad de ADCC más elevada resulta útil como agente terapéutico y como agente diagnóstico para una enfermedad relacionada con las células positivas para TIM-3 humanas.

15 La presente invención puede proporcionar un ADN que codifica el anticuerpo; un vector que comprende el ADN; un transformante obtenido mediante transformación del vector; un procedimiento para producir un anticuerpo utilizando el transformante; un método diagnóstico in vitro que utiliza el anticuerpo, y el anticuerpo para la utilización en un método de terapia.

Breve descripción de los dibujos

20 [Figura 1] La figura 1 son las secuencias de aminoácidos que representan HV0, HV3, HV4, HV5, HV6, HV7, HV8, HV10 y HV12 de las regiones variables de cadena H diseñadas del anticuerpo 8213, respectivamente.

25 [Figura 2] La figura 2 son las secuencias de aminoácidos que representan LV0, LV2, LV4, LV5, LV6, LV7 y LV9 de las regiones variables de cadena L diseñadas del anticuerpo 8213.

Formas de realización para poner en práctica la invención

30 La TIM-3 humana incluye un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 53 o NCBI n° de acceso NM_032782 y que presenta una función de la TIM-3; un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 70%, preferentemente una homología de por lo menos 80%, más preferentemente de por lo menos 90% y todavía más preferentemente de por lo menos 95%, estando la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 53 o NCBI n° de acceso NM_032782 y que presenta una función de TIM-3 y similares.

35 El polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos aminoácidos han sido eliminados, sustituidos y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 53 o NCBI n° de acceso NM_032782 puede obtenerse, por ejemplo, mediante la introducción de una mutación dirigida en el ADN codificante del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 53 mediante mutagénesis dirigida, descrita en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 1987-1997); Nucleic Acids Research 10:6487, 1982; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409, 1982; Gene 34:315, 1985 y Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985, o similares.

45 El número de residuos aminoácidos que han sido eliminados, sustituidos o añadidos no se encuentra particularmente limitado y el número preferentemente es de entre 1 y docenas, tal como de entre 1 y 20, y más preferentemente de entre 1 y varios, tal como de entre 1 y 5.

50 Como gen que codifica la TIM-3 humana, entre los ejemplos se incluyen la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID n° 52 o NCBI n° de acceso NM_032782. Entre los ejemplos se incluyen además un gen que comprende una secuencia de nucleótidos en la que por lo menos un nucleótido ha sido eliminado, sustituido o añadido a la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID n° 52 o NCBI n° de acceso NM_032782 y que comprende un ADN codificante de un polipéptido que presenta una función de TIM-3; un gen que comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una homología de por lo menos 60%, preferentemente de por lo menos 80% y más preferentemente de por lo menos 95% respecto a la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID n° 52 o NCBI n° de acceso NM_032782 y que comprende un ADN codificante de un polipéptido que presenta una función de TIM-3; un gen que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID n° 52 o NCBI n° de acceso NM_032782 bajo condiciones restrictivas y que codifica un polipéptido que presenta una función de TIM-3 y similares.

60 El ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas se refiere a un ADN que se obtiene mediante hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación de transferencia southern, análisis de micromatrices de ADN o similares utilizando un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID n° 52 o NCBI n° de acceso NM_032782 como sonda.

65 Un ejemplo específico de dicho ADN es un ADN que puede identificarse llevando a cabo la hibridación a 65°C en

- 5 presencia de 0,7 a 1,0 mol/l de cloruro sódico utilizando un filtro o un portaobjetos de vidrio con ADN derivado de colonias o placas, productos de PCR u ADN de oligo codificante de la secuencia de ADN inmovilizada en las mismas y lavando después el filtro o un portaobjetos de vidrio a 65°C con una solución SSC de concentración 0,1 a 2 veces (solución SSC de concentración 1 vez: cloruro sódico 150 mmoles/l y citrato sódico 15 mmoles/l). La hibridación puede llevarse a cabo según los métodos descritos en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997; ADN Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, segunda edición, Oxford University, 1995, y similares.
- 10 Específicamente, el ADN capaz de hibridación incluye ADN que presenta una homología de 60% o superior, preferentemente de 80% o superior y más preferentemente de 95% o superior respecto a la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 52 o NCBI nº de acceso NM_032782.
- 15 En la secuencia de nucleótidos del gen codificante de una proteína de un eucariota, con frecuencia se identifican polimorfismos genéticos. El gen TIM-3 también incluye un gen en el que se genera una pequeña modificación en la secuencia de nucleótidos mediante dicho polimorfismo.
- 20 El número de la homología puede ser un número calculado mediante la utilización de un programa de búsqueda de homologías conocidos por el experto en la materia, a menos que se indique lo contrario. Con respecto a la secuencia de nucleótidos, el número puede calcularse mediante la utilización de un parámetro por defecto en BLAST [J. Mol. Biol. 215:403, 1990] o similar y con respecto a la secuencia de aminoácidos, el número puede calcularse mediante la utilización de un parámetro por defecto en BLAST2 [Nucleic Acids Res. 25:3389, 1997; Genome Res. 7:649, 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>] o similar.
- 25 Como parámetro por defecto, G (coste de abrir hueco) es 5 para la secuencia de nucleótidos y de 11 para la secuencia de aminoácidos; -E (coste de extender hueco) es de 2 para la secuencia de nucleótidos y de 1 para la secuencia de aminoácidos; -q (penalización por no correspondencia de nucleótidos) es de -3; -r (recompensa por correspondencia de nucleótido) es de 1; -e (valor esperado) es de 10; -W (tamaño de palabra) es de 11 residuos para la secuencia de nucleótidos y de 3 residuos para la secuencia de aminoácidos; -y (Dropoff (X) para extensiones de blast, en bits) es de 20 para blastn y de 7 para otro programa diferente de blastn; -X (valor 'dropoff' X para alineación con huecos, en bits) es de 15, y Z (valor final de dropoff X para alineación con huecos, en bits) es de 50 para blastn y de 25 para otro programa diferente de blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>).
- 30 El polipéptido que comprende una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53 o NCBI nº de acceso NM_032782 puede prepararse siguiendo un método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, puede prepararse mediante la eliminación de un aparte del ADN codificante de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 52 y el cultivo de un transformante en el que se introduce un vector de expresión que contiene el ADN.
- 35 Además, basándose en el polipéptido o ADN preparado de esta manera, puede prepararse de la manera indicada anteriormente un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituyen o añaden uno o más aminoácidos a una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53 o NCBI nº de acceso NM_032782.
- 40 El polipéptido que comprende una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53 o NCBI nº de acceso NM_032782, o el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un aminoácido ha sido eliminado, sustituido o añadido en una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53 o NCBI nº de acceso NM_032782 también puede producirse mediante un método de síntesis química, tal como un método de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o un método de t-butiloxicarbonilo (tBoc).
- 45 La región extracelular de la TIM-3 humana de la presente invención incluye, por ejemplo, regiones predichas mediante la utilización de la secuencia de aminoácidos del polipéptido representado por la SEC ID nº 53 con el programa de predicción de regiones transmembrana convencionalmente conocido SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html), TMHMM ver. 2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), ExPAS Proteomics Server (<http://Ca.expasy.org/>) o SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).
- 50 La secuencia de aminoácidos de la región extracelular de la TIM-3 humana incluye la secuencia de aminoácidos en las posiciones 1 a 201 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53, que es la región de la región extracelular predicha por SMART.
- 55 La estructura tridimensional de la región extracelular de la TIM-3 humana no se encuentra limitada, con la condición de que la región extracelular de la TIM-3 humana que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53 o GenBank número de acceso NM_032782 presente la misma estructura que en el estado natural. La estructura tridimensional de la región extracelular de la TIM-3 humana en el estado
- 60
- 65

natural es un tipo natural de estructura tridimensional de la TIM-3 humana expresada sobre la superficie de la membrana celular.

5 Con respecto a la función de la TIM-3 humana, la unión de TIM-3 a una proteína ligando (por ejemplo la galectina-9) puede inhibir la respuesta de Th2 mediante un mecanismo tal como la inducción de apoptosis en las células Th1, conduciendo por lo tanto a la inducción de tolerancia periférica. En los fagocitos, la TIM-3 humana funciona como un receptor que reconoce las células apoptóticas.

10 La unión del anticuerpo en la presente invención a una secuencia de aminoácidos de una región extracelular de la TIM-3 humana o una estructura tridimensional de la misma puede confirmarse mediante un método de detección inmunológica convencionalmente conocido, utilizando células que expresan la TIM-3 humana, tal como un radioinmunoensayo con un método de tipo sándwich en fase sólida o un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) y preferentemente un método de tinción celular fluorescente en el que se confirma la capacidad de unión de una célula que expresa un antígeno específico y un anticuerpo para el antígeno específico.

15 Entre los ejemplos específicos se incluye un método de tinción de anticuerpo fluorescente utilizando un sistema FMAT8100HTS (fabricado por Applied Biosystems) [Cancer Immunol. Immunother. 36:373, 1993] o similar, un método de tinción celular fluorescente utilizando citometría de flujo, resonancia del plasmón superficial utilizando un sistema Biacore (fabricado por GE Healthcare) o similar, y similares.

20 Además, Un método de detección inmunológica conocido [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, tercera edición, Academic Press, 1996; Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Monoclonal Antibody Experimental Manual, Kodan-sha Scientific, 1987] y similares pueden combinarse para confirmar la unión.

25 La célula que expresa la TIM-3 humana puede ser cualquier célula, con la condición de que exprese la TIM-3 humana, y entre los ejemplos se incluye una célula que se encuentra naturalmente presente en el cuerpo humano, una línea celular establecida a partir de la célula que se encuentra naturalmente presente en el cuerpo humano, una célula obtenida mediante una técnica recombinante y similares.

30 Entre los ejemplos de células que se encuentran naturalmente presentes en el cuerpo humano se incluye una célula que expresa la TIM-3 en el cuerpo de un paciente que sufre de cáncer, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad alérgica, concretamente las células son células Th1, macrófagos, células dendríticas o similares.

35 Entre los ejemplos de una línea celular establecida a partir de la célula que se encuentra naturalmente presente en el cuerpo humano se incluye una línea celular que expresa la TIM-3 humana, de entre las líneas celulares preparadas mediante el establecimiento de células que expresan la TIM-3 humana obtenidas a partir de los pacientes de cáncer anteriormente indicados, y entre los ejemplos de las mismas se incluyen la línea celular de leucemia mieloide aguda humana KG-1 (ATCC n° de acceso CCL-246), la línea celular de linfoma de Burkitt humano Daudi (ATCC n° de acceso CCL-213), las cuales se establecen a partir de una célula humana, y similares.

40 Entre los ejemplos específicos de la célula obtenida mediante una técnica recombinante puede incluir una célula que expresa TIM-3 humana obtenida mediante la introducción de un vector de expresión que comprende un ADNc codificante de TIM-3 humana en una célula de insecto, una célula animal o similar, y otras.

45 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce una secuencia de aminoácidos o una estructura tridimensional de una región extracelular de la TIM-3 humana y que muestra actividad de ADCC.

50 La actividad de ADCC de la presente invención es una reacción en la que un anticuerpo que se encuentra unido a la TIM-3 humana sobre la superficie celular se une a FcγRIIIa sobre la superficie de principalmente una célula asesina natural (en adelante denominada célula NK) mediante la región Fc y, por lo tanto, una molécula citotóxica, tal como la molécula perforina, y el granzima liberado por la célula NK conduce a la lisis celular [Clark M., Chemical Immunology 65:88, 1997; Gorter A. et al., Immunol. Today 20:576, 1999].

55 El anticuerpo de la presente invención se une a una región extracelular de la TIM-3 humana y presenta actividad de ADCC. El anticuerpo de la invención reconoce una secuencia de aminoácidos de una región extracelular de la TIM-3 humana o de una estructura tridimensional de la misma.

60 El anticuerpo de la presente invención puede unirse a la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre secuencias preferentemente en las posiciones 67 a 105, más preferentemente en las posiciones 67 a 96 y todavía más preferentemente en las posiciones 67 a 87, de la secuencia de aminoácidos de la región extracelular de la TIM-3 humana que comprende la secuencia en las posiciones 1 a 201 de la secuencia representada por la SEC ID n° 53 o la estructura tridimensional de la misma.

65

El anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada (en adelante denominada "cadena H") de un anticuerpo que comprende las regiones determinantes de complementariedad (en adelante denominadas "RDC") 1 a 3 que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID nº 1 a nº 3, respectivamente, y comprende una cadena ligera (en adelante denominada "cadena L") de un anticuerpo que comprende las RDC 1 a 3 que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC ID nº 4 a nº 6, respectivamente.

El anticuerpo monoclonal incluye un monoclonal que comprende la VH de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 20 a 140 de la SEC ID nº 8 y comprende la VL de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 21 a 127 de la SEC ID nº 10.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención incluye un anticuerpo producido por un hibridoma y un anticuerpo recombinante producido por un transformante transformado con un vector de expresión que contiene un gen codificante del anticuerpo.

El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo secretado por un único clon de células productoras de anticuerpos y reconoce únicamente un epítipo (también denominado determinante antigénico) y presenta una secuencia de aminoácidos uniforme (estructura primaria).

Entre los ejemplos del epítipo se incluyen una única secuencia de aminoácidos, una estructura tridimensional que comprende la secuencia de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos unida mediante cadena sacárida, una estructura tridimensional que comprende una secuencia de aminoácidos unida mediante cadena sacárida y similares, que reconoce y a la que se une un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención se une preferentemente a la secuencia de aminoácidos en las posiciones 22 a 131 del dominio IgV de la TIM-3 humana en las regiones extracelulares de la TIM-3 humana representada por la SEC ID nº 53. Específicamente, la secuencia de aminoácidos a la que se une el anticuerpo monoclonal de la presente invención preferentemente es la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 67 y 105, más preferentemente la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 67 y 96, y todavía más preferentemente la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 67 y 87 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53.

El epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de la presente invención preferentemente puede incluirse en el dominio IgV de la TIM-3 humana representada por la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 22 y 131 de la región extracelular de la TIM-3 humana representada por la SEC ID nº 53. Específicamente, el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de la presente invención preferentemente se encuentra incluido en la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 67 y 105, más preferentemente se encuentra incluido en la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 67 y 96 y todavía más preferentemente se encuentra incluido en la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 67 y 87 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53.

La secuencia de aminoácidos del epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de la presente invención preferentemente puede incluir por lo menos un aminoácido seleccionado de entre la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 67 y 87 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53 en el dominio IgV de la TIM-3 humana, y más preferentemente incluye por lo menos un aminoácido seleccionado de entre los aminoácidos en las posiciones 67, 74, 76, 78, 79, 81, 83 y 85.

La secuencia de aminoácidos del epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de la presente invención preferentemente puede incluir por lo menos dos o más aminoácidos continuos seleccionados entre las posiciones 67 y 87 del dominio IgV de la TIM-3 humana y más preferentemente puede incluir por lo menos un aminoácido seleccionado de entre los aminoácidos en las posiciones 67, 74, 76, 78, 79, 81, 83 y 85 e incluye por lo menos dos o más aminoácidos continuos seleccionados de la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 67 y 87 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53.

Específicamente, entre los ejemplos de la secuencia de aminoácidos del epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de la presente invención se incluye la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 67 y 74, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 67 y 76, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 67 y 78, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 67 y 79, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 67 y 81, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 67 y 83, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 67 y 85,

la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 74 y 76, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 74 y 78, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 74 y 79, la secuencia de aminoácidos que comprende los

aminoácidos entre las posiciones 74 y 81, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 74 y 83, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 74 y 85,

5 la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 76 y 78, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 76 y 79, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 76 y 81, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 76 y 83, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 76 y 85, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 78 y 79, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 78 y 81, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 78 y 83, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 78 y 85,

15 la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 79 y 81, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 79 y 83, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 78 y 85,

20 la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 81 y 83, la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 81 y 85,

la secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos entre las posiciones 83 y 85, y similares, en la secuencia de aminoácido representada por la SEC ID nº 53.

25 El hibridoma puede prepararse, por ejemplo, mediante la preparación de las células anteriormente indicadas que expresan TIM-3 como antígeno, la inducción de células productoras de anticuerpos con especificidad de antígeno procedentes de un animal inmunizado con el antígeno y la fusión de las células productoras de anticuerpos con células de mieloma. El anticuerpo anti-TIM-3 puede obtenerse mediante el cultivo del hibridoma o la administración de células de hibridoma en un animal con el fin de causar un tumor ascítico en el animal y la separación y purificación del cultivo o del ascites.

30 El animal inmunizado con un antígeno puede ser cualquier animal, con la condición de que pueda prepararse un hibridoma y convenientemente se utiliza un ratón, rata, hámster, pollo, conejo o similar. Además, la célula con actividad productora de anticuerpos puede obtenerse a partir de dicho animal y el anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo producido por un hibridoma obtenido mediante la fusión de la célula después de la inmunización in vitro con una célula de mieloma.

35 En la presente invención, el anticuerpo recombinante incluye un anticuerpo producido mediante recombinación genética, tal como un anticuerpo humano. Entre los anticuerpos recombinantes, uno que presenta carácter de anticuerpo monoclonal común, baja inmunogenicidad y semivida prolongada en sangre preferentemente actúa como agente terapéutico.

40 El anticuerpo monoclonal de la presente invención incluye un conjugado de anticuerpos en el que el anticuerpo monoclonal de la presente invención que reconoce específicamente la TIM-3 humana y se une a una secuencia de aminoácidos de la región extracelular o estructura tridimensional de la misma se une química o genéticamente a un isótopo radioactivo, un agente que presenta un peso molecular bajo, un agente que presenta un peso molecular alto, una proteína, un anticuerpo terapéutico o similar.

45 El conjugado de anticuerpos de la presente invención puede producirse mediante la conjugación química de un isótopo radioactivo, un agente de peso molecular bajo, un agente de peso molecular alto, un adyuvante, una proteína, un anticuerpo terapéutico o similar, con el lado N-terminal o C-terminal de una cadena H o L, un sustituyente, cadena lateral o cadena sacárida adecuado y similar del anticuerpo monoclonal de la presente invención que reconoce específicamente la TIM-3 humana y se une a una secuencia de aminoácidos de la región extracelular o estructura tridimensional de la misma [Kotai Kogaku Nyumon, publicado por Chijin Shoka, 1994].

50 Además, el conjugado de anticuerpo puede producirse genéticamente mediante la unión de un ADN codificante del anticuerpo monoclonal de la presente invención que reconoce específicamente la TIM-3 humana y se une a una secuencia de aminoácidos de la región extracelular o estructura tridimensional de la misma a otro ADN codificante de una proteína o anticuerpo terapéutico que debe conjugarse, la inserción del ADN en un vector para la expresión y la introducción del vector de expresión en una célula hospedadora apropiada.

55 El isótopo radioactivo incluye ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ⁶⁴Cu, ¹⁹⁹Tc, ⁷⁷Lu, ²¹¹At y similares. El isótopo radioactivo puede conjugarse directamente con el anticuerpo mediante el método de la cloramina T o similar. Además, puede conjugarse con el anticuerpo una sustancia quelante del isótopo radioactivo. El agente quelante incluye ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén-triaminapentaacético (MX-DTPA,) y similares.

60 El agente con un peso molecular bajo incluye un agente antitumoral, tal como un agente alquilante, un agente

nitrosourea, un antagonista del metabolismo, una sustancia antibiótica, un alcaloide derivado de una planta, un inhibidor de topoisomerasa, un agente para la hormonoterapia, un antagonista hormonal, un inhibidor de aromatasas, un inhibidor de glucoproteína P, un derivado de complejo de platino, un inhibidor de la fase M y un inhibidor de cinasa [Rinsho Syuyo-gaku (Oncología clínica), Gan to Kagakuryoho-Sha, 1996]; un agente esteroide, tal como hidrocortisona y prednisona; un agente no esteroideo, tal como aspirina e indometacina; un agente inmunomodulador, tal como aurotiomalato, penicilamina; un agente inmunosupresor, tal como ciclofosfamida y azatioprina; un agente antiinflamatorio, tal como un agente antihistamínico, por ejemplo el maleato de clorfeniramina y la clemastina [Ensho to Kouensho-Ryoho (Inflamación y terapia antiinflamatoria), Ishiyaku Shuppan, 1982] y similares.

Entre los ejemplos del agente antitumoral se incluyen amifostina (Etiol), cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), epirubicina, gemcitabina (Gemsal), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, daunomicina, peplomicina, estramustina, paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotea), aldesleuquina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, hidroxiaurea, ifosfamida, idarubicina, mesna, irinotecán (CPT-11), nogitecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolídeo, megestrol, melfalán, mercaptopurina, hidrocarbamide, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromán, estreptozocina, tamoxifeno, goserelina, leuprorrelina, flutamida, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza uracilo, vinorelbina, clorambucilo, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, vindesina, nimustina, semustina, capecitabina, Tomudex, azacitidina, UFT, oxaliplatino, gefitinib (Iressa), imatinib (STI 571), elrotinib, inhibidor de tirosina cinasa-3 similar a FMS (Flt3), inhibidor del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), inhibidor del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tal como Iressa y Tarceva, radicol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, rapamicina, amsacrina, ácido todo-transretinoico, talidomida, anastrozol, fadrozol, letrozol, exemestano, tiomalato de oro, D-penicilamina, bucilamina, azatioprina, mizoribina, ciclosporina, rapamicina, hidrocortisona, bexaroteno (Targretin), tamoxifeno, dexametasona, sustancias de la progestina, sustancias de estrógeno, anastrozol (Arimidex), leuplina, aspirina, indometacina, celecoxib, azatioprina, penicilamina, tiomalato de oro, maleato de clorfeniramina, clorfeniramina, clemastina, tretinoína, bexaroteno, arsénico, voltezomib, alopurinol, caliqueamicina, ibritumomab tiuxetán, targretina, ozogamina, claritromicina, leucovorina, ifosfamida, quetoconazol, aminoglutetimida, suramina, metotrexato, maitansinoide y derivados de los mismos.

El método para conjugar el agente de bajo peso molecular con el anticuerpo incluye un método en el que el agente y un grupo amino del anticuerpo se conjugan mediante glutaraldehído, un método en el que un grupo amino del agente y un grupo carboxilo del anticuerpo se conjugan mediante carbodiimida soluble en agua, y similares.

El agente con elevado peso molecular incluye polietilenglicol (en adelante denominado "PEG"), albúmina, dextrano, polioxietileno, copolímero de estireno-ácido maleico, polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, hidroxipropilmetacrilamida y similares. Mediante la unión de dichos compuestos de elevado peso molecular a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se esperan los efectos siguientes: (1) una mejora de la estabilidad frente a diversos factores químicos, físicos o biológicos, (2) una notable prolongación de la semivida en sangre, (3) la desaparición de la inmunogenicidad o la supresión de la producción de anticuerpos, y similares [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten, 1993]. Por ejemplo, el método para la unión de PEG a un anticuerpo incluye un método en el que se deja que un anticuerpo reaccione con un reactivo modificador de PEG [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten, 1993]. El reactivo modificador de PEG incluye un agente modificador del grupo ϵ -amino de la lisina (solicitud de patente japonesa publicada no examinada nº 178926/86), un agente modificador de un grupo carboxilo del ácido aspártico y del ácido glutámico (solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 23587/81), un agente modificador de un grupo guanidino de la arginina (solicitud de la patente japonesa publicada no examinada nº 117920/90) y similares.

El inmunoestimulador puede ser cualquier producto natural conocido como inmunoadyuvante. Entre los ejemplos de un agente potenciador de la inmunidad se incluyen $\beta(1\rightarrow3)$ glucano (lentinano, esquizofilano), α -galactosilceramida y similares.

La proteína incluye una citocina o un factor de crecimiento que activa una célula inmunocompetente, tal como una célula NK, macrófago o neutrófilo, una proteína tóxica y similares.

Entre los ejemplos de la citocina o factor de crecimiento se incluyen el interferón (en adelante denominado "IFN")- α , IFN- β , IFN- γ , interleucina (en adelante denominada "IL")-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y similares.

La proteína tóxica incluye la ricina, la toxina diftérica, ONTAK y similares, e incluye además una proteína tóxica en la que se introduce una mutación en una proteína con el fin de controlar la toxicidad.

- 5 El anticuerpo terapéutico incluye un anticuerpo contra un antígeno en el que se induce apoptosis mediante la unión del anticuerpo, un anticuerpo contra un antígeno que participa en la formación del estado patológico de tumor, un anticuerpo contra un antígeno que regula la función inmunológica y un anticuerpo contra un antígeno relacionado con la angiogénesis en la parte patológica.
- 10 El antígeno en que se induce apoptosis mediante la unión del anticuerpo incluye un grupo de diferenciación (en adelante "CD") 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80 (B7.1), CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86 (B7.2), antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y similares.
- 15 Entre los antígenos que participan en la formación del estado patológico del tumor o los antígenos que regulan la función inmunológica se incluyen CD40, ligando de CD40, la molécula de la familia B7 (CD80, CD86, CD274, B7-DC, B7-H2, B7-H3, B7-H4), la molécula ligando de la familia B7 (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, BTLA), OX-40, ligando de OX-40, CD137, moléculas de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (DR4, DR5, TNFR1, TNFR2), moléculas de la familia del receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), moléculas de la familia de receptores de TRAIL (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4), receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK), ligando de RANK, CD25, receptor 4 del ácido fólico, citocina [IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, factor de crecimiento transformante (TGF) β , TNF α , etc.], receptores de dichas citocinas, quimocinas (SLC, ELC, 1-309, TARC, MDC, CTACK, etc.) y receptores de dichas quimocinas.
- 20 Entre los antígenos del anticuerpo que inhibe la angiogénesis en la parte patológica se incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la angiopoyetina, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), EGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la eritropoyetina (EPO), TGF β , IL-8, efilina, SDF-1, receptores de los mismos y similares.
- 25 Puede producirse un anticuerpo de fusión con una proteína o anticuerpo terapéutico mediante la unión de un ADNc codificante de un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo a un ADNc codificante de la proteína, construyendo un ADN codificante del anticuerpo de fusión, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o eucariotas y después introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el anticuerpo de fusión.
- 30 En el caso en que el conjugado de anticuerpo anteriormente indicado se utilice como método de detección, método para la determinación cuantitativa, reactivo de detección, reactivo para la determinación cuantitativa o agente diagnóstico en la presente invención, entre los ejemplos del agente al que el anticuerpo monoclonal de la presente invención que reconoce específicamente la TIM-3 humana y se une a una secuencia de aminoácidos de la región extracelular o estructura tridimensional de la misma, se incluye un marcaje utilizado en el método rutinario de detección o medición inmunológica.
- 35 El marcaje incluye enzimas, tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa y la luciferasa; materiales luminiscentes, tales como el éster de acridinio y la lofina, materiales fluorescentes, tales como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el isotiocianato de tetrametilrodamina (RITC) y similares.
- 40 Además, la presente invención incluye un agente para el tratamiento de una enfermedad relacionada con una célula positiva para TIM-3, que comprende el anticuerpo monoclonal de la presente invención como principio activo.
- 45 La enfermedad relacionada con la célula positiva para TIM-3 es cáncer.
- 50 El cáncer incluye cáncer hematológico, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer rectal, cáncer de tiroides, cáncer del cuello uterino, cáncer del intestino delgado, cáncer de próstata y cáncer pancreático, Entre los ejemplos preferentes de cáncer se incluyen cáncer hematológico, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepático y cáncer de próstata.
- 55 Entre los ejemplos de cáncer hematológico se incluyen la leucemia mieloide aguda (LMA), la leucemia mieloide crónica (LMC), los síndromes mielodisplásicos (SMD), el mieloma múltiple, el linfoma de células T cutáneo (LCTC), el linfoma de células T periférico (LCTP), el linfoma de células grandes anaplásico (LCGA), el leucemia linfocítico agudo (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), otras leucemias linfoides, el linfoma de células NK, el linfoma de Hodgkin, el linfoma no de Hodgkin, tal como el linfoma de Burkitt y similares.
- 60 El agente terapéutico puede comprender el anticuerpo monoclonal anteriormente indicado de la presente invención como principio activo.
- 65 El agente terapéutico que comprende el anticuerpo monoclonal de la presente invención o conjugado del mismo puede comprender sólo el anticuerpo o conjugado del mismo como principio activo. Resulta generalmente

preferente que el agente terapéutico se prepara como preparación farmacéutica producida mediante un método apropiado bien conocido del campo técnico farmacéutico y mediante la mezcla de la misma con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

5 Resulta preferente administrar el agente terapéutico mediante la vía que resulte más eficaz para el tratamiento. Entre los ejemplos se incluye la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa y resulta preferente la administración intravenosa.

10 La preparación farmacéutica incluye pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas, cintas y similares.

Aunque la dosis o la frecuencia de administración varía dependiendo del efecto terapéutico objetivo, el método de administración, el periodo de tratamiento, la edad, el peso corporal y similares, habitualmente es de entre 10
15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y $10 \text{ mg}/\text{kg}$ al día y por adulto.

Además, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar o medir inmunológicamente TIM-3, un reactivo para detectar o medir inmunológicamente TIM-3, un método para detectar o medir
20 inmunológicamente una célula que expresa TIM-3, utilizando el anticuerpo monoclonal de la presente invención, que reconoce específicamente la TIM-3 humana y se une a una secuencia de aminoácidos de la región extracelular o estructura tridimensional de la misma, como principio activo.

En la presente invención, el método para detectar o medir la cantidad de TIM-3 puede ser cualquier método conocido. Por ejemplo, incluye un método de detección o medición inmunológica.
25

El método de detección o medición inmunológica es un método en el que una cantidad de anticuerpo o una cantidad de antígeno se detecta o se determina utilizando un antígeno o anticuerpo marcado. Entre los ejemplos del método de detección o medición inmunológica se incluye un método de inmunoanticuerpo marcado con una sustancia radioactiva (RIA), un inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA), un inmunoensayo fluorescente (FIA), un
30 inmunoensayo luminiscente, un método de transferencia western, un método físicoquímico y similares.

La enfermedad anteriormente indicada relacionada con una célula positiva para TIM-3 puede diagnosticarse mediante la detección o medición de una célula que expresa TIM-3 mediante la utilización del anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de la presente invención.
35

Para la detección de la célula que expresa el polipéptido, pueden utilizarse métodos de detección inmunológica conocidos, y preferentemente se utiliza un método de inmunoprecipitación, un método de tinción celular fluorescente, un método de tinción de tejidos inmunológicos y similares. Además, puede utilizarse un método de tinción fluorescente de anticuerpos utilizando el sistema FMAT 8100 HTS (Applied Biosystems) y similares.
40

En la presente invención, la muestra corporal viva que debe utilizarse para detectar o medir TIM-3 no se encuentra particularmente limitada, con la condición de que exista una posibilidad de que contenga una célula que exprese TIM-3, tal como células de un tejido, sangre, plasma sanguíneo, suero, líquido pancreático, orina, materia fecal, líquido tisular o líquido de cultivo.
45

Un agente diagnóstico que contiene el anticuerpo monoclonal de la presente invención o conjugado del mismo puede contener además un reactivo para llevar a cabo una reacción de antígeno-anticuerpo o un reactivo para la detección de la reacción dependiendo del método diagnóstico deseado. El reactivo para llevar a cabo la reacción de antígeno-anticuerpo incluye un tampón, una sal y similares. El reactivo para la detección incluye un reactivo utilizado generalmente para el método de detección o medición inmunológica, tal como un anticuerpo secundario marcado que reconoce el anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo del mismo o conjugados del mismo y sustrato correspondiente al marcaje y similares.
50

A continuación, se describe específicamente un procedimiento para producir el anticuerpo de la presente invención, un método para tratar la enfermedad y un método para el diagnóstico de la enfermedad.
55

1. Método de preparación de anticuerpo monoclonal

(1) Preparación de antígeno

60 TIM-3 o una célula que expresa TIM-3 como antígeno puede obtenerse mediante la introducción de un vector de expresión que comprende ADNc codificante de TIM-3 de longitud completa o mediante la introducción de una longitud parcial de la misma en *Escherichia coli*, levadura, célula de insecto, célula animal o similar. Además, TIM-3 puede purificarse y obtenerse de diversas líneas celulares tumorales humanas, tejidos humanos y
65 similares que expresan una gran cantidad de TIM-3. La línea celular tumoral y los tejidos pueden permitir la utilización directa como antígenos. Además, puede prepararse un péptido sintético que presenta una secuencia

parcial de TIM-3 mediante un método de síntesis química, tal como el método de Fmoc o el método de tBoc y utilizarse como antígeno.

5 TIM-3 puede prepararse, por ejemplo, mediante la expresión de un ADN codificante de TIM-3 en una célula hospedadora utilizando un método descrito en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1987-1997, o similar según el método siguiente.

10 En primer lugar, se prepara un vector recombinante mediante la inserción de un ADNc de longitud completa que comprende la región codificante de TIM-3 cadena abajo de un promotor de un vector de expresión apropiado. En este momento, en caso necesario, un fragmento de ADN que presenta una longitud apropiada que contiene una región codificante del polipéptido preparado basado en ADNc de longitud completa puede utilizarse en lugar del ADNc de longitud completa. A continuación, puede obtenerse un transformante productor de polipéptido mediante la introducción del vector recombinante en una célula hospedadora adecuada para el vector de expresión.

20 El vector de expresión puede ser cualquier vector, con la condición de que pueda replicarse autónomamente en la célula hospedadora para la utilización o pueda integrarse en un cromosoma que comprende un promotor apropiado en una posición que permita que el ADN codificante del polipéptido pueda transcribirse.

La célula hospedadora puede ser cualquier célula hospedadora, con la condición de que pueda expresar el gen objetivo. Entre los ejemplos se incluye un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, tal como *Escherichia coli*, levaduras, una célula de insecto, una célula animal y similares.

25 En el caso de que se utilice un procarionta, tal como *Escherichia coli*, como célula hospedadora, resulta preferente que el vector recombinante utilizado en la presente invención sea autónomamente replicable en el procarionta y comprenda un promotor, una secuencia de unión ribosómica, el ADN codificante de TIM-3 y una secuencia de terminación de la transcripción. No es necesario que el vector recombinante presente una secuencia de terminación de la transcripción aunque preferentemente se introduce una secuencia de terminación de la transcripción inmediatamente después del gen estructural. El vector recombinante puede comprender además un gen regulador del promotor.

35 Además, el vector recombinante anteriormente indicado preferentemente es un plásmido en el que el espacio entre la secuencia de Shine-Dalgarno, que es la secuencia de unión ribosómica, y el codón de inicio se ajusta a una distancia apropiada (por ejemplo, 6 a 18 nucleótidos).

Además, la secuencia de nucleótidos del ADN codificante de TIM-3 puede sustituirse con otra base de manera que sea un codón adecuado para la expresión en una célula hospedadora, mejorando de esta manera la productividad de la TIM-3 objetivo.

40 Puede utilizarse cualquier vector de expresión, con la condición de que pueda funcionar en la célula hospedadora que debe utilizarse. Entre los ejemplos del vector de expresión se incluyen pBTrp2, pBTac1, pBTac2 (todos preparados por Roche Diagnostics), pKK233-2 (preparado por Pharmacia), pSE280 (preparado por Invitrogen), pGEMEX-1 (preparado por Promega), pQE-8 (preparado por Qiagen), pKYP10 (solicitud de patente japonesa publicada no examinada n° 110600/83), pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry 48:669, 1984], pLSA1 [Agric. Biol. Chem. 53:277, 1989], pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4306, 1985], pBluescript II SK(-) (preparado por Stratagene), pTrs30 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs30 (FERM BP-5407)], pTrs32 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs32 (FERM BP-5408)], pGHA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGHA2 (FERM BP-400), solicitud de patente japonesa no examinada publicada n° 221091/85], pGKA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGKA2 (FERM BP-6798), solicitud de patente japonesa no examinada publicada n° 221091/85], pTerm2 (patentes US n° 4.686.191, n° 4.939.094 y n° 5.160.735), pSupex, pUB110, pTP5, Pc194, pEG400 [J. Bacteriol. 172:2392, 1990], pGEX (preparado por Pharmacia), sistema pET (preparado por Novagen), pME18SFL3 y similares.

55 Puede utilizarse cualquier promotor, con la condición de que pueda funcionar en la célula hospedadora que debe utilizarse. Entre los ejemplos se incluyen promotores derivados de *Escherichia coli*, fagos y similares, tales como el promotor *trp* (*P_{trp}*), el promotor *lac*, el promotor *PL*, el promotor *PR* y el promotor de T7 y similares. Además, pueden utilizarse promotores diseñados y modificados artificialmente, tal como un promotor en el que se encuentran unidos en tándem dos *P_{trp}*, promotor *tac*, promotor *lacT7* y promotor *letI*.

60 Entre los ejemplos de célula hospedadora se incluyen *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC100, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* n° 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Escherichia coli* DH5α y similares.

65 Puede utilizarse cualquier método de introducción del vector recombinante, con la condición de que sea un

método para la introducción de ADN en la célula hospedadora, y entre los ejemplos se incluye un método que utiliza un ion calcio, descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110, 1972; Gene 17:107, 1982, y en Molecular & General Genetics 168:111, 1979, y similares.

5 En el caso de que se utilice una célula animal como la célula hospedadora, puede utilizarse cualquier vector de expresión, con la condición de que pueda funcionar en la célula animal. Entre los ejemplos se incluyen pcDNA1, pcDM8 (preparado por Funakoshi), pAGE107 [solicitud de patente japonesa publicada no examinada nº 22979/91; Cytotechnology 3:133, 1990], pAS3-3 (solicitud de patente japonesa publicada no examinada nº 227075/90), pCDM8 [Nature 329:840, 1987], pcDNA1/Amp (preparado por Invitrogen), pcDNA3.1 (preparado por Invitrogen), pREP4 (preparado por Invitrogen), pAGE103 [J. Biochemistry 101:1307, 1987], pAGE210, pME18SFL3, pKANTEX93 (documento nº 97/10354) y similares.

15 Puede utilizarse cualquier promotor, con la condición de que pueda funcionar en una célula animal. Entre los ejemplos se incluye un promotor de un gen temprano inmediato (IE) de citomegalovirus (CMV), un promotor temprano del SV40, un promotor de retrovirus, un promotor metalotioneína, un promotor de choque térmico, un promotor SR α , un promotor o intensificador del virus de la leucemia murina de Moloney y similares. Además, el intensificador del gen IE del CMV humano puede utilizarse junto con el promotor.

20 La célula hospedadora incluye la célula de leucemia de Namalwa humana, la célula COS de ratón, la célula de ovario de hámster chino (CHO) [Journal of Experimental Medicine 108:945, 1958; Genetics 55:513, 1968; Chromosoma 41:129, 1973; Methods in Cell Science 18:115, 1996; Radiation Research 148:260, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:1275, 1968; Cell 6:121, 1975; Molecular Cell Genetics, apéndices I y II (páginas 883 a 900)], CHO/DG44, CHO-K1 (ATCC nº de acceso CCL-61), DUKXB11 (ATCC nº de acceso CCL-9096), Pro-5 (ATCC nº de acceso CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, nº de cat. 11619), Pro-3, célula de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (también denominada YB2/0), célula de mieloma de ratón NS0, célula de mieloma de ratón SP2/0-Ag14, célula de hámster sirio BHK o HBT5637 (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 299/88) y similares.

30 Puede utilizarse cualquier método de introducción del vector recombinante, con la condición de que sea un método de introducción de ADN en una célula animal, y entre los ejemplos se incluye la electroporación [Cytotechnology 3:133, 1990], el método de fosfato de calcio (solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 227075/90), el método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987] y similares.

35 Puede producirse la TIM-3 mediante el cultivo del transformante derivado de un microorganismo, célula animal o similar que presente un vector recombinante que comprenda el ADN codificante de TIM-3 en un medio para la formación y acumulación de TIM-3 en el cultivo y la recuperación a partir del mismo. El método de cultivo del transformante en el medio se lleva a cabo según el método habitual utilizado en el cultivo de huéspedes.

40 En el caso de que TIM-3 se expresa en una célula derivada de un eucariota, puede obtenerse la TIM-3 a la que pueden unirse azúcares o cadenas de azúcares.

45 En el caso de que se cultive un microorganismo transformado con un vector recombinante que contiene un promotor inducible, puede añadirse al medio un inductor, en caso necesario. Por ejemplo, puede añadirse isopropil- β -D-tiogalactopiranosido o similar al medio en el caso de que se cultive un microorganismo transformado con un vector recombinante, utilizando el promotor *lac*, o puede añadirse ácido indolacrílico o similar al mismo durante la transformación de un microorganismo con un vector recombinante, utilizando el promotor *trp*.

50 En el caso de que se cultive un transformante obtenido utilizando una célula animal como célula hospedadora, el medio incluye el medio de utilización general RPMI 1640 [The Journal of the American Medical Association 199:519, 1967], el medio MEM de Eagle [Science 122:501, 1952], medio MEM modificado por Dulbecco [Virology 8:396, 1959] y el medio 199 [Proceedings of the Society for the Biological Medicine 73:1, 1950], medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), medio al que se añade suero de feto bovino, etc., y similares. El cultivo se lleva a cabo generalmente a un pH de entre 6 y 8 y a una temperatura de entre 30°C y 40°C durante 1 a 7 días en la presencia de 5% de CO₂. En caso necesario, puede añadirse un antibiótico al medio durante el cultivo, tal como canamicina o penicilina.

60 Con respecto al método de expresión del gen codificante de TIM-3, además de la expresión directa, puede llevarse a cabo la producción secretoria, la expresión de proteína de fusión y similares según el método descrito en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

65 El procedimiento para producir TIM-3 incluye un método de expresión intracelular en una célula hospedadora, un método de secreción extracelular a partir de una célula hospedadora, un método de producción sobre la membrana externa de una célula hospedadora y similares. El método apropiado puede seleccionarse cambiando la célula hospedadora utilizada y la estructura de la TIM-3 producida.

En el caso de que se produzca TIM-3 en una célula hospedadora o sobre la cubierta exterior de la membrana celular de un huésped, TIM-3 puede ser positivamente secretado extracelularmente según el método de Paulson et al. [J. Biol. Chem. 264:17619, 1989], el método de Lowe et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8227, 1989; Genes Develop. 4:1288, 1990], los métodos descritos en la solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 336963/93 y el documento nº WO 94723021 y similares.

Además, puede incrementarse la cantidad producida de TIM-3 de acuerdo con el método descrito en la solicitud de patente japonesa no examinada publicada nº 227075/90 utilizando un sistema de amplificación génica utilizando un gen de dihidrofolato reductasa.

La TIM-3 resultante puede aislarse y purificarse, por ejemplo, de la manera siguiente.

En el caso de que TIM-3 se exprese intracelularmente en un estado disuelto, las células después del cultivo se recuperan mediante centrifugación, se suspenden en un tampón acuoso y después se fragmentan utilizando un ultrasonificador, prensa francesa, homogeneizador de Manton Gaulin, molino Dynomill o similar con el fin de obtener un extracto libre de células.

El extracto libre de células se centrifuga para obtener un sobrenadante y puede obtenerse una preparación purificada sometiendo el sobrenadante a un aislamiento general de proteínas y a técnicas de purificación, tales como la extracción con solvente, la precipitación salina ("salting out"), la precipitación con un solvente orgánico, la cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina tal como dietilaminoetil (DEAE)-sefarosa, DIAION HPA-75 (fabricada por Mitsubishi Chemical), la cromatografía de intercambio catiónico utilizando una resina tal como S-Sepharose FF (fabricada por Pharmacia), la cromatografía hidrofóbica utilizando una resina tal como butil-sefarosa o fenil-sefarosa, la filtración en gel utilizando un tamiz molecular, la cromatografía de afinidad, el cromatofoco, la electroforesis, tal como el enfoque isoeléctrico, y similares, que pueden utilizarse por sí solos o en combinación.

En el caso de que TIM-3 se exprese intracelularmente mediante la formación de un cuerpo de inclusión, se recuperan las células, se fragmentan y se centrifugan de la misma manera, y se recupera el cuerpo de inclusión de TIM-3 en forma de una fracción de precipitación. El cuerpo de inclusión recuperado de la proteína TIM-3 se solubiliza con un agente desnaturante de proteínas. La proteína adquiere su estructura tridimensional normal mediante dilución o diálisis de la solución solubilizada y después se obtiene una preparación purificada de polipéptido mediante el mismo método de aislamiento y purificación indicado anteriormente.

En el caso de que TIM-3 o derivado, tal como un producto glucosilado, se secrete extracelularmente, TIM-3 o el derivado, tal como un producto glucosilado, puede recuperarse a partir del sobrenadante de cultivo. Es decir, el cultivo se trata mediante un método, tal como la centrifugación, de la manera indicada anteriormente, con el fin de obtener una fracción soluble, puede obtenerse una preparación purificada de TIM-3 a partir de la fracción soluble mediante el método de aislamiento y purificación indicado anteriormente.

Además, la TIM-3 utilizada en la presente invención puede producirse mediante un método de síntesis química, tal como un método de Fmoc o de tBoc. Además, puede sintetizarse químicamente utilizando un sintetizador de péptidos fabricado por Advanced ChemTech, Perkin-Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu Corporation o similar.

(2) Inmunización de animales y preparación de células productoras de anticuerpos para la fusión

Un ratón, rata o hámster y similar de 3 a 20 semanas de edad se inmuniza con el antígeno preparado en (1), anteriormente, y las células productoras de anticuerpos en el bazo, ganglio linfático o sangre periférica del animal se recolectan. Además, en el caso de que el incremento de un título suficiente en el animal anteriormente indicado no se identifique debido a una baja inmunogenicidad, puede utilizarse un ratón con desactivación de TIM-3 como animal que debe inmunizarse.

La inmunización se lleva a cabo mediante la administración del antígeno en el animal mediante inyección subcutánea, intravenosa o intraperitoneal con un adyuvante apropiado (por ejemplo, adyuvante de Freund completo, una combinación de gel de hidróxido de aluminio con vacuna de pertussis o similar). En el caso de que el antígeno sea un péptido parcial, se produce un conjugado con una proteína portadora, tal como BSA (por sus siglas en inglés, albúmina de suero bovino), KLH (por sus siglas en inglés, hemocianina de lapa americana) o similar, que se utiliza como el antígeno.

La administración del antígeno se lleva a cabo 5 a 10 veces cada semana o cada dos semanas después de la primera administración. El tercer a séptimo día después de cada administración, se extrae una muestra de sangre del fondo del ojo, se somete a ensayo la reactividad del suero con el antígeno, por ejemplo mediante inmunoensayo enzimático [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] o similar. Como fuente de células productoras de anticuerpos para la fusión se utiliza un animal que muestra un título de anticuerpos suficiente en el suero contra el antígeno utilizado para la inmunización.

Tres a siete días después de la administración final del antígeno, se extrajo el tejido que contenía las células productoras de anticuerpos, tal como el bazo, del animal inmunizado a fin de recolectar las células productoras de anticuerpos. En caso de utilizar células de bazo, el bazo se extirpa y tritura, seguido de centrifugación. A continuación, se obtienen las células productoras de anticuerpos para la fusión mediante la eliminación de los eritrocitos.

(3) Preparación de la célula de mieloma

Como células de mieloma se utilizó una línea celular establecida obtenida del ratón. Entre los ejemplos se incluyen la línea celular de mieloma de ratón (derivado de BALB/c) resistente a 8-azaguanina, P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology 18:1, 1978], P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [European J. Immunology 6:511, 1976], SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature 276:269, 1978], P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology 123:1548, 1979], P3-X63-Ag8 (X63) [Nature 256:495, 1975] y similares.

Las células de mieloma se subcultivaron en un medio normal [un medio al que se añade glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, FBS y 8-azaguanina a medio RPMI-1640] 3 o 4 días antes de la fusión celular con el fin de garantizar un número celular de 2×10^7 o superior el día de la fusión.

(4) Fusión celular y preparación de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales

Las células productoras de anticuerpos para la fusión obtenidas en (2), anteriormente, y las células de mieloma obtenidas en (3), anteriormente, se lavaron suficientemente con un medio esencial mínimo (MEM) o PBS (1,83 g de hidrogenofosfato disódico, 0,21 g de dihidrogenofosfato potásico, 7,65 g de cloruro sódico, 1 litro de agua destilada, pH 7,2) y se mezclaron, proporcionando una proporción de células productoras de anticuerpos:células de mieloma=5 a 10:1, seguido de centrifugación. A continuación, se descartó el sobrenadante.

El grupo celular precipitado se disgregó suficientemente. Tras disgregar las células precipitadas, se añadió a la célula bajo agitación a 37°C la mezcla de polietilenglicol-1000 (PEG-1000), MEM y dimetilsulfóxido. Además, se añadió 1 a 2 ml de medio MEM varias veces cada uno o dos minutos y se añadió MEM, proporcionando una cantidad total de 50 ml. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante. Tras disgregar suavemente las células, se suspendieron con cuidado en medio HAT [un medio normal que contiene hipoxantina, timidina y aminopterina]. La suspensión se cultivó en un incubador con 5% de CO₂ durante 7 a 14 días a 37°C.

Tras el cultivo, se muestreó una parte del sobrenadante de cultivo y se seleccionó un hibridoma que era reactivo con un antígeno que contenía TIM-3 y no era reactivo con un antígeno que no contiene TIM-3, mediante el ensayo de unión descrito posteriormente. A continuación, la clonación se llevó a cabo dos veces mediante un método de dilución limitante [En primer lugar, se utilizó medio HT (medio HAT del que se había eliminado la aminopterina) y, en segundo lugar, se utilizó medio normal] y se seleccionó un hibridoma que mostraba establemente un elevado título de anticuerpos, como hibridoma productor de anticuerpos monoclonales.

(5) Preparación de anticuerpos monoclonales purificados

Se administraron las células de hibridoma productoras de anticuerpo monoclonal obtenidas en (4), anteriormente, mediante inyección intraperitoneal en ratones de 8 a 10 semanas desnudos tratados con 0,5 ml de pristano (se administró por vía intraperitoneal 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano), seguido de alimentación durante 2 semanas). El hibridoma desarrolló tumor de ascites en 10 a 21 días. Se recolectó el líquido ascítico de los ratones, se centrifugó para eliminar los sólidos, se sometió a precipitación salina con sulfato amónico al 40-50% y después se precipitó con ácido caprílico, pasándolo por una columna de DEAE-sefarosa, una columna de proteína A o una columna de filtración en gel a fin de recolectar una fracción de IgG o IgM en forma de anticuerpo monoclonal purificado.

Además, se cultivó un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales obtenido en (4), anteriormente, en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% o similar y se separó el sobrenadante mediante centrifugación. Las células precipitadas se suspendieron en medio de hibridoma-SFM y se cultivó durante 3 a 7 días. El anticuerpo monoclonal purificado puede obtenerse mediante centrifugación de la suspensión celular obtenida, seguido de purificación a partir del sobrenadante resultante utilizando una columna de proteína A o una columna de proteína G para recolectar las fracciones de IgG. Además, el medio de hibridoma-SFM puede contener 5% de DIGO GF21.

La subclase del anticuerpo puede determinarse utilizando un kit de tipado de subclase mediante inmunoensayo enzimático. La cantidad de la proteína puede determinarse mediante el método de Lowry o a partir de la absorbancia a 280 nm.

(6) Selección del anticuerpo monoclonal

La selección del anticuerpo monoclonal se llevó a cabo mediante el ensayo de unión siguiente, utilizando un método de inmunoensayo enzimático y un ensayo de inhibición de la incorporación intracelular de aminoácidos.

(6-a) Ensayo de unión

Como antígeno se utilizó una célula con gen introducido obtenida mediante la introducción de un vector de expresión que contenía un ADNc codificante de TIM-3 obtenido en (1), en *Escherichia coli*, una levadura, una célula de insecto, una célula animal o similar, una proteína recombinante, o un polipéptido o péptido parcial purificado obtenido de un tejido humano. En el caso de que el antígeno sea un péptido parcial, se prepara y utiliza un conjugado con una proteína portadora, tal como BSA o KLH.

Tras preparar dichos antígenos en una capa sólida mediante dispensación en una placa de 96 pocillos, se dispensó en la misma la sustancia que debía someterse a ensayo, tal como suero, un sobrenadante de cultivo de un hibridoma o un anticuerpo monoclonal purificado, a modo de anticuerpo primario y se dejó que reaccionase. Tras el lavado a fondo con PBS, PBS-Tween y similar, se dispensó en la misma un anticuerpo antiinmunoglobulina marcado con biotina, un enzima, un material quimioluminiscente, un compuesto radioactivo o similar, a modo de anticuerpo secundario y se dejó que reaccionase. Tras el lavado a fondo con PBS-Tween, se llevó a cabo la reacción apropiada al marcaje del anticuerpo secundario con el fin de seleccionar un anticuerpo monoclonal que reaccionase específicamente con el antígeno.

Además, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal que compita con el anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 de la presente invención para la unión a una región extracelular de la TIM-3 humana mediante la adición de un anticuerpo de la invención al sistema de ensayo de unión anteriormente indicado para dejar que reaccione. Es decir, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal que compita con el anticuerpo monoclonal obtenido en la unión de una secuencia de aminoácidos de la región extracelular de TIM-3 humana o una estructura tridimensional de la misma, mediante cribado de un anticuerpo de la invención que inhibe la unión del anticuerpo monoclonal al añadirlo al anticuerpo.

Además, puede obtenerse un anticuerpo que se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de la presente invención, que se une a una secuencia de aminoácidos de la región extracelular de TIM-3 o estructura tridimensional de la misma, mediante la identificación de un epítipo del anticuerpo obtenido mediante el sistema de ensayo de unión anteriormente indicado, la preparación de un péptido sintético parcial del epítipo o un péptido sintético que mimetiza la estructura tridimensional del epítipo y la inmunización con el péptido.

(6-b) Análisis cinético con Biacore

La cinética entre el antígeno y una sustancia de ensayo se midió utilizando un instrumento Biacore T100 y a continuación se analizaron los resultados obtenidos utilizando el software de análisis que acompaña al aparato. Tras inmovilizar el anticuerpo anti-IgG de ratón en un chip sensor CM5 mediante un método de acoplamiento de aminos, se dejó que fluyese una sustancia de ensayo, tal como sobrenadante de cultivo de un hibridoma o un anticuerpo monoclonal purificado, y se uniese a una cantidad apropiada y se dejó además que fluyese un antígeno a una pluralidad de concentraciones conocidas. A continuación, se midió la unión y la disociación.

Utilizando los datos obtenidos y el software que acompaña al aparato, se llevó a cabo un análisis cinético utilizando el modelo de unión 1:1 con el fin de obtener los parámetros necesarios. En caso contrario, después de inmovilizar la TIM-3 humana sobre el chip sensor mediante un método de acoplamiento de aminos, se dejó que fluyese un anticuerpo monoclonal purificado a una pluralidad de concentraciones conocidas, seguido de la medición de la unión y la disociación. Utilizando los datos obtenidos y el software que acompaña al aparato, se llevó a cabo el análisis cinético utilizando un modelo de analito bivalente para obtener los parámetros necesarios.

2. Preparación de anticuerpo recombinante

Como ejemplos de producción de anticuerpos recombinantes, se muestran a continuación procedimientos para producir un anticuerpo quimérico humano y un anticuerpo con injertación de región determinante de complementariedad (RDC) humana.

(1) Construcción de vector para la expresión de anticuerpos recombinantes

Un vector para la expresión de anticuerpo recombinante es un vector de expresión para células animales en el que se han insertado ADN codificantes de CH y CL de un anticuerpo humano y se construye mediante clonación de cada uno de los ADN codificantes de CH y CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión para células animales.

Como región C de un anticuerpo humano puede utilizarse CH y CL de cualquier anticuerpo humano. entre los

ejemplos se incluye CH perteneciente a la subclase γ 1, CL perteneciente a la clase κ y similares. Como ADN codificantes de CH y CL de un anticuerpo humano, puede utilizarse de manera general el ADNc y también puede utilizarse un ADN cromosómico que comprenda un exón y un intrón.

5 Como el vector de expresión para células animales, puede utilizarse cualquier vector de expresión, con la condición de que pueda insertarse en el mismo y expresarse a partir del mismo un gen codificante de la región C de un anticuerpo humano. Entre los ejemplos se incluyen pAGE107 [Cytotechnol. 3:133, 1990], pAGE103 [J. Biochem. 101:1307, 1987], pHSG274 [Gene 27:223, 1984], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527, 1981], pSG1bd2-4 [Cytotechnol. 4:173, 1990], pSE1UK1Sed1-3 [Cytotechnol. 13:79, 1993] y similares.

10 Entre los ejemplos de promotor e intensificador utilizados para un vector de expresión para células animales se incluyen un promotor temprano del SV40 [J. Biochem. 101:1307, 1987], un RTL de virus de la leucemia de Moloney del ratón [Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:960, 1987], un promotor de cadena H de inmunoglobulina [Cell 41:479, 1985] y un intensificador [Cell 33:717, 1983] y similares.

15 El vector de expresión de anticuerpo recombinante puede ser de un tipo en el que se encuentra presente un gen codificante de una cadena H de anticuerpo y un gen codificante de una cadena L de anticuerpo en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes se encuentran presentes en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción del vector de expresión de anticuerpo recombinante, la facilidad de introducción en células animales y el equilibrio entre las cantidades de expresión de las cadenas H y L de anticuerpo en las células animales, para la expresión de anticuerpo recombinante resulta más preferente el tipo tándem de vector [J. Immunol. Methods 167:271, 1994]. Entre los ejemplos del tipo tándem de vector de expresión de anticuerpos recombinantes se incluye pKANTEX93 (documento nº WO 97/10354), pEE18 [Hybridoma 17:559, 1998] y similares.

20 (2) Obtención de ADNc codificante de región V de anticuerpo derivada de animal no humano y análisis de la secuencia de aminoácidos

25 La obtención de los ADNc codificantes de VH y VL de un anticuerpo no humano y el análisis de la secuencia de aminoácidos se llevan a cabo de la manera siguiente.

30 Se extrajo el ARNm de las células de hibridoma productoras de un anticuerpo no humano a fin de sintetizar el ADNc. El ADNc sintetizado se clonó en un vector, tal como un fago o un plásmido, con el fin de preparar una biblioteca de ADNc.

35 Se aisló un fago recombinante o un plásmido recombinante que contenía ADNc codificante de VH o VL a partir de la biblioteca utilizando ADN codificante de una parte de la región C o región V de un anticuerpo de ratón a modo de sonda. Se determinó la longitud completa de las secuencias de nucleótidos de VH y VL de un anticuerpo de ratón de interés en el fago recombinante o plásmido recombinante y se dedujo la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL a partir de las secuencias de nucleótidos respectivas.

40 Entre los ejemplos de animal no humano para la preparación de una célula de hibridoma que produce un anticuerpo no humano se incluyen el ratón, la rata, el hámster, el conejo o similares. Puede utilizarse cualquier animal con la condición de que pueda producirse una célula de hibridoma a partir del mismo.

45 Entre los ejemplos de método para la preparación de ARN total a partir de una célula de hibridoma se incluye un método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymol. 154:3, 1987], la utilización de un kit, tal como el kit RNeasy (fabricado por Qiagen) y similares.

50 Entre los ejemplos del método de preparación de ARNm a partir del ARN total se incluyen un método de columna de celulosa con oligo (dT) inmovilizado [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989], un método que utiliza un kit, tal como el kit de purificación de ARNm Oligo-dT30 <Super> (fabricado por Takara Bio) y similares. Además, entre los ejemplos del método de preparación de ARNm se incluye un método que utiliza el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen) o el kit de purificación de ARNm QuickPrep (fabricado por Pharmacia) y similares.

55 Entre los ejemplos de método de síntesis de ADNc y de preparación de una biblioteca de ADNc se incluyen métodos conocidos [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, suplemento nº 1, John Wiley & Sons, 1987-1997], un método que utiliza un kit tal como el sistema plasmídico Super Script para la síntesis de ADNc y la clonación de plásmidos (fabricado por Invitrogen), el kit de síntesis de ADNc ZAP-cDNA (fabricado por Stratagene) y similares.

60 El vector en el que se inserta el ADNc sintetizado con el ARNm extraído de una célula de hibridoma como molde, para la preparación de una biblioteca de ADNc, puede ser cualquier vector, con la condición de que pueda insertarse el ADNc. Entre los ejemplos se incluyen ZAP Express [Strategies 5:58, 1992], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research 17:9494, 1989], λ ZAPII (fabricado por Stratagene), λ gt10 y λ gt11 [DNA Cloning: A

65

Practical Approach I.49, 1985], Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell y pT7T3-18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983], pUC18 [Gene 33:103, 1985] y similares.

5 Puede utilizarse cualquier *Escherichia coli* para introducir la biblioteca de ADNc construida con un vector fago o plásmido, con la condición de que pueda introducirse la biblioteca de ADNc, expresarse y mantenerse. Entre los ejemplos se incluyen XL1-Blue MRF' [Strategies 5:81, 1992], C600 [Genetics 39:440, 1954], Y1088 e Y1090 [Science 222:778, 1983], NM522 [J. Mol. Biol. 166:1, 1983], K802 [J. Mol. Biol. 16:118, 1966], JM105 [Gene 38:275, 1985] y similares.

10 Puede utilizarse un método de hibridación de colonias o de hibridación de placas utilizando una sonda marcada isotópicamente o fluorescentemente, para la selección de los clones de ADNc que codifican VH o VL de un anticuerpo no humano o similar a partir de la biblioteca de ADNc [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989].

15 Además, los ADNc codificantes de VH y VL pueden prepararse mediante una reacción en cadena de la polimerasa (en adelante denominada "PCR", Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, suplemento nº 1, John Wiley & Sons, 1987-1997) mediante la preparación de cebadores y utilizando el ADNc preparado a partir de ARNm o una biblioteca de ADNc a modo de molde.

20 La secuencia de nucleótidos del ADNc puede determinarse mediante la digestión del ADNc seleccionado con enzimas de restricción apropiados y similares, la clonación de los fragmentos en un plásmido, tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene), llevando a cabo la reacción mediante un método de análisis de secuencias de nucleótidos utilizado habitualmente. Por ejemplo, un método de análisis de secuencias de nucleótidos se lleva a cabo mediante la utilización de un analizador automático de secuencias de nucleótidos, tal como ABI PRISM3700 (fabricado por PE Biosystems) y un secuenciador de ADN A.L.F. (fabricado por Pharmacia) tras una reacción, tal como el método dideoxi [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463, 1977].

30 Puede confirmarse que los ADNc obtenidos codifican las secuencias de aminoácidos completas de VH y VL del anticuerpo que contiene una secuencia de señal secretoria mediante la estimación de la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL a partir de la secuencia de nucleótidos determinada y la comparación de las mismas con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [secuenciador de ADN A.L.F., US Dept. Health and Human Services, 1991].

35 Con respecto a las secuencias de aminoácidos completas de VH y VL del anticuerpo que contiene una secuencia de señal secretoria, puede estimarse la longitud de la secuencia de señal secretoria y de la secuencia de aminoácidos N-terminal mediante la comparación de las mismas con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [secuenciador de ADN A.L.F., US Dept. Health and Human Services, 1991] y además puede determinarse el subgrupo al que pertenecen. Además, la secuencia de aminoácidos de cada RDC de VH y VL puede determinarse mediante la comparación de las mismas con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [secuenciador de ADN A.L.F., US Dept. Health and Human Services, 1991].

45 Además, la novedad de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de VH y VL puede examinarse llevando a cabo una búsqueda de homologías con las secuencias en cualquier base de datos, por ejemplo SWISS-PROT, PIR-Protein o similar, utilizando la longitud completa obtenida de las secuencias de aminoácidos de VH y VL, por ejemplo de acuerdo con el método BLAST [J. Mol. Biol. 215:403, 1990] o similar.

50 (3) Construcción de vector para la expresión de anticuerpo quimérico humano

El ADNc codificante de cada uno de VH y VL de anticuerpo de un animal no humano se clonó cadena arriba de los genes codificantes de CH o CL del anticuerpo humano del vector para la expresión del anticuerpo recombinante mencionado en (1), anteriormente, a fin de construir de esta manera un vector para la expresión de un anticuerpo quimérico humano.

55 Con el fin de ligar el ADNc que comprendía una secuencia de nucleótidos del extremo 3'-terminal de VH o VL de anticuerpo de un animal no humano y una secuencia de nucleótidos del extremo 5'-terminal de CH o CL de anticuerpo humano, se preparó cada ADNc codificante de VH o VL de un anticuerpo de animal no humano de manera que codificase aminoácidos apropiados y presentase una secuencia de reconocimiento de un enzima de restricción en una parte de ligamiento.

60 Los ADNc preparados codificantes de VH y VL de anticuerpo se clonaron, respectivamente, de manera que cada uno de ellos se expresase en una forma apropiada cadena arriba del gen codificante de CH o CL del anticuerpo humano del vector para la expresión del anticuerpo con injerto de RDC humano mencionado en (1), anteriormente, a fin de construir un vector para la expresión de anticuerpo quimérico humano.

65

Además, se amplificó por PCR el ADNc codificante de VH o VL de un anticuerpo de animal no humano utilizando un ADN sintético que presentaba una secuencia de reconocimiento de un enzima de restricción apropiado en ambos extremos y se clonó cada uno de ellos con el vector de expresión de anticuerpo recombinante obtenido en (1), anteriormente.

(4) Construcción de ADNc codificante de la región V de anticuerpo con injerto de RDC humano

Los ADNc codificantes de VH o VL de un anticuerpo con injerto de RDC humano pueden obtenerse de la manera siguiente.

Se seleccionaron, respectivamente, secuencias de aminoácidos de la región marco (en adelante denominada "RM") en VH o VL de un anticuerpo humano en el que se trasplantaron secuencias de aminoácidos de las RDC en VH o VL de un anticuerpo derivado de un anticuerpo de un animal no humano. Pueden utilizarse cualesquiera secuencias de aminoácidos de RM de un anticuerpo humano, con la condición de que sean de origen humano.

Entre los ejemplos se incluyen secuencias de aminoácidos de RM de anticuerpos humanos registrados en una base de datos tal como Protein Data Bank o similar, y secuencias de aminoácidos comunes a subgrupos de RM de anticuerpos humanos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] y similares. Con el fin de inhibir la reducción de la actividad de unión del anticuerpo, se seleccionaron las secuencias de aminoácidos con una homología elevada (como mínimo de 60%) respecto a la secuencia de aminoácidos de la RM en VH o VL del anticuerpo original.

A continuación, se injertaron las secuencias de aminoácidos de las RDC del anticuerpo original en la secuencia de aminoácidos seleccionada de la RM en VH o VL del anticuerpo humano, respectivamente, a fin de diseñar cada secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humanizado. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convirtieron en secuencias de ADN mediante la consideración de la frecuencia del uso de codones observado en secuencias de nucleótidos de genes de anticuerpos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991] y se diseñó la secuencia de ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humanizado.

Basándose en las secuencias de nucleótidos diseñadas, se sintetizaron varios ADN sintéticos con una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y se llevó a cabo una PCR utilizando dichos ADN. En este caso resultaba preferente el diseño de 6 ADN sintéticos por cada una de las cadenas H y L en vista de la eficiencia de reacción de la PCR y las longitudes de los ADN que pueden sintetizarse.

Además, el ADNc codificante de VH o VL de un anticuerpo con injerto de RDC humano podía clonarse fácilmente en el vector para la expresión de anticuerpo con injerto de RDC humano construido en (1) mediante la introducción de la secuencia de reconocimiento de un enzima de restricción apropiado en el extremo 5'-terminal de los ADN sintéticos existentes en ambos extremos.

De lo contrario, puede llevarse a cabo utilizando un ADN sintético como ADN codificante de la cadena H de longitud completa y de la cadena L de longitud completa, basándose en la secuencia de ADN diseñada.

Después de la PCR, se clonó un producto amplificado en un plásmido, tal como pBluescript SK (-) (fabricado por Stratagene) o similar, y se determinó la secuencia de nucleótidos según un método similar al método descrito en (2) con el fin de obtener un plásmido con una secuencia de ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humanizado deseado.

(5) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo con injerto de RDC humano

Es conocido que al producir un anticuerpo con injerto de RDC humana mediante la simple injerto de sólo las RDC en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las RM de VH y VL de un anticuerpo humano, su actividad de unión a antígeno es más baja que la del anticuerpo original derivado de un animal no humano [Bio/Technology 9:266, 1991].

En los anticuerpos con injerto de RDC humana, entre las secuencias de aminoácidos de las RM en VH y VL de un anticuerpo humano, se identificó un residuo aminoácido relacionado directamente con la unión a antígeno, un residuo aminoácido que interactúa con un residuo aminoácido en la RDC y un residuo aminoácido que mantiene la estructura tridimensional del anticuerpo y que se relaciona indirectamente con la unión a un antígeno, y se modificaron por un residuo aminoácido presente en el anticuerpo no humanizado original, incrementando de esta manera la actividad de unión a antígeno que se había reducido.

Con el fin de identificar los residuos aminoácidos relacionados con la actividad de unión a antígeno en la RM, puede construirse la estructura tridimensional del anticuerpo y llevar a cabo un análisis mediante cristalografía de rayos X [J. Mol. Biol. 112:535, 1977], el modelado por ordenador [Protein Engineering 7:1501, 1994] o similar. Además, el anticuerpo con injerto de RDC humano modificado con suficiente actividad de unión contra el

antígeno puede obtenerse mediante diversos esfuerzos, tales como la producción de varios anticuerpos modificados de cada anticuerpo y el examen de sus actividades de unión.

5 La modificación de la secuencia de aminoácidos de la RM en VH y VL de un anticuerpo humano puede llevarse a cabo utilizando diversos ADN sintéticos para la modificación de acuerdo con la PCR tal como se indica en (4). Con respecto al producto amplificado obtenido mediante PCR, se determinó la secuencia de nucleótidos según el método descrito en (2), de manera que se confirmase que la modificación objetivo había sido realizada.

10 (6) Construcción de vector para la expresión de anticuerpo con injerto de RDC humana

10 Puede construirse un vector para la expresión de anticuerpo con injerto de RDC humana mediante la clonación de cada ADNc codificante de VH o VL de un anticuerpo recombinante construido cadena arriba de cada gen codificante de CH o CL del anticuerpo humano en el vector para la expresión de anticuerpo recombinante tal como se indica en (1).

15 Por ejemplo, al introducir secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción apropiados en el extremo 5'-terminal de ADN sintéticos situados en ambos extremos entre los ADN sintéticos utilizados en la construcción de VH o VL del anticuerpo con injerto de RDC humano en (4) o (5), puede llevarse a cabo la clonación de manera que se expresan en una forma apropiada cadena arriba de cada gen codificante de CH o CL del anticuerpo humano en el vector de expresión de anticuerpo con injerto de RDC humano tal como se indica en (1).

20 (7) Expresión transitoria de anticuerpo recombinante

25 Con el fin de evaluar eficientemente la actividad de unión a antígeno de diversos anticuerpos con injerto de RDC humano producidos, los anticuerpos recombinantes pueden expresarse transitoriamente utilizando el vector para la expresión de anticuerpo tal como se indica en (3) y (6) o el vector de expresión modificado del mismo.

30 Puede utilizarse cualquier célula como célula hospedadora, con la condición de que la célula hospedadora pueda expresar un anticuerpo recombinante. Por ejemplo, se utilizan células COS-7 (ATCC n° CRL1651) en vista de su elevado nivel de expresión [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press 283, 1991].

35 Entre los ejemplos de método de introducción del vector de expresión en células CO-7 se incluye un método de DEAE-dextrano [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283, 1991], un método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987] y similares.

40 Tras la introducción del vector de expresión, puede determinarse el nivel de expresión y la actividad de unión a antígeno del anticuerpo recombinante en el sobrenadante de cultivo mediante inmunoensayo enzimático [Monoclonal Antibodies - Principles and Practice, tercera edición, Academic Press, 1996; Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Monoclonal Antibody Experiment Manual, Kodansha Scientific, 1987] y similares.

45 (8) Obtención de transformantes que expresan establemente anticuerpos recombinantes y preparación de anticuerpos recombinantes

45 Puede obtenerse un transformante que exprese establemente un anticuerpo recombinante mediante la introducción del vector de expresión de anticuerpo recombinante indicado en (3) y (6) en una célula hospedadora apropiada.

50 Entre los ejemplos del método de introducción del vector de expresión en una célula hospedadora se incluye la electroporación [solicitud de patente japonesa no examinada publicada n° 257891/90, Cytotechnology 3:133, 1990] y similares.

55 Como célula hospedadora en la que se introduce un vector de expresión de un anticuerpo recombinante, puede utilizarse cualquier célula, con la condición de que sea una célula hospedadora que pueda producir el anticuerpo recombinante. Entre los ejemplos se incluye CHO-K1 (ATCC n° CCL-61), DUKXB11 (ATCC n° CCL-9096), Pro-5 (ATCC n° CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, n° de cat. 11619), célula de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (también denominada YB2/0), célula de mieloma de ratón NS0, célula de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 (ATC n° CRL1581), célula P3X63-Ag8653 de ratón (ATCC n° CRL1580), célula CHO en la que un gen de dihidrofolato reductasa (en adelante denominado "dhfr") es defectuoso [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980], Lec13 con resistencia adquirida a lectina [Somatic Cell and Molecular Genetics 12:55, 1986], célula CHO en la que el gen α 1,6-fucosiltransferasa es defectuoso (documentos n° WO 2005/35586 y n° WO 02/31140), célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC n° CRL1662) y similares.

65 Además, también pueden utilizarse células hospedadoras en las que una actividad de una proteína, tal como un enzima relacionado con la síntesis de un nucleótido-azúcar intracelular, la GDP-fucosa, una proteína, tal como un enzima relacionado con la modificación de una cadena sacárida en la que la posición 1 de la fucosa se encuentra

5 unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor mediante enlace α en una cadena
sacárida unida mediante N-glucósido de tipo complejo, o una proteína relacionada con el transporte reducido o
anulado de un azúcar-nucleótido intracelular, la GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi, preferentemente una célula
CHO en la que el gen de α -1,6-fucosiltransferasa es defectuoso tal como se indica en el documento n°
WO2005/35586, n° WO02/31140 o similar.

10 Tras la introducción del vector de expresión, se seleccionan transformantes que expresan un anticuerpo
recombinante establemente mediante el cultivo en un medio para el cultivo de células animales que contiene un
agente, tal como sulfato de G418 (en adelante denominado "G418") o similar (solicitud de patente japonesa
publicada no examinada n° 257891/90).

15 Entre los ejemplos de medio para el cultivo de células animales se incluye el medio RPMI1640 (fabricado por
Invitrogen), el medio GIT (fabricado por Nihon Pharmaceutical), el medio EX-CELL301 (fabricado por JRH), el
medio IMDM (fabricado por Invitrogen), el medio de hibridoma-SFM (fabricado por Invitrogen), medios obtenidos
mediante la adición de diversos aditivos, tales como FBS, a dichos medios, y similares.

20 El anticuerpo recombinante puede producirse y acumularse en un sobrenadante de cultivo mediante el cultivo de
los transformantes obtenidos en un medio. La cantidad de expresión y la actividad de unión a antígeno del
anticuerpo recombinante en el sobrenadante de cultivo pueden medirse mediante ELISA o similar. Además, en el
transformante, puede incrementarse la cantidad expresada del anticuerpo recombinante mediante la utilización
del sistema de amplificación de DHFR o similar según el método dado a conocer en la solicitud de patente
publicada no examinada n° 257891/90.

25 La proteína recombinante puede purificarse a partir del sobrenadante de cultivo del transformante mediante la
utilización de una columna de proteína A [Monoclonal Antibodies. Principles and Practice, tercera edición,
Academic Press, 1996; Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]. Además, el
anticuerpo recombinante puede purificarse mediante una combinación de los métodos de purificación, tales como
la filtración en gel, la cromatografía de intercambio iónico, la ultrafiltración y similares.

30 El peso molecular de la cadena H o de la cadena L del anticuerpo recombinante purificado o la molécula de
anticuerpo en su conjunto se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (en adelante
denominada "SDS-PAGE") [Nature 227:680, 1970], transferencia western [Monoclonal Antibodies. Principles and
Practice, tercera edición, Academic Press, 1996; Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
Laboratory, 1988] y similares.

35 3. Evaluación de la actividad del anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo.

La actividad del anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo purificado de la presente invención puede
evaluarse de la manera siguiente.

40 Se evaluó la actividad de unión a la célula que expresa TIM-3 mediante el ensayo de unión indicado en 1-(6a),
anteriormente, y un método de resonancia del plasmón superficial utilizando, por ejemplo, el sistema Biacore
indicado en (6b), anteriormente. Además, puede medirse mediante una técnica de anticuerpos fluorescentes
[Cancer Immunol. Immunother. 36:373, 1993] y similares.

45 Se evaluó la citotoxicidad dependiente del complemento (en adelante denominada "actividad de CDC") o
actividad de ADCC contra una línea celular positiva para antígeno mediante un método conocido [Cancer
Immunol. Immunother. 36:373, 1993].

50 4. Método de control de la actividad efectora de un anticuerpo

55 Como método para el control de la actividad efectora del anticuerpo monoclonal de la presente invención, es
conocido un método de control de la cantidad de fucosa (en adelante denominada también "fucosa nuclear") que
se une en enlace α -1,6 a la N-acetilglucosamina (GlcNAc) presente en un extremo reductor de una cadena
sacárida unida mediante N de tipo complejo que se une a la asparagina (Asn) en la posición 297 de una región
Fc de un anticuerpo (documentos n° WO2005/035586, n° WO2002/31140 y n° WO00/61739), un método de
control de una actividad efectora de un anticuerpo monoclonal mediante la modificación de uno o más
aminoácidos de una región Fc del anticuerpo, y similares. La actividad efectora del anticuerpo monoclonal anti-
TIM-3 de la presente invención puede controlarse mediante la utilización de cualquiera de los métodos.

60 La "actividad efectora" se refiere a una actividad dependiente de anticuerpos que se induce mediante una región
Fc de un anticuerpo. Como actividad efectora, se conoce la actividad de ADCC, la actividad de CDC y la
fagocitosis dependiente de anticuerpos (actividad de ADP) por fagocitos, tales como macrófagos o células
dendríticas.

65 Mediante el control del contenido de fucosa nuclear de la cadena sacárida unida mediante N de tipo complejo de

la región Fc del anticuerpo, puede incrementarse o reducirse la actividad efectora del anticuerpo. Según el método de reducción del contenido de fucosa que se encuentra unida a la cadena sacárida unida a N de tipo complejo unida a Fc del anticuerpo, puede obtenerse un anticuerpo al que no se encuentra unida fucosa, mediante la expresión de un anticuerpo utilizando una célula CHO que es deficiente en un gen codificante de α -1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que no se encuentra unida fucosa presenta una actividad de ADCC elevada.

Por otra parte, según un método para incrementar el contenido de fucosa que se encuentra unida a una cadena sacárida unida mediante N de tipo complejo a la región Fc del anticuerpo, puede obtenerse un anticuerpo al que se encuentra unida fucosa mediante la expresión de un anticuerpo utilizando una célula hospedadora en la que se ha introducido un gen codificante de α -1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que se encuentra unida fucosa presenta una actividad de ADCC más baja que el anticuerpo al que no se encuentra unida fucosa.

Además, mediante la modificación del residuo o residuos aminoácidos en una región Fc del anticuerpo, puede incrementarse o reducirse la actividad de ADCC o de CDC. Por ejemplo, la actividad de unión a un 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 de CDC puede incrementarse o reducirse mediante la modificación de un aminoácido tal como se indica en las patentes US nº 6.737.056, nº 7.297.775 o nº 7.317.091.

Además, puede obtenerse un anticuerpo en el que se ha controlado la actividad efectora, mediante la combinación del método anteriormente indicado dentro de un anticuerpo.

5. Método para tratar una enfermedad utilizando el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo anti-TIM-3 de la presente invención.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede utilizarse para tratar una enfermedad relacionada con una célula positiva para TIM-3.

El agente terapéutico que comprende el anticuerpo de la presente invención o derivados del mismo puede ser únicamente el anticuerpo o fragmento de anticuerpo o derivados del mismo como principio activo y preferentemente se suministra en forma de una preparación farmacéutica producida mediante un método apropiado bien conocido del campo técnico de la farmacéutica mediante la mezcla del mismo con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

Entre los ejemplos de vía de administración se incluyen la administración oral y la administración no oral, tal como la administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Entre los ejemplos de la forma de administración se incluyen pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas, cintas y similares.

La preparación farmacéutica adecuada para la administración oral incluye emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares.

Pueden producirse preparaciones líquidas, tales como emulsiones y jarabes, utilizando, como aditivos, agua, azúcares, tales como la sacarosa, el sorbitol y la fructosa; glicoles, tales como polietilenglicol y propilenglicol; aceites, tales como el aceite de sésamo, el aceite de oliva y el aceite de soja; antisépticos, tales como los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico; saborizantes, tales como los saborizantes de fresa y de menta, y similares.

Pueden producirse cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares utilizando, como aditivos, excipientes, tales como lactosa, glucosa, sacarosa y manitol; agentes desintegrantes, tales como almidón y alginato sódico; lubricantes, tales como estearato de magnesio y talco; ligantes, tales como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa y gelatina; surfactantes, tales como éster de ácido graso; plastificadores, tales como glicerina, y similares.

La preparación farmacéutica adecuada para la administración parenteral incluye inyecciones, supositorios, pulverizaciones y similares.

Pueden prepararse inyecciones utilizando un portador, tal como una solución salina, una solución de glucosa o una mezcla de ambas.

Pueden prepararse supositorios utilizando un portador, tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada o ácido carboxílico.

Pueden prepararse pulverizaciones utilizando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por sí solo o utilizándolo junto con un portador que no estimule la membrana mucosa bucal o respiratoria del paciente y pueda facilitar la absorción del compuesto mediante la dispersión del mismo en partículas finas. El portador incluye lactosa,

glicerol y similares. Resulta posible producir preparaciones farmacéuticas tales como aerosoles y polvos secos.

Además, también pueden añadirse a las preparaciones parenterales, componentes ejemplificados como aditivos para las preparaciones orales.

5

6. Método de diagnóstico de una enfermedad que utiliza el anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 en la presente invención.

10

Puede diagnosticarse una enfermedad relacionada con TIM-3 mediante la detección o determinación de TIM-3 o una célula que expresa TIM-3 utilizando el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de la presente invención.

15

Puede llevarse a cabo un diagnóstico de cáncer, que es una de las enfermedades relacionadas con TIM-3, por ejemplo, mediante la detección o medición siguiente de TIM-3.

20

El diagnóstico de cáncer puede llevarse a cabo in vitro mediante la detección de la expresión de TIM-3 sobre la célula del cuerpo de un paciente mediante un método inmunológico, tal como la citometría de flujo.

25

Un método inmunológico es un método en el que se detecta o se determina una cantidad de anticuerpo o una cantidad de antígeno utilizando un antígeno o anticuerpo marcado. Entre los ejemplos del método inmunológico se incluye un método de inmunoanticuerpo marcado con sustancia radioactiva, un inmunoensayo enzimático, un inmunoensayo fluorescente, un inmunoensayo luminiscente, un método de transferencia western, medios físicoquímicos y similares.

30

Entre los ejemplos del método de inmunoanticuerpo marcado con una sustancia radioactiva se incluye un método en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención se deja reaccionar con un antígeno, una célula que expresa un antígeno o similar, después se somete el anticuerpo anti-inmunoglobulina a un marcaje radioactivo o un fragmento de unión del mismo se deja reaccionar con el mismo, seguido de la determinación utilizando un contador de centelleo o similares.

35

Entre los ejemplos de inmunoensayo enzimático se incluye un método en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención se deja reaccionar con un antígeno, una célula que expresa un antígeno o similar, después se deja reaccionar un anticuerpo antiinmunoglobulina o un fragmento de unión del mismo sometido a marcaje del anticuerpo se deja reaccionar con el antígeno y se mide el pigmento coloreado utilizando un espectrofotómetro y puede utilizarse, por ejemplo, un ELISA de tipo sándwich.

40

Como marcaje utilizado en el inmunoensayo enzimático, puede utilizarse cualquier marcaje enzimático conocido (Enzyme Immunoassay, publicado por Igaku Shoin, 1987) tal como se ha indicado anteriormente. Entre los ejemplos se incluyen el marcaje con fosfatasa alcalina, el marcaje con peroxidasa, el marcaje con luciferasa, el marcaje con biotina y similares.

45

El ELISA de tipo sándwich es un método en el que se une un anticuerpo a una fase sólida, se atrapa el antígeno que debe detectarse o medirse y se deja que reaccione otro anticuerpo con el antígeno atrapado. En el ELISA se preparan dos tipos de anticuerpo que reconocen el antígeno que debe detectarse o medirse o el fragmento de anticuerpo del mismo en el que el sitio de reconocimiento de antígeno es diferente, y el primer anticuerpo o fragmentos de anticuerpos se adsorbe previamente sobre una placa (tal como una placa de 96 pocillos) y el segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo se marca con una sustancia fluorescente, tal como FITC, un enzima tal como la peroxidasa, o la biotina.

50

La placa en la que se encuentra adsorbido el anticuerpo anteriormente indicado se deja reaccionar con las células separadas del cuerpo vivo o suspensión de células desagregadas del mismo, tejido o solución desintegrada del mismo, sobrenadante de cultivo celular, suero, efusión pleural, ascites, solución ocular o similar, y después se dejar reaccionar con un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo marcado y se lleva a cabo una reacción de detección correspondiente a la sustancia marcada. La concentración de antígeno en la muestra que debe someterse a ensayo puede calcularse a partir de una curva de calibración preparada mediante una dilución escalonada del antígeno de concentración conocida.

60

Como anticuerpo utilizado para el ELISA de tipo sándwich, puede utilizarse un anticuerpo policlonal o monoclonal o pueden utilizarse fragmentos de anticuerpo, tales como Fab, Fab' y F(ab)₂. Como combinación de 2 tipos de anticuerpos utilizados en el ELISA de tipo sándwich, puede utilizarse una combinación de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos que reconocen diferentes epítomos o puede utilizarse una combinación de anticuerpo policlonal con anticuerpo monoclonal o fragmentos de anticuerpo.

65

Un inmunoensayo fluorescente incluye un método descrito en la literatura [Monoclonal Antibodies. Principles and Practice, tercera edición, Academic Press, 1996; Manual for Monoclonal Antibody Experiments, Kodansha Scientific, 1987] y similares. Como marcaje para el inmunoensayo fluorescente, puede utilizarse cualquiera de los

marcajes fluorescentes conocidos [Fluorescent Immunoassays, de Akira Kawao, Soft Science, 1983]. Entre los ejemplos del marcaje se incluye FITC, RITC y similares.

5 El inmunoensayo luminiscente puede llevarse a cabo utilizando los métodos descritos en la literatura [Bioluminescence and Chemical Luminescence, Rinsho Kensa 42, Hirokawa Shoten, 1998] y similares. Como marcaje utilizado para el inmunoensayo luminiscente, puede incluirse cualquiera de los marcajes luminiscentes conocidos. Entre los ejemplos que pueden utilizarse se incluye éster de acridinio, lofina o similares.

10 La transferencia western es un método en el que se fracciona un antígeno o una célula que expresa un antígeno mediante SDS (dodecilsulfato sódico)-PAGE [Antibodies. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)], se transfirió el gel a la membrana de PVDF o membrana de nitrocelulosa, la membrana se dejó reaccionar con anticuerpo o fragmento de anticuerpo de reconocimiento de antígeno, se dejó reaccionar adicionalmente con un anticuerpo anti-IgG de ratón o fragmento de anticuerpo que se había marcado con una sustancia fluorescente, tal como FITC, un marcaje enzimático, tal como peroxidasa, un marcaje de biotina o similar, y el marcaje se visualizó para confirmar la reacción. Un ejemplo de la misma se describe posteriormente.

15 Las células o tejidos en los que se expresaba un polipéptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 53 se disolvieron en una solución y, bajo condiciones reductoras, se sometieron a electroforesis 0,1 a 30 µg de proteína en cada carril mediante un método de SDS-PAGE. La proteína sometida a electroforesis se transfirió a una membrana de PVDF y se dejó reaccionar con PBS que contenía 1% a 10% de BSA (en adelante denominado "BSA-PBS") a temperatura ambiente durante 30 minutos para el bloqueo.

20 En la presente memoria, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se dejó reaccionar en la misma, se lavó con PBS que contenía 0,05% a 0,1% de Tween-20 (en adelante denominado "Tween-PBS") y se dejó que reaccionase con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavó con Tween-PBS y se detectó una banda en la que se encontraba unido el anticuerpo monoclonal utilizando reactivos de detección para transferencia western ECL (fabricados por Amersham) o similares para detectar de esta manera un polipéptido con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 1. Como anticuerpo utilizado para la detección en la transferencia western, se utilizó un anticuerpo que podía unirse a un polipéptido que no presentaba estructura tridimensional de un tipo natural.

25 El método físicoquímico se llevó a cabo específicamente haciendo reaccionar TIM-3 como antígeno con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención para formar un agregado y detectando dicho agregado. Entre otros ejemplos de métodos físicoquímicos se incluyen un método capilar, un método de inmunodifusión unidimensional, una inmunoturbidimetría, una inmunoturbidimetría en látex [Handbook of Clinical Test Methods, Kanehara Shuppan, 1988] y similares.

30 Por ejemplo, en un método de inmunodifusión en látex, puede utilizarse un portador, tal como látex de poliestireno con un tamaño de partícula de entre aproximadamente 0,1 µm y 1 µm sensibilizado con anticuerpo o antígeno y durante la reacción de antígeno-anticuerpo con el antígeno o anticuerpo correspondiente, la luz dispersada en la solución de reacción se incrementa mientras que la luz transmitida se reduce. Al detectar dicho cambio como absorbancia o turbidez esférica integral, resulta posible medir la concentración de antígeno, etc. en la muestra que debe someterse a ensayo.

35 Además, para la detección de la célula que expresa TIM-3, pueden utilizarse métodos de detección inmunológica conocidos y preferentemente se utiliza un método de inmunoprecipitación, un método de tinción de células inmunológicas, un método de tinción de tejidos inmunológicos, un método de tinción de anticuerpos fluorescente y similares.

40 Un método de inmunoprecipitación es un método en el que una célula que expresa TIM-3 se dejar reaccionar con el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de la presente invención y después se añade un portador que presenta una capacidad de unión específica a la inmunoglobulina, tal como proteína G-sefarosa, de manera que precipita un complejo de antígeno-anticuerpo. Además, puede llevarse a cabo el método siguiente. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anteriormente indicado de la presente invención se adsorbe a una fase sólida en una placa de 96 pocillos para el ELISA y después se bloquea con BSA-PBS.

45 En el caso de que el anticuerpo se encuentra en un estado no purificado, tal como un sobrenadante de cultivo de una célula de hibridoma, previamente se adsorbe anticuerpo antiinmunoglobulina de ratón, inmunoglobulina de rata, proteína A, proteína G o similar en una placa de 96 pocillos para el ELISA, que se bloquea con BSA-PBS y se dispensa en la misma un sobrenadante de cultivo de células de hibridoma para la unión. Tras descartar el BSA-PBS y lavar suficientemente el residuo con PBS, se lleva a cabo la reacción con una solución disuelta de célula o tejidos que expresan TIM-3. Se extrae un inmunoprecipitado de la placa de pocillos lavados con un tampón de muestras para SDS-PAGE y se detecta mediante la transferencia western anteriormente descrita.

60 Un método de tinción de células inmunológicas o un método de tinción de tejidos inmunológicos son métodos en los que las células o tejidos en los que se expresa un antígeno se tratan, en caso necesario, con un surfactante,

metanol o similar para que el anticuerpo permee fácilmente hasta las células o tejidos, después se deja reaccionar el anticuerpo monoclonal de la presente invención con los mismos, seguidamente se deja adicionalmente reaccionar con un anticuerpo antiinmunoglobulina o fragmento de unión del mismo sometido a marcaje fluorescente, tal como FITC, un marcaje enzimático, tal como el marcaje con peroxidasa o biotina, y se visualiza y observa el marcaje al microscopio.

Además, las células pueden detectarse mediante un método de tinción inmunofluorescente en el que las células se dejaron reaccionar con un anticuerpo marcado fluorescentemente y se analizaron utilizando un citómetro de flujo [Monoclonal Antibodies. Principles and Practice, tercera edición, Academic Press, 1996; Manual for Experiments of Monoclonal Antibodies, Kodansha Scientific, 1987] en el que se dejó que reaccionasen las células con un anticuerpo marcado fluorescentemente y se analizaron utilizando un citómetro de flujo.

En particular, el anticuerpo monoclonal de la presente invención que se une a secuencias de aminoácidos de una región extracelular de TIM-3 o de una estructura tridimensional de la misma pueden detectar una célula que exprese el polipéptido manteniendo una estructura tridimensional natural, mediante un método de anticuerpos fluorescentes.

Además, en el caso de que se utilice un sistema FMAT8100HTS (fabricado por Applied Biosystems) y similar de entre los métodos de tinción de anticuerpos fluorescentes, puede medirse la cantidad de antígeno o de anticuerpo sin separar el complejo de anticuerpo-antígeno formado ni el anticuerpo o antígeno libre que no participa en la formación del complejo de anticuerpo-antígeno.

La presente invención puede proporcionar un anticuerpo monoclonal que se une a secuencias de aminoácidos de una región extracelular de TIM-3 o una estructura tridimensional y expresa actividad de ADCC; un ADN que codifica el anticuerpo; un vector que comprende el ADN; un transformante obtenido mediante transformación del vector; un procedimiento para producir un anticuerpo utilizando el transformante; un método in vitro para detectar o medir inmunológicamente la TIM-3 humana, y el anticuerpo monoclonal de la invención para la utilización en un método de terapia para un cáncer relacionado con una célula positiva para TIM-3 humana.

A continuación en la presente memoria se describen específicamente unas formas de realización ejemplificativas de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada a las formas de realización ejemplificativas descritas a continuación.

Ejemplos

[Ejemplo 1]

(Clonación molecular de ADNc de TIM-3 humana y establecimiento de una célula de expresión estable)

Se amplificó el ADNc de la TIM-3 humana mediante PCR utilizando ExTaq (fabricado por Takara Bio Inc.) y un panel de múltiples tejidos humanos (MTC, fabricado por Clontech) como molde. Como cebadores se utilizó TIM-3 Fw2 (SEC ID nº 31) y TIM-3 Re2 (SEC ID nº 32). El producto de PCR obtenido se insertó en el vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega Corp.) y el plásmido se introdujo en células competentes en TOP10 One Shot (fabricado por Invitrogen) para la amplificación. El ADN plasmídico se extrajo mediante el método miniprep.

Mediante el análisis de la secuencia del ADN purificado utilizando los cebadores TIM-3 Fw y TIM-3 Re2, se seleccionó el clon que presentaba la misma secuencia que la región codificante de GenBank número de acceso NM_032782. Se construyó un retrovirus de TIM-3 humano (TIM-3_h/pMCs-Ig) mediante recombinación de la inserción del clon seleccionado en el vector pMC-IRES-GFP (fabricado por Cell Biolabs Inc.) utilizando el sistema constructivo de retrovirus Ampho (fabricado por Takara Bio Inc.).

Se inyectó el retrovirus de TIM-3 humano en células Jurkat (ATCC nº de acceso CRL-2063), células EoL-1 (Riken Cell Bank nº RCB0641) y células L929 (fabricadas por Sigma-Aldrich Co., LLC), que se confirmó que no expresaban endógenamente TIM-3 mediante análisis de citometría de flujo. Tras varios pases, se recolectaron las células positivas para TIM-3 mediante FACSAria (fabricado por BD Biosciences). Se estableció una línea celular de expresión estable de TIM-3 mediante recolección de las células positivas para TIM-3 mediante FACSAria tras varios pases.

[Ejemplo 2]

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

El ADNc codificante de la región extracelular de la TIM-3 humana se amplificó mediante PCR utilizando ExTaq (fabricado por Takara Bio Inc.) y TIM-3_h/pMCs-Ig construido en el Ejemplo 1, a modo de molde. Se utilizaron los cebadores pMCs-Fw (SEC ID nº 33) y TIM3ED-FcReXba 2 (SEC ID nº 34).

El producto de PCR amplificado se insertó en el vector pTracer-CMV-FLAG-Fc humano [vector modificado en el que FLAG y el dominio Fc de IgG1 humana se insertaron en el vector pTracer-CMV (fabricado por Invitrogen) entre el sitio *Xba*I y el sitio *Apa*I]. Tras introducir el plásmido en células competentes en TOP10 One Shot (fabricado por Invitrogen) para la amplificación, se extrajo el ADN plasmídico (TIM-3_s-FLAG-Fc/pTracerCMV) mediante el método de miniprep.

Mediante el análisis de la secuencia de ADN utilizando T7 (SEC ID nº 35) y TIM-3_h Fw1 (SEC ID nº 36) como cebador, se confirmó que TIM-3_s-FLAG-Fc/pTracerCMV presentaba la misma secuencia de nucleótidos que la región correspondiente en GenBank número de acceso NM_032782. La secuencia de nucleótidos (entre el sitio de reconocimiento *Eco*RI y el sitio de reconocimiento *Apa*I) era idéntica a la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 37.

[Ejemplo 3]

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

Se amplificó el ADNc codificante de la región extracelular de TIM-3 humana mediante PCR utilizando ExTaq (fabricado por Takara Bio Inc.) y TIM-3_h-FLAG-Fc/pTracerCMV establecido en el Ejemplo 2, a modo de molde. Como cebadores se utilizaron TIM-3 Fw2 (SEC ID nº 31) y TIM3ED-FLAG4aa (SEC ID nº 39).

A continuación, se ligó el epítipo FLAG mediante el método de PCR utilizando ExTaq (fabricado por Takara Bio Inc.), TIM-3 Fw2 (SEC ID nº 31) y C-FLAG-NotR2 (SEC ID nº 40) como cebadores y el producto de PCR obtenido como molde. Se insertó el producto de PCR en el vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega Corp.). Tras introducir el plásmido en células competentes en TOP10 One Shot (fabricado por Invitrogen) para la amplificación, se extrajo el ADN plasmídico (TIM-3_s-FLAG/pEF6Myc_HisC) mediante el método de miniprep.

Mediante el análisis de la secuencia de ADN utilizando T7 (SEC ID nº 35) y BGH-R (SEC ID nº 41) como cebador, se confirmó que TIM-3_s-FLAG-Fc/pEF6 Myc_HisC purificado presentaba la misma secuencia de nucleótidos que la región correspondiente en GenBank número de acceso NM_032782.

[Ejemplo 4]

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

El ADN plasmídico de TIM-3_s-FLAG-Fc/pTracerCMV y de TIM-3_s-FLAG-Fc/pEF6 Myc_HisC obtenidos en los Ejemplos 2 y 3, respectivamente, se introdujeron en células HEK293F (preparadas por Invitrogen) y se expresaron transitoriamente. Seis días después, se recuperó cada uno de los sobrenadantes celulares y se utilizaron para la purificación de proteínas.

El sobrenadante de cultivo que contenía la proteína de fusión de TIM-3 humana extracelular soluble-Fc humana o que contenía TIM-3 humana extracelular soluble se recuperó mediante centrifugación seis días después de la transfección. Las proteínas de fusión se purificaron con una columna anti-FLAG preparada utilizando un gel de afinidad de agarosa anti-FLAG M2 (fabricado por Sigma-Aldrich Co., LLC) y péptidos FLAG (fabricados por Sigma-Aldrich Co., LLC) siguiendo los protocolos del fabricante.

Las muestras eluidas se fraccionaron y después cada fracción se analizó mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y después se llevó a cabo la tinción con plata y una transferencia western. Para la transferencia western, se utilizó un anticuerpo anti-FLAG M2 (fabricado por Sigma-Aldrich Co., LLC) y un anticuerpo de conejo antiinmunoglobulina de ratón marcado con fosfatasa alcalina (fabricado por Dako). La fracción que contenía la proteína diana se concentró utilizando Amicon Ultra 4 10K (fabricado por Millipore) y se aplicó para la cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex 200 gp (fabricada por GE Healthcare).

Tras el fraccionamiento, se aplicó cada fracción a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, se tiñó con plata y después se realizó una transferencia western. Se concentró la fracción en la que se encontró la proteína diana y se lavó con 0,5 ml de PBS. La proteína de fusión de TIM-3 humana extracelular soluble-Fc humana o la TIM-3 humana extracelular soluble se recolectaron después de la filtración a través de un filtro esterilizante MILLEX-GV (fabricado por Millipore) que presentaba un diámetro de poro de 0,22 µm. Se midió la pureza de proteína mediante el kit Limulus ES-II Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), que es un kit para detectar endotoxinas, y se confirmó que la fracción había sido suficientemente purificada.

[Ejemplo 5]

(Preparación de ratón expresante del anticuerpo humano)

Los ratones utilizados para la inmunización presentaban un fondo genético en el que tanto el locus endógeno de

la cadena pesada de Ig como el locus de la cadena ligera κ se habían alterado homocigóticamente y se mantuvo un fragmento del cromosoma 14 (SC20) que comprendía un transcromosoma de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena Ig κ humana (KCo5) simultáneamente. Se estableció dicha cepa de ratón mediante el cruce de la cepa A de ratón que presentaba loci de cadena pesada de la Ig humana y la cepa B de ratón que mantenía el transgén de la cadena Ig κ humana.

La cepa A de ratón es un homocigoto en el que el locus endógeno de cadena pesada de Ig y el locus de la cadena ligera κ han sido alterados homocigóticamente, y mantiene un fragmento de cromosoma 14 (SC20) que puede transmitirse a la progenie y que se encuentra descrito, por ejemplo, en Tomizuka et al. (Tomizuka K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727, 2000).

La cepa B de ratón es una cepa de ratón (ratón transgénico) en la que se han alterado homocigóticamente tanto el locus endógeno de la cadena pesada de Ig como el locus de la cadena ligera κ , y mantiene un transgén de la cadena ligera Ig κ humana (KCo5) y se describe, por ejemplo, en Fishwild et al. (1996) [Nature Biotechnology 14:845-851].

El animal individual se obtuvo mediante cruce de un ratón macho de la cepa A y un ratón hembra de la cepa B, o de un ratón hembra de la cepa A y un ratón macho de la cepa B, y era un ratón en el que podían detectarse simultáneamente en el suero la cadena pesada de Ig humana y la cadena ligera Ig κ [Ishida y Lonberg, IBC'S 11th Antibody Engineering, resumen nº 2000] y se utilizó posteriormente para experimentos inmunológicos. A título de información, el ratón expresante de anticuerpo humano (en adelante denominado "ratón KM") puede obtenerse de Kyowa Hakko Kirin mediante la obtención de una licencia.

[Ejemplo 6]

(Preparación de anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 humana)

La preparación del anticuerpo monoclonal en el presente Ejemplo se llevó a cabo siguiendo métodos generales, tales como los publicados en Monoclonal Antibody Experiment Manual (Yasuhigashi Tamie et al., Kodansha, 1991). Como inmunógeno TIM-3 se utilizó la célula L929 expresante de TIM-3 preparada en el Ejemplo 1 o la proteína de fusión de TIM-3 humana extracelular soluble-Fc humana preparada en el Ejemplo 4. El animal inmunizado fue el ratón KM, descrito anteriormente.

Se inyectaron células L929 que expresan TIM-3 en los ratones a una dosis de 1×10^7 células/animal. Tras la primera inmunización, se administró adicionalmente la misma célula tres veces adicionales o más. Tres días antes de obtener el bazo, se administró la proteína de fusión de TIM-3 humana extracelular soluble-Fc humana preparada en el Ejemplo 4 en la vena caudal a una dosis de 20 μ g/ratón. Se extirpó quirúrgicamente el bazo de los ratones inmunizados, se introdujo en 4 ml de PBS y se trituró en una malla (filtro celular fabricado por Falcon) utilizando una jeringa de émbolo.

Las células se precipitaron mediante centrifugación de la suspensión celular que había sido pasada a través de la malla y las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos (fabricado por Sigma-Aldrich Co., LLC). Tras incubar durante 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 10 ml de medio DMEM libre de suero (fabricado por Invitrogen) (en adelante denominado "medio DMEM libre de suero") que contenía 50 unidades/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomina y las células se precipitaron mediante centrifugación.

Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio DMEM libre de suero. Por otra parte, se cultivó la línea celular de mieloma SP2/0 (ATCC nº CRL-1581) en medio DMEM que contenía FBS al 10%, 50 unidades/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomina (en adelante denominado "medio DMEM que contiene suero") y se incubó a 37°C bajo 5% de CO₂ a fin de no exceder una densidad celular de 1×10^6 células/ml.

Las células SP2/0 se lavaron con 10 ml de medio DMEM libre de suero y se suspendieron en medio DMEM libre de suero, tal como en el caso de las células derivadas del bazo. Dicha suspensión de células derivadas de bazo y la suspensión de células de mieloma se mezclaron en una proporción de 5:1, se centrifugaron y se eliminó por completo el sobrenadante. Para fusionar las células, se añadió lentamente 1 ml de polietilenglicol al 50% (p/v) (fabricado por Boehringer Mannheim Corp.) bajo agitación simultánea del sedimento con la punta de pipeta y después se añadió 1 ml de medio DMEM libre de suero precalentado a 37°C. Lentamente se añadieron 5 ml y 10 ml de DMEM libre de suero seguido de 5 min de incubación a 37°C bajo 5% de CO₂.

Tras la centrifugación y eliminación del sobrenadante, las células fusionadas se resuspendieron en 50 ml de medio DMEM que contenía FBS al 10% (fabricado por Invitrogen), penicilina-estreptomina-glutamina (fabricados por Invitrogen, dilución de 100 veces del nº de catálogo 10378-016), IL-6 (5 ng/ml) y 2-mercaptoetanol (fabricado por Invitrogen, dilución de 1.000 veces de nº de catálogo 21985-023) (en adelante denominado "medio DMEM que contiene IL-6") y se incubó a 37°C bajo 5% de CO₂.

Al día siguiente, se recogieron las células mediante pipeteado, se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en

10 ml de medio DMEM que contenía IL-6. Al día siguiente, se añadió hipoxantina-aminopterina-timidina (en adelante denominado "HAT", fabricado por Sigma-Aldrich Co., LLC). Tras incubar durante aproximadamente 7 a 10 días, se recolectó el sobrenadante de cultivo para el cribado de hibridoma.

5 [Ejemplo 7]

(Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón anti-TIM-3 humano)

10 La preparación del anticuerpo monoclonal en el presente Ejemplo se llevó a cabo según los métodos generales publicados en Introduction to Monoclonal Antibody Experiment (Yasuhigashi Tamie et al., Kodansha, 1991). Como inmunógeno TIM-3 se utilizaron las células L929 expresantes de TIM-3 preparadas en el Ejemplo 1 o la TIM-3 humana extracelular soluble preparada en el Ejemplo 4. Los animales inmunizados fueron ratones Balb/c (obtenidos de Nihon Charles River).

15 En primer lugar, se inmunizó un ratón Balb/c mediante la inyección de células L929 que expresaban TIM-3, por vía intraperitoneal a una dosis de 1×10^7 células/animal. Después de la primera inmunización, se administraron adicionalmente las mismas células tres veces adicionales o más. Tres días antes de extraer el bazo, se administró la proteína TIM-3 humana extracelular soluble preparada en el Ejemplo 4, en la vena caudal a una dosis de 20 µg/ratón. Se extirpó quirúrgicamente el bazo del ratón inmunizado, se introdujo en 4 ml de PBS y se trituró en una malla (filtro celular fabricado por Falcon) utilizando una jeringa de émbolo.

20 Las células se precipitaron mediante centrifugación de la suspensión celular, que se pasó por la malla, y las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis para glóbulos rojos (fabricado por Sigma-Aldrich Co., LLC). Tras incubar durante 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 10 ml de medio DMEM libre de suero y después se precipitaron las células mediante centrifugación. Los sedimentos se resuspendieron en medio DMEM libre de suero. Por otra parte, la línea celular de mieloma SP2/0 (ATCC n° CRL-1581) se cultivó en medio DMEM mediante incubación a 37°C bajo 5% de CO₂ hasta una densidad celular de 1×10^6 células/ml o inferior.

25 De manera similar a las células derivadas de bazo, se lavaron células SP2/0 con 10 ml de medio DMEM libre de suero y se suspendieron en medio DMEM libre de suero. La suspensión de células de bazo y la suspensión de células de mieloma se mezclaron en una proporción de 5:1. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante. A dicho sedimento se añadió lentamente 1 ml de polietilenglicol al 50% (p/v) (fabricado por Boehringer Mannheim Corp.), bajo agitación del sedimento con la punta de pipeta y después se añadió 1 ml de medio DMEM libre de suero precalentado a 37°C.

30 A dicha suspensión se añadieron lentamente 5 ml de medio DMEM. Tras añadir adicionalmente 10 ml de DMEM libre de suero, la suspensión se incubó durante 5 min a 37°C bajo 5% de CO₂. Tras centrifugar la suspensión, los sedimentos celulares se resuspendieron en 50 ml de medio DMEM que contenía IL-6 y se cultivaron a 37°C bajo 5% de CO₂. Tras incubar durante un día, se recolectaron las células con una pipeta. Tras la centrifugación, el sedimento se resuspendió en 10 ml de medio DMEM que contenía IL-6. Al día siguiente se añadió medio HAT (fabricado por Sigma-Aldrich Co., LLC). Tras la incubación durante aproximadamente 7 a 10 días, se recuperó el sobrenadante de cultivo y se utilizó para el cribado del hibridoma.

45 [Ejemplo 8]

(Cribado de hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal humano o de ratón que se une a TIM-3 humana)

50 Se cribó el hibridoma utilizando el sobrenadante celular preparado en los Ejemplos 6 y 7. El método utilizado fue un método de citometría de flujo con las líneas celulares expresantes de TIM-3 humana. En primer lugar, la célula Jurkat o EoL-1 expresante de TIM-3 humana preparada en el Ejemplo 1 se lavó con medio de tinción (PBS que contenía FBS al 2% y azida sódica al 0,05%) y después se resuspendió en 1 ml de medio de tinción, proporcionando una densidad celular de 1×10^6 células/ml. La suspensión celular se dispensó a razón de 10 µl/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos.

55 A continuación, se añadieron 50 µl del sobrenadante del hibridoma y se incubaron durante 30 min a 4°C. Después de lavar dos veces las células con el medio de tinción, 50 µl de anticuerpo marcado que había sido diluido 200 veces con medio de tinción se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a 4°C. Respecto a los anticuerpos marcados, se utilizó F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana (específico de cadena γ)-R-PE (fabricado por Southern Biotech) para el anticuerpo monoclonal humano y se utilizó F(ab')₂ de cabra anti-IgG(H+L) de ratón-R-PE (fabricado por Southern Biotech) para el anticuerpo monoclonal de ratón.

60 Tras lavar dos veces con medio de tinción, las células se analizaron utilizando un instrumento FACSCalibur (fabricado por BD Biosciences) como cribado primario. Tras recolectar y expandir los clones positivos, las células e hibridoma fueron separadas según clon mediante FACSARIA (fabricado por BD Biosciences) y cultivadas durante siete días en medio DMEM que contenía IL-6 que contenía además hipoxantina-timidina (en adelante denominado "HT", fabricado por Sigma-Aldrich Co., LLC).

Se cribaron los sobrenadantes recolectados del mismo modo que en el método de cribado primario para la clonación de hibridomas que expresaban anticuerpo monoclonal humano anti-TIM-3 humana y que los hibridomas que expresaban anticuerpo monoclonal de ratón anti-TIM-3 humana y el clon de hibridoma seleccionado se utilizó para la purificación del anticuerpo monoclonal.

[Ejemplo 9]

(Purificación de anticuerpo monoclonal derivado de hibridoma)

Se purificó un anticuerpo monoclonal humano o de ratón anti-TIM-3 a partir del hibridoma expresante de anticuerpo monoclonal humano o de ratón anti-TIM-3 humana preparado en el Ejemplo 8. Brevemente, se preparó el sobrenadante del hibridoma que contenía una elevada concentración del anticuerpo anti-TIM-3 utilizando un sistema de producción de anticuerpos CELLline (fabricado por BD Biosciences) y se purificó el anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 humana a partir del sobrenadante. En primer lugar, para adaptar el hibridoma clonado al medio libre de suero, se cultivaron los hibridomas durante varios días en un medio en que se había mezclado medio DMEM que contenía HT e IL-6 y medio libre de suero BD Cell MAb (fabricado por BD Biosciences) en una proporción 1:1 y después se cultivaron durante varios días en un medio con una proporción de mezcla de 1:2.

A continuación, se cultivaron los hibridomas en un medio libre de suero BD Cell MAb (fabricado por BD Biosciences) y se adaptaron los hibridomas al medio libre de suero. Las células de hibridoma adaptadas al medio libre de suero se cultivaron en matraces CL-1000 siguiendo las instrucciones del fabricante y se recolectó el sobrenadante del hibridoma que contenía una concentración elevada del anticuerpo anti-TIM-3 a partir de los matraces. El anticuerpo del sobrenadante del hibridoma se purificó siguiendo procedimientos estándares utilizando proteína A.

Específicamente, se empaquetó MabSelect (fabricado por GE Healthcare) en una columna abierta y el sobrenadante se diluyó 2 veces cargando PBS y después se eluyó con glicina-HCl 0,1 moles/l (pH 2,7), seguido de la concentración con un Amicon Ultra (fabricado por Millipore). A continuación, mediante la utilización de una columna NAP-5 (fabricada por GE Healthcare), se equilibró la solución obtenida con tampón de PBS y después se esterilizó mediante filtración, obteniendo 4 clones de los anticuerpos monoclonales humanos anti-TIM-3 humano (anticuerpos 512, 644, 4545 y 4177) y un clon (anticuerpo 8213) del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TIM-3 humano.

[Ejemplo 10]

(Identificación de isotipo del anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 humano)

Cada uno de los isotipos de anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 humana que se había preparado en el Ejemplo 9 se determinó mediante un ELISA en fase sólida y citometría de flujo.

Específicamente, respecto al ELISA en fase sólida, la TIM-3 humana extracelular soluble obtenida en el Ejemplo 4 se diluyó con un tampón de carbonato-bicarbonato (fabricado por Sigma-Aldrich Co., LLC), proporcionando una concentración de 1 µg/ml y se dispensó a razón de 50 µl/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (Maxisorp, fabricada por Nunc). La TIM-3 humana extracelular soluble se adsorbió a la microplaca mediante incubación durante la noche a 4°C.

Tras descartar el sobrenadante, se añadió a la placa tampón de bloqueo SuperBlock en TBS (fabricado por Pierce) y después se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se añadieron 50 µl del sobrenadante de cultivo del hibridoma y después se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar cada pocillo con solución salina tamponada con Tris que contenía Tween-20 al 0,1% (TBS-T), se diluyó cada uno de los anticuerpos anti-IgG1 humana, anti-IgG2 humana, anti-IgG3 humana y anti-IgG4 humana, 2.000, 2.000, 2.000 y 4.000 veces, respectivamente, con TBST que contenía tampón de bloqueo SuperBlock al 10% (fabricado por SouthernBiotech) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras lavar cada pocillo con TBS-T, se añadieron 50 µl de tampón de sustrato (TMB, fabricado por Dako) y después se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 0,5 moles/l (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 45 nm (longitud de onda de referencia: 570 nm) en un lector de microplacas (VersaMax, fabricado por Molecular Devices, LLC).

Además, en el método de citometría de flujo, se lavaron con medio de tinción las células Jurkat que expresaban TIM-3 humana preparadas en el Ejemplo 1 y después se añadieron 50 µl del sobrenadante del hibridoma y se incubaron durante 30 min a 4°C. Tras el lavado, se añadieron 50 µl de cada uno de los anticuerpos siguientes: anticuerpo de ratón anti-IgG1 humana-PE, anticuerpo de ratón anti-IgG2 humana-PE, anticuerpo de ratón anti-IgG3 humana (bisagra)-PE y anticuerpo de ratón anti-IgG4(Fc) humana-PE (fabricado por SouthernBiotech) que

se diluyeron 400 veces con medio de tinción, se dejaron reposar durante 30 min a 4°C y después se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur (fabricado por BD Biosciences).

5 Basándose en el resultado, los isotipos de los anticuerpos 512, 644 y 4545 eran IgG1, IgG4 e IgG2, respectivamente.

[Ejemplo de referencia 11]

(Identificación del isotipo del anticuerpo monoclonal de ratón para la TIM-3 humana)

10 Se determinó el isotipo del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TIM-3 humana preparado en el Ejemplo 9 utilizando el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón Iso Strip (fabricado por Roche-Diagnostics). Mediante la utilización del sobrenadante del hibridoma que contenía el anticuerpo anti-TIM-3 preparado en el
15 Ejemplo 8, se determinó el isotipo siguiendo las instrucciones del fabricante. Como resultado, se determinó que el isotipo del anticuerpo 8213 era IgG2b.

[Ejemplo 12]

(Aislamiento del gen del anticuerpo monoclonal anti-TIM-3)

20 Se aisló el gen del anticuerpo monoclonal humano o de ratón anti-TIM-3 preparado en el Ejemplo 9, a partir del hibridoma que producía anticuerpo monoclonal humano o de ratón anti-TIM-3 humana preparado en el Ejemplo 9. Se extrajo el ARN total a partir del hibridoma clonado utilizando el kit de aislamiento de ARN High Pure (fabricado por Roche-Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. La clonación del ADNc codificante
25 de la región variable se llevó a cabo utilizando el kit de amplificación de ADNc Smart Race (fabricado por Clontech) siguiendo las instrucciones adjuntas al mismo.

La cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal humano se amplificó mediante PCR utilizando UPM (kit de amplificación de ADNc Smart Race, fabricado por Clontech) y el cebador hh-6 (SEC ID nº 44). Utilizando parte
30 del producto de reacción como molde, se llevó a cabo la PCR utilizando NUP (kit de amplificación de ADNc Smart Race, fabricado por Clontech) y el cebador hh-3 (SEC ID nº 45). La clonación del producto de PCR se llevó a cabo utilizando el kit de clonación por PCR Zero Blunt TOPO (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia de nucleótidos mediante cebadores universales del vector (por ejemplo el cebador de T7 o M13R) y se dedujo la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos.

35 Como resultado, la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo 512 se encuentran representadas por la SEC ID nº 54 y la SEC ID nº 55, respectivamente; la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo 644 se encontraban representadas por la SEC ID nº 58 y la SEC ID nº 59, respectivamente; la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo 4545 se encontraban representadas por la SEC ID nº 7 y la SEC ID nº 8, respectivamente, y la
40 secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo 4177 se encontraban representadas por las SEC ID nº 17 y la SEC ID nº 18, respectivamente. Cada una de las regiones variables obtenidas y la región constante de la IgG1 humana se insertaron y se ligaron en el vector de expresión N5KG1 (fabricado por Biogene IDEC Inc.).

45 Se amplificó la cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal humano por PCR utilizando UPM (kit de amplificación de ADNc Smart Race, fabricado por Clontech) y el cebador hk-2 (SEC ID nº 46). Utilizando parte del producto de reacción como molde, se llevó a cabo la PCR utilizando NUP (kit de amplificación de ADN c Smart Race, fabricado por Clontech) y el cebador hk-6 (SEC ID nº 47). Se clonó el producto de PCR utilizando el
50 kit de clonación por PCR Zero Blunt TOPO (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia de nucleótidos mediante cebadores universales del vector (por ejemplo, T7 o M13R) y se dedujo la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos.

55 Como resultado, la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo 512 se encuentran representadas por las SEC ID nº 56 y SEC ID nº 57, respectivamente; la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo 644 se encuentran representadas por las SEC ID nº 60 y SEC ID nº 61, respectivamente; la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo 4545 se encuentran representadas por las SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10, respectivamente; y la
60 secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo 4177 se encuentran representadas por las SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20, respectivamente. Cada una de las regiones variables obtenidas y la región constante de la cadena κ se insertaron y se ligaron en el vector de expresión N5KG1 (fabricado por Biogen Idec Inc.).

65 La cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal de ratón se amplificó por PCR utilizando UPM (kit de amplificación de ADNc Smart Race, fabricado por Clontech) y el cebador mH_Rv1 (SEC ID nº 48). Utilizando parte del producto de reacción como molde, se llevó a cabo la PCR utilizando NUP (kit de amplificación de ADNc

Smart Race, fabricado por Clontech) y el cebador mH_Rv2 (SEC ID nº 49).

La clonación del producto de PCR se llevó a cabo utilizando el kit de clonación por PCR Zero Blunt TOPO (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia de nucleótidos utilizando cebadores universales del vector (por ejemplo T7 o M13R) y se dedujo la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos.

Como resultado, la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo 8213 se encuentran representadas por las SEC ID nº 27 y SEC ID nº 28, respectivamente. La región variable y la región constante obtenidas de la IgG2a de ratón se ligaron y se insertaron en el vector de expresión N5KG1 (fabricado por Biogen Idec Inc.).

La cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal de ratón se amplificó por PCR utilizando UPM (kit de amplificación de ADNc Smart Race, fabricado por Clontech) y el cebador mK_Rv1 (SEC ID nº 50). Además, se utilizó parte del producto de reacción como molde y se llevó a cabo una PCR utilizando NUP (kit de amplificación de ADNc Smart Race, fabricado por Clontech) y el cebador mK_Rv2 (SEC ID nº 51). El producto de PCR se clonó utilizando el kit de clonación por PCR Zero Blunt TOPO (fabricado por Invitrogen). Se analizaron las secuencias de nucleótidos utilizando cebadores universales del vector (por ejemplo, T7 o M13R) y se dedujeron las secuencias de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos.

Como resultado, la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo 8213 se encuentran representadas por las SEC ID nº 29 y SEC ID nº 30, respectivamente. La región variable obtenida y la región constante de la cadena κ se ligaron y se insertaron en el vector de expresión anteriormente indicado que codificaba la VH del anticuerpo 8213.

Además, con el fin de obtener un anticuerpo IgG1 humano antidinitrofenilo (DNP) a modo de control negativo, la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo (SEC ID nº 62), la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo (SEC ID nº 64) y la región constante de la IgG1 humana y de la cadena κ se insertaron en el vector de expresión N5KG1 (fabricado por Biogen IDEC Inc.).

[Ejemplo 13]

(Purificación de anticuerpo monoclonal humano defucosilado anti-TIM-3 recombinante)

Se produjo una célula que expresaba un anticuerpo recombinante mediante la introducción del vector de expresión de anticuerpo recombinante preparado en el Ejemplo 12 en la célula hospedadora. Como célula hospedadora para la expresión se utilizaron células CHO FUT8^{-/-} de acuerdo con un informe publicado (Clin. Cancer Res. 12(9), 2006, lida et al.). Brevemente, los vectores de expresión para cada uno de los anticuerpos 512, 644, 4545 y 4177 preparados en el Ejemplo 12 se introdujeron en células CHO FUT8^{-/-} utilizando el reactivo FreeStyle™ MAX (fabricado por Invitrogen). Se cultivaron las células CHO FUT8^{-/-} en un agitador a 37°C bajo 5% de CO₂. Se recuperó el sobrenadante de cultivo después de aproximadamente cinco días.

El sobrenadante recuperado se purificó utilizando proteína A (fabricada por GE Healthcare) y utilizando además una columna de 0,8x40 cm (fabricada por BioRad) o similar, según la cantidad de muestra. Los anticuerpos se purificaron por afinidad utilizando PBS como el tampón de unión y 0,02 moles/l de tampón de citrato sódico (pH 2,7, NaCl 50 mmoles/l) como el tampón de elución. A la fracción de elución se añadieron 0,2 moles/l de tampón de fosfato sódico (pH 7,0).

La solución de anticuerpo preparada se equilibró con PBS utilizando una columna NAP-25 (fabricada por GE Healthcare) y se concentró con un Amicon Ultra (corte: 10.000, fabricado por Millipore). Tras la esterilización mediante filtración, se obtuvieron los anticuerpos monoclonales humanos defucosilados anti-TIM-3 recombinantes (anticuerpos 512, 644, 4545 y 4177). Se determinó la pureza de la proteína utilizando el kit Limulus ES-II Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se encontró que dichos anticuerpos habían sido suficientemente purificados.

El vector para expresar anti-DNP preparado en el Ejemplo 12 se introdujo en células CHO-DG44. Las células CHO-DG44 se cultivaron en un agitador a 37°C bajo 5% de CO₂. Se recuperó el sobrenadante de cultivo tras la incubación durante 5 días. El sobrenadante recolectado se purificó utilizando proteína A (fabricada por GE Healthcare) y además utilizando una columna de 0,8x40 cm (fabricada por BioRad) o similar, según la cantidad de muestra. La purificación por afinidad de los anticuerpos se llevó a cabo utilizando PBS como el tampón de unión y 0,02 moles/l de tampón de citrato sódico (pH 2,7, NaCl 50 mmoles/l) como el tampón de elución. A la fracción de elución se añadieron 0,2 moles/l de tampón de fosfato sódico (pH 7,0). La solución de anticuerpo preparada se equilibró con PBS y se concentró utilizando una columna NAP-25 (fabricada por GE Healthcare) con un Amicon Ultra (corte: 10.000, fabricado por Millipore), respectivamente. Tras la esterilización mediante filtración, se obtuvo el anticuerpo anti-DNP recombinante. La pureza de la proteína se determinó utilizando un kit Limulus ES-II Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se encontró que el anticuerpo había sido suficientemente purificado.

[Ejemplo de referencia 14](Purificación de anticuerpo monoclonal de ratón anti-TIM-3 recombinante)

5 El vector para la expresión del anticuerpo 8213 preparado en el Ejemplo 12 se introdujo en células HEK293F (fabricadas por Invitrogen) utilizando 293fectina (fabricada por Invitrogen). Las células HEK293F se incubaron en un agitador a 37°C bajo 5% de CO₂. El sobrenadante de cultivo se recolectó tras la incubación durante cinco días. El sobrenadante recolectado se purificó utilizando proteína A (preparada por GE Healthcare) y utilizando además una columna de 0,8x40 cm (fabricada por BioRad) o similar, según la cantidad de muestra. La purificación por afinidad del anticuerpo se llevó a cabo utilizando PBS como un tampón de unión y 0,02 moles/l de tampón de citrato sódico (pH 2,7, NaCl 50 mmoles/l) como un tampón de elución.

15 A la fracción de elución se añadieron 0,2 moles/l de tampón de fosfato sódico (pH 7,0). La solución de anticuerpo preparada se equilibró con PBS utilizando una columna NAP-25 (fabricada por GE Healthcare) y se concentró con un Amicon Ultra (corte: 10.000, fabricado por Millipore). Tras la esterilización mediante filtración, se obtuvo el anticuerpo monoclonal de ratón anti-TIM-3 recombinante (anticuerpo 8213). Se determinó la pureza de la proteína utilizando un kit Limulus ES-II Wako (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se encontró que el anticuerpo había sido purificado suficientemente.

[Ejemplo 15](Marcaje fluorescente de anticuerpo monoclonal purificado)

25 El marcaje fluorescente del anticuerpo monoclonal y anticuerpo monoclonal recombinante derivados de hibridoma se llevó a cabo mediante la utilización del kit de marcaje de anticuerpos monoclonales Alexa Fluor 647 (fabricado por Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el marcaje, se confirmó que cada anticuerpo se había marcado positivamente con Alexa Fluor 647 (en adelante denominado "Alexa-647") utilizando el análisis de FACSCalibur (fabricado por BD Biosciences) para las células expresantes de TIM-3.

[Ejemplo 16](Clasificación de epítomos utilizando la prueba de competición nº 1)

35 La relación de epítomos entre los anticuerpos preparados en los Ejemplos 13 y 14 y el anticuerpo anti-TIM-3 comercialmente disponible 344823 (clon 344823, fabricado por R&D Systems) se analizó mediante una prueba de competición. Brevemente, se dejó que el anticuerpo de ensayo interactuase con la célula de expresión de TIM-3 preparada en el Ejemplo 1 y después se evaluó si otro anticuerpo anti-TIM-3 podía unirse adicionalmente a células expresantes de TIM-3 mediante un método de citometría de flujo.

40 En la primera etapa, se examinó la existencia o no de competición entre cada uno de los anticuerpos monoclonales preparados en los Ejemplos 13 y 14 (anticuerpos 512, 644, 4177 y 8213) y el anticuerpo 34823. En primer lugar, se lavaron las células EoL-1 expresantes de TIM-3 humana y las células parentales EoL-1 con medio de tinción y después se dejaron reaccionar con cada uno de los anticuerpos monoclonales purificados de la invención (anticuerpos 512, 644, 4177 y 8213) (4°C, 30 min). La concentración final era de 10 µg/ml. A continuación, se añadió el anticuerpo marcado con PE, 344823 (clon 344823, fabricado por R&D Systems) y se dejó reaccionar (4°C, 30 min). Tras el lavado con medio de tinción, se añadió 7-ADD (fabricado por BD Biosciences) y se analizó utilizando un FACSCalibur (fabricado por BD Biosciences).

50 Como resultado, el anticuerpo policlonal de cabra anti-TIM-3 humana (fabricado por R&D Systems) utilizado como control positivo y el anticuerpo 644 bloquearon prácticamente por completo la unión del anticuerpo marcado con PE 344823 a las células expresantes de TIM-3. Sin embargo, los anticuerpos 512, 4545 y 8213 no inhibieron la unión del anticuerpo marcado con PE 344823 a las células expresantes de TIM-3. El anticuerpo 4177 inhibió la unión del anticuerpo marcado con PE 344823 a las células expresantes de TIM-3, aunque esta inhibición era más débil que la del anticuerpo 644. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el anticuerpo 644 compitió con el anticuerpo 344823, pero los anticuerpos 512, 4545 y 8213 no compitieron con el anticuerpo 344823. Se encontró que el anticuerpo 4177 y el anticuerpo 344823 competían entre sí, aunque competían parcialmente.

60 En la segunda etapa, entre los anticuerpos monoclonales anti-TIM-3 sometidos a ensayo, los anticuerpos 512, 4545 y 8213 que no interactuaron con el anticuerpo 344823 se examinó si competían o no. El experimento se llevó a cabo de la misma manera que en la primera etapa, excepto en que se utilizó el anticuerpo 512 marcado con Alexa-647 o el anticuerpo 8213 marcado con Alexa-647 preparado en el Ejemplo 15 como anticuerpo marcado. En consecuencia, los anticuerpos 4545 y 8213 no inhibieron la unión del anticuerpo 512 marcado con Alexa-647 a las células expresantes de TIM-3.

Sin embargo, el anticuerpo 4545 inhibió la unión del anticuerpo 8213 marcado con Alexa-647 a las células expresantes de TIM-3. Por lo tanto, se encontró que los anticuerpos 4545 y 8213 competían entre sí, aunque estos dos anticuerpos no competían con el anticuerpo 512. Este resultado señala a que el anticuerpo 512 reconoce epítodos diferentes que los anticuerpos 344823 y 8213.

En la tercera etapa, se llevó a cabo un ensayo competitivo con los anticuerpos 512 y 8213 en el anticuerpo 4177, que se demostró que competía parcialmente con el anticuerpo 344823 en la primera etapa. El experimento se llevó a cabo de la manera ya descrita en la segunda etapa. Como resultado, el anticuerpo 4177 no inhibió la unión del anticuerpo 512 marcado con Alexa-647 a las células expresantes de TIM-3, pero inhibió la unión del anticuerpo 8213 marcado con Alexa-647 a las células expresantes de TIM-3. Por lo tanto, se encontró que el anticuerpo 4177 no competía con el anticuerpo 512, sino únicamente con el anticuerpo 8213.

Basándose en dichos resultados, entre los 5 anticuerpos preparados en los Ejemplos 13 y 14, el anticuerpo 644 reconocía un epítodo que se encontraba próximo al epítodo que reconocía el anticuerpo 344823; el anticuerpo 512 reconocía un epítodo diferente del epítodo reconocido por el anticuerpo 344823 y por los otros cuatro anticuerpos (anticuerpos 644, 4545, 4177 y 8213).

Se señalaba a que el anticuerpo 8213 reconocía un epítodo diferente del reconocido por el anticuerpo 344823 o el anticuerpo 512. Se señalaba a que el anticuerpo 4545 reconocía un epítodo que era próximo al epítodo reconocido por el anticuerpo 8213. Sin embargo, el anticuerpo 4177 reconocía el epítodo que era próximo al epítodo reconocido por el anticuerpo 8213 y también reconocía débilmente un epítodo que era próximo al epítodo reconocido por el anticuerpo 344823.

[Ejemplo 17]

(Prueba de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de anticuerpo monoclonal humano defucosilado anti-TIM-3 recombinante)

Con respecto a la actividad citotóxica celular mediante anticuerpos, se midió la actividad de ADCC contra la célula diana mediante la utilización de células mononucleares de sangre periférica humana (en adelante denominadas "PBMC") como efector en presencia del anticuerpo. En primer lugar, se recolectó sangre periférica del donante humano sano y se mezcló con anticoagulante. La sangre obtenida se cargó en Ficoll-Plaque Plus (fabricada por GE Healthcare) y se centrifugó a 2.000 rpm durante 20 min utilizando una centrífuga de gran escala (CF9RX, fabricada por Hitachi Koki Co., Ltd.) de manera que no se perturbase la zona límite.

Las células que contenían la fracción intermedia se recolectaron y se lavaron con PBS y después se centrifugaron a 900 rpm durante 20 min para separar las plaquetas. Las PBMC obtenidas de esta manera se utilizaron para las mediciones. A continuación, las células Daudi utilizadas como célula diana y las PBMC se mezclaron en una proporción de efectoras/diana de 50.

Cada uno de los anticuerpos monoclonales defucosilados antihumanos recombinantes (anticuerpos 512, 644, 4545 y 4177) preparados en los Ejemplos 13 y 14 y el anticuerpo anti-DNP como IgG1 humano de control se suspendieron en medio hasta proporcionaron una concentración final de 1 µg/ml y un volumen total de 100 µl. Tras la mezcla, la solución se incubó a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 4 h. Se evaluó la proporción de lisis de la célula diana basándose en la cantidad de LDH liberada al medio. Se calculó la actividad de LDH y la proporción de lisis utilizando el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96 (fabricado por Promega Corp.) según las instrucciones adjuntas al mismo. Como análisis estadístico se utilizó la prueba t de Student estándar, en la que se consideró que una muestra con una tasa de riesgo (p) inferior a 0,05 era significativamente diferente.

Como resultado de la medición de la actividad de ADCC sobre las células Daudi, se encontró que los anticuerpos 4545 y 4177 presentaban una proporción de lisis de la célula diana significativamente incrementada respecto a la del anticuerpo anti-DNP. Este resultado señala a que el anticuerpo de ratón anti-TIM-3 8213 y el anticuerpo anti-TIM-3 que competía con el anticuerpo de ratón anti-TIM-3 8213 presentaban una actividad de ADCC elevada.

De manera similar, se midió la actividad de ADCC mediante la utilización de los anticuerpos defucosilados monoclonales humanos anti-TIM-3 recombinantes (anticuerpos 4545 y 4177) preparados en el Ejemplo 13, el anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 disponible comercialmente 344823 y el anticuerpo anti-DNP como control negativo.

En primer lugar, se recolectó sangre periférica del donante humano sano y se mezcló con anticoagulante. A continuación, la sangre obtenida se cargó en Ficoll-Plaque Plus (fabricado por GE Healthcare) y se centrifugó a 2.000 rpm durante 20 min utilizando una centrífuga de gran escala (CF9RX, fabricada por Hitachi Koki Co., Ltd.) de manera que no perturbase la zona límite. Las células que contenían la fracción intermedia se recolectaron y se lavaron con PBS y después se centrifugaron a 900 rpm durante 20 min para separar las plaquetas. La fracción de PBMC obtenidas de esta manera se utilizó para la medición de la actividad de ADCC.

A continuación, se mezclaron las células Daudi utilizadas como células diana y las PBMC en una proporción de efectoras/diana de 25. Se suspendió cada uno de los anticuerpos 4545, 4177, 344823, anticuerpo anti-DNP y PBS en el medio hasta proporcionar una concentración final de 1 µg/ml y un volumen total de 100 µl. Tras la mezcla, se incubó la solución a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 4 h. Se evaluó la proporción de lisis de la célula diana basándose en la utilización de la cantidad de LDH liberado al medio.

Se calculó la actividad de LDH y la proporción de lisis utilizando el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96 (fabricado por Promega Corp.) siguiendo las instrucciones adjuntas al mismo. Como análisis estadístico se utilizó la prueba t de Student estándar, en la que se consideró que una muestra con una tasa de riesgo (p) inferior a 0,05 era significativamente diferente. Como resultado de la medición de la actividad de ADCC sobre las células Daudi se encontró que los anticuerpos 4545 y 4177 presentaban una proporción de lisis de la célula diana significativamente incrementada en comparación con el anticuerpo anti-DNP. Por otra parte, el anticuerpo 344823 no mostraba un incremento significativo de la proporción de lisis de la célula diana en comparación con el anticuerpo anti-DNP ni con PBS.

[Ejemplo 18]

(Cálculo de la constante de unión/disociación utilizando el anticuerpo anti-TIM-3)

Se analizó la constante de unión/disociación utilizando un biosensor basado en resonancia del plasmón superficial (Biacore, fabricado por GE Healthcare). Brevemente, se inmovilizó sobre los chips sensores CM5 un anticuerpo antihumano o un anticuerpo antirratón. A continuación, el anticuerpo humano o de ratón anti-TIM-3 se hizo fluir sobre el chip para la unión y seguidamente se hizo fluir sobre el chip la TIM-3 humana extracelular soluble preparada en el Ejemplo 4, a fin de examinar la constante de unión/disociación de TIM-3 al anticuerpo anti-TIM-3. Durante el procedimiento experimental, se utilizó básicamente el método experimental proporcionado por GE Healthcare para el cálculo de la constante de unión/disociación.

Específicamente, se utilizó CM5 como el chip sensor (grado de investigación, fabricado por GE Healthcare). En primer lugar, se activó el chip CM5 haciendo fluir una solución mixta de partes iguales de EDC (hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) 400 mmoles/l y NHS (N-hidroxisuccinimida) 100 mmoles/l. A continuación, se diluyó el anticuerpo antihumano unido al kit de captura de anticuerpos humanos (fabricado por GE Healthcare) con la solución adjunta en el kit y se hizo fluir la solución obtenida de manera que la cantidad requerida del anticuerpo de un anticuerpo de anticuerpo humano se inmovilizase sobre el chip CM5.

Para el anticuerpo de ratón, el anticuerpo contra el anticuerpo de ratón se inmovilizó sobre la superficie de CM5 mediante la dilución en la solución que proporciona el kit de captura de anticuerpos de ratón (fabricado por GE Healthcare). Se bloqueó la superficie activada del chip haciendo pasar hidrocloruro de etanolamina 1 mol/l y se inactivó.

A continuación, se diluyó un tipo de anticuerpos anti-TIM-3 con tampón HBS-EP (fabricado por GE Healthcare) por cada celda de flujo y se pasó por la misma a fin de que se uniese el anticuerpo para el anticuerpo humano o el anticuerpo para el anticuerpo de ratón inmovilizado sobre la superficie del chip. A continuación, se hizo fluir TIM-3 humana extracelular soluble. Para disociar el anticuerpo anti-TIM-3 unido respecto de la TIM-3 humana extracelular soluble, se hizo fluir por la celda el volumen total de 3 moles/l de MgCl₂ que se encontraba unido al kit de captura de anticuerpos humanos o glicina-HCl (pH 1,7) que se encontraba unida al kit de captura de anticuerpos de ratón.

Los procedimientos anteriormente indicados se consideraron una etapa y se repitió un procedimiento similar utilizando concentraciones diferentes de la TIM-3 humana extracelular soluble para recoger datos (sensograma) para el cálculo de la constante de unión/disociación. La concentración de TIM-3 humana extracelular soluble utilizada como analito se calculó mediante la medición de la absorbancia a 280 nm y convirtiendo después el valor de 1,4 de DO a 1 mg/ml.

Se calculó el peso molecular de la TIM-3 humana extracelular soluble como 42,8 kDa basada en la movilidad en la electroforesis. Se analizaron los datos utilizando el software Biaevaluation (fabricado por GE Healthcare) según el manual del software Biaevaluation. Específicamente, se llevó a cabo el análisis cinético simultáneo y se calculó la constante de tasa de asociación (K_a) y la constante de tasa de disociación (K_d) básicamente adoptando un modelo de reacción de unión 1:1 de Langmuir que se utilizó para el ajuste. A continuación, se calculó el valor de la constante de disociación (K_D) a partir de K_d/K_a.

La mayor parte del anticuerpo monoclonal humano anti-TIM-3 humana presentaba un valor de K_D del orden de 10⁻⁹ moles/l. En el presente aspecto, no se observó correlación entre la actividad de ADCC y la afinidad de unión para TIM-3.

Al monitorizar el anticuerpo monoclonal anti-TIM-3 humano (por ejemplo se monitorizó el estado de disociación durante 30 min) no se detectó disociación con el antígeno TIM-3 humano extracelular soluble como antígeno.

Como resultado, se encontró que resulta posible producir un anticuerpo monoclonal con una afinidad muy elevada para TIM-3 humana.

[Ejemplo 19]

(Clasificación de epítomos utilizando el ensayo de competición nº 2)

Los epítomos de los anticuerpos anti-TIM-3, es decir, los anticuerpos 512, 644, 4545, 8213, 344823, F38-2E2 y anti-DNP a modo de control se analizaron mediante un ensayo competitivo. Brevemente, el anticuerpo diana no marcado se dejó interactuar con la célula de expresión de TIM-3 preparada en el Ejemplo 1 y se evaluó si se unía o no adicionalmente el anticuerpo anti-TIM-3 marcado fluorescentemente a células de expresión de TIM-3 utilizando el método de citometría de flujo.

Se lavaron las células EoL-1 expresantes de TIM-3 humana con medio de tinción y se dejaron reaccionar con anticuerpos monoclonales de ensayo purificados [anticuerpos 512, 644, 4545, 8213, 344823 (fabricado por R&D Systems) y F38-2E2 (fabricado por Imgenex)] (4°C, 30 min). La concentración final fue de 10 µg/ml. A continuación, se añadieron los anticuerpos anti-TIM-3 marcados con Alexa-647 o APC [el anticuerpo 344823 (fabricado por R&D Systems) y el anticuerpo F38-2E2 (fabricado por eBiosciences)] y se dejaron reaccionar (4°C, 30 min). Tras el lavado con medio de tinción, se añadió 7-ADD (fabricado por BD Biosciences) antes del análisis con FACSCalibur (fabricado por BD Biosciences).

Se muestran los resultados en la Tabla 1. Tal como se muestra en la Tabla 1, los casos en que el grado de unión a la célula de expresión de TIM-3 a la que se encontraba unido el anticuerpo anti-TIM-3 no marcado era similar al de un control negativo se indicaron como "+"; los casos en que el grado de unión a la célula de expresión de TIM-3 al que se encontraba unido anticuerpo anti-TIM-3 no marcado era inferior al de un control negativo se indicó como "+/-" y los casos en que la unión a la célula de expresión de TIM-3 a la que se encontraba unido el anticuerpo anti-TIM-3 no marcado no era detectable se indicó como "-".

[Tabla 1]

		Anticuerpo no marcado						
		DNP	512	644	4545	8213	344823	F38-2E2
Anticuerpo marcado con Alexa-647 o APC	DNP	-	-	-	-	-	-	-
	512	+	-	+	+	+	+	+
	644	+	+	+/-	+	+	+/-	+/-
	4545	+	+	+	-	-	+	+
	8213	+	+	+	-	-	+	+
	344823	+	+	-	+	+	-	+/-
	F38-2E2	+	+	-	+	+	-	-

Tal como se muestra en la Tabla 1, debido a que se observó que el anticuerpo 512 marcado con Alexa-647 se unía a la célula expresante de TIM-3 a la que se encontraban unidos otros anticuerpos anti-TIM-3 no marcados, se señala que dicho anticuerpo podría reconocer un epítomo independiente con el que no competían los anticuerpos 644, 4545, 8213, 344823 y F38-2E2.

Debido a que se encontró que el anticuerpo 644 marcado con Alexa-647 no se unía o presentaba una unión reducida a la célula expresante de TIM-3 a la que se encontraba unido el anticuerpo anti-TIM-3 no marcado 344823 o F38-2E2, ello señala a que este anticuerpo competía con el anticuerpo 344823 o F38-2E2 en el reconocimiento de un epítomo próximo.

Debido a que se encontró que el anticuerpo 4545 marcado con Alexa-647 no se unía a la célula expresante de TIM-3 a la que se encontraba unido el anticuerpo anti-TIM-3 8213 no marcado, ello señala a que este anticuerpo competía con el anticuerpo 8213 en el reconocimiento de un epítomo próximo.

Debido a que se encontró que el anticuerpo 8213 marcado con Alexa-647 no se unía a la célula expresante de TIM-3 a la que se encontraba unido el anticuerpo anti-TIM-3 4545 no marcado, ello señala a que este anticuerpo competía con el anticuerpo 4545 en el reconocimiento de un epítomo próximo.

Debido a que se encontró que el anticuerpo 344823 marcado con APC no se unía a la célula expresante de TIM-3 a la que se encontraba unido el anticuerpo anti-TIM-3 644 o F38-2E2 no marcado, ello señala a que este anticuerpo competía con el anticuerpo 644 o F38-2E2 en el reconocimiento de un epítomo próximo.

Debido a que se encontró que el anticuerpo F38-2E2 marcado con APC no se unía a la célula expresante de TIM-3 a la que se encontraba unido el anticuerpo anti-TIM-3 644 o 344823 no marcado, ello señala a que este anticuerpo competía con el anticuerpo 644 o 344823 en el reconocimiento de un epítomo próximo.

[Ejemplo 20]

(Clonación molecular del ADNc de la TIM-3 de ratón)

5 Se preparó el ADNc de la TIM-3 de ratón de la manera indicada en el Ejemplo 1. Se extrajo el ARN total de células de médula ósea derivadas de ratón Balb/c utilizando el kit de aislamiento de ARN High Pure (fabricado por Roche). Se sintetizó ADNc molde utilizando el sistema de RT-PCR ThermoScript (fabricado por Invitrogen). Se utilizaron los cebadores Tim-3_m Fw3 (SEC ID nº 70) y Tim-3_m Re3 (SEC ID nº 71). Se insertó el ADNc en el vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega Corp.) y se analizó la secuencia. Se seleccionó el clon que presentaba una secuencia de nucleótidos idéntica a la región codificante de GenBank número de acceso AF450241.

15 Se llevó a cabo una PCR utilizando el clon seleccionado como molde y se insertó el ADN en el sitio *NotI* del vector pEF6/Myc-HisC (fabricado por Invitrogen) (Tim-3_m/pEF6 Myc_HisC). Se utilizaron los cebadores de PCR Tim-3_m Fw4NotI (SEC ID nº 72) y Tim-3_m Re4NotI (SEC ID nº 73).

[Ejemplo 21]

20 (Construcción de Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC)

Se digirieron los ADN plasmídicos TIM-3_h/pMCS-Ig preparado en el Ejemplo 1 y pEF6 Myc_HisC con *NotI* para construir el vector expresante de TIM-3 humano pEF6 Myc_HisC (Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC). El análisis de la secuencia de ADN confirmó que la secuencia del vector se correspondía con la región codificante de GenBank número de acceso NM_032782.

[Ejemplo 22]

30 (Reactividad cruzada del anticuerpo anti-TIM-3 humano con el anticuerpo anti-TIM-3 humano)

Se introdujo cada uno de los ADN plasmídicos TIM-3_m/pEF6 Myc_HisC y Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC preparados en los Ejemplos 20 y 21 y un control vector vacío en célula HEK293F de la misma manera que en el Ejemplo 4. Dos días después, del mismo modo que en el Ejemplo 15, se evaluó la actividad de unión de los anticuerpos marcados con Alexa-647 (anticuerpos 512, 644, 4545 y 8213), de los anticuerpos anti-TIM-3 humana marcados con APC disponibles comercialmente (anticuerpos 344823 y F38-2E2) y del anticuerpo anti-TIM-3 de ratón marcado con PE disponible comercialmente (anticuerpo RMT3-23, fabricado por BioLegend Inc.) a TIM-3 humana y a TIM-3 de ratón utilizando el análisis de citometría de flujo.

40 Como resultado, los anticuerpos 512, 644, 4545, 8213, 344823 y F38-2E2 interactuaron exclusivamente con las células 293F expresantes de TIM-3 humana. Sin embargo, el anticuerpo RMT3-23 interactuó exclusivamente con las células 293F expresantes de TIM-3 de ratón. Por lo tanto, se encontró que los anticuerpos 512, 644, 4545, 8213, 344823 y F38-2E2 no presentaban reactividad cruzada con TIM-3 de ratón.

[Ejemplo 23]

45 (Construcción de sistema de expresión para la proteína TIM-3 quimérica con dominio IgV sustituido por TIM-3 de ratón)

50 Se amplificó la secuencia objetivo mediante PCR utilizando el ADN plasmídico Tim-3_h/pEF6 Myc-HisC como molde, los cebadores TIM3_h+IgV_m_vecR1 (SEC ID nº 74) y TIM3_h+IgV_m_vecF1 (SEC ID nº 75) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.). Se amplificó la secuencia objetivo mediante PCR utilizando el ADN plasmídico Tim-3_m/pEF6 Myc_HisC como molde, los cebadores TIM-3_h+IgV_m_insF1 (SEC ID nº 76) y TIM3_h+IgV_m_insR1 (SEC ID nº 77) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.).

55 Se ligaron los dos productos de PCR obtenidos utilizando el kit de clonación y ensamblaje Seamless GENEART (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia del transformante y se encontró que los productos de PCR presentaban las secuencias objetivas (quimera de TIM-3 e IgV/pEF6 Myc_HisC, SEC ID nº 78).

[Ejemplo 24]

60 (Construcción de sistema de expresión para la proteína TIM-3 quimérica con dominio de mucina sustituido por TIM-3 de ratón)

65 Se amplificó la secuencia objetivo mediante PCR utilizando el ADN plasmídico Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC como molde, los cebadores TIM3_h+Mucina_m_vecR2 (SEC ID nº 80) y TIM3_h+Mucina_m_vecF2 (SEC ID nº 81) y la

ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.). Se amplificó la secuencia objetivo mediante PCR utilizando el ADN plasmídico Tim-3_m/pEF6 Myc_HisC como molde, los cebadores TIM3_h+Mucina_m_insF2 (SEC ID nº 82) y TIM3_h+Mucina_m_insR2 (SEC ID nº 83) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.).

Los dos productos de PCR obtenidos se ligaron utilizando el kit de clonación y ensamblaje Seamless GENEART (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia del transformante y se encontró que los productos de PCR presentaban las secuencias objetivo (quimera de TIM-3 mucina/pEF6 Myc_HisC, SEC ID nº 84).

[Ejemplo 25]

(Ensayo de unión de anticuerpo anti-TIM-3 a proteína TIM-3 quimérica en la que el dominio IgV ha sido sustituido por TIM-3 de ratón y proteína de TIM-3 quimérica en la que el dominio de mucina ha sido sustituido por TIM-3 de ratón)

Cada uno de los ADN plasmídicos preparados en los Ejemplos 23 y 24, IgV quimera TIM-3/pEF6 Myc_HisC, Mucina quimera TIM-3/pEF6 Myc_HisC, Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC, Tim-3_m/pEF6 Myc_HisC, y un control vector vacío en las células HEK293F de la misma manera que en el Ejemplo 4. Dos días después, de la misma manera que en el Ejemplo 22, se evaluó la actividad de unión del anticuerpo anti-TIM-3 utilizando citometría de flujo.

Como resultado, los anticuerpos 512, 644, 4545, 8213, 4177, 344823 y F38-2E2 se unían únicamente a las células expresantes de TIM-3 y a las células expresantes de quimera de TIM-3 y mucina. Sin embargo, el anticuerpo RMT-23 se unía a las células expresantes de TIM-3 de ratón y a las células expresantes de quimera de TIM-3 y IgV únicamente.

Por lo tanto, como consecuencia, se encontró que la totalidad de los anticuerpos anti-TIM-3 humanos sometidos a ensayo (anticuerpos 512, 644, 4545, 8213, 344823 y F38-2E2) y el anticuerpo de TIM-3 de ratón (anticuerpo RMT3-23) reconocían el dominio IgV.

[Ejemplo 26]

(Construcción de la quimera de TIM-3 22-47/pEF6 Myc_HisC)

Se construyó un vector que expresaba la proteína TIM-3 quimérica en la que el aminoácido de TIM-3 humana (SEC ID nº 53) en las posiciones 22 a 47 se sustituyó con el aminoácido correspondiente de la TIM-3 de ratón (en adelante denominado "quimera de TIM-3 22-47"). Mediante la utilización del ADN plasmídico Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC preparado en el Ejemplo 21 como molde y los cebadores quimera 22-47F1 de TIM3_h (SEC ID nº 86) y quimera 22-47R1 de TIM3_h (SEC ID nº 87), se llevó a cabo una PCR utilizando la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.).

Utilizando el producto de PCR obtenido a modo de molde, se amplificó la secuencia objetivo mediante PCR utilizando los cebadores quimera 22-47F2 de TIM3_h (SEC ID nº 88) y quimera 22-47R2 de TIM-3_h (SEC ID nº 89) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.).

Utilizando el producto de PCR obtenido como molde, se amplificó mediante PCR la secuencia objetivo utilizando los cebadores quimera 22-47F3 de TIM3_h (SEC ID nº 90) y quimera 22-47R3 de TIM-3_h (SEC ID nº 91) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.).

Tras digerir con *DpnI* (fabricada por New England Biolabs) el producto de PCR obtenido de la tercera PCR, se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se extrajo el ADN y se ligó utilizando el kit de clonación y ensamblaje Seamless GENEART (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia del clon obtenido del transformante y se confirmó que el clon presentaba la secuencia objetivo (quimera 22-47 de TIM-3/pEF6 Myc_HisC, SEC ID nº 92).

[Ejemplo 27]

(Construcción de la quimera de TIM-3 57-66/pEF6 Myc_HisC)

Se construyó un vector que expresaba la proteína TIM-3 quimérica en la que el aminoácido de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) en las posiciones 57 a 66 se había sustituido por el aminoácido correspondiente de la TIM-3 de ratón (en adelante denominado "quimera 57-66 de TIM-3"). Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN plasmídico Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC preparado en el Ejemplo 21 como molde, los cebadores quimera 57-66F de TIM3_h (SEC ID nº 94) y quimera 57-66R de TIM3_h (SEC ID nº 95) fosforilado con la polinucleótido cinasa de T4 (fabricada por New England Biolabs) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.) para amplificar la secuencia objetivo.

Tras digerir con *DpnI* el producto de PCR obtenido (fabricado por New England Biolabs), se sometió a

electroforesis en gel de agarosa. Se extrajo el ADN y se ligó con el sistema de ligación rápida de ADN LigaFast™ (fabricado por Promega Corp.). Se analizó la secuencia del clon obtenido del transformante y se confirmó que era la secuencia objetivo (quimera 57-66 de TIM-3/pEF6 Myc_HisC, SEC ID nº 96).

5 [Ejemplo 28]

(Construcción de la quimera 67-105 de TIM-3/pEF6 Myc_HisC)

10 Se construyó un vector que expresaba la proteína TIM-3 quimérica en la que los aminoácidos de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) entre las posiciones 67 y 105 se sustituyeron por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón (en adelante denominada "quimera 67-105 de TIM-3"). Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN plasmídico Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC como molde, los cebadores quimera 67-105F de TIM3_h (SEC ID nº 98) y quimera 67-105R de TIM3_h (SEC ID nº 99) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.) para amplificar la secuencia objetivo.

15 Se llevó a cabo una PCR utilizando el ADN plasmídico Tim-3_m/pEF6 Myc_HisC como molde, los cebadores quimera 67-105F de TIM3_m (SEC ID nº 100) y quimera 67-105R de TIM3_m (SEC ID nº 101) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.). Se ligaron los dos productos de PCR utilizando el kit de clonación y ensamblaje Seamless GENEART (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia del clon obtenido del transformante y se confirmó que era la secuencia objetivo (quimera 67-105 de TIM-3/pEF6 Myc_HisC, SEC ID nº 102).

20 [Ejemplo 29]

25 (Construcción de quimera 74-81 de TIM-3/pEF6 Myc_HisC)

30 Se construyó un vector que expresaba la proteína TIM-3 quimérica en la que los aminoácidos de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) entre las posiciones 74 y 81 se habían sustituido por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón (en adelante denominado "quimera 74-81 de TIM-3"). Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN plasmídico Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC preparado en el Ejemplo 21 como molde, los cebadores quimera 74-81 de TIM3_h (SEC ID nº 104) y quimera 74-81R de TIM3_h (SEC ID nº 105) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.).

35 Tras digerir el producto de PCR con *DpnI* (fabricado por New England Biolabs), se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se extrajo el ADN y se ligó con el kit de clonación y ensamblaje Seamless GENEART (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia del clon obtenido del transformante y se confirmó que era la secuencia objetivo (quimera 74-81 de TIM-3/pEF6 Myc_HisC, SEC ID nº 106).

40 [Ejemplo 30]

(Construcción de quimera 88-96 de TIM-3/pEF6 Myc_HisC)

45 Se construyó un vector que expresaba la proteína TIM-3 quimérica en la que se habían sustituido los aminoácidos de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) entre las posiciones 88 y 96 por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón (en adelante denominada "quimera 88-96 de TIM-3"). Se llevó a cabo la PCR mediante la preparación de una solución de reacción que contenía el ADN plasmídico Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC preparado en el Ejemplo 21 como molde, los cebadores quimera 88-96F de quimera de TIM-3_h (SEC ID nº 108) y quimera 88-96R de TIM3_h (SEC ID nº 109) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.).

50 Tras digerir el producto de PCR con *DpnI* (fabricado por New England Biolabs), se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se extrajo el ADN y se ligó con el kit de clonación y ensamblaje Seamless GENEART (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia del clon obtenido del transformante y se confirmó que era la secuencia objetivo (quimera 88-96 de TIM-3/pEF6 Myc_HisC, SEC ID nº 110).

55 [Ejemplo 31]

(Construcción de quimera 96-105 de TIM-3/pEF6 Myc_HisC)

60 Se construyó un vector que expresaba la proteína TIM-3 quimérica en la que se habían sustituido los aminoácidos de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) entre las posiciones 96 y 105 por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón (en adelante denominada "quimera 96-105 de TIM-3"). Se llevó a cabo la PCR mediante la preparación de una solución de reacción que contenía el ADN plasmídico Tim-3_h/pEF6 Myc_HisC preparado en el Ejemplo 21 como molde, los cebadores quimera 96-105F de quimera de TIM-3_h (SEC ID nº 112) y quimera 96-105R de TIM3_h (SEC ID nº 113) y la ADN polimerasa PrimeSTAR GXL (fabricada por Takara Bio Inc.).

Tras digerir el producto de PCR con *DpnI* (fabricado por New England Biolabs), se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se extrajo el ADN y se ligó con el kit de clonación y ensamblaje Seamless GENEART (fabricado por Invitrogen). Se analizó la secuencia del clon obtenido del transformante y se confirmó que era la secuencia objetivo (quimera 96-105 de TIM-3/ρEF6 Myc_HisC, SEC ID nº 114).

[Ejemplo 32]

(Ensayo de unión de anticuerpo anti-TIM-3 a la proteína TIM-3 quimérica en la que parte del dominio IgV ha sido sustituido por TIM-3 de ratón)

Se introdujeron cada uno de los diversos vectores TIM-3 preparados en los Ejemplos 26 a 31 y un vector vacío a modo de control, en HEK293F de la misma manera que en el Ejemplo 4. Los vectores introducidos y las proteínas quiméricas de TIM-3 expresadas en los mismos fueron las siguientes:

- (1) quimera 22-47 de TIM-3: proteína TIM-3 quimérica en la que la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 22 y 47 de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) se han sustituido por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón,
- (2) quimera 57-66 de TIM-3: proteína TIM-3 quimérica en la que la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 57 y 66 de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) se han sustituido por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón,
- (3) quimera 67-105 de TIM-3: proteína TIM-3 quimérica en la que la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 67 y 105 de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) se han sustituido por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón,
- (4) quimera 74-81 de TIM-3: proteína TIM-3 quimérica en la que la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 74 y 81 de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) se han sustituido por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón,
- (5) quimera 88-96 de TIM-3: proteína TIM-3 quimérica en la que la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 88 y 96 de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) se han sustituido por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón,
- (6) quimera 96-105 de TIM-3: proteína TIM-3 quimérica en la que la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 96 y 105 de la TIM-3 humana (SEC ID nº 53) se han sustituido por los aminoácidos correspondientes de la TIM-3 de ratón.

Dos días después de la transfección, de la misma manera que en el Ejemplo 22, se evaluó la actividad de unión del anticuerpo anti-TIM-3 utilizando la citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Tabla 2. Tal como se muestra en la Tabla 2, el caso en que se detectaba la unión del anticuerpo a la célula transfectada se indica como "+"; el caso en que se detectaba la unión del anticuerpo a la célula transfectada pero el grado de unión se había reducido se indica como "+/-" y el caso en que no se detectaba la unión del anticuerpo a la célula transfectada se indica como "-".

[Tabla 2]

Nombre del vector	4545	8213	4177	512	644	344823	F38-2E2
quimera 22-47 de TIM-3	+	+	+/-	-	+	+	+
quimera 57-66 de TIM-3	+	+	+/-	+	-	-	-
quimera 67-105 de TIM-3	-	-	+/-	+	+	+	+
quimera 74-81 de TIM-3	-	-	+	+	+	+	+
quimera 88-96 de TIM-3	+	+	+	+	+	+	+
quimera 96-105 de TIM-3	+	+	+	+	+	+	+

Tal como se muestra en la Tabla 2, los anticuerpos 4545 y 8213 unidos a las células transfectadas con quimera 22-47 de TIM-3, quimera 57-66 de TIM-3, quimera 88-96 de TIM-3 o quimera 96-105 de TIM-3. Sin embargo, dichos anticuerpos no se unían a las células en las que se había introducido la quimera 67-105 de TIM-3.

El anticuerpo 512 se unía a las células transfectadas con quimera 57-66 de TIM-3, quimera 88-96 de TIM-3, quimera 96-105 de TIM-3, quimera 67-105 de TIM-3 o quimera 74-81 de TIM-3. Sin embargo, el anticuerpo 512 no se unía a las células transfectadas con la quimera 22-47 de TIM-3.

Los anticuerpos 644, 344823 y F38-2E2 se unían a las células transfectadas con quimera 22-47 de TIM3, quimera 88-96 de TIM3, quimera 96-105 de TIM3, quimera 67-105 de TIM-3 o quimera 74-81 de TIM-3. Sin embargo, dichos anticuerpos no se unían a las células transfectadas con la quimera 57-66 de TIM-3.

5 El anticuerpo 4177 se unió a las células transfectadas con quimera 88-96 de TIM-3, quimera 96-105 de TIM-3 o quimera 74-81 de TIM-3. El anticuerpo 4177 se unió débilmente a las células transfectadas con quimera 22-47 de TIM-3, quimera 57-66 de TIM-3 o quimera 67-105 de TIM-3.

10 Basándose en los resultados anteriores y en los resultados de los Ejemplos 16 y 19, se sugiere que los anticuerpos 4545 y 8213 se unían a la secuencia de aminoácidos en las posiciones 67 a 87 de la TIM-3 humana. Debido a que los anticuerpos 4545 y 8213 no se unían a las células transfectadas con quimera 74-81 de TIM-3, se sugiere que los aminoácidos requeridos para la unión del anticuerpo 4545 y del anticuerpo 8213 a la TIM-3 humana se encontraban incluidos en los aminoácidos entre las posiciones 74 y 81.

15 Además, se sugería que el anticuerpo 512 unido a los aminoácidos hasta la posición 47 de la TIM-3 humana y que los anticuerpos 644, 344823 y F38-2E2 se unen a la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 57 y 66 de la TIM-3 humana.

20 Además, se sugería que el anticuerpo 4177 se une a aminoácidos diferentes de los situados entre las posiciones 74 y 81 en los aminoácidos entre las posiciones 67 y 86 de la TIM-3 humana a la que se unen los anticuerpos 4545 y 8213, aunque los anticuerpos 512, 644, 344823 y F38-2E2 no se unen.

[Ejemplo de referencia 33]

25 (Preparación de anticuerpo 8213 humanizado anti-TIM-3 humana)

(1) Diseño de secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo 8213 humanizado

30 Se diseñó la secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 8213 humanizado de la manera siguiente. Las secuencias de aminoácidos de las RM en VH del anticuerpo humano que resultan adecuadas para el injerto de las secuencias de aminoácidos (SEC ID nº 21 a nº 23) de las RDC 1 a 3 del anticuerpo 8213 se seleccionaron de la manera siguiente.

35 Kabat et al. han clasificado la VH de los diversos anticuerpos humanos convencionalmente conocidos en tres subgrupos (HSG I a III) basándose en la homología de sus secuencias de aminoácidos e informan de las secuencias de consenso de cada uno de los subgrupos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991]. Por lo tanto, se llevó a cabo la búsqueda de homología de las secuencias de consenso de aminoácidos de la RM de VH subgrupos I a III de los anticuerpos humanos con las secuencias de aminoácidos de la RM de VH del anticuerpo 8213.

40 Como resultado de la búsqueda de homología, las homologías de HSGI, HSGII y HSGIII eran de 77,0%, 55,2% y 58,6%, respectivamente. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la RM de la región VH del anticuerpo 8213 presentaba la homología más alta con el subgrupo I.

45 Basándose en los resultados anteriores, la secuencia de aminoácidos de la RDC de la VH del anticuerpo 8213 (SEC ID nº 21 a nº 23) se injertó en una posición apropiada de la secuencia de aminoácidos de la RM de la secuencia de consenso de subgrupo I de la VH del anticuerpo humano. De esta manera, se diseñó HV0 del anticuerpo 8213 representado por la SEC ID nº 67, es decir, la secuencia de aminoácidos de VH de un anticuerpo 8213 humanizado anti-TIM-3 humana.

50 A continuación, la secuencia de aminoácidos de la VL del anticuerpo 8213 humanizado se diseñó de la manera siguiente. Las secuencias de aminoácidos de la RM en la VL del anticuerpo humano que resultaban adecuadas para el injerto de las secuencias de aminoácidos (SEC ID nº 24 a nº 26) de las RDC 1 a 3 en la VL del anticuerpo 8213 se seleccionaron de la manera siguiente.

55 Kabat et al. han clasificado la VL de diversos anticuerpos humanos conocidos en cuatro subgrupos (HSG I a IV) basándose en la homología de sus secuencias de aminoácidos y han informado de las secuencias de consenso de cada uno de los subgrupos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991]. Por lo tanto, se realizó una búsqueda de homología entre las secuencias de consenso de aminoácidos de RM de VL subgrupos I a IV de los anticuerpos humanos respecto a la secuencia de aminoácidos de la RM de VL del anticuerpo 8213.

60 Como resultado de la búsqueda de homología, las homologías de HSGI, HSGII, HSGIII y HSGIV eran de 76,3%, 61,3%, 61,3% y 68,8%, respectivamente. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la RM de la región VL del anticuerpo 8213 presentaba la homología más alta respecto al subgrupo I.

65

Basándose en los resultados anteriores, se injertó cada una de las secuencias de aminoácidos de las RDC de la VL del anticuerpo 8213 (SEC ID nº 24 a nº 26) en una posición apropiada de la secuencia de aminoácidos de la RM de la secuencia de consenso del subgrupo I de la VL de un anticuerpo humano. De esta manera, se diseñó LV0 del anticuerpo 8213 representada por la SEC ID nº 69, es decir, la secuencia de aminoácidos de la VL de un anticuerpo 8213 humanizado anti-TIM-3 humana.

La secuencia de aminoácidos de HV0 del anticuerpo 8213 que era la VH del anticuerpo 8213 humanizado y la secuencia de aminoácidos de LV0 del anticuerpo 8213 que era VL del anticuerpo 8213 humanizado diseñado anteriormente eran las secuencias en las que sólo las secuencias de aminoácidos de las RDC del anticuerpo monoclonal de ratón 8213 se injertaron en la secuencia de aminoácidos de la RM seleccionada del anticuerpo humano.

Sin embargo, en general, es conocido que un anticuerpo humanizado preparado meramente mediante injerto de las RDC de un anticuerpo de ratón en las RM de un anticuerpo humano presenta una actividad de unión más baja. Con el fin de evitar reducir la actividad de unión, se han realizado intentos de preparar un anticuerpo humanizado para elevar la actividad de unión reducida, mediante la modificación de los residuos aminoácidos que se considera que presentan una influencia sobre la actividad de unión de entre las secuencias de aminoácidos de las RM de un anticuerpo humano que son diferentes de las de un anticuerpo de ratón, así como el injerto de secuencias de aminoácidos de las RDC. Por lo tanto, en los Ejemplos, los inventores han decidido identificar y modificar los residuos de aminoácidos de la RM que se considera que presentan una influencia sobre la actividad de unión, de la manera siguiente.

En primer lugar, se construyó la estructura tridimensional de la región V de anticuerpo diseñada anteriormente (en adelante denominada "HV0LV0") que comprendía la secuencia de aminoácidos de HV0 del anticuerpo 8213 que era la VH del anticuerpo 8213 humanizado y la secuencia de aminoácidos de LV0 del anticuerpo 8213 que era la VL del anticuerpo 8213 humanizado, utilizando una técnica de modelado informático. Se utilizó Discovery Studio (fabricado por Accelrys Inc.) para la preparación de la estructura tridimensional y la visualización de la estructura tridimensional. Se construyó de la misma manera un modelo informático de la estructura tridimensional de la región V del anticuerpo 8213.

Además, se seleccionaron los residuos aminoácidos que eran diferentes de los del anticuerpo 8213 en la secuencia de aminoácidos de las RM de VH y VL de HV0LV0, se preparó una secuencia de aminoácidos en la que dichos residuos aminoácidos habían sido sustituidos por los residuos aminoácidos correspondientes del anticuerpo 8213 y después se construyó de la misma manera un modelo de la estructura tridimensional. Se seleccionaron los aminoácidos que se consideró que presentaban una influencia sobre la actividad de unión, mediante la comparación de las estructuras tridimensionales de las regiones V del anticuerpo 8213 y HV0LV0 y el producto modificado.

Como resultado, como residuos aminoácidos de la RM en HV0LV0 que se consideró que modificaban la estructura tridimensional de la región de unión a antígeno y que presentaban una influencia sobre la actividad de unión, se seleccionaron en LV0 del anticuerpo 8213, Lys en la posición 12, Val en la posición 20, Arg en la posición 38, Ala en la posición 40, Met en la posición 48, Arg en la posición 67, Val en la posición 68, Ile en la posición 70, Ala en la posición 72, Thr en la posición 74, Arg en la posición 98 y Val en la posición 113, y en LV0 del anticuerpo 8213 se seleccionaron Leu en la posición 11, Ala en la posición 13, Val en la posición 15, Tyr en la posición 36, Ala en la posición 43, Pro en la posición 44, Leu en la posición 46, Phe en la posición 71 y Thr en la posición 85.

De entre los residuos aminoácidos seleccionados se sustituyó uno o más residuos aminoácidos por residuos aminoácidos que se encontraban presentes en los sitios correspondientes del anticuerpo 8213 y se construyeron las VH y VL del anticuerpo humanizado que comprendían diversas modificaciones.

Específicamente, respecto a la VH, se introdujo por lo menos una modificación entre las modificaciones de aminoácidos para sustituir Lys en la posición 12 por Val, Val en la posición 20 por Leu, Arg en la posición 38 por Lys, Ala en la posición 40 por Arg, Met en la posición 48 por Ile, Arg en la posición 67 por Lys, Val en la posición 68 por Ala, Ile en la posición 70 por Leu, Ala en la posición 72 por Val, Thr en la posición 74 por Lys, Arg en la posición 98 por Gly, o Val en la posición 113 por Leu, en la secuencia de aminoácido representada por la SEC ID nº 67.

Respecto a la VL, se introdujo por lo menos una modificación entre las modificaciones de aminoácidos de sustitución de Leu en la posición 11 por Met, Ala en la posición 13 por Val, Val en la posición 15 por Leu, Tyr en la posición 36 por Leu, Ala en la posición 43 por Ser, Pro en la posición 44 por Phe, Leu en la posición 46 por Gly, Phe en la posición 71 por Tyr y Thr en la posición 85 por Asp, en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 69.

Como región V de anticuerpo del anticuerpo con humanización de anticuerpo 8213 en el que se había modificado por lo menos un aminoácido existente en la RM en HV0LV0, se diseñaron HV0LV0, HV0LV2, HV0LV4, HV0LV5,

5 HV0LV6, HV0LV7, HV0LV9, HV3LV0, HV3LV2, HV3LV4, HV3LV5, HV3LV6, HV3LV7, HV3LV9, HV4LV0, HV4LV2, HV4LV4, HV4LV5, HV4LV6, HV4LV7, HV4LV9, HV5LV0, HV5LV2, HV5LV4, HV5LV5, HV5LV6, HV5LV7, HV5LV9, HV6LV0, HV6LV2, HV6LV4, HV6LV5, HV6LV6, HV6LV7, HV6LV9, HV7LV0, HV7LV2, HV7LV4, HV7LV5, HV7LV6, HV7LV7, HV7LV9, HV8LV0, HV8LV2, HV8LV4, HV8LV5, HV8LV6, HV8LV7, HV8LV9, HV10LV0, HV10LV2, HV10LV4, HV10LV5, HV10LV6, HV10LV7, HV10LV9, HV12LV0, HV12LV2, HV12LV4, HV12LV5, HV12LV6, HV12LV7 y HV12LV9.

10 Las secuencias de aminoácidos de cada una de las regiones variables de cadena H, HV3, HV4, HV5, HV6, HV7, HV8, HV10 y HV12 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena L, LV2, LV4, LV5, LV6, LV7 y LV9 se muestran en las figuras 1 y 2, respectivamente.

(2) Preparación de anticuerpo con humanización de anticuerpo 8213

15 Se diseñó ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo con humanización de anticuerpo 8213 utilizando codones utilizados en los ADN (SEC ID nº 27 y nº 29) codificantes de la secuencia de aminoácidos de la VH del anticuerpo 8213 y la VL del anticuerpo 8213, respectivamente. Al introducir la modificación de aminoácido, se diseñó ADN utilizando un codón que se utilizó en una célula de mamífero con una frecuencia elevada.

20 Utilizando dichas secuencias de ADN, se construyeron vectores para expresar un anticuerpo y se expresaron anticuerpos humanizados.

Aplicabilidad industrial

25 La presente invención puede proporcionar un anticuerpo monoclonal que se une a la secuencia de aminoácidos o a la estructura tridimensional de la misma de la región extracelular de la TIM-3 humana y presenta actividad de ADCC; un ADN que codifica el anticuerpo; un vector que comprende el ADN; un transformante que se obtiene mediante la transformación del vector; un procedimiento para producir un anticuerpo o un fragmento del mismo utilizando el transformante; un método *in vitro* para detectar o medir inmunológicamente una TIM-3 humana, y un anticuerpo monoclonal para la utilización en el tratamiento de un cáncer relacionado con una célula positiva para la TIM-3 humana.

Texto libre de listado de secuencias

- 35 SEC ID nº 1: secuencia de aminoácidos de RDC1 de cadena H del anticuerpo 4545 humano
- SEC ID nº 2: secuencia de aminoácidos de RDC2 de cadena H del anticuerpo 4545 humano
- SEC ID nº 3: secuencia de aminoácidos de RDC3 de cadena H del anticuerpo 4545 humano
- SEC ID nº 4: secuencia de aminoácidos de RDC1 de cadena L del anticuerpo 4545 humano
- SEC ID nº 5: secuencia de aminoácidos de RDC2 de cadena L del anticuerpo 4545 humano
- 40 SEC ID nº 6: secuencia de aminoácidos de RDC3 de cadena L del anticuerpo 4545 humano
- SEC ID nº 11: secuencia de aminoácidos de RDC1 de cadena H del anticuerpo 4177 humano
- SEC ID nº 12: secuencia de aminoácidos de RDC2 de cadena H del anticuerpo 4177 humano
- SEC ID nº 13: secuencia de aminoácidos de RDC3 de cadena H del anticuerpo 4177 humano
- SEC ID nº 14: secuencia de aminoácidos de RDC1 de cadena L del anticuerpo 4177 humano
- 45 SEC ID nº 15: secuencia de aminoácidos de RDC2 de cadena L del anticuerpo 4177 humano
- SEC ID nº 16: secuencia de aminoácidos de RDC3 de cadena L del anticuerpo 4177 humano
- SEC ID nº 21: secuencia de aminoácidos de RDC1 de cadena H del anticuerpo 8213 de ratón
- SEC ID nº 22: secuencia de aminoácidos de RDC2 de cadena H del anticuerpo 8213 de ratón
- SEC ID nº 23: secuencia de aminoácidos de RDC3 de cadena H del anticuerpo 8213 de ratón
- 50 SEC ID nº 24: secuencia de aminoácidos de RDC1 de cadena L del anticuerpo 8213 de ratón
- SEC ID nº 25: secuencia de aminoácidos de RDC2 de cadena L del anticuerpo 8213 de ratón
- SEC ID nº 26: secuencia de aminoácidos de RDC3 de cadena L del anticuerpo 8213 de ratón
- SEC ID nº 31: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3 Fw2
- SEC ID nº 32: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3 Re2
- 55 SEC ID nº 33: secuencia de nucleótidos del cebador pMCs-Fw
- SEC ID nº 34: secuencia de nucleótidos del cebador TIM3ED-FcReXba
- SEC ID nº 35: secuencia de nucleótidos del cebador T7
- SEC ID nº 36: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h Fw1
- SEC ID nº 37: secuencia de nucleótidos of inserto de fusión TIM-3_h ECD Fc
- 60 SEC ID nº 38: secuencia de aminoácidos de inserto de fusión TIM-3_h ECD Fc
- SEC ID nº 39: secuencia de nucleótidos del cebador TIM3ED-FLAG4aa
- SEC ID nº 40: secuencia de nucleótidos del cebador C-FLAG-NotR2
- SEC ID nº 41: secuencia de nucleótidos del cebador BGH-R
- SEC ID nº 42: secuencia de nucleótidos of inserto TIM-3_h ECD
- 65 SEC ID nº 43: secuencia de aminoácidos de inserto TIM-3_h ECD
- SEC ID nº 44: secuencia de nucleótidos del cebador hh-6

SEC ID nº 45: secuencia de nucleótidos del cebador hh-3
 SEC ID nº 46: secuencia de nucleótidos del cebador hk-2
 SEC ID nº 47: secuencia de nucleótidos del cebador hk-6
 SEC ID nº 48: secuencia de nucleótidos del cebador mH_Rv1
 5 SEC ID nº 49: secuencia de nucleótidos del cebador mH_Rv2
 SEC ID nº 50: secuencia de nucleótidos del cebador mK_Rv1
 SEC ID nº 51: secuencia de nucleótidos del cebador mK_Rv2
 SEC ID nº 66: secuencia de nucleótidos región variable HV0 del anticuerpo 8213
 SEC ID nº 67: secuencia de aminoácidos de región variable HV0 del anticuerpo 8213
 10 SEC ID nº 68: secuencia de nucleótidos de región variable LV0 del anticuerpo 8213
 SEC ID nº 69: secuencia de aminoácidos de región variable LV0 del anticuerpo 8213
 SEC ID nº 70: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_m Fw3
 SEC ID nº 71: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_m Re3
 SEC ID nº 72: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_m Fw4NotI
 15 SEC ID nº 73: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_m Re4NotI
 SEC ID nº 74: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h+mIgV_vecR1
 SEC ID nº 75: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h+mIgV_vecF1
 SEC ID nº 76: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h+mIgV_insF1
 SEC ID nº 77: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h+mIgV_insR1
 20 SEC ID nº 78: secuencia de nucleótidos of inserto IgV quimeraTIM-3/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 79: secuencia de aminoácidos de inserto IgV quimeraTIM-3/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 80: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h+mMucina_vecR2
 SEC ID nº 81: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h+mMucina_vecF2
 SEC ID nº 82: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h+mMucina_insF2
 25 SEC ID nº 83: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h+mMucina_insR2
 SEC ID nº 84: secuencia de nucleótidos of inserto de mucina quimera TIM-3/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 85: secuencia de aminoácidos de inserto de mucina quimera TIM-3/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 86: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 22-47F1
 SEC ID nº 87: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 22-47R1
 30 SEC ID nº 88: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 22-47F2
 SEC ID nº 89: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 22-47R2
 SEC ID nº 90: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 22-47F3
 SEC ID nº 91: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 22-47R3
 SEC ID nº 92: secuencia de nucleótidos of inserto de quimera de TIM-3 22-47/pEF6 Myc_HisC
 35 SEC ID nº 93: secuencia de aminoácidos de inserto de quimera de TIM-3 22-47/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 94: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 57-66F
 SEC ID nº 95: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 57-66R
 SEC ID nº 96: secuencia de nucleótidos of inserto de quimera de TIM-3 57-66/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 97: secuencia de aminoácidos de inserto de quimera de TIM-3 57-66/pEF6 Myc_HisC
 40 SEC ID nº 98: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 67-105F
 SEC ID nº 99: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 67-105R
 SEC ID nº 100: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_m quimera 67-105F
 SEC ID nº 101: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_m quimera 67-105R
 SEC ID nº 102: secuencia de nucleótidos of inserto de quimera de TIM-3 67-105/pEF6 Myc_HisC
 45 SEC ID nº 103: secuencia de aminoácidos de inserto de quimera de TIM-3 67-105/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 104: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera74-81F
 SEC ID nº 105: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera74-81R
 SEC ID nº 106: secuencia de nucleótidos of inserto de quimera de TIM-3 74-81/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 107: secuencia de aminoácidos de inserto de quimera de TIM-3 74-81/pEF6 Myc_HisC
 50 SEC ID nº 108: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera88-96F
 SEC ID nº 109: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera88-96R
 SEC ID nº 110: secuencia de nucleótidos of inserto de quimera de TIM-3 88-96/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 111: secuencia de aminoácidos de inserto de quimera de TIM-3 88-96/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 112: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 96-105F
 55 SEC ID nº 113: secuencia de nucleótidos del cebador TIM-3_h quimera 96-105R
 SEC ID nº 114: secuencia de nucleótidos of inserto de quimera de TIM-3 96-105/pEF6 Myc_HisC
 SEC ID nº 115: secuencia de aminoácidos de inserto de quimera de TIM-3 96-105/pEF6 Myc_HisC

Listado de secuencias

60 <110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.
 Kyushu University, National University Corporation
 <120> Anticuerpo anti-TIM-3
 65 <130>W502531

<150> US61/353836
 <151> 2010-06-11

5 <160> 115
 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 15 <223> RDC1 de cadena H del anticuerpo 4545 humano

<400> 1
Arg Gly Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5

20 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> RDC2 de cadena H del anticuerpo 4545 humano

<400> 2
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

30 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> RDC3 de cadena H del anticuerpo 4545 humano

<400> 3
Asp His Tyr Ser Ser Ser Trp Thr Phe Asp Tyr
 40 1 5 10

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Artificial

<220>
 <223> RDC1 de cadena L del anticuerpo 4545 humano

50 <400> 4
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 55 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> RDC2 de cadena L del anticuerpo 4545 humano

60 <400> 5

```

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1           5

<210> 6
<211> 9
5 <212> PRT
   <213> Artificial

<220>
<223> RDC3 de cadena L del anticuerpo 4545 humano
10

<400> 6
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
1           5

<210> 7
<211> 420
15 <212> ADN
   <213> Homo sapiens

<220>
20 <221> CDS
   <222> (1)..(420)

<400> 7
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctc ctg gcg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Ala Ala Ala Pro Arg Trp
1           5           10           15

gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag      96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20           25           30

cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc ttc      144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe
35           40           45

agc cgt ggt ggt tat tac tgg aac tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag      192
Ser Arg Gly Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50           55           60

25 gga ctg gag tgg att ggg tat atc tat tac agt ggg agc acc aac tac      240
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
65           70           75           80

aac ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc atc tca cta gac acg tcc aag      288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys
85           90           95

aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gcg gac acg gcc      336
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100          105          110

gtg tat tac tgt gcg aga gat cat tat agc agc agc tgg acc ttt gac      384
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp His Tyr Ser Ser Ser Trp Thr Phe Asp
115          120          125

tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca      420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130          135          140

<210> 8
<211> 140
30 <212> PRT
   <213> Homo sapiens

<400> 8

```

ES 2 682 078 T3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Ala Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe
 35 40 45

Ser Arg Gly Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp His Tyr Ser Ser Ser Trp Thr Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 9

<211> 381

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(381)

<400> 9

ES 2 682 078 T3

atg gaa gcc cca gct cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

gat acc acc gga gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct 96
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

gtt agc agc tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc 192
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc 240
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc 336
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

aac tgg cct ccg acg ttc ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 381
 Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 10
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 10
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

10

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT

15

<213> Artificial

<220>
<223> RDC1 de cadena H del anticuerpo 4177 humano

5 <400> 11
Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

10 <210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> RDC2 de cadena H del anticuerpo 4177 humano

<400> 12
Tyr Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

20 <210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> RDC3 de cadena H del anticuerpo 4177 humano

<400> 13
Asp Gly Glu Tyr Phe Asp Met Leu Thr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> RDC1 de cadena L del anticuerpo 4177 humano

<400> 14
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

40 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> RDC2 de cadena L del anticuerpo 4177 humano

50 <400> 15
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

55 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>
<223> RDC3 de cadena L del anticuerpo 4177 humano

<400> 16

ES 2 682 078 T3

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 420
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(420)

<400> 17
 atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

gtc ctg tcc cag gtg cag ttg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag 96
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tet ggt ggc tcc atc 144
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

agt agt tac tac tgg agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag gga ctg 192
 Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

gag tgg att ggg tat atc ttt cac agt ggg agc acc aac tac aac ccc 240
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag 288
 Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gcg gac acg gcc gtg tat 336
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

tac tgt gcg aga gat ggg gag tat ttc gat atg ttg act ggt ttt gac 384
 Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Glu Tyr Phe Asp Met Leu Thr Gly Phe Asp
 115 120 125

tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 420
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 15 130 135 140

<210> 18
 <211> 140
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 682 078 T3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Glu Tyr Phe Asp Met Leu Thr Gly Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

- 5 <210> 19
- <211> 387
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(387)

<400> 19

ES 2 682 078 T3

atg gac atg agg gtc ctc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgt	48
Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys	
1 5 10 15	
ttc cca ggt gcc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca	96
Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser	
20 25 30	
ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt	144
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser	
35 40 45	
cag ggt att agc agc tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa	192
Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys	
50 55 60	
gcc cct aag tcc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc	240
Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val	
65 70 75 80	
cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc	288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
85 90 95	
atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag	336
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	
100 105 110	
tat aat agt tac cct cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc	384
Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile	
115 120 125	
aaa	387
Lys	

5 <210> 20
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

ES 2 682 078 T3

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys

5 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> RDC1 de cadena H del anticuerpo 8213 de ratón

<400> 21
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5

15 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> RDC2 de cadena H del anticuerpo 8213 de ratón

<400> 22
 Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

25 Thr

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> RDC3 de cadena H del anticuerpo 8213 de ratón

ES 2 682 078 T3

atg gga tgg agc tat atc atc ctc ttt ttg gta gca aca gcg aca gat 48
 Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15

gtc cac tcc cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gaa ctg gtg aag 96
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

acc agc tac tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt 192
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

gag tgg att gga gag att aat cct agc aac ggt cgt act aac tac aat 240
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

gag aag ttc aag acc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc 288
 Glu Lys Phe Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

aca gcc tac atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

tat tac tgt gcg ggg ggt tac tac ctc tac ttt gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Tyr Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

ggc acc act ctc aca gtc tcc tca 408
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 28
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 28
 Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

10

ES 2 682 078 T3

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Tyr Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 29
<211> 387
5 <212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(387)

<400> 29
atg gac atg atg gtc ctt gct cag ttt ctt gca ttc ttg ttg ctt tgg 48
Met Asp Met Met Val Leu Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

ttt cca ggt gca aca tgt gac atc ctg atg acc caa tct cca tcc tcc 96
Phe Pro Gly Ala Thr Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

atg tct gta tct ctg gga gac aca gtc aac atc act tgc cat gca agt 144
Met Ser Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Asn Ile Thr Cys His Ala Ser
35 40 45

cag ggc att agg att aat ata ggg tgg ttg cag cag aag cca ggg aaa 192
Gln Gly Ile Arg Ile Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

tca ttt aag ggc ctg atc tat cat gga acc aac ttg gaa gat gga gtt 240
Ser Phe Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val
65 70 75 80

cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct gga cca gat tat tct ctc acc 288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

atc agc agc ctg gaa tct gaa gat ttt gca gac tat tac tgt gta cag 336
Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln
100 105 110

tat ggt cag ttt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atg 384
Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met
115 120 125

aaa 387
15 Lys

<210> 30

ES 2 682 078 T3

<211> 129
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 30
 Met Asp Met Met Val Leu Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ala Thr Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Met Ser Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Asn Ile Thr Cys His Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Arg Ile Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ser Phe Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Tyr Ser Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln
 100 105 110
 Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met
 115 120 125

Lys

10 <210> 31
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador TIM-3 Fw2
 15 <400> 31
 gccaccatgt ttccacatct tccctt 26
 20 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador TIM-3 Re2
 <400> 32
 ctatggcatt gcaaagcgac 20
 30 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador pMCs-Fw

<400> 33
 tcaaagtaga cggcatcgca g 21

5 <210> 34
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador TIM3ED-FcReXba

<400> 34
 ttttctagat ctgatggtg ctccaga 27

15 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador T7

<400> 35
 25 taatagcact cactataggg 20

<210> 36
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador TIM-3_h Fw1

35 <400> 36
 actctggagc aaccatca 18

<210> 37
 <211> 1333
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inserto de fusión TIM-3_h ECD Fc

45 <220>
 <221> CDS
 <222> (11)..(1333)

50 <400> 37

ES 2 682 078 T3

gattgccacc atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg ctg ctg	49
Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu	
1 5 10	
ctg ctg cta cta ctt aca agg tcc tca gaa gtg gaa tac aga gcg gag	97
Leu Leu Leu Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu	
15 20 25	
gtc ggt cag aat gcc tat ctg ccc tgc ttc tac acc cca gcc gcc cca	145
Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro	
30 35 40 45	
ggg aac ctc gtg ccc gtc tgc tgg ggc aaa gga gcc tgt cct gtg ttt	193
Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe	
50 55 60	
gaa tgt ggc aac gtg gtg ctc agg act gat gaa agg gat gtg aat tat	241
Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr	
65 70 75	
tgg aca tcc aga tac tgg cta aat ggg gat ttc cgc aaa gga gat gtg	289
Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val	
80 85 90	
tcc ctg acc ata gag aat gtg act cta gca gac agt ggg atc tac tgc	337
Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys	
95 100 105	
tgc cgg atc caa atc cca ggc ata atg aat gat gaa aaa ttt aac ctg	385
Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu	
110 115 120 125	
aag ttg gtc atc aaa cca gcc aag gtc acc cct gca ccg act cgg cag	433
Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln	
130 135 140	
aga gac ttc act gca gcc ttt cca agg atg ctt acc acc agg gga cat	481
Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His	
145 150 155	
ggc cca gca gag aca cag aca ctg ggg agc ctc cct gat ata aat cta	529
Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu	
160 165 170	
aca caa ata tcc aca ttg gcc aat gag tta cgg gac tct aga ttg gcc	577
Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala	
175 180 185	
aat gac tta cgg gac tct gga gca acc atc aga tct aga gca gac tac	625

ES 2 682 078 T3

Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ser Arg Ala Asp Tyr
 190 195 200 205

aag gac gac gat gac aag act agt gac aaa act cac aca tgc cca ccg 673
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220

tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc 721
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235

cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca 769
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 240 245 250

tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac 817
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 255 260 265

tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg 865
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 270 275 280 285

gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc 913
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc 961
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315

aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa 1009
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 320 325 330

ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag 1057
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 335 340 345

gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc 1105
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 350 355 360 365

tat ccc agc gac atc gcc gcg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag 1153
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Ala Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc 1201
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395

ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg 1249
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 400 405 410

aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac 1297
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 415 420 425

acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1333
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 430 435 440

<210> 38
 <211> 440
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

10 <400> 38

ES 2 682 078 T3

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

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 Ser Arg Ala Asp Tyr Lys Asp Asp
 195 200 205

ES 2 682 078 T3

Asp Asp Lys Thr Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220

 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240

 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255

 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270

 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285

 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300

 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 305 310 315 320

 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335

 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 340 345 350

 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365

 Asp Ile Ala Ala Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380

 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400

 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 405 410 415

 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430

 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 39
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador TIM3ED-FLAG4aa

10 <400> 39
 gtcctgtag tctctgatgg ttgctccaga 30

<210> 40

ES 2 682 078 T3

```

<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

5  <220>
    <223> Cebador C-FLAG-NotR2

    <400> 40
10  aaaagcggcc gtcacttgt cgtcatcgtc cttgtagtc      39

    <210> 41
    <211> 18
    <212> ADN
    <213> Artificial

15  <220>
    <223> Cebador BGH-R

    <400> 41
20  tagaaggcac agtcgagg 18

    <210> 42
    <211> 645
    <212> ADN
25  <213> Artificial

    <220>
    <223> Inserto de TIM-3_h ECD

30  <220>
    <221> CDS
    <222> (19)..(645)

    <400> 42
    gggaattcga ttgccacc atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg      51
                               Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu
                               1           5           10

    ctg ctg ctg ctg cta cta ctt aca agg tcc tca gaa gtg gaa tac aga      99
    Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg
                               15           20           25

    gcg gag gtc ggt cag aat gcc tat ctg ccc tgc ttc tac acc cca gcc      147
    Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala
                               30           35           40

    gcc cca ggg aac ctc gtg ccc gtc tgc tgg ggc aaa gga gcc tgt cct      195
    Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro
    35      45           50           55

```

ES 2 682 078 T3

gtg ttt gaa tgt ggc aac gtg gtg ctc agg act gat gaa agg gat gtg 243
 Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val
 60 65 70 75

aat tat tgg aca tcc aga tac tgg cta aat ggg gat ttc cgc aaa gga 291
 Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly
 80 85 90

gat gtg tcc ctg acc ata gag aat gtg act cta gca gac agt ggg atc 339
 Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile
 95 100 105

tac tgc tgc cgg atc caa atc cca ggc ata atg aat gat gaa aaa ttt 387
 Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe
 110 115 120

aac ctg aag ttg gtc atc aaa cca gcc aag gtc acc cct gca ccg act 435
 Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr
 125 130 135

cgg cag aga gac ttc act gca gcc ttt cca agg atg ctt acc acc agg 483
 Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg
 140 145 150 155

gga cat ggc cca gca gag aca cag aca ctg ggg agc ctc cct gat ata 531
 Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile
 160 165 170

aat cta aca caa ata tcc aca ttg gcc aat gag tta cgg gac tct aga 579
 Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg
 175 180 185

ttg gcc aat gac tta cgg gac tct gga gca acc atc aga gac tac aag 627
 Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Asp Tyr Lys
 190 195 200

gac gat gac gac aag tga 645
 Asp Asp Asp Asp Lys
 205

<210> 43
 <211> 208
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

10 <400> 43
 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

ES 2 682 078 T3

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

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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
 195 200 205

5 <210> 44
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador hh-6

<400> 44
 ggtccgggag atcatgaggg tgcctt 27

15 <210> 45
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador hh-3

<400> 45
 gtgcacgccg ctggtcaggg cgcttg 26

25 <210> 46
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador hk-2

<400> 46
 gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc 26

 5 <210> 47
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador hk-6

 <400> 47
 tggcgggaag atgaagacag atggtg 26

 15 <210> 48
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador mH_Rv1

 <400> 48
 atttgtcga cckygtsyt gctggcyggg tg 32
 25
 <210> 49
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador mH_Rv2

 <400> 49
 gcacacyrct ggacagggat ccagagtcc 30
 35
 <210> 50
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador mK_Rv1

 45 <400> 50
 ttgaagctct tgacaatggg tgaagttgat 30

 <210> 51
 <211> 30
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador mK_Rv2
 55
 <400> 51
 gtaggtgctg tctttgctgt cctgatcagt 30

 <210> 52
 60 <211> 906
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 65 <221> CDS
 <222> (1)..(906)

ES 2 682 078 T3

```

<400> 52
atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg ctg ctg ctg cta      48
Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu
1           5           10           15

cta ctt aca agg tcc tca gaa gtg gaa tac aga gcg gag gtc ggt cag      96
Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
           20           25           30

aat gcc tat ctg ccc tgc ttc tac acc cca gcc gcc cca ggg aac ctc      144
Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
           35           40           45

gtg ccc gtc tgc tgg gcc aaa gga gcc tgt cct gtg ttt gaa tgt ggc      192
Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
           50           55           60

aac gtg gtg ctc agg act gat gaa agg gat gtg aat tat tgg aca tcc      240
Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
65           70           75           80

aga tac tgg cta aat ggg gat ttc cgc aaa gga gat gtg tcc ctg acc      288
Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
           85           90           95

ata gag aat gtg act cta gca gac agt ggg atc tac tgc tgc cgg atc      336
Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
           100          105          110

caa atc cca gcc ata atg aat gat gaa aaa ttt aac ctg aag ttg gtc      384
Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
           115          120          125

atc aaa cca gcc aag gtc acc cct gca ccg act cgg cag aga gac ttc      432
Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
           130          135          140

act gca gcc ttt cca agg atg ctt acc acc agg gga cat ggc cca gca      480
Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
145           150          155          160

gag aca cag aca ctg ggg agc ctc cct gat ata aat cta aca caa ata      528
Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile

```

ES 2 682 078 T3

	165		170		175	
tcc aca ttg gcc aat gag tta cgg gac tct aga ttg gcc aat gac tta						576
Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu	180		185		190	
cgg gac tct gga gca acc atc aga ata ggc atc tac atc gga gca ggg						624
Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly	195		200		205	
atc tgt gct ggg ctg gct ctg gct ctt atc ttc ggc gct tta att ttc						672
Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe	210		215		220	
aaa tgg tat tct cat agc aaa gag aag ata cag aat tta agc ctc atc						720
Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile		230		235	240	
tct ttg gcc aac ctc cct ccc tca gga ttg gca aat gca gta gca gag						768
Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu	245		250		255	
gga att cgc tca gaa gaa aac atc tat acc att gaa gag aac gta tat						816
Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr	260		265		270	
gaa gtg gag gag ccc aat gag tat tat tgc tat gtc agc agc agg cag						864
Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln	275		280		285	
caa ccc tca caa cct ttg ggt tgt cgc ttt gca atg cca tag						906
Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro	290		295		300	

<210> 53
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 53
 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

10

ES 2 682 078 T3

				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	
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> 54
 <211> 426
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(426)

<400> 54

ES 2 682 078 T3

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc 144
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

aat agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
 Asn Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

gag tgg gtg gca gtt ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gga 240
 Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly
 65 70 75 80

gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

tat tac tgt gcg ata tgg ttc ggg gag atg ttt tcc gaa tac ttc cag 384
 Tyr Tyr Cys Ala Ile Trp Phe Gly Glu Met Phe Ser Glu Tyr Phe Gln
 115 120 125

cac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 426
 His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

<210> 55
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 55
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Asn Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

10

ES 2 682 078 T3

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ile Trp Phe Gly Glu Met Phe Ser Glu Tyr Phe Gln
115 120 125

His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

<210> 56
<211> 393
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(393)

<400> 56
atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctt ctg ctg ctc tgg 48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

ctc cca ggt gcc aga tgt gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc 96
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt 144
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

cag ggc att agc agt gct tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa 192
Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

gct cct aag ctc ctg atc tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc 240
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag 336
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

ttt aat agt tac cct ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc 384
Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

aaa cgt acg 393
Lys Arg Thr
130

<210> 57
<211> 131
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

ES 2 682 078 T3

<400> 57

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr
130

<210> 58

5 <211> 432

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(432)

<400> 58

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctt gtt gct att ata aaa ggt
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly
1 5 10 15

48

15

ES 2 682 078 T3

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc aag 96
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30

cct gga ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

agt gac tac tac atg agc tgg atc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg 192
 Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

gag tgg gtt tca ttc att agt agt agt ggt agt atc ata tac tac gca 240
 Glu Trp Val Ser Phe Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc agg gac aac gcc aag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

tat tac tgt gcg aga gat ggg tat agc agc agt tgg tat tac tac ggt 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Tyr Gly
 115 120 125

atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gct agc 432
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

<210> 59
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 59
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Phe Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

10

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Tyr Gly
 115 120 125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

ES 2 682 078 T3

<210> 60
 <211> 390
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(390)
 10
 <400> 60
 atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

 gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct 96
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

 ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

 gtt agc agc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct 192
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

 ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca 240
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

 gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc 288
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

 agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat 336
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

 ggt agc tca ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 384
 Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

 cgt acg 390
 Arg Thr
 130

 <210> 61
 15 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 61

ES 2 682 078 T3

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr
130

<210> 62
<211> 414
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(414)

<400> 62
atg gac tgg acc tgg agc atc ctt ttc ttg gtg gca gca gca aca ggt 48
Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

gcc cac tcc cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag 96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

ES 2 682 078 T3

acc agc tat ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192
 Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

gag tgg atg gga tgg atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca 240
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80

cag aag ctc cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc 288
 Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

aca gcc tac atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

tat tac tgt gcg aga tgg gat agc agc agc tgg tcc ttt gac tac tgg 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Ser Ser Ser Trp Ser Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125

ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 414
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 63
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 63
 Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Ser Ser Ser Trp Ser Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

10

<210> 64
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <221> CDS

ES 2 682 078 T3

<222> (1)..(390)

<400> 64

atg gac atg agg gtc ctc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgt 48
 Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

ttc cca ggt gcc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca 96
 Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt 144
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

cag ggt att agc agc tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa 192
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60

gcc cct aag tcc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc 240
 Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 288
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag 336
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

tat aat agt tac ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc 384
 Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

aaa cgt 390
 Lys Arg
 130

5

<210> 65

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 65

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

ES 2 682 078 T3

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg
130

<210> 66
<211> 351
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> HVO de VH de anticuerpo 8213 de ratón

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(351)

15 <400> 66
cag gtc caa ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aag cct ggg gct 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
tca gtg aag gtg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
tgg atg cac tgg gtg cgg cag gcg cct gga caa ggc ctt gag tgg atg 144
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
gga gag att aat cct agc aac ggt cgt act aac tac aat gag aag ttc 192
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

ES 2 682 078 T3

aag acc cgg gtc aca atc act gca gac aca tcc acc agc aca gcc tac 240
 Lys Thr Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gaa ctc agc agc ctg cga tct gag gac act gcg gtc tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg cgg ggt tac tac ctc tac ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc ctg 336
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

gtc aca gtc tcc tca 351
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 67
 <211> 117
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético
 10

<400> 67
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Thr Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 68
 15 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> LV0 de VL de anticuerpo 8213 de ratón

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

25 <400> 68

ES 2 682 078 T3

gac atc cag atg acc caa tct cca tcc tcc ttg tct gca tct gtg gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cga gtc acc atc act tgc cat gca agt cag ggc att agg att aat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ile Asn
 20 25 30

ata ggg tgg tat cag cag aag cca ggg aaa gca cct aag ctc ctg atc 144
 Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat cat gga acc aac ttg gaa gat gga gtt cca tca agg ttc agt ggc 192
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct gga aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca acc tat tac tgt gta cag tat ggt cag ttt ccg tgg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp
 85 90 95

acg ttc ggt cag ggc acc aag ctg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 69
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 69
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ile Asn
 20 25 30

Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 70
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador TIM-3_m Fw3

 <400> 70
 5 ctacacagag ctgtccttg at 22

 <210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador TIM-3_m Re3

 <400> 71
 15 ttctcagtg gctgtgtca 20

 <210> 72
 <211> 33
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador TIM-3_m Fw4NotI

 <400> 72
 25 aattgcgcc gccaccatgt ttcaggct tac 33

 <210> 73
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador TIM-3_m Re4NotI

 <400> 73
 35 aattgcgcc gctcaggatg gctgctgct 30

 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h+mlgV_vecR1

 <400> 74
 50 ggacctgta agtagtagca 20

 <210> 75
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h+mlgV_vecF1

 <400> 75
 60 gccaggca cccctgcacc ga 22

 <210> 76
 <211> 35
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 682 078 T3

<220>
<223> Cebador TIM-3_h+mlgV_insF1

5 <400> 76
ctactataca ggccttgga agatggttat aaggt 35

<210> 77
<211> 35
<212> ADN
10 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador TIM-3_h+mlgV_insR1

15 <400> 77
aggggtgacc ttggctgctt tgatgtctaa tttca 35

<210> 78
<211> 909
20 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IgV quimera TIM-3/pEF6 Myc_HisC

25

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(909)

30 <400> 78
atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg ctg ctg ctg cta 48

ES 2 682 078 T3

Met	Phe	Ser	His	Leu	Pro	Phe	Asp	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu		
1				5					10						15		
cta	ctt	aca	agg	tcc	ttg	gaa	gat	ggt	tat	aag	gtt	gag	gtt	ggt	aaa		96
Leu	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Lys	Val	Glu	Val	Gly	Lys		
			20					25						30			
aat	gcc	tat	ctg	ccc	tgc	agt	tac	act	cta	cct	aca	tct	ggg	aca	ctt		144
Asn	Ala	Tyr	Leu	Pro	Cys	Ser	Tyr	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser	Gly	Thr	Leu		
		35					40					45					
gtg	cct	atg	tgc	tgg	ggc	aag	gga	ttc	tgt	cct	tgg	tca	cag	tgt	acc		192
Val	Pro	Met	Cys	Trp	Gly	Lys	Gly	Phe	Cys	Pro	Trp	Ser	Gln	Cys	Thr		
	50					55					60						
aat	gag	ttg	ctc	aga	act	gat	gaa	aga	aat	gtg	aca	tat	cag	aaa	tcc		240
Asn	Glu	Leu	Leu	Arg	Thr	Asp	Glu	Arg	Asn	Val	Thr	Tyr	Gln	Lys	Ser		
65					70					75					80		
agc	aga	tac	cag	cta	aag	ggc	gat	ctc	aac	aaa	gga	gat	gtg	tct	ctg		288
Ser	Arg	Tyr	Gln	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Asp	Val	Ser	Leu		
			85						90					95			
atc	ata	aag	aat	gtg	act	ctg	gat	gac	cat	ggg	acc	tac	tgc	tgc	agg		336
Ile	Ile	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Asp	Asp	His	Gly	Thr	Tyr	Cys	Cys	Arg		
			100					105						110			
ata	cag	ttc	cct	ggt	ctt	atg	aat	gat	aaa	aaa	tta	gaa	ctg	aaa	tta		384
Ile	Gln	Phe	Pro	Gly	Leu	Met	Asn	Asp	Lys	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Leu		
		115					120					125					
gac	atc	aaa	gca	gcc	aag	gtc	acc	cct	gca	ccg	act	cgg	cag	aga	gac		432
Asp	Ile	Lys	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Arg	Gln	Arg	Asp		
	130					135					140						
ttc	act	gca	gcc	ttt	cca	agg	atg	ctt	acc	acc	agg	gga	cat	ggc	cca		480
Phe	Thr	Ala	Ala	Phe	Pro	Arg	Met	Leu	Thr	Thr	Arg	Gly	His	Gly	Pro		
145					150						155				160		
gca	gag	aca	cag	aca	ctg	ggg	agc	ctc	cct	gat	ata	aat	cta	aca	caa		528
Ala	Glu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Ser	Leu	Pro	Asp	Ile	Asn	Leu	Thr	Gln		
			165						170					175			
ata	tcc	aca	ttg	gcc	aat	gag	tta	cgg	gac	tct	aga	ttg	gcc	aat	gac		576
Ile	Ser	Thr	Leu	Ala	Asn	Glu	Leu	Arg	Asp	Ser	Arg	Leu	Ala	Asn	Asp		
			180					185						190			
tta	cgg	gac	tct	gga	gca	acc	atc	aga	ata	ggc	atc	tac	atc	gga	gca		624
Leu	Arg	Asp	Ser	Gly	Ala	Thr	Ile	Arg	Ile	Gly	Ile	Tyr	Ile	Gly	Ala		
			195				200					205					
ggg	atc	tgt	gct	ggg	ctg	gct	ctg	gct	ctt	atc	ttc	ggc	gct	tta	att		672
Gly	Ile	Cys	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ile	Phe	Gly	Ala	Leu	Ile		
	210					215					220						
ttc	aaa	tgg	tat	tct	cat	agc	aaa	gag	aag	ata	cag	aat	tta	agc	ctc		720
Phe	Lys	Trp	Tyr	Ser	His	Ser	Lys	Glu	Lys	Ile	Gln	Asn	Leu	Ser	Leu		
225					230					235					240		
atc	tct	ttg	gcc	aac	ctc	cct	ccc	tca	gga	ttg	gca	aat	gca	gta	gca		768
Ile	Ser	Leu	Ala	Asn	Leu	Pro	Pro	Ser	Gly	Leu	Ala	Asn	Ala	Val	Ala		
				245					250					255			
gag	gga	att	cgc	tca	gaa	gaa	aac	atc	tat	acc	att	gaa	gag	aac	gta		816
Glu	Gly	Ile	Arg	Ser	Glu	Glu	Asn	Ile	Tyr	Thr	Ile	Glu	Glu	Asn	Val		
			260					265						270			
tat	gaa	gtg	gag	gag	ccc	aat	gag	tat	tat	tgc	tat	gtc	agc	agc	agg		864
Tyr	Glu	Val	Glu	Glu	Pro	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Tyr	Val	Ser	Ser	Arg		
		275					280										
cag	caa	ccc	tca	caa	cct	ttg	ggt	tgt	cgc	ttt	gca	atg	cca	tag			909
Gln	Gln	Pro	Ser	Gln	Pro	Leu	Gly	Cys	Arg	Phe	Ala	Met	Pro				
	290						295					300					

ES 2 682 078 T3

<210> 79
 <211> 302
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

10 <400> 79
 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 Leu Glu Asp Gly Tyr Lys Val Glu Val Gly Lys
 20 25 30
 Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Ser Tyr Thr Leu Pro Thr Ser Gly Thr Leu
 35 40 45
 Val Pro Met Cys Trp Gly Lys Gly Phe Cys Pro Trp Ser Gln Cys Thr
 50 55 60
 Asn Glu Leu Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asn Val Thr Tyr Gln Lys Ser
 65 70 75 80
 Ser Arg Tyr Gln Leu Lys Gly Asp Leu Asn Lys Gly Asp Val Ser Leu
 85 90 95
 Ile Ile Lys Asn Val Thr Leu Asp Asp His Gly Thr Tyr Cys Cys Arg
 100 105 110
 Ile Gln Phe Pro Gly Leu Met Asn Asp Lys Lys Leu Glu Leu Lys Leu
 115 120 125
 Asp Ile Lys Ala Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp
 130 135 140
 Phe Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro
 145 150 155 160

ES 2 682 078 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h+mMucinaa_vecR2

<400> 80
 tggtttgatg accaactca g 21

15 <210> 81
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h+mMucinaa_vecF2

<400> 81
 ataggcatct acatcggagc agg 23

25 <210> 82
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h+mMucinaa_insF2

<400> 82
 ttggtcatca aaccagccaa ggtcactcca gctca 35

35 <210> 83

ES 2 682 078 T3

```

<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
  <223> Cebador TIM-3_h+mMucinaa_insR2

  <400> 83
  gatgtagatg cctattctga tcgtttctcc agagt      35

10 <210> 84
  <211> 876
  <212> ADN
  <213> Artificial

15 <220>
  <223> Quimera de mucinaa TIM-3/pEF6 Myc_HisC

  <220>
20 <221> CDS
  <222> (1)..(876)

  <400> 84

  atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg ctg ctg ctg cta      48
  Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu
  1          5          10          15

  cta ctt aca agg tcc tca gaa gtg gaa tac aga gcg gag gtc ggt cag      96
  Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
          20          25          30

  aat gcc tat ctg ccc tgc ttc tac acc cca gcc gcc cca ggg aac ctc      144
  Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
          35          40          45

  gtg ccc gtc tgc tgg ggc aaa gga gcc tgt cct gtg ttt gaa tgt ggc      192
  Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
  50          55          60

  aac gtg gtg ctc agg act gat gaa agg gat gtg aat tat tgg aca tcc      240
  Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
  65          70          75          80

  aga tac tgg cta aat ggg gat ttc cgc aaa gga gat gtg tcc ctg acc      288
  Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
          85          90          95

  ata gag aat gtg act cta gca gac agt ggg atc tac tgc tgc cgg atc      336
  Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
25          100          105          110

```

ES 2 682 078 T3

caa atc cca ggc ata atg aat gat gaa aaa ttt aac ctg aag ttg gtc 384
 Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
 115 120 125

atc aaa cca gcc aag gtc act cca gct cag act gcc cat ggg gac tct 432
 Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Gln Thr Ala His Gly Asp Ser
 130 135 140

act aca gct tct cca aga acc cta acc acg gag aga aat ggt tca gag 480
 Thr Thr Ala Ser Pro Arg Thr Leu Thr Thr Glu Arg Asn Gly Ser Glu
 145 150 155 160

aca cag aca ctg gtg acc ctc cat aat aac aat gga aca aaa att tcc 528
 Thr Gln Thr Leu Val Thr Leu His Asn Asn Gly Thr Lys Ile Ser
 165 170 175

aca tgg gct gat gaa att aag gac tct gga gaa acg atc aga ata ggc 576
 Thr Trp Ala Asp Glu Ile Lys Asp Ser Gly Glu Thr Ile Arg Ile Gly
 180 185 190

atc tac atc gga gca ggg atc tgt gct ggg ctg gct ctg gct ctt atc 624
 Ile Tyr Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 195 200 205

ttc ggc gct tta att ttc aaa tgg tat tct cat agc aaa gag aag ata 672
 Phe Gly Ala Leu Ile Phe Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile
 210 215 220

cag aat tta agc ctc atc tct ttg gcc aac ctc cct ccc tca gga ttg 720
 Gln Asn Leu Ser Leu Ile Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu
 225 230 235 240

gca aat gca gta gca gag gga att cgc tca gaa gaa aac atc tat acc 768
 Ala Asn Ala Val Ala Glu Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr
 245 250 255

att gaa gag aac gta tat gaa gtg gag gag ccc aat gag tat tat tgc 816
 Ile Glu Glu Asn Val Tyr Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys
 260 265 270

tat gtc agc agc agg cag caa ccc tca caa cct ttg ggt tgt cgc ttt 864
 Tyr Val Ser Ser Arg Gln Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe
 275 280 285

gca atg cca tag 876
 Ala Met Pro
 290

<210> 85
 <211> 291
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

10 <400> 85
 Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

ES 2 682 078 T3

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 Gln Thr Ala His Gly Asp Ser
 130 135 140

Thr Thr Ala Ser Pro Arg Thr Leu Thr Thr Glu Arg Asn Gly Ser Glu
 145 150 155 160

Thr Gln Thr Leu Val Thr Leu His Asn Asn Asn Gly Thr Lys Ile Ser
 165 170 175

Thr Trp Ala Asp Glu Ile Lys Asp Ser Gly Glu Thr Ile Arg Ile Gly
 180 185 190

Ile Tyr Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 195 200 205

Phe Gly Ala Leu Ile Phe Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile
 210 215 220

Gln Asn Leu Ser Leu Ile Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu
 225 230 235 240

Ala Asn Ala Val Ala Glu Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr
 245 250 255

Ile Glu Glu Asn Val Tyr Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys
 260 265 270

Tyr Val Ser Ser Arg Gln Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe
 275 280 285

Ala Met Pro
 290

5 <210> 86
 <211> 35
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h quimera22-47F1
 5
 <400> 86
 acatctggga cactgtgcc cgtctgctgg ggcaa 35
 <210> 87
 10 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador TIM-3_h quimera22-47R1
 <400> 87
 ataaccatct tccaaggacc ttgtaagtag tagca 35
 20 <210> 88
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h quimera22-47F2
 <400> 88
 30 ctgcagttac actctaccta catctgggac acttg 35
 <210> 89
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h quimera22-47R2
 <400> 89
 40 ttaccaacct caacctata accatctcc aagga 35
 <210> 90
 <211> 35
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h quimera22-47F3
 50 <400> 90
 aaatgcctat ctgccctgca gttacactct accta 35
 <210> 91
 <211> 33
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> Cebador TIM-3_h quimera22-47R3
 <400> 91
 gcagatagg cattttacc aacctcaacc tta 33
 <210> 92
 65 <211> 906
 <212> ADN

ES 2 682 078 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Quimera de TIM-3 22-47/pEF6 Myc_HisC

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(906)

10

<400> 92

atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg ctg ctg ctg cta	48
Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
cta ctt aca agg tcc ttg gaa gat ggt tat aag gtt gag gtt ggt aaa	96
Leu Leu Thr Arg Ser Leu Glu Asp Gly Tyr Lys Val Glu Val Gly Lys	
20 25 30	
aat gcc tat ctg ccc tgc agt tac act cta cct aca tct ggg aca ctt	144
Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Ser Tyr Thr Leu Pro Thr Ser Gly Thr Leu	
35 40 45	
gtg ccc gtc tgc tgg ggc aaa gga gcc tgt cct gtg ttt gaa tgt ggc	192
Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly	
50 55 60	
aac gtg gtg ctc agg act gat gaa agg gat gtg aat tat tgg aca tcc	240
Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser	
65 70 75 80	
aga tac tgg cta aat ggg gat ttc cgc aaa gga gat gtg tcc ctg acc	288
Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr	
85 90 95	
ata gag aat gtg act cta gca gac agt ggg atc tac tgc tgc cgg atc	336
Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile	
100 105 110	
caa atc cca ggc ata atg aat gat gaa aaa ttt aac ctg aag ttg gtc	384
Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val	
115 120 125	

ES 2 682 078 T3

atc aaa cca gcc aag gtc acc cct gca ccg act cgg cag aga gac ttc 432
 Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
 130 135 140

act gca gcc ttt cca agg atg ctt acc acc agg gga cat ggc cca gca 480
 Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
 145 150 155 160

gag aca cag aca ctg ggg agc ctc cct gat ata aat cta aca caa ata 528
 Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
 165 170 175

tcc aca ttg gcc aat gag tta cgg gac tct aga ttg gcc aat gac tta 576
 Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
 180 185 190

cgg gac tct gga gca acc atc aga ata ggc atc tac atc gga gca ggg 624
 Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly
 195 200 205

atc tgt gct ggg ctg gct ctg gct ctt atc ttc ggc gct tta att ttc 672
 Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe
 210 215 220

aaa tgg tat tct cat agc aaa gag aag ata cag aat tta agc ctc atc 720
 Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile
 225 230 235 240

tct ttg gcc aac ctc cct ccc tca gga ttg gca aat gca gta gca gag 768
 Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu
 245 250 255

gga att cgc tca gaa gaa aac atc tat acc att gaa gag aac gta tat 816
 Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr
 260 265 270

gaa gtg gag gag ccc aat gag tat tat tgc tat gtc agc agc agg cag 864
 Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln
 275 280 285

caa ccc tca caa cct ttg ggt tgt cgc ttt gca atg cca tag 906
 Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
 290 295 300

<210> 93
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Constructo sintético

10

<400> 93
 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 Leu Glu Asp Gly Tyr Lys Val Glu Val Gly Lys
 20 25 30

ES 2 682 078 T3

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Ser Tyr Thr Leu Pro Thr Ser Gly Thr 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

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

5 <210> 94
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h quimera57-66F

ES 2 682 078 T3

```

<400> 94
acagtgtacc aatgaggtgc tcaggactga tgaaa      35

5  <210> 95
   <211> 33
   <212> ADN
   <213> Artificial

10 <220>
   <223> Cebador TIM-3_h quimera57-66R

   <400> 95
   gaccaaggac agaatccttt gccccagcag acg      33

15 <210> 96
   <211> 906
   <212> ADN
   <213> Artificial

20 <220>
   <223> Quimera de TIM-3 57-66/pEF6 Myc_HisC

   <220>
25 <221> CDS
   <222> (1)..(906)

   <400> 96
   atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg ctg ctg ctg ctg cta      48
   Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
   1           5           10           15

   cta ctt aca agg tcc tca gaa gtg gaa tac aga gcg gag gtc ggt cag      96
   Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
           20           25           30

   aat gcc tat ctg ccc tgc ttc tac acc cca gcc gcc cca ggg aac ctc      144
   Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
           35           40           45

   gtg ccc gtc tgc tgg ggc aaa gga ttc tgt cct tgg tca cag tgt acc      192
   Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Phe Cys Pro Trp Ser Gln Cys Thr
           50           55           60

   aat gag gtg ctc agg act gat gaa agg gat gtg aat tat tgg aca tcc      240
   Asn Glu Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
   65           70           75           80

30

```


ES 2 682 078 T3

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 Phe Cys Pro Trp Ser Gln Cys Thr
50 55 60

Asn Glu 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

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

ES 2 682 078 T3

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

- 5 <210> 98
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h quimera67-105F
 <400> 98
 ctggatgacc atgggatcta ctgctgccgg atcc 34
- 15 <210> 99
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h quimera67-105R
 <400> 99
 atcagtctg agcaacacgt tgccacattc aaa 33
- 25 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 30 <220>
 <223> Cebador TIM-3_m quimera67-105F
 <400> 100
 ttgctcagaa ctgatgaaag 20
- 35 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 40 <220>
 <223> Cebador TIM-3_m quimera67-105R
 <400> 101
 cccatggatca tccagagtca 20
- 45 <210> 102
 <211> 909
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 50 <220>
 <223> Quimera de TIM-3 67-105/pEF6 Myc_HisC

ES 2 682 078 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(909)

5 <400> 102

atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg ctg ctg ctg ctg cta	48
Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
cta ctt aca agg tcc tca gaa gtg gaa tac aga gcg gag gtc ggt cag	96
Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln	
20 25 30	
aat gcc tat ctg ccc tgc ttc tac acc cca gcc gcc cca ggg aac ctc	144
Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu	
35 40 45	
gtg ccc gtc tgc tgg ggc aaa gga gcc tgt cct gtg ttt gaa tgt ggc	192
Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly	
50 55 60	
aac gtg ttg ctc aga act gat gaa aga aat gtg aca tat cag aaa tcc	240
Asn Val Leu Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asn Val Thr Tyr Gln Lys Ser	
65 70 75 80	
agc aga tac cag cta aag ggc gat ctc aac aaa gga gat gtg tct ctg	288
Ser Arg Tyr Gln Leu Lys Gly Asp Leu Asn Lys Gly Asp Val Ser Leu	
85 90 95	
atc ata aag aat gtg act ctg gat gac cat ggg atc tac tgc tgc cgg	336
Ile Ile Lys Asn Val Thr Leu Asp Asp His Gly Ile Tyr Cys Cys Arg	
100 105 110	
atc caa atc cca ggc ata atg aat gat gaa aaa ttt aac ctg aag ttg	384
Ile Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu	
115 120 125	
gtc atc aaa cca gcc aag gtc acc cct gca ccg act cgg cag aga gac	432
Val Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp	
130 135 140	
ttc act gca gcc ttt cca agg atg ctt acc acc agg gga cat ggc cca	480
Phe Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro	
145 150 155 160	
gca gag aca cag aca ctg ggg agc ctc cct gat ata aat cta aca caa	528
Ala Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln	
165 170 175	
ata tcc aca ttg gcc aat gag tta cgg gac tct aga ttg gcc aat gac	576
Ile Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp	

ES 2 682 078 T3

	180		185		190											
tta	cgg	gac	tct	gga	gca	acc	atc	aga	ata	ggc	atc	tac	atc	gga	gca	624
Leu	Arg	Asp	Ser	Gly	Ala	Thr	Ile	Arg	Ile	Gly	Ile	Tyr	Ile	Gly	Ala	
	195						200					205				
ggg	atc	tgt	gct	ggg	ctg	gct	ctg	gct	ctt	atc	ttc	ggc	gct	tta	att	672
Gly	Ile	Cys	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ile	Phe	Gly	Ala	Leu	Ile	
	210					215				220						
ttc	aaa	tgg	tat	tct	cat	agc	aaa	gag	aag	ata	cag	aat	tta	agc	ctc	720
Phe	Lys	Trp	Tyr	Ser	His	Ser	Lys	Glu	Lys	Ile	Gln	Asn	Leu	Ser	Leu	
225					230					235					240	
atc	tct	ttg	gcc	aac	ctc	cct	ccc	tca	gga	ttg	gca	aat	gca	gta	gca	768
Ile	Ser	Leu	Ala	Asn	Leu	Pro	Pro	Ser	Gly	Leu	Ala	Asn	Ala	Val	Ala	
			245						250					255		
gag	gga	att	cgc	tca	gaa	gaa	aac	atc	tat	acc	att	gaa	gag	aac	gta	816
Glu	Gly	Ile	Arg	Ser	Glu	Glu	Asn	Ile	Tyr	Thr	Ile	Glu	Glu	Asn	Val	
			260					265						270		
tat	gaa	gtg	gag	gag	ccc	aat	gag	tat	tat	tgc	tat	gtc	agc	agc	agg	864
Tyr	Glu	Val	Glu	Glu	Pro	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Tyr	Val	Ser	Ser	Arg	
	275						280					285				
cag	caa	ccc	tca	caa	cct	ttg	ggt	tgt	cgc	ttt	gca	atg	cca	tag		909
Gln	Gln	Pro	Ser	Gln	Pro	Leu	Gly	Cys	Arg	Phe	Ala	Met	Pro			
	290					295					300					

<210> 103
 <211> 302
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

10 <400> 103
 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 Leu Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asn Val Thr Tyr Gln Lys Ser
 65 70 75 80
 Ser Arg Tyr Gln Leu Lys Gly Asp Leu Asn Lys Gly Asp Val Ser Leu
 85 90 95

ES 2 682 078 T3

Ile Ile Lys Asn Val Thr Leu Asp Asp His Gly Ile Tyr Cys Cys Arg
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 104
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador TIM-3_h quimera74-81F

10 <400> 104
 gtgacatc agaaatcctc cagatactgg ctaaa 35

15 <210> 105
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador TIM-3_h quimera74-81R

ES 2 682 078 T3

```

<400> 105
tttctgatat gtcacattcc tttcatcagt cctga      35

<210> 106
5 <211> 909
  <212> ADN
  <213> Artificial

<220>
10 <223> Quimera de TIM-3 74-81/pEF6 Myc_HisC

<220>
  <221> CDS
  <222> (1)..(909)

15 <400> 106
   atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg ctg ctg ctg ctg cta      48
   Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
   1           5           10           15

   cta ctt aca agg tcc tca gaa gtg gaa tac aga gcg gag gtc ggt cag      96
   Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
           20           25           30

   aat gcc tat ctg ccc tgc ttc tac acc cca gcc gcc cca ggg aac ctc      144
   Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
           35           40           45

   gtg ccc gtc tgc tgg ggc aaa gga gcc tgt cct gtg ttt gaa tgt ggc      192
   Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
           50           55           60

   aac gtg gtg ctc agg act gat gaa agg aat gtg aca tat cag aaa tcc      240
   Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asn Val Thr Tyr Gln Lys Ser
   65           70           75           80

   tcc aga tac tgg cta aat ggg gat ttc cgc aaa gga gat gtg tcc ctg      288
   Ser Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu
           85           90           95

   acc ata gag aat gtg act cta gca gac agt ggg atc tac tgc tgc cgg      336
   Thr Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg
           100          105          110

   atc caa atc cca ggc ata atg aat gat gaa aaa ttt aac ctg aag ttg      384
   Ile Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu
           115          120          125

   gtc atc aaa cca gcc aag gtc acc cct gca ccg act cgg cag aga gac      432
   Val Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp

```

ES 2 682 078 T3

130	135	140	
ttc act gca gcc ttt cca agg atg ctt acc acc agg gga cat ggc cca			480
Phe Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro			
145	150	155	160
gca gag aca cag aca ctg ggg agc ctc cct gat ata aat cta aca caa			528
Ala Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln			
	165	170	175
ata tcc aca ttg gcc aat gag tta cgg gac tct aga ttg gcc aat gac			576
Ile Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp			
	180	185	190
tta cgg gac tct gga gca acc atc aga ata ggc atc tac atc gga gca			624
Leu Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala			
	195	200	205
ggg atc tgt gct ggg ctg gct ctg gct ctt atc ttc ggc gct tta att			672
Gly Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile			
	210	215	220
ttc aaa tgg tat tct cat agc aaa gag aag ata cag aat tta agc ctc			720
Phe Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu			
	225	230	235
atc tct ttg gcc aac ctc cct ccc tca gga ttg gca aat gca gta gca			768
Ile Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala			
	245	250	255
gag gga att cgc tca gaa gaa aac atc tat acc att gaa gag aac gta			816
Glu Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val			
	260	265	270
tat gaa gtg gag gag ccc aat gag tat tat tgc tat gtc agc agc agg			864
Tyr Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg			
	275	280	285
cag caa ccc tca caa cct ttg ggt tgt cgc ttt gca atg cca tag			909
Gln Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro			
	290	295	300

<210> 107
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Constructo sintético

10

<400> 107
 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

ES 2 682 078 T3

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 Asn Val Thr Tyr Gln Lys Ser
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 108
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador TIM-3_h quimera88-96F

ES 2 682 078 T3

```

<400> 108
aaaggagatg tgtctctgat catagagaat gtgac      35

<210> 109
5 <211> 35
  <212> ADN
  <213> Artificial

<220>
10 <223> Cebador TIM-3_h quimera88-96R

<400> 109
agacacatct ccttgttga gatccccatt tagcc      35

15 <210> 110
  <211> 906
  <212> ADN
  <213> Artificial

20 <220>
  <223> Quimera de TIM-3 88-96/pEF6 Myc_HisC

<220>
<221> CDS
25 <222> (1)..(906)

<400> 110
atg ttt tca cat ctt ccc ttt gac tgt gtc ctg ctg ctg ctg ctg cta      48
Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1           5           10           15

cta ctt aca agg tcc tca gaa gtg gaa tac aga gcg gag gtc ggt cag      96
Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
          20           25           30

aat gcc tat ctg ccc tgc ttc tac acc cca gcc gcc cca ggg aac ctc      144
Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
          35           40           45

gtg ccc gtc tgc tgg ggc aaa gga gcc tgt cct gtg ttt gaa tgt ggc      192
Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
          50           55           60

aac gtg gtg ctc agg act gat gaa agg gat gtg aat tat tgg aca tcc      240
Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
65           70           75           80

aga tac tgg cta aat ggg gat ctc aac aaa gga gat gtg tct ctg atc      288
Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Leu Asn Lys Gly Asp Val Ser Leu Ile

```

ES 2 682 078 T3

	85	90	95	
	ata gag aat gtg act cta gca gac agt ggg atc tac tgc tgc cgg atc			336
	Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile			
	100	105	110	
	caa atc cca ggc ata atg aat gat gaa aaa ttt aac ctg aag ttg gtc			384
	Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val			
	115	120	125	
	atc aaa cca gcc aag gtc acc cct gca ccg act cgg cag aga gac ttc			432
	Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe			
	130	135	140	
	act gca gcc ttt cca agg atg ctt acc acc agg gga cat ggc cca gca			480
	Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala			
	145	150	155	160
	gag aca cag aca ctg ggg agc ctc cct gat ata aat cta aca caa ata			528
	Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile			
	165	170	175	
	tcc aca ttg gcc aat gag tta cgg gac tct aga ttg gcc aat gac tta			576
	Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu			
	180	185	190	
	cgg gac tct gga gca acc atc aga ata ggc atc tac atc gga gca ggy			624
	Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly			
	195	200	205	
	atc tgt gct ggg ctg gct ctg gct ctt atc ttc ggc gct tta att ttc			672
	Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe			
	210	215	220	
	aaa tgg tat tct cat agc aaa gag aag ata cag aat tta agc ctc atc			720
	Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile			
	225	230	235	240
	tct ttg gcc aac ctc cct ccc tca gga ttg gca aat gca gta gca gag			768
	Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu			
	245	250	255	
	gga att cgc tca gaa gaa aac atc tat acc att gaa gag aac gta tat			816
	Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr			
	260	265	270	
	gaa gtg gag gag ccc aat gag tat tat tgc tat gtc agc agc agg cag			864
	Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln			
	275	280	285	
	caa ccc tca caa cct ttg ggt tgt cgc ttt gca atg cca tag			906
	Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro			
	290	295	300	

<210> 111
 <211> 301
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

10 <400> 111

ES 2 682 078 T3

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 Leu Asn Lys Gly Asp Val Ser Leu Ile
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

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

ES 2 682 078 T3

<400> 115

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 Ile
 85 90 95

Ile Lys Asn Val Thr Leu Asp Asp His 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 Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly

ES 2 682 078 T3

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			

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal que se une a una región extracelular de una TIM-3 humana, en el que el anticuerpo presenta una actividad de ADCC y es un anticuerpo monoclonal que comprende VH de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 20 a 140 de SEC ID nº 8 y comprende VL de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 21 a 127 de SEC ID nº 10.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que es un anticuerpo recombinante.
3. ADN que codifica el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2.
4. Vector recombinante que comprende el ADN según la reivindicación 3.
- 15 5. Transformante no humano que es una célula que expresa de manera estable el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2, que puede obtenerse introduciendo el vector recombinante según la reivindicación 4 en una célula hospedadora.
- 20 6. Procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2, que comprende cultivar el transformante según la reivindicación 5 en cultivo para formar y acumular el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2 y recuperar el anticuerpo monoclonal a partir del cultivo.
- 25 7. Método *in vitro* para detectar o medir inmunológicamente una TIM-3 humana, que comprende utilizar el anticuerpo monoclonal como se define en la reivindicación 1 o 2.
8. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2 para la utilización en un método de terapia para una enfermedad relacionada con una célula positiva para TIM-3 humana, siendo dicha enfermedad un cáncer.

Fig. 1

	1	2	3	4	5	6
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
anticuerpo 8213 HV0	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYMMHWVROA	PGQGLEWMGE	INPSNGRTNY
anticuerpo 8213 HV3				K		I
anticuerpo 8213 HV4				K		I
anticuerpo 8213 HV5				K R		I
anticuerpo 8213 HV6		V				
anticuerpo 8213 HV7				K R		I
anticuerpo 8213 HV8			L			
anticuerpo 8213 HV10		V		K R		I
anticuerpo 8213 HV12		V	L	K R		I

	7	8	9	10	11	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
anticuerpo 8213 HV0	NEKFKTRVFI	TADTSTSTAY	MELSSLRSED	TAVYICARGY	YLYFDYWGQG	TIIVTVSS
anticuerpo 8213 HV3				G		
anticuerpo 8213 HV4	K	K				
anticuerpo 8213 HV5	K			G		
anticuerpo 8213 HV6	KA	V K		G		
anticuerpo 8213 HV7	K	V K		G		
anticuerpo 8213 HV8	A L	V		G	L	
anticuerpo 8213 HV10	KA L	V K		G		
anticuerpo 8213 HV12	KA L	V K		G		

