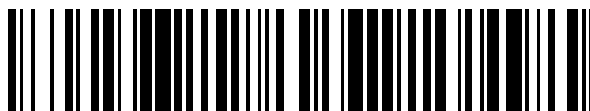


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 548**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2015 PCT/EP2015/075820**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16071448**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2015 E 15790559 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3215532**

54 Título: **Anticuerpos anti-TIM3 y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

06.11.2014 EP 14192175
02.10.2015 EP 15188056

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2020

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

LIFKE, VALERIA;
GEORGES, GUY;
LEVITSKY, VICTOR;
PLOETTNER, OLIVER;
SEEBER, STEFAN;
WEISER, BARBARA;
WUENSCH, ILDIKO y
ZWICK, ADRIAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 763 548 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

Anticuerpos anti-TIM3 y procedimientos de uso

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-TIM3 y a procedimientos de uso de los mismos.

10 ANTECEDENTES

La TIM3 es una proteína humana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y a la familia de las proteínas TIM. En humanos, al igual que en ratones, TIM-3 se expresa en linfocitos T, así como en células fagocíticas tales como los macrófagos y las células dendríticas. La unión de TIM-3 a un ligando proteico (por ejemplo, galectina-9) puede inhibir la respuesta Th1 por medio del 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 TIM-3 humana por anticuerpos de bloqueo incrementó la secreción de interferón alfa de los linfocitos T CD4 positivos, apoyando el papel inhibitorio de TIM-3 en linfocitos T humanos. En los fagocitos, TIM-3 también funciona como un receptor para reconocer las células apoptóticas. El análisis de muestras clínicas de pacientes con enfermedades autoinmunitarias no mostró expresión de TIM-3 en células CD4 positivas. En particular, en los clones de linfocitos T derivados del líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple, el nivel de expresión de TIM-3 fue menor y el nivel de secreción de IFN-gamma fue mayor que el de los clones derivados de personas sanas normales (Koguchi K *et al.*, J Exp Med. 203 (2006) 1413-1418).

Existen informes sobre la relación de TIM-3 con enfermedades alérgicas o asma (documentos WO96/27603 y WO2003/063792).

De acuerdo con el análisis de micromatrices de células madre hematopoyéticas de pacientes con leucemia mielógena aguda (a continuación en el presente documento "LMA") y células madre hematopoyéticas normales, TIM-3 se expresa en células madre de LMA y, por lo tanto, el análisis sugirió la implicación de TIM-3 en neoplasias hematológicas malignas (Majeti R *et al.*, PNAS, 106 (2009) 3396-3401 y documento WO2009/091547).

Los ejemplos de los anticuerpos monoclonales anti-TIM-3 incluyen anticuerpo monoclonal de rata anti-TIM-3 humana (clon 344823, fabricado por R&D Systems) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-TIM-3 humana (Clon F38-2E2, fabricado por R&D Systems). El documento WO2013/06490 se refiere a anticuerpos anti-TIM-3 que muestran una rápida internalización e inmunoconjugados de los mismos para tratar el cáncer y reducir la inflamación. El documento US2012/189617 se refiere a anticuerpos anti-TIM-3 que presentan una mayor actividad efectora, tal como una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad ADCC) para enfermedades relacionadas con una célula que expresa TIM-3 humana.

40 SUMARIO

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto expuesto en el presente documento que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones es solo para fines informativos.

La invención proporciona anticuerpos anti-TIM3 y procedimientos de uso de los mismos.

La invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a TIM3 humana, en el que el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 39; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

La invención proporciona además un anticuerpo aislado que se une a TIM3 humana, en el que el anticuerpo comprende

i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 83 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 84, o

ii) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 85 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 86.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 de acuerdo con la invención es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-TIM3 de acuerdo con la invención es un anticuerpo IgG1 de longitud completa con mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Otro aspecto de la invención es un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención y un agente citotóxico.

Un modo de realización preferente de la invención es un inmunoconjugado en el que el agente citotóxico es la exotoxina A de *Pseudomonas* o una amatoxina.

Otro aspecto de la invención es una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención o el inmunoconjugado de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención o un inmunoconjugado de acuerdo con la invención para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención o el inmunoconjugado de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención o el inmunoconjugado de acuerdo con la invención para su uso en la fabricación de un medicamento.

Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención o el inmunoconjugado de acuerdo con la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para tratar a un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención o el inmunoconjugado de acuerdo con la invención.

Los anticuerpos anti-TIM3 de la presente invención muestran propiedades altamente valiosas como una internalización rápida y fuerte en células cancerosas que expresan TIM3, una fuerte actividad citotóxica como inmunoconjugado (por ejemplo, cuando se conjuga con exotoxinas de *Pseudomonas* o amatoxinas). Por lo tanto, son terapias útiles para el tratamiento de diferentes cánceres, especialmente neoplasias hematológicas como leucemias y linfomas. Además, muestran una fuerte liberación de citocinas inmunoestimulantes en una reacción de linfocitos mixtos (RLM) y, por lo tanto, son útiles como tratamiento inmunoestimulante contra el cáncer. Además, las versiones de anticuerpos humanizados presentan mejor unión y especificidad de unión a los linfocitos T CD4 que los anticuerpos originales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1A: Internalización basada en FACS dependiente del tiempo del anticuerpo anti-TIM3 Tim3_0022 (abreviado como Ab anti-TIM-3(022)) internalizado en células CHO-K1 recombinantes que expresan huTIM-3 después de la incubación a 37 °C.

FIG. 1B: Los resultados del ensayo de internalización basado en FACS muestran que el fragmento Fab del anticuerpo anti-TIM3 Tim3_0022 (abreviado como Ab anti-TIM-3(022)) se internaliza en células CHO-K1 recombinantes que expresan huTIM-3 después de la incubación a 37 °C con una cinética similar al formato con la IgG completa.

FIG. 2A: Unión de anticuerpos anti-TIM3 a células RPMI-8226 (el anticuerpo denominado clon 0016 se refiere al anticuerpo Tim3_0016, el clon 0016 se refiere a la variante de anticuerpo Tim3_0016 (anticuerpo Tim3_0018), el clon 0022 se refiere al anticuerpo Tim3_00122, etc.).

FIG. 2B: Unión de anticuerpos anti-TIM3 a células Pfeiffer (el anticuerpo denominado 0016 se refiere al anticuerpo Tim3_0016, el clon 0016 se refiere a la variante de anticuerpo Tim3_0016 (anticuerpo Tim3_0018), el clon 0022 se refiere al anticuerpo Tim3_00122, etc.).

FIG. 3: Nivel de expresión de TIM-3 en diferentes muestras de células de pacientes con LMA mediante FACS usando mAb anti-TIM-3.

FIG. 4: Comparación directa de la unión de anticuerpos TIM3 a diferentes células mononucleares de sangre periférica (monocitos, linfocitos NK, linfocitos T, linfocitos T CD4):

4A: % de células positivas a las que se unen la variante Tim3_0016 (anticuerpo Tim3_0018) y las versiones humanizadas.

4B: Intensidad de fluorescencia media de unión de la variante Tim3_0016 (anticuerpo Tim3_0018) y versiones humanizadas a diferentes células mononucleares de sangre periférica.

4C: % de células positivas a las que se unen Tim3_0028 y las versiones quiméricas y humanizadas.

4D: Intensidad de fluorescencia media de unión de Tim3_0028 y versiones quiméricas y humanizadas a diferentes células mononucleares de sangre periférica.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

Una "región estructural humana aceptora" para los propósitos del presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural de dominio variable de cadena ligera (VL) o una región estructural de dominio variable de cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o de una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos que esta, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o a la secuencia de la región estructural consenso humana. (definir líneas germinales si procede)

Los términos "anticuerpo anti-TIM3" y "un anticuerpo que se une a TIM3" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a TIM3 con suficiente afinidad, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico dirigido a TIM3. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-TIM3 a una proteína distinta de TIM3 no relacionada es inferior a aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a TIM3 según lo medido, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, BIACORE). En determinados modos de realización, una proteína de unión a antígeno que se une a TIM3 humana tiene un valor de KD de la afinidad de unión para unirse a TIM3 humana de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En un modo de realización preferente, el valor de KD respectivo de las afinidades de unión se determina en un ensayo de resonancia de plasmón superficial usando el dominio extracelular (ECD) de TIM3 humana (ECD-Tim3) para la afinidad de unión a TIM3.

Se usa el término "anticuerpo" en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia un 50 % o más. En el presente documento se proporciona un ensayo de competencia ejemplar.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca la muerte o destrucción de las células. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos (por ejemplo, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del desarrollo; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación.

En un modo de realización preferente, el "agente citotóxico" es una exotoxina A de *Pseudomonas* (o variantes de la misma) documentos WO2005052006, WO2007016150, WO2007014743, WO2007031741, WO200932954, WO201132022, WO2012/154530 y WO 2012/170617, Liu W. *et al.*, PNAS 109 (2012) 11782-11787, Mazor R. *et al.*, PNAS 111 (2014) 8571-8576 y Alewine C. *et al.*, Mol Cancer Ther. (2014) 2653-61. En un modo de realización preferente, la "exotoxina A de *Pseudomonas*" comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 o comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 (su preparación también se describe en Mazor R. *et al.*, PNAS 111 (2014) 8571-8576 y Alewine C. *et al.*, Mol Cancer Ther. (2014) 2653-61).

En otro modo de realización preferente, el "agente citotóxico" es una amatoxina (o variantes de la misma) como se describe, por ejemplo, en los documentos WO2010/115630, WO2010/115629, WO2012/119787, WO2012/041504 y WO2014135282 con variantes preferentes descritas en WO2012/041504 (por ejemplo, conjugado a través del átomo de C en 6' del aminoácido 4 de amatoxina, en particular a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C en 6' del aminoácido amatoxina, y en el que el anticuerpo TIM3 está conectado por medio de un conector a través de un resto de urea) y el documento WO2014135282.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos de la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

"Región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en cuanto al contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada inicialmente se incluye en el presente documento.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos de aminoácidos que aparecen con mayor frecuencia en una selección de secuencias de la región estructural de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR se corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado

puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en cuanto a secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos en contacto con el antígeno ("contactos con el antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR ejemplares en el presente documento incluyen:

(a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) las CDR que se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) contactos con el antígeno que se producen en los residuos de aminoácido 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al. J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); y

(d) las combinaciones de (a), (b) y/o (c), que incluyen residuos de aminoácidos de las HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado a una o más molécula(s) heteróloga(s), incluyendo pero sin limitarse a un agente citotóxico. En un modo de realización preferente, un inmunoconjugado es un anticuerpo anti-TIM3 como se describe en el presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos (preferentemente una exotoxina A de *Pseudomonas* o una amatoxina).

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, un anticuerpo se purifica a más de un 95 % o 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman, S. *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 79-87.

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-TIM3" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyéndose dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana; estando descritos en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos

ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica (incluir si en la técnica anterior hay inmunoconjugados).

Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas mediante enlaces disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoácídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácídicos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático públicamente disponible, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos del presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias los configura el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

$$100 \text{ por la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no sea tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

El término "TIM3", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína natural de dominio 3 de mucina de inmunoglobulina de linfocito T (TIM3) (también conocida como receptor celular 2 del virus de la hepatitis A (HAVcr-2), molécula de lesión renal 3 (KIM-3), TIM-3, Tim3 o Tim-3) de cualquier fuente de vertebrados, incluidos

mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba la TIM3 no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de TIM3 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de TIM3, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una TIM3 humana ejemplar se muestra en SEQ ID NO: 77. La secuencia de aminoácidos del dominio extracelular (ECD) de TIM3 se muestra en SEQ ID NO: 78.

La TIM3 es una proteína humana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y a la familia de las proteínas TIM. En humanos, al igual que en ratones, TIM-3 se expresa en linfocitos T, así como en células fagocíticas tales como los macrófagos y las células dendríticas. La unión de TIM-3 a un ligando proteico (por ejemplo, galectina-9) puede inhibir la respuesta Th1 por medio del 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 TIM-3 humana por anticuerpos de bloqueo incrementó la secreción de interferón alfa de los linfocitos T CD4 positivos, apoyando el papel inhibidor de TIM-3 en linfocitos T humanos. En los fagocitos, TIM-3 también funciona como un receptor para reconocer las células apoptóticas. El análisis de muestras clínicas de pacientes con enfermedades autoinmunitarias no mostró expresión de TIM-3 en células CD4 positivas. En particular, en los clones de linfocitos T derivados del líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple, el nivel de expresión de TIM-3 fue menor y el nivel de secreción de IFN- γ fue mayor que el de los clones derivados de personas sanas normales (Koguchi K *et al.*, J Exp Med. 203 (2006) 1413-1418).

Existen informes sobre la relación de TIM-3 con enfermedades alérgicas o asma (documentos WO96/27603 y WO2003/063792).

De acuerdo con el análisis de micromatrices de células madre hematopoyéticas de pacientes con leucemia mielógena aguda (a continuación en el presente documento "LMA") y células madre hematopoyéticas normales, TIM-3 se expresa en células madre de LMA y, por lo tanto, el análisis sugirió la implicación de TIM-3 en neoplasias hematológicas malignas (Majeti R *et al.*, PNAS, 106 (2009) 3396-3401 y documento WO2009/091547).

Los ejemplos de los anticuerpos monoclonales anti-TIM-3 incluyen anticuerpo monoclonal de rata anti-TIM-3 humana (clon 344823, fabricado por R&D Systems) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-TIM-3 humana (Clon F38-2E2, fabricado por R&D Systems).

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se trata, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de las metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejoría o atenuación de la enfermedad y la remisión o el pronóstico mejorado. En algunos modos de realización se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt, T.J. *et al.*, Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano, S. *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está ligada. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están enlazados funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

II. COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el hallazgo de que los anticuerpos anti-TIM3 seleccionados de la invención se unen a determinados epítopos de TIM3, mostrando una internalización fuerte y rápida y/o una alta actividad citotóxica contra las células cancerosas como inmunoconjugado y/o mostrando una fuerte liberación de citocinas inmunoestimulantes (por ejemplo, interferón gamma). En determinados modos de realización se proporcionan anticuerpos que se unen a TIM3. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento del cáncer.

A. Anticuerpos anti-TIM3 ejemplares

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto expuesto en el presente documento que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones es solo para fines informativos.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a TIM3. En determinados modos de realización se proporciona un anticuerpo anti-TIM3, en el que el anticuerpo:

- induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™)) en al menos un 45 % después de 120 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™)) en al menos un 50 % después de 120 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™)) en al menos un 55 % después de 120 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™)) en al menos un 60 % después de 240 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™)) en al menos un 65 % después de 240 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

En determinados modos de realización se proporciona un anticuerpo anti-TIM3, en el que el anticuerpo:

- compete por la unión a TIM3 con un anticuerpo anti-Tim3 que comprende el VH y VL de Tim3_0016

- se une a una TIM3 humana y de macaco

- muestra como inmunoconjugado una actividad citotóxica en células que expresan TIM3 (en un modo de realización, los inmunoconjugados tienen un valor de CI50 relativo de actividad citotóxica como conjugado con exotoxina A de *Pseudomonas* en células RPMI-8226 de 0,1 o menor (como se midió en el Ejemplo 11)

- induce la liberación de interferón gamma (en el ensayo de RLM, véase el Ejemplo 5).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; o HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 8;
- ii) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 9 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 10;
- iii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i) o ii).

En un modo de realización preferente, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 79 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 80, o
- ii) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 81 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 82.

Un modo de realización preferente es un anticuerpo que se une al anticuerpo TIM3 humano, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 79 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 80.

Un modo de realización preferente es un anticuerpo que se une al anticuerpo TIM3 humano, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 81 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 82.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 15; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 15; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 20;
- ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 23; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 23; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 27 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 28;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 36;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 39; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 39; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 43 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 44;
- ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

5 En un modo de realización preferente, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 83 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 84, o
- ii) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 85 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 86.

10 Un modo de realización preferente es un anticuerpo que se une al anticuerpo TIM3 humano, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 83 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 84.

15 Un modo de realización preferente es un anticuerpo que se une al anticuerpo TIM3 humano, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 85 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 86.

20 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

25 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

30 En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

40 En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

45 En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 51 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 52;
- ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

50 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58.

60 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58.

65 En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, y (iii) HVR-H3 que

comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 55; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 55; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 59 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 60;
- ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 63; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 63; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

En un modo de realización, dicho anticuerpo anti-TIM3 comprende

- i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 67 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 68;
- ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En cualquiera de los modos de realización anteriores un anticuerpo anti-TIM3 es humanizado. En un modo de realización, un anticuerpo anti-TIM3 comprende HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y comprende además una región estructural humana aceptora, por ejemplo, una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana. En otro modo de realización, un anticuerpo anti-TIM3 comprende HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y además comprende un VH y VL que comprende dichas HVR.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-TIM3 proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, en determinados modos de realización se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 8, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 9 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 10, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 20, o se proporciona un anticuerpo que

se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 27 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 28, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 36, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 43 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 44, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 51 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 52, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 59 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 60, o se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 67 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 68.

En un modo de realización preferente se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 8.

En un modo de realización preferente se proporciona un anticuerpo que compite por la unión a TIM3 humana con el anticuerpo anti-TIM3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 8 (como se determina en un ensayo de competencia descrito en el Ejemplo 4 en células RPMI-8226 (ATCC® CCL-155™)).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a TIM3 humana) que comprende

A) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

B) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

C) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

D) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; o

E) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; o

F) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; o

G) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; o

H) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

I) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 55; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; o

J) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 63; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a TIM3 humana) que

A1)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 8;

ii) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 9 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 10;

iii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i) o ii);

o A2)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 79 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 80, o

ii) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 81 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 82.

o B)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 20;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i);

o C)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 27 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 28;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i);

o D)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 36;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i);

o E)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 43 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 44;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i);

o F)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 51 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 52;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i);

o G1)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 59 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 60;

ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i);

o G2)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 83 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 84, o

5 ii) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 85 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 86.

o H)

i) comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 67 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 68;

10 ii) o variante humanizada de VH y VL del anticuerpo de i).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a TIM3 humana) que comprende

15 A) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

25 B) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

30 C) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

35 D) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 15; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; o

40 E) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 23; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; o

45 F) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; o

50 G) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 39; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; o

55 H) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; o

60 I) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 55; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; o

J) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 63; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66;

en el que el anticuerpo se caracteriza independientemente por una o más de las siguientes propiedades: el anticuerpo anti-TIM3

- induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 45 % después de 120 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 50 % después de 120 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 55 % después de 120 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 60 % después de 240 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 65 % después de 240 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a TIM3 humana) que comprende

A) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

B) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

C) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

D) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 15; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; o

E) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 23; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; o

F) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 31; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; o

G) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 39; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; o

H) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; o

I) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 55; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; o

J) (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 63; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66;

en el que el anticuerpo se caracteriza independientemente por una o más de las siguientes propiedades: el anticuerpo anti-TIM3

- induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 45 % después de 120 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 50 % después de 120 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 55 % después de 120 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 60 % después de 240 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- En un modo de realización, el anticuerpo induce la internalización de TIM3 (en un ensayo FACS en células RPMI8226 que expresan TIM3) en al menos un 65 % después de 240 minutos a 37 °C (véase el Ejemplo 6).

- compete por la unión a TIM3 con un anticuerpo anti-Tim3 que comprende el VH de SEQ ID NO: 7 y el VL de SEQ ID NO: 8.

- se une a una TIM3 humana y de macaco

- muestra como inmunoconjugado una actividad citotóxica en células que expresan TIM3 (en un modo de realización, los inmunoconjugados tienen un valor de CI50 relativo de actividad citotóxica como conjugado con exotoxina A de *Pseudomonas* en células RPMI-8226 de 0,1 o menor (como se midió en el Ejemplo 11)

- induce la liberación de interferón gamma (en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (RLM) como se describe en el Ejemplo 5.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-TIM3 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un modo de realización, un anticuerpo anti-TIM3 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4 intacto u otra clase de anticuerpo o isotipo como se define en el presente documento.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-TIM3 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, como se describen en las Secciones 1-7 a continuación:

1. Afinidad de anticuerpos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación K_D de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En un modo de realización preferente, K_D se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE® a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones seriadas de factor 2 de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on} o k_a) y velocidades de disociación (k_{off} o k_d) se calculan usando un modelo simple de unión uno-a-uno de Langmuir (software de evaluación BIACORE® versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensoogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio K_D se calcula como la proporción k_d/k_a (k_{off}/k_{on}). Véase, por ejemplo, Chen, Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881. Si la velocidad de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno, como se mide en un espectrómetro tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv y otros fragmentos que se describen a continuación. Para un análisis de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Para un análisis de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, Nueva York (1994), págs. 269-315; véanse también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo mediante diversas técnicas que incluyen, pero no se limitan a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison, S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en los seres humanos, pero conservando la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o partes de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante humana. En algunos modos de realización, algunos residuos de FR de un anticuerpo humanizado se sustituyen por los residuos

correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann, I. *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri, S.V. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 25-34 (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol* 28 (1991) 489-498 (que describe el "remodelado"); Dall'Acqua, W.F. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 43-60 (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn, J. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 61-68 y Klimka, A. *et al.*, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (que describe el enfoque de "selección guiada" para reordenamiento de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J. *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y Presta, L.G. *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 y Rosok, M.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

4. Anticuerpos humanos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374 y Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459.

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígenos. Dichos animales típicamente contienen todos o una parte de los locus de inmunoglobulina humana, que rempazan a los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena, en general, se han inactivado. Para un análisis de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125. Véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE®, y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos mediante procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1987), págs. 51-63 y Boerner, P. *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de linfocito B humano también se describen en Li, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562. Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM monoclonales humanos a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006) 265-268 (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers, H.P. y Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937 y Vollmers, H.P. y Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191.

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos. Dichas secuencias de dominio variable se pueden combinar a continuación con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

5. Anticuerpos derivados de colecciones

Se pueden aislar los anticuerpos de la invención cribando colecciones combinatorias para determinar los anticuerpos con la actividad o actividades deseada(s). Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar anticuerpos que

posean las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R. *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 178 (2001) 1-37 y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty, J. *et al.*, *Nature* 348 (1990) 552-554; Clackson, T. *et al.*, *Nature* 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. y Bradbury, A., *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12467-12472; y Lee, C.V. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284 (2004) 119-132.

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de los genes VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que después se pueden cribar para determinar los fagos que se unen a los antígenos como se describe en Winter, G. *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455. Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad por el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, a partir de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y no propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths, A.D. *et al.*, *EMBO J.* 12 (1993) 725-734. Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos de V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe en Hoogenboom, H.R. y Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388. Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

6. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es por TIM3 y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes de TIM3. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos para células que expresan TIM3. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina que tienen especificidades diferentes (véase Milstein, C. y Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540, el documento WO 93/08829, y Traunecker, A. *et al.*, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659), y genomanipulación de tipo "botón en ojal (knob-in-hole)" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticular dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, y Brennan, M. *et al.*, *Science* 229 (1985) 81-83); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A. *et al.*, *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Holliger, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448); y usar dímeros de Fv monocatenarios (scFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M. *et al.*, *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374); y preparar anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt, A. *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69).

Los anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une al TIM3, así como a otro antígeno diferente (véase el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793, WO2011/117330, WO2012/025525, WO2012/025530, WO2013/026835, WO2013/026831, WO2013/164325 o WO 2013/174873.

7. Variantes de anticuerpos

En determinados modos de realización se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos

proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y delección

En determinados modos de realización se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones aminoacídicas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Se proporcionan cambios ejemplares en la Tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones ejemplares", y como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales aminoacídicas. Se muestran sustituciones conservadoras en la Tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades que comparten las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo original y/o habrá(n) conservado sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo de afinidad madurada, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Se pueden realizar dichas alteraciones en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con frecuencia alta durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), y/o SDR (a-CDR), sometiendo a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración de afinidad mediante la construcción y reelección de colecciones secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R. *et al.*, en *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. En algunos modos de realización de la maduración de la afinidad se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. A menudo se seleccionan en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, en las HVR se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de la HVR o los SDR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se puede seleccionar para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe en Cunningham, B.C. y Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085. En este procedimiento se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar o eliminar como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

b) Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes con respecto a Fc incluyen mutantes con respecto a Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante con respecto a Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a los FcR. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312, y Shields, R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

En un modo de realización de la invención, dicho anticuerpo es una IgG1 con mutaciones L234A y L235A o con mutaciones L234A, L235A y P329G. En otro modo de realización, o IgG4 con mutaciones S228P y L235E o S228P, L235E o y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat *et al.*, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Salud, Bethesda, MD, 1991).

En el documento US 2005/0014934 se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L. *et al.*, J. Immunol. 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K. *et al.*, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; los documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc.

c) Variantes de anticuerpos genomanipulados con cisteína

En determinados modos de realización puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen por residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos por cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe con más detalle en el presente documento. En determinados modos de realización se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomodificados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

d) Derivados de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar adicionalmente para que contenga restos no proteínicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se pueden determinar el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado del anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteínico hasta una temperatura a la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteínico.

B. Procedimientos y composiciones recombinantes

Se pueden producir anticuerpos usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. En un modo de realización se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo). En otro modo de realización se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo anti-TIM3, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-TIM3, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos, que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo, incluyendo cepas de hongos y levaduras en las que sus vías de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; y Li, H. *et al.*, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar junto con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células HEK293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L. *et al.*, *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P. *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), págs. 255-268.

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-TIM3 proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar para determinar o

caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunoelectrotransferencia, etc.

En otro aspecto, los ensayos de competencia se pueden usar para identificar un anticuerpo que compite con Tim3_0016 (que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 8) por la unión a TIM3 (o de forma alternativa con la variante Tim3_0018 del anticuerpo Tim3_0016 con las 6 HVR idénticas). Por tanto, un modo de realización de la invención es un anticuerpo que compite por la unión a TIM3 humana con un anticuerpo anti-TIM3 que comprende las 3 HVR de la secuencia de VH de SEQ ID NO: 7 y las 3 HVR de la secuencia de VL de SEQ ID NO: 8). En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) que está unido al anticuerpo anti-TIM3 Tim3_0016. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para mapear un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris, G.E. (ed.), *Epitope Mapping Protocols*, en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, Humana Press, Totowa, NJ (1996).

En un ensayo de competencia ejemplar, (ECD-)TIM3 inmovilizada se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a TIM3 (por ejemplo, el anticuerpo anti-TIM3 aTim3_0016) y un segundo anticuerpo no marcado que se está sometiendo a prueba para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión a TIM3. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba TIM3 inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de su incubación, en condiciones que permitan la unión del primer anticuerpo a TIM3, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado con la TIM3 inmovilizada. Si se reduce sustancialmente la cantidad de marcador asociado con la TIM3 inmovilizada en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces, eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión a TIM3. Véase Harlow, E. y Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988). Para otro ensayo de competencia ejemplar, véase el Ejemplo 4.

2. Ensayos de actividad

En un aspecto se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-TIM3 que tengan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, internalización del receptor de TIM3, o liberación de citocinas, o actividad citotóxica (como inmunoconjugados conjugados a una toxina), o reactividad cruzada de unión a TIM3 de macaco, así como también unión a diferentes tipos de células. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En determinados modos de realización, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar dicha actividad biológica como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos 5 a 15.

D. Inmunoconjugados (solo cáncer o modificar para la diana)

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-TIM3 del presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas) o isótopos radiactivos.

En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo está conjugado a uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitarse a, un maitansinoide (véanse los documentos US 5.208.020, US 5.416.064 y EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco monometil auristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse los documentos US 5.635.483, US 5.780.588 y US 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o un derivado de la misma (véanse los documentos US 5.712.374, US 5.714.586, US 5.739.116, US 5.767.285, US 5.770.701, US 5.770.710, US 5.773.001 y US 5.877.296; Hinman, L.M. *et al.*, *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342; y Lode, H.N. *et al.*, *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz, F. *et al.*, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523; Jeffrey, S.C. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362; Torgov, M.Y. *et al.*, *Bioconj. Chem* 16 (2005) 717-721; Nagy, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 829-834; Dubowchik, G.M. *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532; King, H.D. *et al.*, *J. Med. Chem* 45 (2002) 4336-4343; y la patente de EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, que incluye, pero sin limitarse a, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina,

proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una exotoxina A de *Pseudomonas* (o variantes de la misma). La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) es una toxina bacteriana con actividad citotóxica que puede ser eficaz para destruir o inhibir el crecimiento de células indeseables, por ejemplo, células cancerosas. Por consiguiente, la PE puede ser útil para tratar o prevenir enfermedades tales como, por ejemplo, cáncer. Varias exotoxinas de *Pseudomonas* (PE) desinmunizadas son conocidas en la técnica. Las versiones con delecciones en el dominio II (por ejemplo, PE24) pueden ser menos inmunógenas y pueden causar menos efectos secundarios (como, por ejemplo, síndrome de extravasación capilar y hepatotoxicidad) que PE38, que contiene el dominio II. Se pueden emplear diferentes conectores escindibles con furina en variantes de PE24. Dichas exotoxinas de *Pseudomonas* (PE) desinmunizadas se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional WO2005052006, WO2007016150, WO2007014743, WO2007031741, WO200932954, WO201132022, WO2012/154530 y WO 2012/170617. El término "una exotoxina A de *Pseudomonas*", como se usa en el presente documento, abarca exotoxinas de *Pseudomonas* (PE) naturales y desinmunizadas. En un modo de realización preferente, "una exotoxina A de *Pseudomonas*" se refiere a una variante PE24 desinmunizada, por ejemplo, como se describe en, pero sin limitarse a, los documentos WO2009/32954, WO2011/32022, WO2012/154530, WO 2012/170617, Liu W. *et al.*, PNAS 109 (2012) 11782-11787, Mazor R. *et al.*, PNAS 111 (2014) 8571-8576 y Alewine C. *et al.*, Mol Cancer Ther. (2014) 2653-61. En un modo de realización preferente, la "una exotoxina A de *Pseudomonas*" comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 o comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 (su preparación también se describe en Mazor R. *et al.*, PNAS 111 (2014) 8571-8576 y Alewine C. *et al.*, Mol Cancer Ther. (2014) 2653-61).

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una amatoxina o variantes de la misma. Las amatoxinas (α -amanitina, β -amanitina, amanina) son péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos. Se pueden aislar de los hongos *Amanita phalloides* o prepararse a partir de los componentes esenciales mediante síntesis. Las amatoxinas inhiben específicamente la ARN polimerasa II dependiente de ADN de las células de mamíferos y, de ese modo, la transcripción y biosíntesis de proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula provoca la detención del crecimiento y la proliferación. Aunque no está unido covalentemente, el complejo entre amanitina y la ARN polimerasa II es muy fuerte (KD = 3 nM). La disociación de la amanitina de la enzima es un proceso muy lento que hace que la recuperación de una célula afectada sea poco probable. Cuando, en una célula, la inhibición de la transcripción dura demasiado tiempo, la célula sufre muerte celular programada (apoptosis), como se muestra en cultivos de células Jurkat incubadas con α -amanitina, o, con mucha mayor eficacia, en células Jurkat incubadas con el oleato de O-metil- α -amanitina que puede permear la membrana. En un modo de realización preferente, el término "amatoxina", como se usa en el presente documento, se refiere a una alfa-amanitina o una variante de la misma como se describe, por ejemplo, en los documentos WO2010/115630, WO2010/115629, WO2012/119787, WO2012/041504 y WO2014135282 con variantes preferentes descritas en el documento WO2012/041504 (por ejemplo, conjugada a través del átomo de C 6' del aminoácido 4 de amatoxina, en particular a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina, y en el que el anticuerpo anti-TIM3 está conectado por un conector a través de un resto de urea) y el documento WO2014135282.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Están disponibles una variedad de isótopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb y los isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{123}I , o un marcador de espín para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se pueden preparar conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor biactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta, E.S. *et al.*, Science 238 (1987) 1098-1104. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil a ácidos, un conector sensible a peptidasa, un conector fotolábil, un conector dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari, R.V. *et al.*, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, pero sin limitarse a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo), que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

E. Procedimientos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En determinados modos de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-TIM3 proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de TIM3 en una muestra biológica. El término "detectar", como se usa en el presente documento, engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como las células madre cancerosas de LMA.

En un modo de realización se proporciona un anticuerpo anti-TIM3 para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto se proporciona un procedimiento de detectar la presencia de TIM3 en una muestra biológica. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-TIM3 como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-TIM3 a TIM3, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-TIM3 y TIM3. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización se usa un anticuerpo anti-TIM3 para seleccionar sujetos elegibles para su tratamiento con un anticuerpo anti-TIM3, por ejemplo, cuando TIM3 es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de la invención incluyen cáncer, que incluye diferentes formas de cánceres hematológicos como LMA o mielomas múltiples (MM).

En determinados modos de realización se proporcionan anticuerpos anti-TIM3 marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodenso, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-TIM3 como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son, en general, atóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (SHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Se describen determinadas SHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rhuPH20, en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto se combina una SHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y el documento WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo, según sea necesario

para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además [[enumerar los medicamentos que se podrían combinar con el anticuerpo anti-TIM3]]. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Composiciones y procedimientos terapéuticos

Cualquiera de los anticuerpos anti-TIM3 (o proteínas de unión a antígeno) o los inmunoconjugados de los anticuerpos anti-TIM3 (o proteínas de unión a antígeno) conjugados a un agente citotóxico proporcionados en el presente documento se puede usar en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto se proporciona un anticuerpo anti-TIM3 o inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un agente citotóxico para su uso como medicamento. En aspectos adicionales se proporciona un anticuerpo anti-TIM3 o inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un agente citotóxico para su uso en el tratamiento del cáncer. En determinados modos de realización se proporciona un anticuerpo anti-TIM3 o inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un agente citotóxico para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 o inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un agente citotóxico para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene cáncer, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TIM3 o el inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un agente citotóxico.

En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 o inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un agente citotóxico para su uso en la inducción de apoptosis en una célula cancerosa o la inhibición de la proliferación de células cancerosas. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 o inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un agente citotóxico para su uso en un procedimiento de inducción de apoptosis en una célula cancerosa o inhibición de la proliferación de células cancerosas en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TIM3 o inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un agente citotóxico para inducir apoptosis en una célula cancerosa o para inhibir la proliferación de células cancerosas.

En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 para su uso como agente inmunoestimulador o para estimular la secreción de IFN gamma. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TIM3 para su uso en un procedimiento de inmunestimulación o estimulación de la secreción de IFN gamma en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TIM3 para la inmunestimulación o estimulación de la secreción de IFN gamma.

Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es preferentemente un ser humano. En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-TIM3 o un inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un agente citotóxico en la fabricación o preparación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento del cáncer. En otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer, que comprende administrar a un individuo que tiene cáncer una cantidad eficaz del medicamento. En otro modo de realización, el medicamento es para inducir apoptosis en una célula cancerosa o para inhibir la proliferación de células cancerosas. En otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento para inducir apoptosis en una célula cancerosa o inhibir la proliferación de células cancerosas en un individuo que padece cáncer, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inducir apoptosis en una célula cancerosa o para inhibir la proliferación de células cancerosas. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar el cáncer. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene un cáncer una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIM3. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inducir apoptosis en una célula cancerosa o inhibir la proliferación de células cancerosas en un individuo que padece cáncer. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIM3 o un inmunoconjugado del anticuerpo anti-TIM3 conjugado a un compuesto citotóxico para inducir apoptosis en una célula cancerosa o para inhibir la proliferación de células cancerosas en el individuo que padece cáncer. En un modo de realización, un "individuo" es un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-TIM3 proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-TIM3 proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen pero sin limitarse a administraciones individuales o múltiples durante diversos puntos temporales, administración intravenosa rápida, e infusión pulsada.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una forma consistente con las buenas prácticas médicas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no se necesita, el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, ya sea si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,5 mg/kg – 10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, en una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento en general se mantendría hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguido de una o más dosis más bajas. Una pauta posológica ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que se puede llevar a cabo cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-TIM3.

Se entiende que se puede llevar a cabo cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-TIM3.

III. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en el recipiente o asociado con el mismo. Los recipientes

adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas con solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o combinada con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente terapéutico adicional citotóxico o de otro tipo. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución glucosada. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-TIM3.

Descripción de las secuencias de aminoácidos

SEQ ID NO: 1	HVR-H1 de cadena pesada, Tim3_0016
SEQ ID NO: 2	HVR-H2 de cadena pesada, Tim3_0016
SEQ ID NO: 3	HVR-H3 de cadena pesada, Tim3_0016
SEQ ID NO: 4	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0016
SEQ ID NO: 5	HVR-L2 de cadena ligera, Tim3_0016
SEQ ID NO: 6	HVR-L3 de cadena ligera, Tim3_0016
SEQ ID NO: 7	dominio variable de cadena pesada VH, Tim3_0016
SEQ ID NO: 8	dominio variable de cadena ligera VL, Tim3_0016
SEQ ID NO: 9	dominio variable de cadena pesada VH, variante de Tim3_0016 (0018)
SEQ ID NO: 10	dominio variable de cadena ligera VL, variante de Tim3_0016 (0018)
SEQ ID NO: 11	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0016 HVR-L1 variante 1_NQ (eliminación del sitio de glucosilación por mutación de N a Q)
SEQ ID NO: 12	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0016 HVR-L1 variante 2_NS (eliminación del sitio de glucosilación por mutación de N a S)
SEQ ID NO: 13	HVR-H1 de cadena pesada, Tim3_0021
SEQ ID NO: 14	HVR-H2 de cadena pesada, Tim3_0021
SEQ ID NO: 15	HVR-H3 de cadena pesada, Tim3_0021
SEQ ID NO: 16	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0021
SEQ ID NO: 17	HVR-L2 de cadena ligera, Tim3_0021
SEQ ID NO: 18	HVR-L3 de cadena ligera, Tim3_0021
SEQ ID NO: 19	dominio variable de cadena pesada VH, Tim3_0021
SEQ ID NO: 20	dominio variable de cadena ligera VL, Tim3_0021
SEQ ID NO: 21	HVR-H1 de cadena pesada, Tim3_0022
SEQ ID NO: 22	HVR-H2 de cadena pesada, Tim3_0022
SEQ ID NO: 23	HVR-H3 de cadena pesada, Tim3_0022
SEQ ID NO: 24	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0022
SEQ ID NO: 25	HVR-L2 de cadena ligera, Tim3_0022
SEQ ID NO: 26	HVR-L3 de cadena ligera, Tim3_0022
SEQ ID NO: 27	dominio variable de cadena pesada VH, Tim3_0022
SEQ ID NO: 28	dominio variable de cadena ligera VL, Tim3_0022
SEQ ID NO: 29	HVR-H1 de cadena pesada, Tim3_0026
SEQ ID NO: 30	HVR-H2 de cadena pesada, Tim3_0026

ES 2 763 548 T3

SEQ ID NO: 31	HVR-H3 de cadena pesada, Tim3_0026
SEQ ID NO: 32	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0026
SEQ ID NO: 33	HVR-L2 de cadena ligera, Tim3_0026
SEQ ID NO: 34	HVR-L3 de cadena ligera, Tim3_0026
SEQ ID NO: 35	dominio variable de cadena pesada VH, Tim3_0026
SEQ ID NO: 36	dominio variable de cadena ligera VL, Tim3_0026
SEQ ID NO: 37	HVR-H1 de cadena pesada, Tim3_0028
SEQ ID NO: 38	HVR-H2 de cadena pesada, Tim3_0028
SEQ ID NO: 39	HVR-H3 de cadena pesada, Tim3_0028
SEQ ID NO: 40	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0028
SEQ ID NO: 41	HVR-L2 de cadena ligera, Tim3_0028
SEQ ID NO: 42	HVR-L3 de cadena ligera, Tim3_0028
SEQ ID NO: 43	dominio variable de cadena pesada VH, Tim3_0028
SEQ ID NO: 44	dominio variable de cadena ligera VL, Tim3_0028
SEQ ID NO: 45	HVR-H1 de cadena pesada, Tim3_0030
SEQ ID NO: 46	HVR-H2 de cadena pesada, Tim3_0030
SEQ ID NO: 47	HVR-H3 de cadena pesada, Tim3_0030
SEQ ID NO: 48	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0030
SEQ ID NO: 49	HVR-L2 de cadena ligera, Tim3_0030
SEQ ID NO: 50	HVR-L3 de cadena ligera, Tim3_0030
SEQ ID NO: 51	dominio variable de cadena pesada VH, Tim3_0030
SEQ ID NO: 52	dominio variable de cadena ligera VL, Tim3_0030
SEQ ID NO: 53	HVR-H1 de cadena pesada, Tim3_0033
SEQ ID NO: 54	HVR-H2 de cadena pesada, Tim3_0033
SEQ ID NO: 55	HVR-H3 de cadena pesada, Tim3_0033
SEQ ID NO: 56	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0033
SEQ ID NO: 57	HVR-L2 de cadena ligera, Tim3_0033
SEQ ID NO: 58	HVR-L3 de cadena ligera, Tim3_0033
SEQ ID NO: 59	dominio variable de cadena pesada VH, Tim3_0033
SEQ ID NO: 60	dominio variable de cadena ligera VL, Tim3_0033
SEQ ID NO: 61	HVR-H1 de cadena pesada, Tim3_0038
SEQ ID NO: 62	HVR-H2 de cadena pesada, Tim3_0038
SEQ ID NO: 63	HVR-H3 de cadena pesada, Tim3_0038
SEQ ID NO: 64	HVR-L1 de cadena ligera, Tim3_0038
SEQ ID NO: 65	HVR-L2 de cadena ligera, Tim3_0038
SEQ ID NO: 66	HVR-L3 de cadena ligera, Tim3_0038
SEQ ID NO: 67	dominio variable de cadena pesada VH, Tim3_0038
SEQ ID NO: 68	dominio variable de cadena ligera VL, Tim3_0038
SEQ ID NO: 69	una variante 1 de exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> ejemplar (ejemplo de PE24 desinmunizada)
SEQ ID NO: 70	una variante 2 de exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> ejemplar (ejemplo de PE24 desinmunizada)
SEQ ID NO: 71	región constante de cadena ligera kappa humana
SEQ ID NO: 72	región constante de cadena ligera lambda humana
SEQ ID NO: 73	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1
SEQ ID NO: 74	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1 con mutaciones L234A y L235A
SEQ ID NO: 75	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1 con mutaciones L234A, L235A y P329G
SEQ ID NO: 76	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG4

SEQ ID NO: 77	secuencias TIM3 humanas ejemplares
SEQ ID NO: 78	dominio extracelular (ECD) de TIM3 humana
SEQ ID NO: 79	versión humanizada de VH de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433)
SEQ ID NO: 80	versión humanizada de VL de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433)
SEQ ID NO: 81	versión humanizada de VH de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434)
SEQ ID NO: 82	versión humanizada de VL de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434)
SEQ ID NO: 83	versión humanizada de VH de Tim3-0028 (= Tim3-0438)
SEQ ID NO: 84	versión humanizada de VL de Tim3-0028 (= Tim3-0438)
SEQ ID NO: 85	versión humanizada de VH de Tim3-0028 (= Tim3-0443)
SEQ ID NO: 86	versión humanizada de VL de Tim3-0028 (= Tim3-0443)

A continuación se enumeran las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL, incluidas las HVR marcadas (HVR en negrita y subrayadas) de los anticuerpos anti-TIM3 Tim3-0016, la variante de Tim3-0016 (0018) y sus versiones humanizadas Tim3-0433 y Tim3-0434, Tim3-0021, Tim3-0022, Tim3-0026, Tim3-0028 y sus versiones humanizadas Tim3-0438 y Tim3-0443, Tim3-0030 y Tim3-0033, Tim3-0038:

VH de Tim3_0016:

```

1   qvtlkesgpg ilqpsqtlrl tcsfsgfsls tsgmsvgwir
qpsgkglewl

51  ahiwlnddvf fnpalksrll iskdtsnnqv flqiasvvt
dtatyycvra

101 ngylyaldyw gqgtsvtvss

```

VL de Tim3_0016:

```

1   qivltqspai msaspgqkvt itcsasssvn ytqwyyqqklg
sspkliwyda

51  fklapgvpar fsgsgtgtsy sltissmeae daasyfchqw
ssypwtfggg

101  tkleik

```

VH de Tim3_0018 (= variante de VL de Tim3_0016):

```

1   qvtlkesgpg ilqpsqtlsl tcsfsgfsls tsgmsvgwir
qpsgkglewl

51  ahiwlnddvf fnpalkrrll iskdtsnnqv flqiasvvt
dtatyycvra

101 ngylyaldyw gqgisvtvss

```

VL de Tim3_0018 (= variante de VL de Tim3_0016):

```

1   qivltqspai msaspgqkvt itcsasssvn ytqwyyqqklg
sspkliwyda

51  fklapgvpar fsgsgtgtsy sltissmeae daasyfchqw
ssypwtfggg

```

101 tkleik

Versión humanizada de VH de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433)

1 qitlkesgpt lvkptqtltl tctfsgfsls tsgmsvgwir
 qppgkglewl

51 ahiwlnddvf fnpalksrlt itkdt sknqv vltmt nmdpv
 dtatyycvra

5 101 ngylyaldyw gqgtlvtvss

Versión humanizada de VL de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433)

1 ettl tqspaf msatpgdkvn iacsassvs ytqwyqqkpg
 eapklwi yda

51 fklapgi ppr fsgsgygtdf tltinniese daayyfchqw
ssypwtfgqg

101 tkleik

10

Versión humanizada de VH de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434)

1 qitlkesgpt lvkptqtltl tctfsgfsls tsgmsvgwir
 qppgkglewl

51 ahiwlnddvf fnpalksrlt itkdt sknqv vltmt nmdpv
 dtatyycvra

101 ngylyaldyw gqgtlvtvss

15 **Versión humanizada de VL de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434)**

1 diql tqspsf lsasvgdrvt itcsassvs ytqwyqqkpg
 kapklwi yda

51 fklapgvpsr fsgsgsgtef tltisslqpe dfatyfchqw
ssypwtfgqg

101 tkleik

VH de Tim3_0021:

20

1 QVQLQQSGPQ LVRPGASVQI SCKASGYSFT SYLLHWLKQR
PGQGLEWIGM

51 IDPSDSETRL NQKFQDKATL TVDKSSSTAY MQLSSPTSED
SAVYYCARDG

101 YYAWYYFDCW GQGTTTLTVSS

VL de Tim3_0021:

1 DIVLTQSPAT LSVTPGDRVS LSCRASQSIG NNLHWYQQKS
HESPRLLIKY

51 ASHSISGIPS KFSGTGSGTD FTLSFN SVET EDFGMYFCQQ
SNSWPLTFGA

101 GTKLELK

5 -----

VH de Tim3_0022:

1 EVQLQESGPS LVKPSQTL SL TCSVTGDSIA SAYWNWIRKF
PGNKLEYMGY

51 INYSGSTYYN PSLKSRISIT RDT SQNQYYL QLNSVT T EDT
ATYYCVTGDY

101 FDYWGRGTTL TVSS

VL de aTim3_0022:

1 DIQMTQSPSS LSAYLG GKVT ITCKARQDVR KNIGWYQH KP
GKGPRLLIWY

51 TSTLQSGIPS RFSGSGSGRD YSFNINNLEP EDIATYYCLQ
YDNLPFTFGT

101 GTKLEIR

15 -----

VH de Tim3_0026:

1 QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA
PGRGLKWMGY

51 INTETYEPTF GADFKGRFAF SLDTSATTAY LQINSLKTED
TATFFCGGGG

101 YPAYWGQGT VIVSA

VL de Tim3_0026:

1 DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSRTIL HSSGNTYLEW
YLQKPGQSPK

51 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLNI SRVEAEDLG
YYCFQDSHVP

101 FTFGTGTKLE IK

VH de Tim3_0028:

1 EVQLQQSVAE LVRPGASVKL SCTASGfNIK TTYMHWVKQR
PEQGLEWIGR

51 IDPADDNTKY APKFQGKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED
AAIYYCVRDF

101 GYVawfaYWG QGTLVTfSA

VL de Tim3_0028:

1 NIVMTPTPKF LPVSSGDRVT MTCRASSQSVD NYVAWYQQKP
GQSPKLLIYY

51 ASNRYIGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQV EDLAVYFCQQ
HYSSPYTfGS

101 GTKLEIK

Versión humanizada de VH de Tim3-0028 (= Tim3-0438)

1 evqlvesggg lvqpggslrl scaasgfnik ttymhwvrqa
pgkglewvgr

51 idpaddntky apkfqgkati sadtskntay lqmnsdraed
tavyycvrdf

101 gyvawfaywg qgtlvtvss

versión humanizada de VL de Tim3-0028 (= Tim3-0438)

1 divmtqspls lpvtpgepas iscrassqsvd nyvawylqkp
gqspqlliyY

51 asnryigvpd rfsqsgsgtd ftkisrvea edvgvyyccq
hysspytfqg

101 gtkveik

Versión humanizada de VH de Tim3-0028 (= Tim3-0443)

1 evqlvesggg lvqpggslrl scaasgfnik ttymhwvrqa
pgkglewvgr

51 idpaddntky apkfqgkati sadtskntay lqmnslraed
tavyycvrdf

101 gyvawfaywg qgtlvtfss

versión humanizada de VL de Tim3-0028 (= Tim3-0443)

1 divmtqspls lpvtpgepas iscrasqsvd nyvawylqkp
gqspqlliyy

51 asnryigvpd rfsgsgsgtd ftkisrvea edvgvyycqq
hysspytfqg

101 gtkveik

5 -----

VH de aTim3_0030:

1 QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYPFS EYSIHWVKQA
PGKGLKWMVY

51 VNTETGQPIV GDDFRGRFVL SLETSASTAY LQINNLKNE
TATYFCGGGGG

101 YPAYWGQGTL VTVSA

10

VL de aTim3_0030:

1 DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSRSIV HSSGNTYLEW
YLQKPGQSPK

51 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLNI SRVEAEDLGV
YYCFQDSHVP

101 ETFGTGTKLE IK

15 **VH de aTim3_0033:**

1 QGQMHQSGAE LVKPGSSVKL SCKTSGFTFS SSFISWLKQK
PGQSLEWIAW

51 IYAATGSTSY NQKFTNKAQL TVDTSSSAAY MQFSSLTTED
SAIYYCARHA

101 GYPHYAMDY WGQGTSVTVS S

20 **VL de aTim3_0033:**

1 DIQMTQSPAS LSASVGETVT ITCRA**SENIF** **SNLAWYQQKQ**
GKSPQLLVY**S**

51 **AT**NLGDGVPS RFSGSGSGTQ FSLKINSIQP EDFGNYYCQH
FYKIPFTFGT

101 GTKLEIK

VH de aTim3_0038:

1 EVQLQQSGAE PLKPGASVKL TCTTS**GFNIK** **DYYIHWVKQR**
SDQGLEWIGR

51 IDP**EDG**ELIY APKFQDKATI TVDTSSNIAY LQLNSLTSED
TAVYYCSR**DH**

101 **GYVGWFA**YWG QGTLVTVSA

VL de aTim3_0038:

1 NVVMTQSPKS MIMSVGQRTV LNCK**ASENVD** **TYVSWYQQKP**
EQSPKLLIY**G**

51 **ASN**RYTGVPD RFTGSRSATD FTLTISSVQA EDLAVYYCGQ
SYSYPWTFGG

101 GTKLEFR

V. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para los propósitos de claridad de comprensión, no se deben interpretar las descripciones y ejemplos como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1a: Generación de anticuerpos anti-TIM3

Inmunización de ratones

Los ratones NMRI se inmunizaron genéticamente, usando un vector de expresión de plásmido que codifica Tim-3 humana de longitud completa mediante la aplicación intradérmica de 100 µg de ADN de vector (plásmido 15304_hTIM3-fl), seguido de electroporación (2 pulsos cuadrados de 1000 V/cm, duración de 0,1 ms, intervalo de 0,125 s; seguido de 4 pulsos cuadrados de 287,5 V/cm, duración de 10 ms, intervalo de 0,125 s. Los ratones recibieron 6 inmunizaciones consecutivas los días 0, 14, 28, 42, 56, 70 y 84. Se extrajo sangre los días 36, 78 y 92 y se preparó suero, que se usó para la determinación del título mediante ELISA (véase a continuación). Los animales con los títulos más altos se seleccionaron para administrarles una dosis de refuerzo el día 96, mediante inyección intravenosa de 50 µg de quimera de Fc humana recombinante de Tim-3 humana, y los anticuerpos monoclonales se aislaron mediante tecnología de hibridoma, mediante fusión de esplenocitos a la línea celular de mieloma 3 días después del refuerzo.

Determinación de títulos séricos (ELISA)

La quimera de Fc humana recombinante de Tim-3 humana se inmovilizó en una placa NUNC Maxisorp de 96 pocillos a 0,3 µg/ml, 100 µl/pocillo, en PBS, seguido de: bloqueo de la placa con proteína C al 2 % en PBS, 200 µl/pocillo; aplicación de diluciones en serie de antisueros, por duplicado, en proteína C al 0,5 % en PBS, 100 µl/pocillo; detección con anticuerpo antimurino de cabra conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071; 1/16000). Para todas las etapas, las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C. Entre todas las etapas, las placas se lavaron 3 veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS. Se reveló la señal mediante adición de BM Blue POD Substrate soluble (Roche), 100 µl/pocillo; y se detuvo mediante adición de HCl 1 M, 100 µl/pocillo. La absorbancia se leyó a 450 nm, frente a 690 nm como referencia. Se definió el título como la dilución de antisueros que da como resultado una señal que es la mitad de la señal máxima.

Ejemplo 1b: Caracterización de anticuerpos anti-Tim3

ELISA para Tim3

Las placas de estreptavidina Nunc-Maxi Sorp (MicroCoat n.º 11974998/MC1099) se recubrieron con 25 µl/pocillo de

ECD-Tim3-His-Biotina (biotinilada con BirA ligasa) y se incubaron a TA durante 1 h mientras se agitaban a 400 rpm. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 µl de muestras de aTim3 o anticuerpo de referencia aTim3 F38-2E2 (Biolegend) diluido (1:2) y se incubaron durante 1 h a TA. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 µl/pocillo anticuerpo de oveja antimurino-POD (GE NA9310V) en dilución 1:9000 y se incubó a TA durante 1 h con agitación a 400 rpm. Después de lavar (4 x 90 µl/pocillo con tampón PBST), se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato TMB (Calbiochem, n.º CL07) y se incubó hasta una DO de 1,5 - 2,5. A continuación, se detuvo la reacción mediante la adición de 25 µl/pocillo de solución de HCl 1 N. La medición tuvo lugar a 370/492 nm.

Los resultados del ELISA se muestran como valores de CE50 [ng/ml] de forma resumida en la Tabla 2 a continuación.

Ejemplo: ELISA de células para Tim3

La línea celular CHO-K1 adherida se transfectó de manera estable con el plásmido 15312_hTIM3-fl_pUC_Neo que codifica Tim3 humana de longitud completa y la selección con G418 (marcador de resistencia a la neomicina en el plásmido) se sembró a una concentración de 1,2 x 10E6 células/ml en placas de fondo plano de 384 pocillos y se cultivó durante la noche.

Al día siguiente, se añadieron 25 µl/pocillo de muestra de Tim3 o de un anticuerpo de referencia de aTim3 F38-2E2 sin azida (Biolegend, 354004) y se incubó durante 2 h a 4 °C (para evitar la internalización). Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo de PBST (BIOTEK Washer: Prog. 29, 1 x 90)), las células se fijaron mediante eliminación del tampón residual y adición de 50 µl/pocillo de glutaraldehído al 0,05 %: (dilución 1:500 de glutaraldehído al 25 %, Sigma ref. G5882) en tampón 1 x PBS y se incubaron durante 1 h a TA. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo de PBST (BIOTEK Washer: Prog. 21, 3 x 90 GreinLysin), se añadieron 25 µl/pocillo de anticuerpo secundario para la detección (anticuerpo de oveja antimurino-POD; fragmento F(ab')₂ unido a POD de rábano picante; GE NA9310), seguido de incubación durante 2 h a TA mientras se agitaba a 400 rpm. Después de lavar (3 x 90 µl/pocillo de PBST (BIOTEK Washer: Prog. 21, 3 x 90 GreinLysin), se añadieron 25 µl/pocillo de solución de sustrato TMB (Roche 11835033001) y se incubó hasta una DO de 1,5 - 2,5. A continuación, se detuvo la reacción mediante la adición de 25 µl/pocillo de solución de HCl 1 N. La medición tuvo lugar a 370/492 nm.

Los resultados de ELISA de células se enumeran como valores "CE50 CHO-Tim3" [ng/ml] de forma resumida en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Afinidades de unión de anticuerpos ejemplares (ELISA y BIACORE)

Ensayo	Tim3_0018	Tim3_0021	Tim3_0028	Tim3_0026	Tim3_0033	Tim3_0038
Afinidad KD [nM]						
Monómero/dímero de Tim3	3,4/1,1	204/4,1	173/2,8	6,2/1,5	n.f./3,1	7,6/0,6
CE50 ELISA [nM]	0,56		0,22			0,501
CE50 ELISA [ng/ml]	94	47	37	47	1321	83
CE50 CHO-Tim3 [nM]	0,52		0,32			0,17
CE50 CHO-Tim3 [ng/ml]	87	73	53	69	3710	29

Caracterización por BIAcore de los anticuerpos anti-Tim3

Se ha utilizado un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar los parámetros cinéticos de la unión entre varios anticuerpos de ratón que se unen a Tim3, así como referencias comerciales que se unen a Tim3 humana. Por lo tanto, se inmovilizó un anticuerpo anti-IgG murina mediante acoplamiento de amina a la superficie de un chip sensor CM5 (BIAcore). A continuación, se capturaron las muestras y se les unió ECD-Tim3 hu/cy monomérica, así como un dímero de ECD-Tim3 humana marcado con Fc. La superficie del chip sensor se regeneró después de cada ciclo de análisis. La constante de equilibrio K_D se obtuvo finalmente introduciendo los datos en un modelo de interacción de Langmuir 1:1.

Aproximadamente 12000 unidades de respuesta (UR) de 30 µg/ml de anticuerpo anti-IgG de ratón (GE Healthcare n.º BR-1008-38) se acoplaron a los puntos 1, 2, 4 y 5 de las cubetas de lectura 1-4 (los puntos 1, 5 son de anticuerpos activos y los puntos 2, 4 son de anticuerpos de referencia) de un chip sensor CM5 en un BIAcore B4000 a pH 5,0 utilizando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare.

La muestra y el tampón de migración fueron HBS-EP + (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactante P20 al 0,05 % v/v, pH 7,4). La temperatura de la cubeta de lectura se configuró a 25 °C y la del compartimento de muestras a 12 °C. El sistema se cebó con tampón de migración.

Las muestras se inyectaron durante 30 segundos con una concentración de 200 µg/ml y se unieron a los puntos 1 y 5 de cada cubeta de lectura, lo que permitió la medición de ocho muestras en paralelo. A continuación, se inyectó un

conjunto completo (ECD-Tim3 monomérico de macaco, ECD-Tim3 monomérico humano y ECD-Tim3 dimérico humano fusionado a huFc) de diferentes concentraciones (véase la Tabla X) sobre cada muestra durante 240 s, seguido de un tiempo de disociación de 30/1800 s (véase la Tabla 1). Cada ciclo de análisis (captura de muestra, punto 1 y 5, inyección de ECD-Tim3) se regeneró a continuación con una inyección durante 30 segundos de glicina-HCl pH 1,7. El caudal se ajustó a 30 µl/min para todo el ensayo.

Finalmente, los datos de doble referencia se introdujeron en un modelo de interacción de Langmuir 1:1 con el software de evaluación BIAcore B4000. En las Tablas 2 y 3 se muestran las afinidades resultantes con Tim3 monomérico humano o de macaco y Tim3 humana dimérica fusionada a huFc. La afinidad por el dímero de huTim3 es la que probablemente se ve más afectada por la aidez y, por lo tanto, parece ser más fuerte que la afinidad por huTim3 monomérica.

Tabla 3a: Afinidades de unión determinadas por los valores KD de BIAcore obtenidos por medición cinética de SPR. -n.f. significa que no pudo hallarse el valor, muy probablemente debido a la falta de unión o a una unión débil.

Muestra	K _D huTim3 (25 °C) [M]	K _D huTim3Fc (25 °C) [M]	K _D cyTim3 (25 °C) [M]
TIM3-0016	3,29E-09	1,09E-09	2,16E-08
Variante de TIM3-0016 (0018)	3,40E-09	1,11E-09	4,19E-08
TIM3-0021	2,04E-07	4,07E-09	n.f.
TIM3-0022	1,26E-07	1,52E-09	2,84E-08
TIM3-0026	6,23E-09	1,52E-09	n.f.
TIM3-0028	1,73E-07	2,77E-09	n.f.
TIM3-0030	3,11E-09	1,28E-09	n.f.
TIM3-0033	n.f.	3,05E-09	n.f.
TIM3-0038	7,56E-09	5,69E-10	n.f.
Anticuerpo de referencia Biolegend F38-2E2	1,36E-08	7,50E-09	1,68E-07
Anticuerpo de referencia USB 11E365	1,34E-08	7,73E-09	1,41E-07

Determinación de la afinidad por Tim3 mediante SPR (variante quimérica de TIM3-0016 (0018) y versiones humanizadas)

La proteína A se inmovilizó por acoplamiento de amina a la superficie de un chip sensor CM5 (Biacore). A continuación, se capturaron las muestras y se unió ECD-Tim3 humana a ellas. La superficie del chip sensor se regeneró después de cada ciclo de análisis. La constante de equilibrio y las constantes de velocidad cinética se obtuvieron finalmente introduciendo los datos en un modelo de interacción de Langmuir 1:1.

Aproximadamente 2000 unidades de respuesta (UR) de 20 µg/ml de proteína A se acoplaron a los puntos 1, 2, 4 y 5 de todas las cubetas de lectura de un chip sensor CM5 en un instrumento Biacore B4000 utilizando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare.

La muestra y el tampón de migración fueron HBS-EP + (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactante P20 al 0,05 % v/v, pH 7,4). La temperatura de la cubeta de lectura se configuró a 25 °C y la del compartimento de muestras a 12 °C. El sistema se cebó con tampón de migración.

Se inyectaron diferentes muestras durante 30 segundos con una concentración de 10 nM y se unieron consecutivamente a los puntos 1 y 5 en todas las cubetas de lectura. A continuación, se inyectó consecutivamente un conjunto completo de diluciones de ECD-Tim3 humana monomérica (600 nM, 200 nM, 66,7 nM, 2 x 22,2 nM, 7,4 nM, 2,5 nM y 2 x 0 nM) sobre cada muestra durante 300 s. A cada inyección de antígeno le siguió un tiempo de disociación de 12 s/1000 s y dos etapas de regeneración de 30 s con una solución de glicina-HCl pH 1,5, de las cuales la última contenía un período de estabilización después de la inyección de 20 segundos.

Finalmente, los datos de doble referencia se introdujeron en un modelo de interacción de Langmuir 1:1 utilizando el software de evaluación Biacore B4000. Los valores de K_D resultantes se muestran en la Tabla 3b.

Determinación de la afinidad por Tim3 mediante SPR (TIM3-0028 quimérico y versiones humanizadas)

El anticuerpo anti-Fc de IgG humana se inmovilizó por acoplamiento de amina a la superficie de un chip sensor CM5 (Biacore). A continuación, se capturaron las muestras y se unió ECD-Tim3 humana a ellas. La superficie del chip sensor se regeneró después de cada ciclo de análisis. La constante de equilibrio y las constantes de velocidad cinética

se obtuvieron finalmente introduciendo los datos en un modelo de interacción de Langmuir 1:1.

Aproximadamente 2500 unidades de respuesta (UR) de 10 µg/ml de anticuerpo anti-Fc de IgG humana (GE Healthcare n.º BR-1008-39) se acoplaron a los puntos 1, 2, 4 y 5 de todas las cubetas de lectura de un chip sensor CM5 en un Instrumento Biacore B4000 utilizando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare.

La muestra y el tampón de migración fueron HBS-EP + (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactante P20 al 0,05 % v/v, pH 7,4). La temperatura de la cubeta de lectura se configuró a 25 °C y la del compartimento de muestras a 12 °C. El sistema se cebó con tampón de migración.

Se inyectaron diferentes muestras durante 30 segundos con una concentración de 10 nM y se unieron consecutivamente a los puntos 1 y 5 en todas las cubetas de lectura. A continuación, se inyectó consecutivamente un conjunto completo de diluciones de ECD-Tim3 humana monomérica (600 nM, 200 nM, 66,7 nM, 2 x 22,2 nM, 7,4 nM, 2,5 nM y 2 x 0 nM) sobre cada muestra durante 300 s. A cada inyección de antígeno le siguió un tiempo de disociación de 12 s/700 s y dos etapas de regeneración de 30 s con una solución de MgCl₂ 3 M, de las cuales la última contenía un "lavado adicional después de la inyección" con tampón en migración.

Finalmente, los datos de doble referencia se introdujeron en un modelo de interacción de Langmuir 1:1 utilizando el software de evaluación Biacore B4000. Los valores de K_D resultantes se muestran en la Tabla 3b.

Tabla 3b: Afinidades de unión determinadas por los valores de K_D de Biacore obtenidos por medición cinética mediante SPR

Muestra	K_D huTim3 (25 °C) [M]
Variante de TIM3-0016 quimérica (0018)	2,78E-09
TIM3-0433	5,74E-09
TIM3-0434	5,76E-09
TIM3-0028 quimérica	2,35E-07
TIM3-0438	3,05E-07
TIM3-0443	2,87E-07

Ejemplo 2: Generación de derivados de anticuerpos anti-Tim3

Derivados de anticuerpos quiméricos

Los anticuerpos anti-Tim3 quiméricos se generaron amplificando las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos murinos anti-TIM3 Tim3-0016, variante de Tim3-0016 (0018), Tim3-0021, Tim3-0022, Tim3-0026, Tim3-0028, Tim3-0030 y Tim3-0033, Tim3-0038 a través de PCR y clonándolos en vectores de expresión de cadena pesada como proteínas de fusión con cadena principal de IgG1 humana / CH1-bisagra-CH2-CH3 humana con mutaciones LALA y PG (leucina 234 a alanina, leucina 235 a alanina, prolina 329 a glicina) anulando funciones efectoras y vectores de expresión de cadena ligera como proteínas de fusión para C-kappa humana. Los plásmidos de LC y HC se cotransfectaron a continuación en HEK293 y se purificaron después de 7 días a partir de los sobrenadantes mediante procedimientos estándar para la purificación de anticuerpos.

Eliminación del sitio de glucosilación NYT: modificación de la posición 1 de HVR-L1 en Tim3-0016 y variante de Tim3_0016 (llamada 0018 o Tim3_0018) por sustitución de N por Q o S

Las mutaciones dentro de la región variable de la cadena ligera de Tim3_0016 y la variante de Tim3_0016 (0018) se generaron por mutagénesis *in vitro* utilizando el "Kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning" de Agilent de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mediante este procedimiento, la asparagina (N) del motivo NYT del sitio de glucosilación en la cadena ligera HVR-L1 (SEQ ID NO: 4) se reemplazó por glutamina (Q) (dando como resultado SEQ ID NO: 11 = Tim3_0016_HVR-L1 variante 1_NQ) o, de forma alternativa, la asparagina (N) se reemplazó por serina (S) (dando como resultado SEQ ID NO: 12 = Tim3_0016_HVR-L1 variante 2_NS). En ambos, el motivo NYT del sitio de glucosilación se modificó con éxito. Los plásmidos de LC y HC que codifican las variantes se cotransfectaron a continuación en HEK293 y se purificaron después de 7 días a partir de los sobrenadantes mediante procedimientos estándar para la purificación de anticuerpos.

Los mutantes generados se sometieron a prueba por ELISA de Tim3 humana, ELISA de Tim3 de macaco y ELISA de células en células CHO-K1 adheridas que expresan Tim3 humana de longitud completa.

TABLA 4:

Anticuerpos y anticuerpos mutantes sometidos a prueba	Biochem Human		Biochem Cyno		Unión en células CHO-TIM3	
	Valores de CE50 [ng/ml] en relación con el valor máx. de las muestras	Punto de inflexión [ng/ml]	Valores de CE50 [ng/ml] en relación con el valor máx. de las muestras	Punto de inflexión [ng/ml]	Valores de CE50 [ng/ml] en relación con el valor máx. de las muestras	Punto de inflexión [ng/ml]
F38-2E2 anti-Tim3	73,2	88,3	423,0	209871,3	150,2	224,3
Tim3_0018 (variante de TIM3-0016)	15,1	15,3	14,6	14,6	26,4	29,4
Tim3_0018MutNQ	12,0	10,8	13,2	10,8	13,4	12,8
Tim3_0018MutNS	10,3	6,5	11,9	6,5	11,2	11,1
Tim3_0016MutNQ	7,6	5,7	8,3	5,7	6,3	5,4
Tim3_0016MutNS	8,5	5,5	9,7	5,5	9,1	8,5

Se encontró que todos los mutantes generados mostraban aún más unión funcional a TIM3 humana (humano), TIM3 de macaco (macaco) o TIM3 humana en células CHO que los anticuerpos originales Tim3_0016 o la variante de anticuerpo Tim3_0016 Tim3_0018, respectivamente.

Derivados de anticuerpos humanizados

Humanización de los dominios VH y VL de la variante de anti-Tim3-0016 murina (0018) y anti-Tim3_0028

Basándose en la secuencia de aminoácidos de los dominios VH y VL de a) variante de anticuerpo anti-Tim3 Tim3_0016 (0018) (con las secuencias de aminoácidos de las 6 HVR en las que en la cadena ligera se usó la variante 2_NS de HVR-L1 (eliminación del sitio de glucosilación por mutación de N a S)) (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 12, 5 y 6), se generaron las variantes humanizadas de anticuerpos anti-Tim3 Tim3-0433 y Tim3-0434; y basándose en la secuencia de aminoácidos de los dominios VH y VL de b) anticuerpo anti-Tim3 Tim3_0028 (con las secuencias de aminoácidos de las 6 HVR) (SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 y 42), se generaron las variantes humanizadas de anticuerpos anti-Tim3 Tim3-0438 y Tim3-0443.

Las secuencias de aminoácidos humanizadas para las regiones variables de la cadena pesada y ligera se tradujeron en ADN y se sintetizó el ADNc resultante (GenArt); a continuación, se clonó en vectores de expresión de cadena pesada como proteínas de fusión con cadena principal de IgG1 humana / CH1-bisagra-CH2-CH3 humana con mutaciones LALA y PG (leucina 234 a alanina, leucina 235 a alanina, prolina 329 a glicina) anulando funciones efectoras o en vectores de expresión de cadena ligera como proteínas de fusión con C-kappa humana. Los plásmidos de LC y HC se cotransfectaron a continuación en HEK293 y se purificaron después de 7 días a partir de los sobrenadantes mediante procedimientos estándar para la purificación de anticuerpos. Los anticuerpos anti-Tim3 humanizados resultantes se nombran como sigue:

Tabla: Secuencias de VH y VL de anticuerpos humanizados

Anticuerpos humanizados de la variante de Tim3_0016 (0018)	VH / SEQ ID NO:	VL / SEQ ID NO:
Tim3-0433	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80
Tim3-0434	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82
Anticuerpos humanizados de Tim3_0028	VH / SEQ ID NO:	VL / SEQ ID NO:
Tim3-0438	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84
Tim3-0443	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86

Tabla: Secuencias de HVR de anticuerpos humanizados

Anticuerpos humanizados de la variante de Tim3_0016 (0018)	HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 / SEQ ID NO:	HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 / SEQ ID NO:
Tim3-0433	SEQ ID NO: 1, 2 y 3	SEQ ID NO: 12, 5 y 6
Tim3-0434	SEQ ID NO: 1, 2 y 3	SEQ ID NO: 12, 5 y 6

Anticuerpos humanizados de Tim3_0028	HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 / SEQ ID NO:	HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 / SEQ ID NO:
Tim3-0438	SEQ ID NO: 37, 38 y 39	SEQ ID NO: 40, 41 y 42
Tim3-0443	SEQ ID NO: 37, 38 y 39	SEQ ID NO: 40, 41 y 42

Ejemplo 3: Marcado fluorescente de anticuerpo monoclonal purificado

El marcado fluorescente del anticuerpo monoclonal derivado de hibridoma se llevó a cabo utilizando el kit de marcado de anticuerpos monoclonales Alexa Fluor 488 (fabricado por Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del marcado, se confirmó que cada anticuerpo estaba realmente marcado con Alexa Fluor 488 (a continuación en el presente documento denominado "Alexa-488") mediante el análisis FACSCalibur (fabricado por BD Biosciences) para células RPMI-8226 y células Pfeiffer que expresan TIM-3.

Ejemplo 4: Clasificación de grupos de epítomos de unión mediante ensayo de competencia basado en FACS

La relación de los epítomos entre los anticuerpos anti-TIM3 generados y seis anticuerpos de referencia anti-TIM3 se analizó mediante un ensayo de competencia de unión basado en FACS. Los anticuerpos de referencia anti-TIM3 fueron los siguientes: anticuerpos 4177 y 8213 como se describe en el documento US2012/189617, anticuerpos 1.7E10 y 27.12E12 como se describe en el documento WO2013/06490; anticuerpo 344823 (Clon 344823, fabricado por R&D Systems) y anticuerpo F38-2E2 (Clon F38-2E2, fabricado por BioLegend y R&D Systems). En resumen, se permitió que el anticuerpo de prueba interactuara con y se uniera a las células RPMI-8226 que expresan TIM-3 (ATCC® CCL-155™) y, a continuación, se evaluó mediante un procedimiento de citometría de flujo si otro anticuerpo anti-TIM-3 también se podría unir a las células que expresan TIM-3.

En resumen, las células RPMI-8226 que expresaban TIM3 humana se incubaron con Human BD Fc Block durante 10 min a 4 °C y se tiñeron en dos configuraciones experimentales diferentes para excluir el impacto sobre la unión de la diferencia en la afinidad de los anticuerpos sometidos a prueba:

1) con anti-TIM3 purificado divulgado (10 µg/ml en tampón de tinción BD durante 0,5 h a 4 °C), que se conjugó con Alexa*488 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes A-20181) con un promedio de 2,7 fluoróforos por anticuerpo. A continuación, a) se añadieron anticuerpos anti-TIM3 recombinantes de referencia sin marcar (1-4) o control de isotipo (10 µg/ml) durante 0,5 h a 4 °C en BD SB y, después de lavar con BD SB, se tiñeron con Abs anti-huFcγ marcado con PE (JIR, 109-116-098, 1:200, 0,5 h a 4 °C en BD SB) o b) se añadieron anticuerpos anti-TIM3 de referencia marcados con PE (5-6) disponibles o controles de isotipo apropiados (10 µg/ml) durante 0,5 h a 4 °C en BD SB. Después del lavado y la centrifugación, las señales MFI de las células RPMI-8226 teñidas se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

Tabla 5: Resumen de la caracterización de epítomos: competencia de los anticuerpos anti-Tim3 por la unión a Tim3

	% máx. de inhibición de la unión					
	Grupo de epítomo 1			Grupo de epítomo 3		
	1a	1b	3a	3b		
	Tim3_0016	Tim3_0018	Tim3_0026	Tim3_0022	Tim3_0028	Tim3_0038
Clon 4177	1	-9	29	79	-3	0
Clon 8213	-2	9	9	9	38	29
Clon 1.7E10	-5	15	24	0	20	7
Clon 27.2E12	-1	4	22	40	82	94
Clon 344823	0	0	3	102	107	99
Clon F38-2E2	-7	6	2	77	75	94

Los resultados del mapeo de los grupos de epítomos basado en FACS muestran que Tim3_0016 y la variante de Tim3_0016 Tim3_0018 no muestran competencia de unión con ningún anticuerpo de referencia anti-TIM-3 sometido a prueba y se sugirió que estos Abs reconocieron un nuevo epítomo diferente de los epítomos que reconocieron todos los anticuerpos de referencia anti-TIM3 descritos anteriormente, mientras que Tim3_0022, Tim3_0026, Tim3_0028 y Tim3_0038 compiten en diferente grado por la unión a TIM3 expresada en la superficie en células JRPMI-8226 con varios competidores.

Ejemplo 5: Efecto de los anticuerpos anti-TIM-3 humanos sobre la producción de citocinas en una reacción de linfocitos mixtos (RLM)

Se usó una reacción de linfocitos mixtos para demostrar el efecto que tiene el bloqueo de la ruta TIM-3 sobre las

células linfocíticas efectoras. Los linfocitos T en el ensayo se sometieron a prueba para evaluar la activación y la secreción de IFN-gamma en presencia o ausencia de un mAb anti-TIM-3.

Los linfocitos humanos se aislaron de sangre periférica de un donante sano mediante centrifugación por gradiente de densidad usando Leukosep (Greiner Bio One, 227 288). En resumen, la sangre heparinizada se diluyó con tres volúmenes de PBS y se colocaron alícuotas de 25 ml de la sangre diluida en capas en tubos Leukosep de 50 ml. Después de la centrifugación a 800 x g durante 15 min a temperatura ambiente (sin rotura), las fracciones que contenían linfocitos se recogieron, se lavaron en PBS y se usaron directamente en un ensayo funcional o se resuspendieron en medio de congelación (10 % DMSO, 90 % FCS) a $1,0 \times 10^7$ células/ml y se almacenaron en nitrógeno líquido. En el ensayo de RLM se usó una proporción 1:1 de células diana/respondedor (es decir, cada cultivo de RLM contenía $2,0 \times 10^5$ PBMC de cada donante en un volumen total de 200 μ l. Los anticuerpos monoclonales anti-TIM3 Tim3_0016, variante de Tim3_0016 (Tim3_0018), Tim3_0021, Tim3_0022, Tim3_0026, Tim3_0028, Tim3_0030, Tim3_0033, Tim3_0038 y L38-2E2 (BioLegend) se añadieron a cada cultivo en diferentes concentraciones de anticuerpos. No se usó ningún anticuerpo ni anticuerpo de control de isotipo como control negativo y se usó IL-2 rec hu (20 EU/ml) como control positivo. Las células se cultivaron durante 6 días a 37 °C. Después del día 6, se tomaron 100 μ l de medio de cada cultivo para la medición de citocinas. Los niveles de IFN-gamma se midieron utilizando el kit OptEIA ELISA (BD Biosciences).

Los resultados se muestran en la Tabla 6 (secreción/liberación de IFN-g). Los anticuerpos monoclonales anti-TIM-3 promovieron la activación de linfocitos T y la secreción de IFN-gamma de manera dependiente de la concentración. Los anticuerpos anti-TIM3 Tim3_0021, Tim3_0022, Tim3_0028 y Tim3_0038 reducen la liberación de la citocina inflamatoria (IFN-gamma) más que el anticuerpo F38-2E2. Tim3_0016, la variante de Tim3_0016 (Tim3_0018), Tim3_0033 y Tim3_0038 mostraron una liberación similar en comparación con el anticuerpo F38-2E2. Por el contrario, los cultivos que contenían el anticuerpo de control de isotipo no mostraron un incremento en la secreción de IFN-gamma.

Tabla 6a: Porcentaje de liberación de IFN-gamma inducida por anticuerpos anti-Tim3 en comparación con IL-2 rec hu (20 EU/ml) (= 100 %) como control positivo y ausencia de anticuerpo como control negativo

Concentración de compuesto	RLM + IL-2 20 U/ml	Isotipo IgG2a	F38-2E2	Tim3_0016	Tim3_0018	Tim3_0021	Tim3_0022	Tim3_0026	Tim3_0028	Tim3_0030	Tim3_0033	Tim3_0038	Isotipo hlgG 1
40 μ g/ml		2	36	33	36	112	58	25	40	14	35	51	0
10 μ g/ml	100	0	26	22	30	108	38	16	38	4	30	38	5
1 μ g/ml		0	7	7	12	101	18	18	12	3	0	1	0

En otros experimentos se midieron los valores de CE50 de los siguientes anticuerpos quiméricos y humanizados (generados como se describe anteriormente) en combinación con 0,1 μ g/ml de mAb anti-PD1: anticuerpo quimérico chi_Tim3_018 y sus versiones humanizadas Tim3-433 y Tim3-434, anticuerpo quimérico chi_Tim3_028 y sus versiones humanizadas Tim3-438 y Tim3-443 con diferentes mezclas de linfocitos de donantes (D2 y D3 o D1 y D5, respectivamente). Los resultados se muestran en la Tabla 6b.

Tabla 6b: CE50 de la secreción/liberación de IFN-g inducida por anticuerpos anti-Tim3

Anticuerpo	CE50 [nM] con donantes D2+D3	CE50 [nM] con donantes D1+D5
chi_Tim3_018	3,1	4,2
Tim3-433	3,0	2,4
Tim3-434	1,7	2,6
chi_Tim3_028	2,9	6,4
Tim3-438	1,9	2,7
Tim3-443	3,0	4,7

Ejemplo 6: Internalización de anticuerpos anti-TIM-3 en células que expresan TIM-3

Los anticuerpos específicos de TIM-3 descritos en el presente documento se pueden internalizar en células que expresan TIM-3, incluyendo células de linfoma, mieloma múltiple y de LMA que expresan TIM-3. Por ejemplo, se muestra que los anticuerpos específicos de TIM-3 divulgados y fragmentos de los mismos se internalizan en células CHO TIM3 recombinantes que expresan TIM-3 humana de forma estable según se evalúa por ELISA basado en células, citometría de flujo (FACS) y microscopía confocal.

Por ejemplo, células CHO-K1 transfectadas de forma estable con TIM3 (clon 8) (4×10^4 células/pocillo/100 μ l) se

sembraron en MTP de 98 pocillos utilizando medio de cultivo fresco. Después de la unión celular durante la noche, se retiró el medio de cultivo celular y se añadieron los anticuerpos de prueba a las células (10 µg/ml en medio de cultivo celular) y se incubaron durante 0,5 horas a 4 °C. Como referencia se usó un anticuerpo comercial de ratón antihumano (TIM3 MAB 11E365 (US Biological, T5469-92P)). Después del lavado (2 veces con medio de cultivo celular) y centrifugación, las células se incubaron durante 3 horas a a) 4 °C o b) 37 °C en 200 µl de medio de cultivo celular. La internalización se produce típicamente a 37 °C, pero no a 4 °C, lo que proporciona otro control para la reacción. A continuación, las células se fijaron con 100 µl/pocillo de glutaraldehído al 0,05 % (Sigma ref. G5882) en 1 x PBS durante 10 min a temperatura ambiente (TA). A esto le siguieron tres etapas de lavado con 200 µl de PBS-T y se añadió el anticuerpo secundario de oveja antimurino-POD (fragmento F(ab')₂ unido a POD de rábano picante; GE NA9310)) durante 1 hora a TA. Después de las etapas finales de lavado (3 x PBS-T), se añadió sustrato TMB (Roche ref. 11835033001) durante 15 min y se detuvo el revelado del color usando HCl 1 N. Las DO finales se determinaron por medición a 450/620 nm en un lector de ELISA. Este procedimiento ELISA de células se usó para la evaluación del rendimiento medio de la capacidad de internalización de los anticuerpos de prueba que se purificaron a partir de sobrenadantes de hibridoma.

El porcentaje de internalización se calculó como sigue:

$$\text{Internalización [\%]} = (1 - \text{DO}_{\text{muestra}_{37\text{ °C}}} / \text{DO}_{\text{muestra}_{4\text{ °C}}}) * 100$$

Los resultados se muestran en las Figs. 1A y B para (Internalización). Casi todos los anticuerpos monoclonales anti-TIM-3 sometidos a prueba fueron bien internalizados de forma similar en células CHO-K1 transfectadas de forma estable con Tim3 después de 3 h de incubación a 37 °C (no se muestran todos los datos).

La determinación de los valores de CE50 de internalización (dependencia del tiempo), así como la comparación de la cinética de la internalización en función de la monovalencia frente a la bivalencia se estimó mediante FACS para los candidatos seleccionados.

En resumen, se sembraron células CHO-K1 que expresan de forma estable TIM3 humana (4 x 10⁵ células/pocillo/50 µl) en MTP de fondo en V de 98 pocillos usando medio de cultivo fresco y se incubaron con Redimune® NF Liquid durante 10 min a TA para bloquear la unión inespecífica. A continuación, se añadieron 50 µl/pocillo de anticuerpo anti-TIM3 purificado seleccionado (10 µg/ml en medio de cultivo celular) y se incubó durante 1 h a 4 °C. Después del lavado (con medio de cultivo celular) y la centrifugación, las células se incubaron durante 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 24 horas a a) 4 °C o b) 37 °C en 200 µl de medio de cultivo celular. A continuación, las células se lavaron con PBS/BSA al 1 % y se añadieron anticuerpo secundario de cabra anti-F(ab)₂ de IgG murina marcado con Alexa Fluor 488 durante 1 hora a 4 °C. Después del lavado y la centrifugación, se añadieron 125 µl de CellFix (BD Bioscience, 1:1000) y se analizaron las señales MFI de las células teñidas mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

El porcentaje de internalización se calculó como sigue:

$$\text{Internalización [\%]} = (1 - \text{MFI}_{\text{muestra}_{37\text{ °C}}} / \text{MFI}_{\text{muestra}_{4\text{ °C}}}) * 100$$

Ejemplo para la evaluación de la internalización dependiente del tiempo de los anticuerpos anti-TIM3 Tim3_0016, variante de Tim3_0016 (Tim3_0018), Tim3_0021, Tim3_0028, Tim3_0030, Tim3_0033, Tim3_0038 en células RPMI-8226 (ATCC® CCL-155™):

Los anticuerpos anti-TIM3 divulgados actualmente se internalizan rápidamente en células RPMI-8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™) a un nivel alto. Los experimentos se realizaron como se describe anteriormente con células RPMI-8226 que expresan TIM3 (ATCC® CCL-155™) en lugar de células CHO-K1 recombinantes que expresan huTIM-3. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Como anticuerpos de referencia anti-TIM3 se usaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo 8213 como se describe en el documento US2012/189617, anticuerpo 27.12E12 como se describe en el documento WO2013/06490. Tim3_0016, la variante de Tim3_0016 (Tim3_0018) y Tim3_0038 se utilizaron como versiones quiméricas de IgG1 humanas.

Tabla 7: Porcentaje de internalización en el punto de tiempo indicado (0 min establecido como 0 por ciento)

Anticuerpo	Porcentaje de internalización de anticuerpos anti-TIM3				
	30 min	60 min	120 min	240 min	26 h
8213	22	22	43	52	72
27.12E12	19	22	25	46	59
Tim3_0016	33	52	55	66	87
Tim3_0018	39	41	80	70	88
Tim3_0021	70	75	74	78	77

Anticuerpo	Porcentaje de internalización de anticuerpos anti-TIM3				
	30 min	60 min	120 min	240 min	26 h
Tim3_0028	50	59	67	68	83
Tim3_0033	75	81	82	82	80
Tim3_0038	22	20	45	46	63

A partir de los resultados, los anticuerpos de la invención se internalizan rápidamente en un alto porcentaje en comparación con los anticuerpos de referencia en células RPMI-8226 (ATCC® CCL-155™).

5 Ejemplo 7: Unión de anticuerpos anti-TIM-3 a monocitos humanos aislados que expresan TIM-3

Los monocitos CD14+ se aislaron de sangre periférica anticoagulada de donantes sanos por centrifugación por gradiente de densidad usando Ficoll-Paque (GE Healthcare) (véanse los protocolos generales en los manuales de usuario o visite www.miltenyibiotec.com/protocols) y posterior selección positiva por medio de microperlas CD14 MicroBeads. Primero, las células CD14+ se marcan magnéticamente con CD14 MicroBeads. A continuación, la suspensión celular se carga en una columna MACS® que se coloca en el campo magnético de un separador MACS. Las células CD14+ marcadas magnéticamente quedan retenidas en la columna. Las células no marcadas atraviesan la columna y esa fracción celular está empobrecida en células CD14+. Después de retirar la columna del campo magnético, las células CD14+ retenidas magnéticamente se pueden eluir como la fracción celular seleccionada positivamente. Después de la centrifugación a 200 x g durante 10 min a temperatura ambiente, los monocitos se recogieron y se usaron directamente en un ensayo de unión o se resuspendieron en medio de congelación (10 % DMSO, 90 % FCS) a 1,0E+07 células/ml y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Como se muestra en la literatura, los monocitos expresan constitutivamente TIM3 en su superficie. Se colocaron 1 x 10⁵ monocitos humanos CD14+ aislados (50 µl/pocillo) en MTP de fondo en V de 98 pocillos en medio de cultivo fresco y se incubaron con Redimune® NF Liquid durante 15 min a TA para bloquear la unión inespecífica. A continuación, se añadieron 50 µl/pocillo de los mAbs anti-TIM3 divulgados o de los mAbs anti-TIM-3 de referencia 344823 (R&D) y F38-2E2 (BioLegend) (10 µg/ml en medio de cultivo celular) y se incubaron durante 1 h a 4 °C. A continuación, las células se lavaron con PBS/BSA al 1 % y se añadieron anticuerpo secundario de cabra anti-F(ab)₂ de ratón marcado con PE (Jackson Lab 115-006-072) durante 1 hora a 4 °C. Después del lavado y la centrifugación, las señales MFI de las células teñidas se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

La unión específica se calculó como sigue:

Unión específica [MFI] = . media geom. de la MFI_{muestra} – media geom. de la MFI_{control de isotipo}

Los resultados se muestran en la Tabla 8: (Unión a monocitos humanos). Los clones de TIM3 Tim3_0016, Tim3_0018, Tim3_0020, Tim3_0028 y Tim3_0038 se unen a monocitos humanos de diferentes donantes incluso mejor que los Abs anti-TIM-3 de referencia.

Tabla 8: Unión a monocitos humanos

	donante 1 (CD14+)	donante 2 (CD14+)	donante 3 (CD14+)
Tim3_0016	2122	1634	1690
Tim3_0018	2326	1818	1943
Tim3_0020	1917	1377	1462
Tim3_0021	1134	951	1197
Tim3_0022	1468	1111	1235
Tim3_0026	1665	1016	900
Tim3_0030	1411	419	466
Tim3_0038	1637	1368	1401
Tim3_0028	1351	950	1607
Tim3_0033	480	328	595
M-IgG2b	0	13	0
M-IgG1	144	55	213
mAb <TIM-3>PE, IgG1 de ratón (Clon F38-2E2; Biolegend)	516	493	460
mAb <TIM-3>PE, IgG2A de rata (Clon 344823, R&D)	1010	917	814

	donante 1 (CD14+)	donante 2 (CD14+)	donante 3 (CD14+)
IgG2A-PE de rata	71	68	70

Ejemplo 8: Unión de anticuerpos anti-TIM-3 a monocitos de macaco aislados que expresan TIM-3

Los monocitos CD14+ se aislaron de sangre periférica anticoagulada de macaco (Covance) mediante centrifugación por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque (GE Healthcare) (véanse protocolos generales en los manuales de usuario o visite www.miltenyibiotec.com/protocols) y la posterior selección positiva por medio de microperlas NHP CD14 MicroBeads. Primero, las células CD14+ se marcan magnéticamente con CD14 MicroBeads. A continuación, la suspensión celular se carga en una columna MACS® que se coloca en el campo magnético de un separador MACS. Las células CD14+ marcadas magnéticamente quedan retenidas en la columna. Las células no marcadas atraviesan la columna y esa fracción celular está empobrecida en células CD14+. Después de retirar la columna del campo magnético, las células CD14+ retenidas magnéticamente se pueden eluir como la fracción celular seleccionada positivamente. Después de la centrifugación a 200 x g durante 10 min a temperatura ambiente, los monocitos se recogieron y se usaron directamente en un ensayo de unión o se resuspendieron en medio de congelación (10 % DMSO, 90 % FCS) a 1,0E+07 células/ml y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Como se muestra en la literatura, los monocitos expresan constitutivamente TIM3 en su superficie. Se colocaron 1 x 10⁵ monocitos de macaco CD14+ aislados (50 µl/pocillo) en MTP de fondo en V de 96 pocillos en medio de cultivo fresco y se incubaron con Redimune® NF Liquid durante 15 min a TA para bloquear la unión inespecífica. Se añadieron 50 µl/pocillo de anticuerpo anti-TIM3 marcado con Alexa488 (10 µg/ml en medio de cultivo celular) y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Después del lavado y la centrifugación, las señales MFI de las células teñidas se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

La unión específica se calculó como sigue:

Unión específica [MFI] = . media geom. de la MFI_{muestra} – media geom. de la MFI_{control de isotipo}

Los resultados se muestran en la Tabla 9 (Unión a monocitos de macaco). Los clones de TIM3 Tim3_0016, Tim3_0018, Tim3_0026, Tim3_0028 y Tim3_0030 se unen a los monocitos de diferentes macacos donantes.

Tabla 9: Unión a monocitos de macaco (cyno)

	cyno1 (16719M) CD14+	cyno2 (17435M) CD14+	cyno3 (30085F) CD14+
AF+PI	75	83	84
humTIM-3 Alexa488 R&D (34482)	158	121	143
IgG2A-Alexa488 de rata	84	86	91
humTIM-3 A488 F38-2E2 (NOVUS Biol)	135	136	124
IgG1-Alexa 488 de ratón	72	82	83
Tim3_0016-A488	157	177	187
Variante de Tim3_0016 0018-A488	301	480	417
Tim3_0022 A488	115	134	138
Tim3_0026 A488	137	184	197
Tim3_0028 A488	3936	2996	4090
Tim3_0038 A488	97	107	120
Tim3_0020 A488	274	378	354
Tim3_0021 A488	348	473	399
Tim3_0030 A488	119	163	144
Tim3_0033 A488	71	81	83
TIM-3 (4177) A488	78	83	85
TIM-3 (8213) A488	75	83	87

Ejemplo 9: Unión de anticuerpos anti-TIM-3 a líneas celulares de LNH y MM que expresan TIM-3

La capacidad de unión de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados y de dos clones de anticuerpos de referencia anti-TIM3 (1) 4177 y (2) 8213 (Kyowa) se analizó mediante FACS. En resumen, las células de linfoma de linfocitos B que expresan TIM3 humana (ejemplificadas como células Pfeiffer) y las células de mieloma múltiple (ejemplificadas como células RPMI-8226) se incubaron con Human BD Fc Block durante 10 min a TA para bloquear la unión inespecífica.

A continuación, se colocaron 2×10^5 células (50 μ l/pocillo) en MTP de fondo en V de 98 pocillos y se añadieron 50 μ l/pocillo de anticuerpo anti-TIM3 marcado con Alexa488 (10 μ g/ml en tampón de tinción BD) y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Después del lavado y la centrifugación, las señales MFI de las células teñidas se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSCanto de BD Biosciences.

La unión específica se calculó como sigue:

Unión específica [MFI] = . media geom. de la MFI_{muestra} - media geom. de la MFI_{control de isotipo}

Los resultados se muestran en las Figs. 2A y 2B (Unión a células RPMI-8226 y Pfeiffer).

Ejemplo 10: Actividad citotóxica de anticuerpos anti-TIM-3 en células de LNH y MM que expresan TIM-3

Los anticuerpos específicos de TIM3 conjugados con exotoxina de *Pseudomonas* (PE 24) eliminan eficazmente las células que expresan TIM3.

La actividad citotóxica de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados y de un clon de anticuerpo de referencia anti-TIM3 disponible comercialmente 11E365 (disponible en US Biological) se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega. En resumen, a 5×10^3 células CHO-K1 recombinantes que expresan TIM-3 humana de forma estable (50 μ l/pocillo en MTP de 98 pocillos, por triplicado) o 2×10^4 células linfoma de linfocitos B que expresan TIM3 humana (50 μ l/pocillo en MTP de 98 pocillos, por triplicado) (ejemplificadas como células Pfeiffer) o células de mieloma múltiple (ejemplificadas como células RPMI-8226) se añadieron 25 μ l/pocillo de dilución en serie 1:5 de los anticuerpos anti-TIM-3 divulgados con la concentración más alta de 10 μ g/ml o medios apropiados para células sin tratar o control de isotipo para células tratadas no diana. El tratamiento varía desde 10 μ g/ml hasta 1 ng/ml por triplicado. Todos los anticuerpos se usaron como versiones de Fcy de ratón de longitud completa. Para la conjugación de la exotoxina de *Pseudomonas* se añadieron 10 μ g/ml de Fabs específicos de fragmentos Fcy de ratón conjugados con PE 24 y se incubaron durante 3 días a 37 °C. La cicloheximida, como inhibidor conocido de la síntesis de proteínas en eucariotas, se usó como control positivo. La viabilidad de las células tratadas se midió con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega.

La actividad citotóxica se calculó como sigue:

Inhibición relativa [%] = $(1 - (E_{\text{muestra}} - E_{\text{control negativo}}) / (E_{\text{control positivo}} - E_{\text{control negativo}})) \times 100$

Los resultados se muestran en la Tabla 10 (Actividad citotóxica de mAbs anti-TIM3 en líneas celulares recombinantes de LNH y MM que expresan TIM-3 en formato sándwich).

Tabla 10:

Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	CI50 [nM]		
	Células CHO recTIM-3	Células Pfeiffer	RPMI-8226
Tim3_0016	0,04	0,09	0,55
Variante 1 de Tim3_0016 (Tim3_0018)	0,05	0,10	0,66
Tim3_0020	0,07	0,11	>64
Tim3_0021	0,04	0,10	5,9
Tim3_0022	0,02	0,07	0,36
Tim3_0023	0,03	0,08	>64
Tim3_0026	0,03	0,08	>64
Tim3_0030	0,03	0,10	>64
Tim3_0033	0,11	0,20	0,79
Tim3_0038	0,01	< 0,002	0,16
Clon 11E365 (US Biological)	0,7	1,2	1,1
Células sin Ab	-	-	-
Células + <mFc> Fab PE	-	-	-
IgG2A + <mFc> Fab PE	-	-	-
Cicloheximida	135	181	245

Todos los clones TIM3 sometidos a prueba son altamente potentes (intervalo de CI50 0,01-0,2 nM) en células CHO-

K1 recombinantes que expresan TIM-3 de forma estable y células Pfeiffer que expresan niveles altos y moderados de TIM-3 e incluso más potentes en cuanto a su actividad citotóxica que el clon 11E365 de anticuerpo anti-TIM-3 de referencia con internalización potente de US Biological. Los clones de TIM3 0016, 0018, 0021, 0022, 0033 y 0038 también son potentes en células RPMI-8226, expresando un nivel de TIM-3 5 veces menor que las células CHO TIM-3 recombinantes.

Ejemplo 11: Comparación de la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados frente a dos anticuerpos de referencia anti-TIM3 1.7E10 y 27.12E12 (como se describe en el documento WO2013/06490).

La actividad citotóxica de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados y de dos anticuerpos anti-TIM3 de referencia, los anticuerpos de referencia TIM3 1.7E10 y 27.12E12 como se describe en el documento WO2013/06490, se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente. Todos los anticuerpos se usaron con formato de IgG1 humana de longitud completa, incluida la parte del Fc gamma humano. En este experimento, la conjugación de la exotoxina de *Pseudomonas* se logró a través de Fabs específicos del fragmento Fc gamma humano conjugado a PE 24 (10 µg/ml) que se añadieron e incubaron durante 5 días a 37 °C.

Los resultados se muestran en la Tabla 11. - Comparación de la actividad citotóxica de mAbs anti-TIM3 en líneas celulares de LNH y MM que expresan TIM-3

Tabla 11: Comparación de la actividad citotóxica de mAbs anti-TIM3 en líneas celulares de LNH y MM que expresan TIM-3

Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	Células Pfeiffer		Células RPMI-8226	
	Eliminación máx.	CI50 rel. [nM]	Eliminación máx.	CI50 rel. [nM]
Cicloheximida	100 [%]	271	100 [%]	111
1.7E10	60,3 [%]	0,68	65,7 [%]	2,544
27-12E12	75,7 [%]	0,02	86,6 [%]	0,111
Tim3_0016	84,9 [%]	0,05	86,6 [%]	0,063
Variante de Tim3_0016 (Tim3_0018)	82,9 [%]	0,06	88,1 [%]	0,081
Tim3_0026	78,3 [%]	<0,02	83,1 [%]	0,067
Tim3_0038	82,6 [%]	<0,02	83,8 [%]	0,047
Control de isotipo hIgG1	3,2 [%]	N.D.	0,4 [%]	N.D.

Todos los clones TIM3 divulgados son altamente activos (intervalo de CI50 0,02-0,08 nM) en células Pfeiffer y RPMI-8226 que expresan TIM-3 e incluso más potentes en cuanto a su actividad citotóxica que el clon 27.2E12 de anticuerpo anti-TIM-3 de referencia con internalización potente. Todos los anticuerpos se compararon como conjugados de exotoxina de *Pseudomonas* (PE24) usando la misma exotoxina de *Pseudomonas* en las mismas condiciones

Ejemplo 12: Actividad citotóxica de las construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados en líneas celulares de MM, LNH y LMA (que expresan TIM3, pero no PSMA).

La actividad citotóxica se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente. Se incubaron diluciones seriadas 1:5 de fragmentos Fab de anticuerpos anti-TIM3 divulgados directamente conjugados a PE24 con la concentración más alta de 50 µg/ml o medio apropiado para células no tratadas o control Fab-PE24 anti-PSMA sin unión para células tratadas no diana con $7,5 \times 10^3$ células Pfeiffer o 2×10^3 células RPMI-8226 (50 µl/pocillo en MTP de 96 pocillos) durante 4 días a 37 °C. El tratamiento varía desde 50 µg/ml hasta 8 ng/ml por triplicado. Se usó cicloheximida como control positivo.

Los resultados se muestran en la Tabla 12. (Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados en líneas celulares de MM, LNH y LMA).

Tabla 12: Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados en diferentes líneas celulares de MM, LNH y LMA (RPMI-8226, Karpas-299, CMK, TF-1, MOLM-13)

	RPMI-8226		Karpas-299		CMK		TF-1		MOLM-13	
Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	Eliminación máx.	CI50 [nM]	Eliminación máx.	CI50 [nM]	Eliminación máx.	CI50 [nM]	Eliminación máx.	CI50 [nM]	Eliminación máx.	CI50 [nM]
Cicloheximida	100 [%]	281	100 [%]	113	100 [%]	149,0	100 [%]	207	100 [%]	156
Anti_PSMA	10,5 [%]	N.D.	40,1 [%]	N.D.	8,98 [%]	N.D.	5,27 [%]	N.D.	18,9 [%]	N.D.
Tim3_0022	99,1 [%]	1,9	98,8 [%]	10	67,1 [%]	255	58,6 [%]	299	58,5 [%]	579
Tim3_0016	99,3 [%]	1,1	99,2 [%]	4	64,8 [%]	225	54,2 [%]	534	62,7 [%]	459

5 Todas las construcciones Fab-PE24 sometidas a prueba de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados son altamente potentes (intervalo de CI50 1-10 nM) en células de MM (RPMI-8226) y de LNH (Karpas-299) que expresan un nivel moderado de TIM-3 y demuestran una actividad citotóxica significativa en líneas celulares de LMA (CMK, TL-1, MOLM-13) que expresan niveles muy bajos de TIM-3.

10 **Ejemplo 13: Actividad citotóxica de inmunoconjugados (conjugados de exotoxina de *Pseudomonas* A (construcciones Fab-PE24) de anticuerpos anti-TIM3 divulgados en células madre/progenitoras de LMA primaria de pacientes recidivantes/resistentes**

15 Se obtuvieron linfocitos CD34+ de sangre periférica de pacientes recidivantes/resistentes de AllCells, LLC, Alameda, CA, EE. UU.

Tabla 13: Características clínicas de los pacientes con LMA

Muestras	Donante	Diagnóstico clínico	Sexo	Edad: años	Subtipo de FAB	Linfocitos [x 10 ⁹ /l]	Linfocitos CD34+ [%]	PLT [x 10 ⁹ /l]	Anomalía citogén.
LMA1	EBO PB0136	LMA recid./resist.	F	64	M2	4	50		N.D.
LMA2	EBO PB0142	LMA recid./resist.	F	35	N.D.	65	22		Normal
LMA3	EBO PB0135	LMA recid./resist.	M	72	M0	4	15		N.D.
LMA4a	EBO PB0193	LMA recid./resist.	M	76	N.D.	21	52		der(7)t(7;? 13)

20 Después de la confirmación de la pureza y la viabilidad de todas las muestras (intervalo de pureza 84-94 % e intervalo de viabilidad 95-99 %), el nivel de expresión de TIM-3 se evaluó por FACS como se describe en el Ejemplo 7 usando mAbs anti-TIM-3 344823 (R&D). (véase la Figura 3)

25 Todas las muestras madres/progenitoras (CD34+) de LMA primaria (4/4) sometidas a prueba de pacientes recidivantes/resistentes demuestran una expresión homogénea de TIM-3 a diferentes niveles.

30 Para la evaluación de la actividad citotóxica de las construcciones Fab-PE24 de los clones anti-TIM3 0016 y 0022 divulgados en linfocitos CD34+ de LMA primaria, se incubaron 1 x 10⁴ células (50 µl/pocillo en MTP de 96 pocillos, por triplicado) con diluciones seriadas 1:5 de fragmentos Fab con la concentración más alta de 50 µg/ml o medios apropiados para células no tratadas o control de Fab-PE24 anti-PSMA sin unión para células tratadas no diana durante 3 días a 37 °C. Se usó cicloheximida como control positivo. La actividad citotóxica se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente en el Ejemplo 12.

35 Los resultados se muestran en la Tabla 14. (Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados en linfocitos CD34+ de LMA primaria).

Tabla 14: Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 divulgados en células CD34+ de LMA primaria

	D1; células PB0136 CD34+ de LMA		D2; células PB0142 CD34+ de LMA		D3; células PB0135 CD34+ de LMA		D4; células PB0193 CD34+ de LMA	
Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	Eliminación máx.	CI50 [nM]	Eliminación máx.	CI50 [nM]	Eliminación máx.	CI50 [nM]	Eliminación máx.	CI50 [nM]
Cicloheximida	100 [%]	212	100 [%]	262	100 [%]	121	100 [%]	208
Anti-PSMA	2 [%]	N.D.	8 [%]	N.D.	18 [%]	N.D.	12 [%]	N.D.
TIM-3 0022-cFP	38 [%]	>691	75 [%]	107	31 [%]	>691	57 [%]	375
TIM-3 0016-cFP	48 [%]	>691	79 [%]	30	44 [%]	>691	69 [%]	116

5 Las construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 Tim3_0016 y Tim3_0022 son altamente potentes en muestras de LMA primaria (2/4) (PB0142 y PB0135) (intervalo de CI50 30-116 nM) y demuestran una actividad citotóxica significativa en todas las células madre/progenitoras (CD34+) de LMA primaria (4/4) que expresan diferentes niveles de TIM-3.

10 **Ejemplo 14: Comparación de la potencia de las construcciones Fab-PE24 de anticuerpos anti-TIM3 seleccionados en líneas celulares de LNH y MM**

La evaluación de la actividad citotóxica de las construcciones Fab-PE24 acopladas a sortasa de anticuerpos anti-TIM3 divulgados seleccionados se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente en el Ejemplo 12.

Los resultados se muestran en la Tabla 15. (Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de anticuerpos anti-TIM3 seleccionados en células de LNH y MM).

20 **Tabla 15: Actividad citotóxica de construcciones Fab-PE24 de anticuerpos anti-TIM3 seleccionados en células de LNH y MM**

	Células Pfeiffer		Células RPMI-8226	
Anticuerpos y referencias (todos los anticuerpos anti-TIM3 conjugados con una exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> desinmunizada)	Eliminación máx.	CI50 [nM]	Eliminación máx.	CI50 [nM]
Cicloheximida	100 [%]	271,1	100 [%]	153
Anti-PSMA	25,2 [%]	N.D.	21,5 [%]	N.D.
TIM-3 0022	99,9 [%]	1,58	99,6 [%]	2,14
TIM-3 0016	99,6 [%]	0,77	99,2 [%]	0,61
TIM-3 0021	98,4 [%]	2,15	99,1 [%]	3,61
TIM-3 0033	99,8 [%]	5,30	99,7 [%]	5,73
TIM-3 0038	99,6 [%]	0,47	98,3 [%]	0,32

25 Se demostró una alta potencia citotóxica con las construcciones Fab-PE24 de todos los anticuerpos anti-TIM3 divulgados seleccionados (intervalo de CI50 0,3-5 nM) en células de LNH (Pfeiffer) y MM (RPMI-8226) que expresan un nivel moderado de TIM-3.

La actividad citotóxica más alta se observó con las construcciones Fab-PE24 de los anticuerpos anti-TIM3 Tim3_0016 y Tim3_0038 divulgados.

30 **Ejemplo 15: Comparación de la actividad citotóxica de la construcción Fab-PE24 frente al conjugado IgG total-amatoxina del mismo clon del anticuerpo anti-TIM-3 divulgado en células Pfeiffer**

La evaluación de la actividad citotóxica de la construcción Fab-PE24 conjugada del clon 0016 anti-TIM3 divulgado frente a la IgG total del mismo clon conjugada con amatoxina (de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO2012/041504 (conjugado a través del átomo de C 6' del aminoácido 4 de amatoxina, en particular a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina, y en el que el anticuerpo anti-TIM3 está conectado por un conector a través de un resto de urea) se analizó con el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo de Promega como se describe anteriormente en el Ejemplo 12.

Los resultados se muestran en la Tabla 16. (Actividad citotóxica de la construcción Fab-PE24 frente al conjugado IgG total-amatoxina del clon anti-TIM3 0016 en células de LNH).

Tabla 16: Actividad citotóxica de la construcción Fab-PE24 frente al conjugado IgG total-amatoxina del clon anti-TIM3 0016 en células de LNH

Células Pfeiffer	Eliminación máx.	CI50 [nM]
Cicloheximida	100 [%]	163
Isotipo hlgG1-amatoxina	28 [%]	N.D.
TIM-3 0016-amatoxina	93,3 [%]	0,81
TIM-3 0016-PE24	99,8 [%]	0,25

La actividad citotóxica del clon 0016 anti-TIM-3 conjugado con amanitina (CI50 0,8 nM) es comparable a la actividad citotóxica de la construcción Fab-PE24 del mismo clon (CI50 0,3 nM) en células de LNH (Pfeiffer) que expresan un nivel moderado de TIM-3.

Ejemplo 15: Comparación directa de la unión de los anticuerpos anti-TIM3 a diferentes células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Ensayo de unión

PBMC recién aisladas o linfocitos T CD4 activados policlonalmente durante 3 días (anticuerpos anti-CD3 unidos a placa y anticuerpos anti-CD28 solubles, 1 µg/ml cada uno, ambos de BD Pharmingen) se tiñeron con anticuerpos anti-TIM conjugados directamente con Alexa 647 Tim3- 0018, Tim3-0028 o versiones quimerizadas o humanizadas de los mismos durante 1 hora a 4 °C. A continuación, las células se lavaron para eliminar el anticuerpo no unido y se tiñeron para marcadores de superficie durante 30 minutos a 4 °C para discriminar los monocitos (CD14+ (BD Pharmingen)), los linfocitos NK (CD16+ (eBioscience), CD56+ (BioLegend) y CD3-) y linfocitos T (CD3+ (eBioscience)) antes de fijarse con BD Cell Fix. Las células fueron adquiridas a LSRFortessa, BD Biosciences.

Los resultados se muestran en las Figuras 4A a 4D (en las Figuras se usaron las siguientes denominaciones: 0018 (aTIM-3) para Tim3-0018, 0434 (h0018) para la versión humanizada de Tim3-0018 Tim3-0434, 0028 (aTIM-3) para Tim3-0028, chi0028 para Tim3-0028 quimérico, 0438 (h0028) para la versión humanizada de Tim3-0028 Tim3-0438). Los datos muestran que los anticuerpos humanizados presentan unión y especificidad de unión a linfocitos T CD4 mejoradas respecto a los anticuerpos originales.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> ANTICUERPOS ANTI-TIM3 Y PROCEDIMIENTOS DE USO

<130> 32411

5 <150> EP14192175.9
<151> 06-11-2014

<150> EP15188056.4
<151> 02-10-2015

<160> 86

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met
1 5

<210> 2
<211> 3
<212> PRT
20 <213> *Mus musculus*

<400> 2

Leu Asn Asp
1

<210> 3
<211> 8
25 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 3

Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp
1 5

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 4

Ser Ser Ser Val Asn Tyr
1 5

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 10 <213> *Mus musculus*

<400> 5

Asp Ala Phe
1

<210> 6
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 6

Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
 20 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 7

ES 2 763 548 T3

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Arg Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ala Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Arg Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ala Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 8

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Thr
20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 9

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Arg Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ala Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ile Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

ES 2 763 548 T3

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 10

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Thr
 20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 11

Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 12

Ser Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 13

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 14

<211> 3

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 14

Ser Asp Ser
1

<210> 15

15 <211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 15

Gly Tyr Tyr Ala Trp Tyr Tyr Phe Asp
1 5

20 <210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 16

Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
1 5

25

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 17

Tyr Ala Ser
1

<210> 18

5 <211> 6

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 18

Ser Asn Ser Trp Pro Leu
1 5

10 <210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Gln Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Leu Leu His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

15

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Ala Trp Tyr Tyr Phe Asp Cys Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 20

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser His Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60

Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Phe Asn Ser Val Glu Thr
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 21

Gly Asp Ser Ile Ala
 1 5

<210> 22
 <211> 3
 <212> PRT
 10 <213> *Mus musculus*

<400> 22

Tyr Ser Gly
 1

<210> 23
 <211> 4
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 23

Asp Tyr Phe Asp
 1

<210> 24
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 24

Arg Gln Asp Val Arg Lys Asn
 1 5

25 <210> 25
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 25

Tyr Thr Ser

1

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 26

Tyr Asp Asn Leu Pro Phe

1

5

<210> 27

<211> 114

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 27

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Ala Ser Ala
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

Thr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

15 <210> 28

ES 2 763 548 T3

<211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 28

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Tyr Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Arg Gln Asp Val Arg Lys Asn
 20 25 30

Ile Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Asn Ile Asn Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
 100 105

5

<210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 29

Gly Tyr Thr Phe Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 30

Glu Thr Tyr
1

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 31

Gly Tyr Pro Ala
1

<210> 32

<211> 12

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 32

Ser Arg Thr Ile Leu His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 33

15 <211> 3

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 33

Lys Val Ser
1

20 <210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 34

Asp Ser His Val Pro Phe
1 5

25

<210> 35

<211> 115

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 35

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Thr Glu Thr Tyr Glu Pro Thr Phe Gly Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Phe Phe Cys
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Tyr Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Val Val Ile
100 105 110

Val Ser Ala
115

5 <210> 36

<211> 112

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 36

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Thr Ile Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 37

Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
1 5

<210> 38

<211> 3

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 38

Ala Asp Asp

1

15 <210> 39

<211> 8

<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 39

Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala
1 5

5 <210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 40

Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
1 5

10 <210> 41
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 41

Tyr Ala Ser
1

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
20 <213> *Mus musculus*

<400> 42

His Tyr Ser Ser Pro Tyr
1 5

<210> 43
<211> 119
25 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 43

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Asp Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Phe Ser Ala
115

- 5 <210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 44

Asn Ile Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 45

Gly Tyr Pro Phe Ser Glu Tyr
1 5

<210> 46

<211> 3

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 46

Glu Thr Gly
1

<210> 47

15 <211> 4

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 47

Gly Tyr Pro Ala
1

<210> 48

5 <211> 12

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 48

Ser Arg Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

10 <210> 49

<211> 3

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 49

Lys Val Ser
1

15 <210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20 <400> 50

Asp Ser His Val Pro
1 5

<210> 51

<211> 115

<212> PRT

25 <213> *Mus musculus*

<400> 51

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Ser Glu Tyr
20 25 30

Ser Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Val Tyr Val Asn Thr Glu Thr Gly Gln Pro Ile Val Gly Asp Asp Phe
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Val Leu Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Gly Gly Gly Gly Tyr Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 52

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Asp
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 53

5 <211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 53

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
1 5

10 <210> 54

<211> 3

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 54

Ala Thr Gly
1

15

<210> 55

<211>	8
<212>	PRT
<213>	<i>Mus musculus</i>

<400> 55

5 Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Met Asp
1 5

<210>	56
<211>	7
<212>	PRT
<213>	<i>Mus musculus</i>

10 <400> 56

Ser Glu Asn Ile Phe Ser Asn
1 5

<210>	57
<211>	3
<212>	PRT
<213>	<i>Mus musculus</i>

<400> 57

Ser Ala Thr
1

<210>	58
<211>	6
<212>	PRT
<213>	<i>Mus musculus</i>

<400>	58
-------	----

Phe Tyr Lys Ile Pro Phe
1 5

	<210>	59
25	<211>	121
	<212>	PRT
	<213>	<i>Mus musculus</i>

<400> 59

ES 2 763 548 T3

Gln Gly Gln Met His Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Ile Ser Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Trp Ile Tyr Ala Ala Thr Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Thr Asn Lys Ala Gln Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ala Gly Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Asn

ES 2 763 548 T3

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Asn Leu Gly Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Lys Ile Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 61

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
1 5

<210> 62

<211> 3

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 62

Glu Asp Gly
1

<210> 63

15 <211> 8

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 63

His Gly Tyr Val Gly Trp Phe Ala
1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 64

Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr
1 5

<210> 65

<211> 3

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 65

Gly Ala Ser
1

<210> 66

15 <211> 6

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 66

Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp
1 5

20 <210> 67

<211> 119

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 67

ES 2 763 548 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Leu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Leu Ile Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Ile Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Asp His Gly Tyr Val Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 68

<211> 107

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 68

Asn Val Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ile Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Phe Arg
100 105

<210> 69

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> una variante 1 de endotoxina A de *Pseudomonas* ejemplar (ejemplo de PE24 desinmunizado)

<400> 69

Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser
1 5 10 15

Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His
20 25 30

Ala Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr
35 40 45

Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Ala Ala Arg
50 55 60

Ser Gln Asp Leu Ala Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp
65 70 75 80

Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala
85 90 95

10

Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Ala Ser
100 105 110

Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu
115 120 125

Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Ala
130 135 140

Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr
145 150 155 160

Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
165 170 175

Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser
180 185 190

Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser
195 200 205

Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
210 215

Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Ala Ser
100 105 110

Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu
115 120 125

Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Ala
130 135 140

Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr
145 150 155 160

Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
165 170 175

Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser
180 185 190

Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser
195 200 205

Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
210 215

<210> 70

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> una variante 2 de endotoxina A de *Pseudomonas* ejemplar (ejemplo de PE24 desinmunizado)

<400> 70

Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser
1 5 10 15

Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His
20 25 30

Ala Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr
35 40 45

ES 2 763 548 T3

Ala Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg
50 55 60

Ser Gln Asp Leu Arg Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp
65 70 75 80

Pro Ala His Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg
85 90 95

Gly Arg Ile Ala Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Ala Ser
100 105 110

Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu
115 120 125

Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg
130 135 140

Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Glu Glu Thr
145 150 155 160

Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
165 170 175

Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser
180 185 190

Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser
195 200 205

Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
210 215

<210> 71

<211> 107

<212> PRT

5 <213> *Homo Sapiens*

<400> 71

ES 2 763 548 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 72

5 <211> 105

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 72

ES 2 763 548 T3

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 73

<211> 330

5 <212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 73

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

ES 2 763 548 T3

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

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 74

<211> 330

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 74

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser	Thr	Ser	Gly 20	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys 30	Asp	Tyr
Phe	Pro	Glu 35	Pro	Val	Thr	Val	Ser 40	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala 45	Leu	Thr	Ser
Gly	Val 50	His	Thr	Phe	Pro	Ala 55	Val	Leu	Gln	Ser	Ser 60	Gly	Leu	Tyr	Ser
Leu 65	Ser	Ser	Val	Val	Thr 70	Val	Pro	Ser	Ser	Ser 75	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr 80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val 85	Asn	His	Lys	Pro	Ser 90	Asn	Thr	Lys	Val	Asp 95	Lys
Lys	Val	Glu	Pro 100	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys 105	Thr	His	Thr	Cys	Pro 110	Pro	Cys
Pro	Ala	Pro 115	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly 120	Pro	Ser	Val	Phe	Leu 125	Phe	Pro	Pro
Lys	Pro 130	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 135	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro 140	Glu	Val	Thr	Cys
Val 145	Val	Val	Asp	Val	Ser 150	His	Glu	Asp	Pro	Glu 155	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val 165	Glu	Val	His	Asn	Ala 170	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 175	Glu
Glu	Gln	Tyr	Asn 180	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val 185	Val	Ser	Val	Leu	Thr 190	Val	Leu
His	Gln	Asp 195	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 200	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 205	Val	Ser	Asn
Lys	Ala 210	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 215	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser 220	Lys	Ala	Lys	Gly
Gln 225	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 230	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro 235	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu 240

ES 2 763 548 T3

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 75

<211> 330

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 75

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

ES 2 763 548 T3

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 76

<211> 327

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 76

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

ES 2 763 548 T3

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 77

<211> 280

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 77

ES 2 763 548 T3

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60

Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr
65 70 75 80

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60

Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr
65 70 75 80

ES 2 763 548 T3

Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile
85 90 95

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Gly Leu
180 185 190

Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe Lys Trp Tyr Ser His
195 200 205

Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile Ser Leu Ala Asn Leu
210 215 220

Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu Gly Ile Arg Ser Glu
225 230 235 240

Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr Glu Val Glu Glu Pro
245 250 255

Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln Gln Pro Ser Gln Pro
260 265 270

Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
275 280

<210> 78

<211> 181

5 <212> PRT

ES 2 763 548 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 78

```

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro
1          5          10          15
Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
          20          25          30
Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
          35          40          45
Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
          50          55          60
Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr
65          70          75          80
Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile
          85          90          95
Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
          100          105          110
Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
          115          120          125
Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130          135          140
Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145          150          155          160
Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
          165          170          175
Thr Ile Arg Ile Gly
          180

```

5

<210> 79

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 763 548 T3

<220>

<223> versión humanizada de VH de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433)

<400> 79

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ala Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 80

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> versión humanizada de VL de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433)

<400> 80

ES 2 763 548 T3

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

Asp Lys Val Asn Ile Ala Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Thr
20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 81

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> versión humanizada de VH de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434)

<400> 81

ES 2 763 548 T3

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

ES 2 763 548 T3

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ala Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 82

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> versión humanizada de VL de la variante de Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434)

<400> 82

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Thr
20 25 30

Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

ES 2 763 548 T3

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 83

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> versión humanizada de VH de Tim3-0028 (= Tim3-0438)

<400> 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Asp Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> versión humanizada de VL de Tim3-0028 (= Tim3-0438)

<400> 84

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 85

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 763 548 T3

<223> versión humanizada de VH de Tim3-0028 (= Tim3-0443)

<400> 85

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Asp Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser
115

5 <210> 86

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> versión humanizada de VL de Tim3-0028 (= Tim3-0443)

<400> 86

ES 2 763 548 T3

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

ES 2 763 548 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a TIM3, en el que el anticuerpo comprende
 - 5 i) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 83 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 84; o
 - ii) una secuencia de VH de SEQ ID NO: 85 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 86.
- 10 2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 83 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 84.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende
- 15 una secuencia de VH de SEQ ID NO: 85 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 86.
4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.
- 20 5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo IgG1 de longitud completa con mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).
6. El ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 25 7. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico del modo de realización 6.
8. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped del modo de realización 7 de modo que se produzca el anticuerpo.
- 30 9. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende además recuperar el anticuerpo de la célula huésped.
10. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un agente citotóxico.
- 35 11. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el inmunoconjugado de la reivindicación 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el inmunoconjugado de la reivindicación 10 para su uso como medicamento.
- 40 13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el inmunoconjugado de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento del cáncer.

Figura 1A

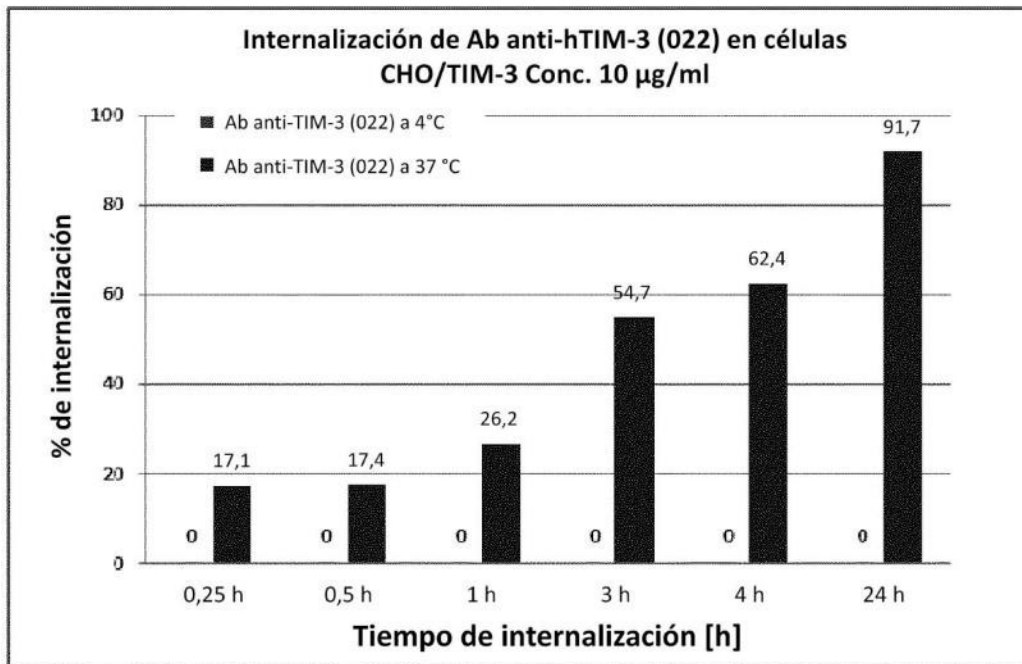


Figura 1B

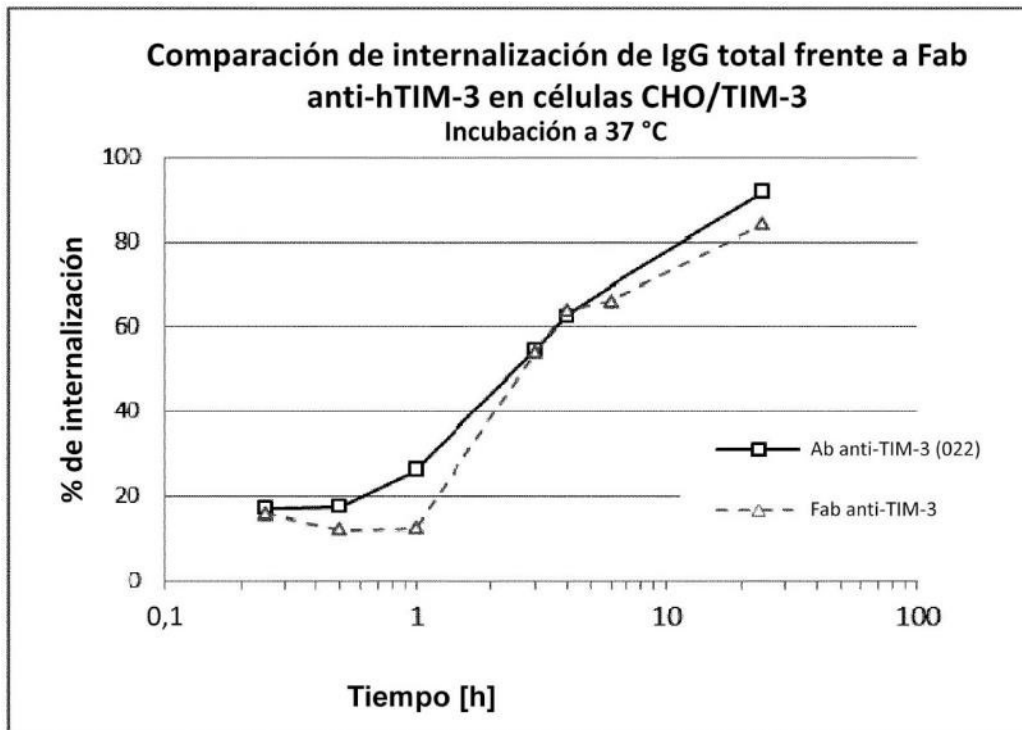


Figura 2A

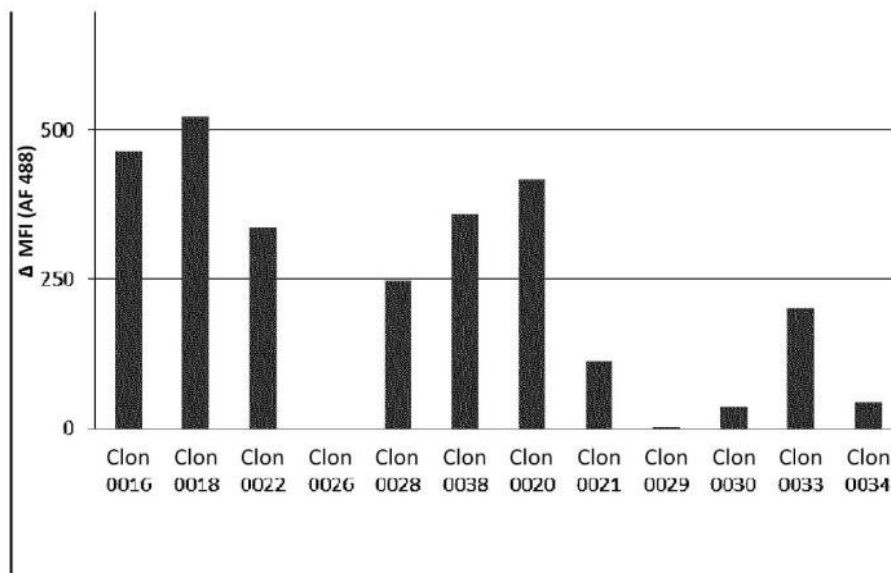


Figura 2B

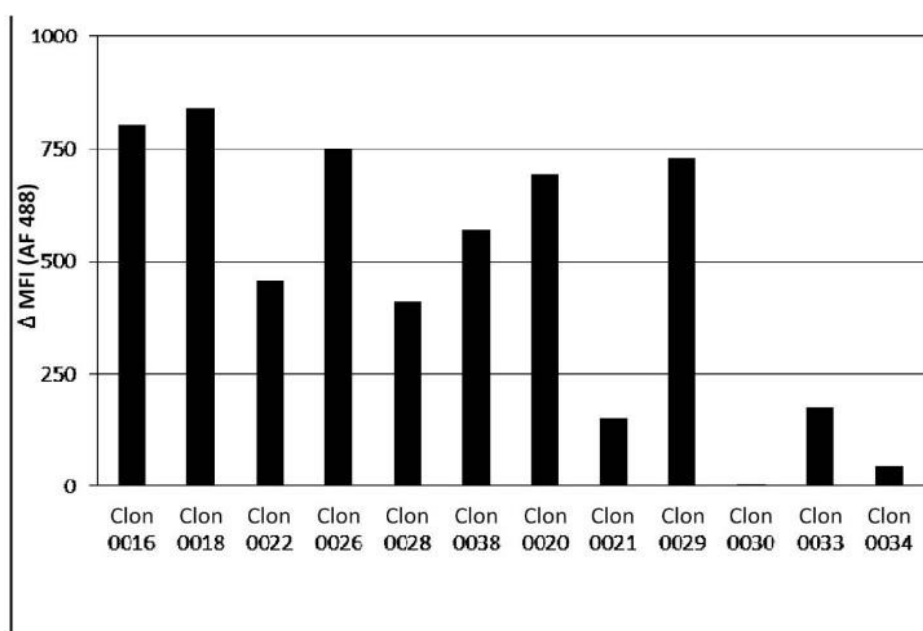


Figura 3

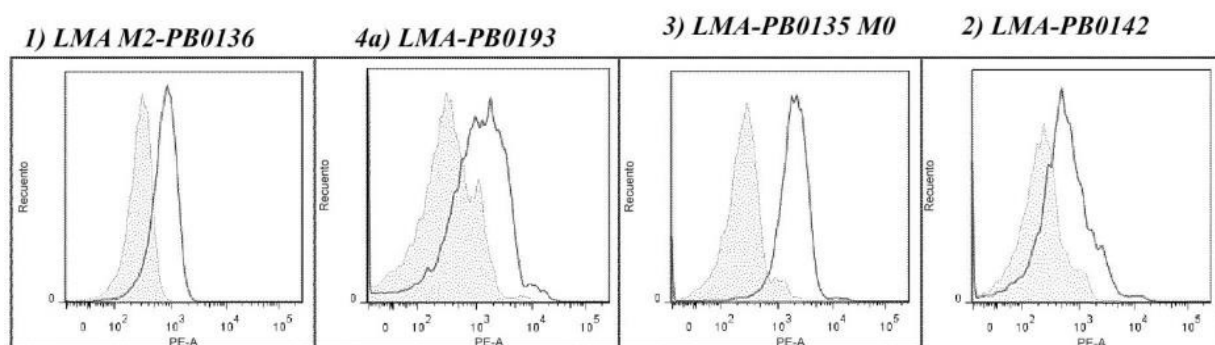


Figura 4A

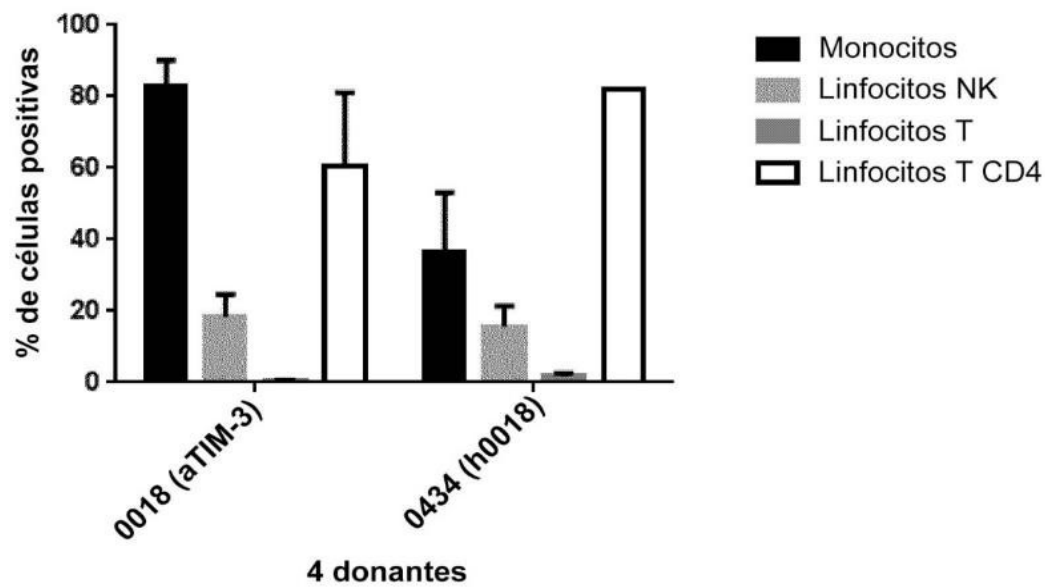


Figura 4B

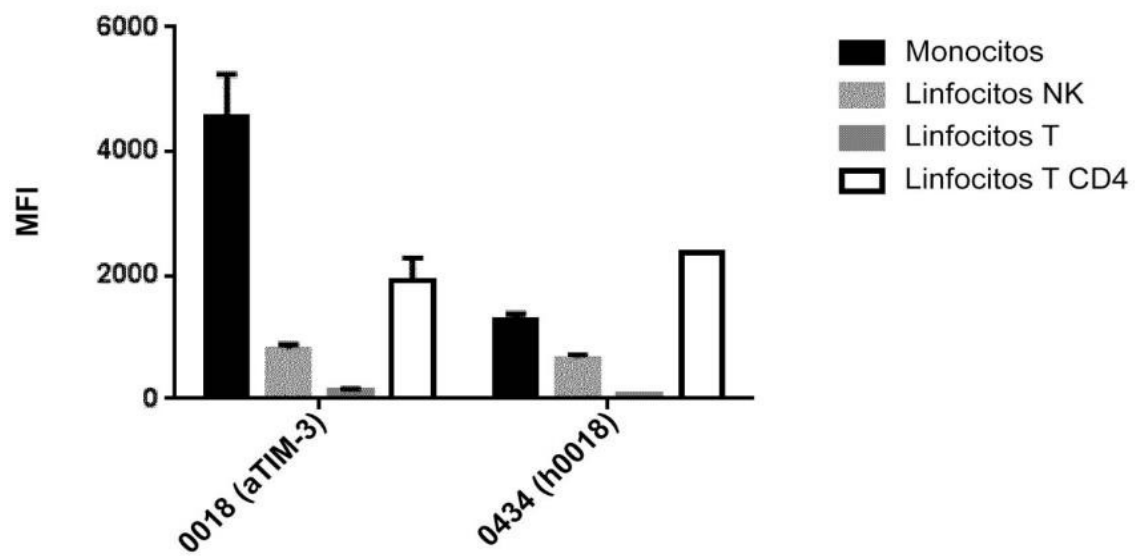


Figura 4C

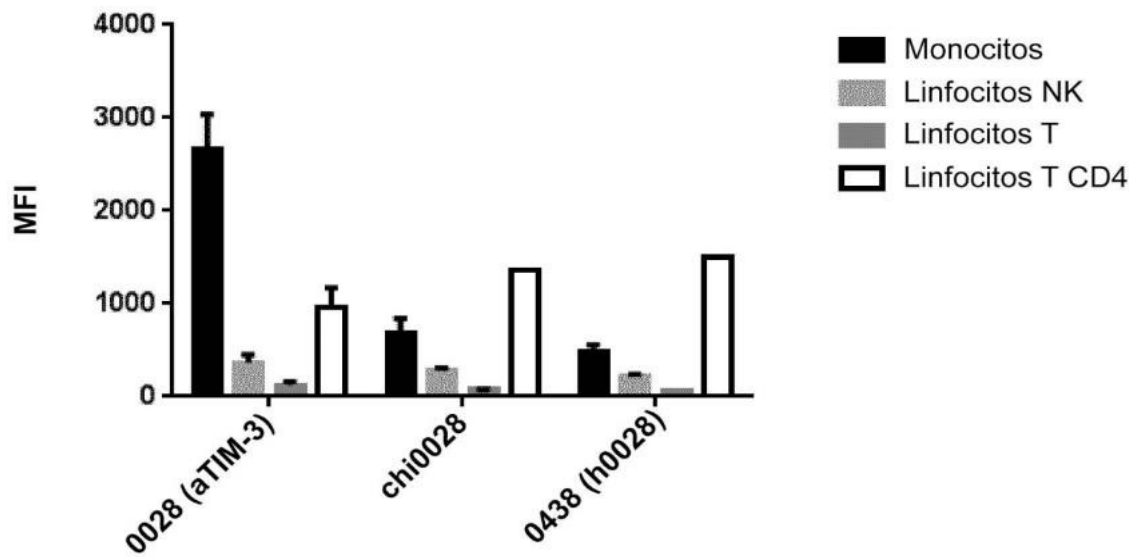


Figura 4D

