

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年9月10日 (10.09.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/175191 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/078473

(22) 国际申请日: 2021年3月1日 (01.03.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010134434.6 2020年3月2日 (02.03.2020) CN

(71) 申请人: 信达生物制药(苏州)有限公司 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.)
[CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 匡智慧 (KUANG, Zhihui); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 荆华 (JING, Hua); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 陈炳良 (CHEN, Bingliang); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 刘军建 (LIU, Junjian); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所 (ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: ANTI-TIM-3 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗TIM-3抗体及其用途

(57) Abstract: Provided are an antibody or an antigen-binding fragment thereof that specifically bind to TIM-3, and a composition containing the antibody or antigen-binding fragment thereof. Also provided are a corresponding encoding nucleic acid, a host cell, and use of the antibody or antigen binding fragment thereof in therapy and diagnosis.

(57) 摘要: 提供了特异性结合TIM-3的抗体或其抗原结合片段以及含有该抗体或其抗原结合片段的组合物; 还提供了相应的编码核酸、宿主细胞, 以及该抗体或其抗原结合片段在治疗和诊断中的用途。



WO 2021/175191 A1

抗 TIM-3 抗体及其用途

本申请是以 CN 申请号为 202010134434.6, 申请日为 2020 年 3 月 2 日的申请为基础, 并主张其优先权, 该 CN 申请的公开内容在此次作为整体引入本申请中。

本发明涉及特异性结合 TIM-3 的新型抗体和抗体片段以及含有所述抗体或抗体片段的组合物。此外, 本发明涉及编码所述抗体或其抗体片段的核酸及包含其的宿主细胞, 以及相关用途。此外, 本发明涉及这些抗体和抗体片段 (特别是与 PD-1 途径抗体组合) 的治疗和诊断用途。

背景技术

T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域-3 (TIM3), 也称为甲型肝炎病毒细胞受体 2 (HAVCR2), 是 I 型跨膜蛋白, 其作为第二代免疫检查点药物的靶点之一, 表达在多种免疫细胞表面, 例如 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞的表面。与许多抑制性受体 (例如, PD-1 和 CTLA-4) 一样, TIM3 表达与许多类型的慢性疾病 (包括癌症) 相关。

已经鉴定了 TIM3 的几种潜在配体: 半乳凝集素-9、HMGB1、Semaphorin-4A、CEACAM-1、ILT-4 和磷脂酰丝氨酸 (PtdSer 或 PS)。PtdSer 是重要的细胞膜成分, 且通常定位于细胞膜的内小叶。但是当细胞经历细胞凋亡时, PtdSer 被重新分布并暴露于外膜。在许多肿瘤细胞系中也观察到这种重新分布。TIM3 与 PtdSer 的结合可能对吞噬作用和交叉呈递至关重要。

研究表明 TIM3 与抑制性受体 PD-1 之间具有密切关系。例如, 许多肿瘤特异性 T 细胞表达 PD-1 和 TIM3, 并且与仅表达 PD-1 或 TIM3 的 T 细胞相比, 已显示这些 T 细胞功能失调更多。参见 Fourcade J 等人, *J Exp Med* .207: 2175-2186 (2010)。

研究表明, Tim-3 信号通路在免疫调控中起到负调控作用, 抑制抗肿瘤的 T 细胞应答, 因此阻断 Tim-3 信号通路能够显著提高 T 细胞抗肿瘤作用。具体而言, 表达 Tim-3 的 T 细胞可以表现出特征在于细胞毒性功能、效应细胞因子产生和增殖受损的耗尽表型。在这方面, 已经显示抗 Tim-3 抗体可以在一些鼠癌模型中恢复抗肿瘤免疫。

针对人 Tim-3 的抗体是已知的。WO2016161270 中描述了针对人 Tim-3 的人源化抗体。目前临床上开展了针对人 Tim-3 抗体的多项抗肿瘤实验, 然而, 迄今为止, 没有靶向 Tim-3 的抗体被批准用于人类中的治疗用途。

因此, 仍然还需要提供这样的抗体, 其以强亲和力与人 Tim-3 结合, 与 PD-1 途径抗体组合时增强治疗效果, 并且还有望克服 PD-1 途径抗体治疗产生的耐药性。

发明内容

本发明提供一种新型的 Tim-3 抗体, 其以更高的亲和力结合 Tim-3, 特别是人和食蟹猴 Tim-3, 能够增强 PD-1 途径抗体激活 T 细胞的能力, 增强 PD-1 途径抗体的抗肿瘤活性。

在小鼠肿瘤模型中, 抗 Tim-3 抗体联合抗 PD-1 抗体能达到比单用 PD-1 抗体更好的抗肿瘤效果。因此抗 Tim-3 抗体和抗 PD-1 抗体联合治疗不仅可能提高抗 PD-1/抗 PD-L1 抗体的疗效, 同时有望克服抗 PD-1/抗 PD-L1 抗体治疗产生的耐药性。已经证明本发明的抗 Tim-3 单抗联合抗 PD-1 单抗在体内和体外药效均好于 PD-1 单药。

在一些方面, 本发明涉及以下实施方案:

1、结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段, 其包含如 SEQ ID NO: 8、15 或 26 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR, 以及如 SEQ ID NO: 9、16 或 27 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR。

2、实施方案 1 的抗体或其抗原结合片段, 其包含

(i) 如 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR, 以及如 SEQ ID NO:

9所示的轻链可变区的3个互补决定区LCDR;

(ii) 如SEQ ID NO: 15所示的重链可变区的3个互补决定区HCDR,以及如SEQ ID NO: 16所示的轻链可变区的3个互补决定区LCDR; 或

(iii) 如SEQ ID NO: 26所示的重链可变区的3个互补决定区HCDR,以及如SEQ ID NO: 27所示的轻链可变区的3个互补决定区LCDR。

3、实施方案1的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中

(a) 所述VH包含HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中

在Abm规则下HCDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在Kabat规则下HCDR2包含SEQ ID NO:2或12的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在Kabat规则下HCDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;且

(b) 所述VL包含LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中

在Kabat规则下LCDR1包含SEQ ID NO:5或14的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在Kabat规则下LCDR2包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在Kabat规则下LCDR3包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

或者

(a) 所述VH包含HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中

在Abm规则下HCDR1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在Kabat规则下HCDR2包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在Kabat规则下HCDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;且

(b) 所述VL包含LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中

在Kabat规则下LCDR1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在Kabat规则下LCDR2包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在Kabat规则下LCDR3包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

或者

(a) 所述VH包含HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中

在Abm规则下HCDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在Abm规则下HCDR2包含SEQ ID NO:4或13的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在Abm规则下HCDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(b) 所述VL包含LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中

在Kabat规则下LCDR1包含SEQ ID NO:5或14的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在Kabat规则下LCDR2包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
或者

(a) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中

在 Abm 规则下 HCDR1 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

在 Abm 规则下 HCDR2 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

在 Abm 规则下 HCDR3 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(b) 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

在 Kabat 规则下 LCDR1 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

在 Kabat 规则下 LCDR2 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4、实施方案 1 至 3 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含轻链可变区和/或重链可变区，其中，

(a)重链可变区

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 8、15 或 26 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 8、15 或 26 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 8、15 或 26 所示的氨基酸序列相比具有 1-10 个的氨基酸置换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和/或

(b)轻链可变区

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 9、16 或 27 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 9、16 或 27 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 9、16 或 27 所示的氨基酸序列相比具有 1-10 个的氨基酸置换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

5、实施方案 1 至 3 中任一项的的抗体或其抗原结合片段，其包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/或包含与 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区；

(ii) 包含与 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/或包含与 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区；或

(iii) 包含与 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/或包含与 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区。

6、实施方案 1 至 3 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含

(i) 含有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/

或含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区；

(ii) 含有 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/或含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区；或

(iii) 含有 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/或含有 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区。

7、实施方案 1 至 6 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含

(a) 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 10、17 或 28 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 10、17 或 28 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 10、17 或 28 所示的氨基酸序列相比具有 1-20 个的氨基酸改变的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 11、18 或 29 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 11、18 或 29 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 11、18 或 29 所示的氨基酸序列相比具有 1-20 个的氨基酸改变的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

8、实施方案 1 至 6 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链和/或轻链，其中

(i) 重链包含与 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含与 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 重链包含与 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含与 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(iii) 重链包含与 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

9、实施方案 1 至 6 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链和/或轻链，其中

(i) 重链包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 重链包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(iii) 重链包含 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

10、实施方案 1 至 9 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是 IgG1 形式或 IgG2 形式或 IgG3 形式或 IgG4 形式的抗体或抗原结合片段。

11、实施方案 1 至 10 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是单克隆抗体。

12、实施方案 1 至 11 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是人源化的抗体或人抗体或嵌合抗体。

13、实施方案 1 至 12 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段是选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)或(Fab')₂、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体。

14、实施方案 1 至 13 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为双特异性或多特异性抗体分子，优选地，双特异性抗体分子还与 PD-1、PD-L1 或 PD-L2 结合。

15、分离的核酸，其编码实施方案 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段中的轻链可变区或重链可变区，或轻链或重链。

16、包含实施方案 15 的核酸的载体，优选地所述载体是表达载体。

17、包含实施方案 15 的核酸或实施方案 16 的载体的宿主细胞，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，更优选的选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 293F 细胞或 CHO-S 细胞或 ExpiCHO 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。

18、制备结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括在适于表达编码实施方案 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养实施方案 17 的宿主细胞，任选地分离所述抗体或其抗原结合片段，任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段。

19、免疫缀合物，其包含实施方案 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段和其它物质，例如细胞毒性剂。

20、药物组合物，其包含实施方案 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段或实施方案 19 的免疫缀合物，以及任选地一种或多种其它治疗剂，例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂，以及任选地药用辅料。

21、药物组合，其包含实施方案 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段或实施方案 19 的免疫缀合物，以及 PD-1 途径抗体例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体，以及任选的一种或多种其它治疗剂，例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂。

22、预防或治疗受试者中肿瘤的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的实施方案 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段、或实施方案 19 的免疫缀合物、或实施方案 20 的药物组合物。

23、实施方案 22 所述的方法，其还包括向所述受试者联合施用 PD-1 途径抗体例如抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。

24、预防或治疗受试者中肿瘤的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的实施方案 21 的药物组合。

25、实施方案 22-24 中任一项的方法，其中所述肿瘤为癌症，更优选的，所述癌症具有升高水平的(例如核酸或蛋白质水平的)TIM-3 和/或升高水平的(例如核酸或蛋白质水平的)PD-L1 或 PD-1 或 PD-L2。

26、实施方案 22-25 中任一项的方法，其中所述肿瘤是对 PD-1 途径抗体例如抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体治疗产生耐药性的肿瘤。

27、实施方案 22-26 中任一项的方法，其中所述方法还包括向患者施用一种或多种疗法，例如治疗方式和/或其它治疗剂，优选地，治疗方式包括手术治疗和/或放射疗法，其它治疗剂选自化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂。

28、检测样品中 TIM-3 的方法，所述方法包括

(a)将样品与根据实施方案 1 至 14 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段接触；以及

(b)检测抗体或其抗原结合片段与 TIM-3 间的复合物的形成；任选地，抗体是被可检测地标记的。

在下面的附图和具体实施方案中进一步说明本发明。然而，这些附图和具体实施方案不应被认为限制本发明的范围，并且本领域技术人员容易想到的改变将包括在本发明的精神和所附权利要求的保护范围内。

附图说明

图 1 显示了通过流式细胞术测定本发明的嵌合抗体与人 Tim-3 CHO-S 稳定转染细胞株的结合能力。

图 2 显示了通过流式细胞术测定本发明的人源化抗体与人 Tim-3 CHO-S 稳定转染细胞株的结合能力。

图 3 显示了通过流式细胞术测定本发明的人源化抗体与 CD4+T 的结合能力。

图 4 显示了通过 MOA 法测定本发明的人源化抗体阻断 Tim-3 结合 PtdSer 的能力。

图 5 显示了本发明的人源化抗体激活 CD4+ T 细胞释放 IL-2 的能力。

图 6 显示了 NK 细胞激活实验的结果，其中 A 显示了细胞表面表达 NKG2D 的细胞的百分比，B 显示了细胞表面表达 CD107a 的百分比

图 7 显示了本发明的人源化抗体分子体内药效检测的结果。

图 8 显示了对本发明抗体对小鼠体重的影响。

图 9 显示了通过 DSF 法检测本发明抗体 Hz4-3.6 的 Tm。

图 10 显示了本发明抗体 Hz4-3.6 的加速稳定性。

发明详述

I. 定义

在下文详细描述本发明前，应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% 的下限和比指定数字数值大 5% 的上限的范围内的数字数值。

如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项。

如本文所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组合的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

本文所用的术语“T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域-3”或“TIM-3”是指作为蛋白的 T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域 (TIM) 家族的成员的受体。TIM3 的主要配体包括磷脂酰丝氨酸 (PtdSer)。TIM3 也称为甲型肝炎病毒细胞受体 2 (HAVCR2)、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白受体 3、TIM3、TIMD3、TIMD-3、肾损伤分子-3、KIM-3 和 CD366。术语“TIM-3”包括由细胞天然表达的 TIM3 的任何变体或同种型。因此，本文所述的抗体可以与来自人以外的

物种的 TIM-3 (例如, 食蟹猴 TIM3) 交叉反应。TIM-3 或其任何变体和同种型可以从天然表达它们的细胞或组织中分离, 或者使用本领域熟知的技术和/或本文所述的那些技术重组产生。在一个实施方案中, 人 TIM-3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

本文所用的术语“抗 TIM-3 抗体”、“抗 TIM-3”、“TIM-3 抗体”或“结合 TIM-3 的抗体”是指这样的抗体, 所述抗体能够以足够的亲和力结合(人或食蟹猴)TIM-3 或其变体和同种型以致所述抗体可以用作靶向(人或食蟹猴)TIM-3 的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中, 抗 TIM-3 抗体与非(人或食蟹猴)TIM-3 蛋白结合的程度低于所述抗体与(人或食蟹猴)TIM-3 结合的约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%或约 90%或以上, 例如通过放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法 (SPR) 测量的。

“抗体片段”指与完整抗体不同的分子, 其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体(例如 scFv); 单结构域抗体; 双价或双特异性抗体或其片段; 骆驼科抗体; 和由抗体片段形成的双特异性抗体或多特异性抗体。

如本文所用, 术语“表位”指抗原(例如, TIM-3)中与抗体分子特异性相互作用的部分。

与参照抗体“结合相同或重叠表位的抗体”是指这样的抗体, 其在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合, 反言之, 参照抗体在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。

与参照抗体竞争结合其抗原的抗体是指这样的抗体, 其在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合。反言之, 参照抗体在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗体是否与另一种竞争, 这些测定例如: 固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等, 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253)。

抑制(例如竞争性抑制)参照抗体与其抗原的结合的抗体是指这样的抗体, 其抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合。反言之, 参照抗体抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。抗体与其抗原的结合可以亲和力(例如平衡解离常数)衡量。测定亲和力的方法是本领域已知的。

与参照抗体显示相同或相似的结合亲和力和/或特异性的抗体是指这样的抗体, 其能够具有参照抗体的至少 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的结合亲和力和/或特异性。这可以通过本领域已知的任何测定结合亲和力和/或特异性的方法进行测定。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3, 从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中, 各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派系统的任一种或其组合确定, 所述指派系统包括例如: 基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人, (1989) *Nature* 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 273, 927-948 (1997)), 基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health

(1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/上), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering) 的 North CDR 定义。

例如, 根据不同的 CDR 确定方案, 每一个 CDR 的残基如下所述。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 编号系统)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 编号系统)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat 编号系统)				

CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。

除非另有说明, 否则在本发明中, 术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

除非另有说明, 否则在本发明中, 当提及抗体可变区中的残基位置(包括重链可变区残基和轻链可变区残基)时, 是指根据 Kabat 编号系统(Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 的编号位置。

在一个实施方案中, 本发明抗体的重链可变区 CDR 按照如下规则确定

- (1) VH CDR1 按照 Abm 规则确定, 且 VHCDR2 和 VHCDR3 按照 Kabat 规则提供; 或者
- (2) VH CDR1、2 和 3 均按照 Abm 规则确定。

在一个实施方案中, 本发明抗体的轻链可变区 CDR 按照 Kabat 规则确定。

应该注意, 基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一种抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此, 在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时, 所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体, 其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列, 但是由于应用了不同的方案(例如不同的指派系统规则或组合)而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

具有不同特异性(即, 针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的 CDR(在同一指派

系统下)。然而, 尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的, 但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM、Contact 和 North 方法中的至少两种, 可以确定最小重叠区域, 从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。正如本领域技术人员明了, 通过抗体的结构和蛋白折叠, 可以确定 CDR 序列其余部分的残基。因此, 本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如, 在一个 CDR 的变体中, 最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变, 而根据 Kabat 或 Chothia 定义的其余 CDR 残基可以被保守氨基酸残基替代。

“IgG 形式的抗体”是指抗体的重链恒定区所属的 IgG 形式。所有同一型的抗体的重链恒定区都是相同的, 不同型的抗体之间的重链恒定区不同。例如, IgG4 形式的抗体是指其重链恒定区来自 IgG4。

“人源化”抗体是指包含来自非人 CDR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的抗体。在一些实施方案中, 人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域, 其中所有或基本上所有的 CDR(例如, CDR)对应于非人抗体的那些, 并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。“人抗体”指具有这样的氨基酸序列的抗体, 所述氨基酸序列对应于下述抗体的氨基酸序列, 所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源, 其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

如本文所用, 术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法如例如通过放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法 (SPR) 测定。

“免疫缀合物”是与一个或多个其它物质(包括但不限于细胞毒性剂或标记)缀合的抗体。

本文所用的术语“PD-1 途径抗体”包括与 PD-1 或其结合配体例如 PD-L1 或 PD-L2 特异性结合的抗体。在一个方面, PD-1 途径抗体降低、阻断、抑制、消除或干扰源自 PD-1 与一种或多种它的配体(诸如 PD-L1, PD-L2)相互作用的信号转导。在一些实施方案中, PD-1 途径抗体是 PD-1 抗体、PD-L1 抗体或 PD-L2 抗体。

本文所用的术语“抗 PD-1/PD-L1/PD-L2 抗体”、“抗 PD-1/PD-L1/PD-L2”、“PD-1/PD-L1/PD-L2 抗体”或“结合 PD-1/PD-L1/PD-L2 的抗体”是指这样的抗体, 所述抗体能够以足够的亲和力结合 PD-1/PD-L1/PD-L2 蛋白或其片段。在一个实施方案中, 抗 PD-1/PD-L1/PD-L2 抗体与非 PD-1/PD-L1/PD-L2 蛋白结合的程度低于所述抗体与 PD-1/PD-L1/PD-L2 结合的约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%或约 90%或以上, 如例如通过放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法 (SPR) 测量的。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗肿瘤, 例如癌症中有效的任何物质, 包括化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂(例如免疫抑制剂)。

术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

“化疗剂”包括在治疗癌症或免疫系统疾病中有用的化学化合物。

术语“小分子药物”是指低分子量的能够调节生物过程的有机化合物。“小分子”被定义为分子量小于 10kD、通常小于 2kD 和优选小于 1kD 的分子。小分子包括但不限于无机分子、有

机分子、含无机组分的有机分子、含放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。作为治疗剂,小分子可以比大分子更能透过细胞、对降解更不易感和更不易于引发免疫应答。

本文使用的术语“免疫调节剂”指抑制或调节免疫应答的天然或合成活性剂或者药物。免疫应答可以是体液应答或细胞应答。免疫调节剂包含免疫抑制剂。

本文使用的“免疫抑制剂”、“免疫抑制药物”或“免疫抑制物”是在免疫抑制治疗中用于抑制或阻止免疫系统活性的治疗剂。

“功能性 Fc 区”拥有天然序列 Fc 区的“效应器功能”。例示性的“效应器功能”包括 C1q 结合; CDC; Fc 受体结合; ADCC; 吞噬作用; 细胞表面受体(例如 B 细胞受体; BCR)下调等。此类效应器功能一般要求 Fc 区与结合结构域(例如抗体可变域)联合,而且可以使用多种测定方法来评估,例如本文所公开的那些。

术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域,所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。

术语“有效量”指本发明的抗体或片段或缀合物或组合物或组合的这样的量或剂量,其以单一或多次剂量施用患者后,在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。

“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段,有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的量,其中抗体或抗体片段或其缀合物或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象,“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤体积)至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、60%或 70%和仍更优选地至少约 80%或 90%。

“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段,有效实现所需预防结果的量。通常,由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用,故预防有效量将小于治疗有效量。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换地使用且是指其中引入外源核酸的细胞,包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括初级转化的细胞和来源于其的后代,而不考虑传代的数目。后代在核酸内容上可能与亲本细胞不完全相同,而是可以包含突变。本文中包括在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

本文所使用的术语“标记”是指被直接或间接缀合或融合至试剂(诸如多核苷酸探针或抗体)并且促进其所缀合或融合的试剂的检测的化合物或组合物。标记本身可以是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记)或在酶促标记的情况下可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。术语旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即,物理连接)至探针或抗体来直接标记探针或抗体以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记探针或抗体。

“个体”或“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于,家养动物(例如,牛,羊,猫,狗和马),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴),兔,以及啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在一些实施方案中,个体或受试者是人。

“分离的”抗体是这样的抗体,其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中,将抗体纯化至超过 95%或 99%纯度,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE,等电聚焦(IEF),毛细管电泳)或层析(例如,离子交换或反相 HPLC)确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman 等, *J.Chromatogr.B*848: 79-87(2007)。

“分离的编码抗 TIM-3 抗体或其片段的核酸”是指一个或多个核酸分子,其编码抗体重链或轻链(或其片段),包括在单一载体或分开的载体中的这样的核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这样的核酸分子。

如下进行序列之间序列同一性的计算。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数,将所述序列出于最佳比较目的比对(例如,可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位

或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中,为比较目的,所比对的参考序列的长度是至少 30%、优选地至少 40%、更优选地至少 50%、60%和甚至更优选地至少 70%、80%、90%、100%的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在这个位置处是相同的。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。在一个优选实施方案中,使用已经集成至 GCG 软件包的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) 算法(在 <http://www.gcg.com> 可获得),使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。在又一个优选的实施方案中,使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 <http://www.gcg.com> 可获得),使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重 40、50、60、70 或 80 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6,确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分 12、空位延伸罚分 4 和移码空位罚分 5 的 Blossum 62 评分矩阵。

还可以使用 PAM120 加权余数表、空位长度罚分 12,空位罚分 4),利用已经并入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyers 和 W. Miller 算法,((1989) CABIOS, 4:11-17)确定两个氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分数。

额外地或备选地,可以进一步使用本文所述的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库执行检索,以例如鉴定其他家族成员序列或相关序列。

如本文所用,术语“在严格条件下(例如在低严格性、中等严格性、高严格性或极高严格性条件下)杂交”描述了杂交和洗涤条件。进行杂交反应的指导可以在通过引用方式并入的 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中找到。参考文献中描述了含水方法和非含水方法并且可以使用任一方法。本文中提及的特异性杂交条件如下:1)低严格性杂交条件是在约 45°C 于 6X 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,随后至少在 50°C (对于低严格性条件,可以增加洗涤的温度至 55°C)于 0.2X SSC, 0.1% SDS 中洗涤两次;2)中等严格性杂交条件是在约 45°C 于 6 X SSC 中、随后在 60°C 在 0.2 X SSC、0.1% SDS 中洗涤一次或多次;3)高严格性杂交条件是在约 45°C 在 6 X SSC 中、随后在 65°C 于 0.2X SSC、0.1% SDS 中洗涤一次或多次;并且优选地 4)极高严格性杂交条件是在 65°C 于 0.5 M 磷酸钠、7%SDS 中、随后在 65°C 于 0.2X SSC、0.1% SDS 中洗涤一次或多次。极高严格性条件(4)是优选的条件和除非另外说明,否则应当使用的一个条件。

术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果,包括但不限于例如,肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。

术语“肿瘤”和“癌症”在本文中互换地使用,涵盖实体瘤和液体肿瘤。

术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。在某些实施方案中,适合于通过本发明的抗体来治疗的癌症包括结肠癌、直肠癌、结直肠癌,包括那些癌症的转移性形式。

术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提及时并不互相排斥。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

术语“药物组合物”指这样的组合物,其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药物组合”是指非固定组合产品或固定组合产品,包括但不限于药盒、药物组合

物。术语“非固定组合”意指活性成分(例如,(i)抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段、以及(ii)PD-1 途径抗体或其抗原结合片段)以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者,其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。在一些实施方案中,药物组合中使用的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段和 PD-1 途径抗体或其抗原结合片段以不超过它们单独使用时的水平施用。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择,从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式,其制剂形式可以相同也可以不同。

术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂或治疗方式(例如放射疗法或手术)以治疗本文所述疾病。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂,例如以具有固定比例的活性成分的单一胶囊。或者,这种施用包括对于各个活性成分在多种或在分开的容器(例如片剂、胶囊、粉末和液体)中的共同施用。粉末和/或液体可以在施用前重构或稀释至所需剂量。此外,这种施用还包括以大致相同的时间或在不同的时间以顺序的方式使用每种类型的治疗剂。在任一情况下,治疗方案将提供药物组合在治疗本文所述的病症或病状中的有益作用。

用于本文时,“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

用于本文时,“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方式中,具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常,在癌症的背景中,术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前,特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称作“表达载体”。

“受试者/患者/个体样品”指从患者或受试者得到的细胞或流体的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织,像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品;血液或任何血液组分;体液,诸如脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液;来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物,诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。

II. 抗体

在一些实施方案中,本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段以高亲和力结合 TIM-3(例如人 TIM-3 或食蟹猴 TIM-3),在一些实施方案中,TIM-3 为人 TIM-3。在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段与人或食蟹猴 TIM-3 的结合亲和力高于已知的 TIM-3 抗体,例如 WO2016161270 的 TIM-3 抗体,例如在本文中称为 TSR-022 的抗 TIM-3 抗体。在一些实施方案中,通过生物膜薄层干涉测定技术或表面等离子共振法,例如 Biacore 测定抗体的亲和力。

在一些实施方案中,本发明的抗 TIM-3 抗体,以以下平衡解离常数(K_D)与人 TIM-3 结合,所述 K_D 小于大约 10nM,优选地,小于或等于大约 6nM、5.5nM、5nM、4.5nM、4nM、3.5nM、3nM、2.5nM,在一些实施方案中,所述 K_D 在上述数值之间(包括端点)。

在一些实施方案中,本发明的抗 TIM-3 抗体,以以下平衡解离常数(K_D)与食蟹猴 TIM-3 结合,所述 K_D 小于大约 11nM,优选地,小于或等于大约 5nM、4.5nM、4nM、3.5nM、3nM、2.5nM、2nM、1.5nM,在一些实施方案中,所述 K_D 在上述数值之间(包括端点)。

在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段与细胞表面的 Tim-3 结合。在一些

实施方案中, Tim-3 在细胞表面过表达。在一些实施方案中, 细胞为 CHO 细胞, 例如 CHO-S。在一些实施方案中, 细胞为 NK 细胞。在一些实施方案中, 利用流式细胞仪检测所述结合。在一些实施方案中, 本发明的抗体以小于或等于大约 1.5nM、1.4nM、1.3nM、1.2nM、1.1nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM 的 EC50 结合 CHO 细胞上过表达的 TIM-3。

在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段与 CD4+T 细胞结合。

在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段阻断 TIM-3 与其配体的结合。在一个实施方案中, 配体是 PtdSer, 例如凋亡细胞表面的 PtdSer。在一个实施方案中, 细胞为 L363 细胞。

在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段与 PD-1 途径抗体或其抗原结合片段组合能够有效激活 CD4+T 细胞, 优选地优于 PD-1 途径抗体单独激活, 更优选地优于 PD-1 途径抗体与其他抗 TIM-3 抗体 (例如 TSR-022) 组合激活。在一些实施方案中, PD-1 途径抗体是抗 PD-1 抗体, 例如 IBI308。

在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段能够有效激活 NK 细胞。在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段能够增强 NK 细胞表面的 NKG2D 和/或 CD107a 的表达。

在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段与 PD-1 途径抗体或其抗原结合片段组合, 能够用于治疗癌症, 优选地, 其疗效优于 PD-1 途径抗体单独使用。在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段与 PD-1 途径抗体或其抗原结合片段组合, 能够有效抑制肿瘤生长, 肿瘤抑制率大于或等于约 60%、65%、或 70%。

在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段具有良好的热稳定性。在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的热稳定性用差示扫描荧光法检测, 优选地, T_m 大于或等于 65°C、66°C、67°C、68°C 或 69°C。

在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段具有良好的长期热稳定性和加速稳定性。在一个实施方案中, 本发明的抗体或其片段在至少 7、8、9、10、11、12、13、14 天保持至少 95%、96%、97%、97.5% 的纯度, 且其结合表达人 Tim-3 的细胞的能力无显著变化。

在一些实施方案中, 本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH), 其中所述 VH 包含

- (i) 如 SEQ ID NO:8、15 或 26 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR), 或
- (ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中, 本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区 (VL), 其中所述 VL 包含:

- (i) 如 SEQ ID NO:9、16 或 27 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 (CDR); 或
- (ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中, 本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL, 其中

- (a) 所述 VH 包含
 - (i) 如 SEQ ID NO: 8、15 或 26 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR), 或
 - (ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的序列; 和/或
- (b) 所述 VL 包含:
 - (i) 如 SEQ ID NO: 9、16 或 27 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 (CDR); 或
 - (ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的序列。

在优选的实施方案中，VH 包含选自 SEQ ID NO: 8、15 或 26 所示的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中，VL 包含选自 SEQ ID NO: 9、16 或 27 所示的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中，本发明抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO: 8、15 或 26 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及如 SEQ ID NO: 9、16 或 27 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR。

在优选的实施方案中，本发明抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO: 8 或 15 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及如 SEQ ID NO: 9 或 16 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR。

在更优选的实施方案中，本发明抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含

- (i) 如 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR;
- (ii) 如 SEQ ID NO: 15 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及如 SEQ ID NO: 16 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR; 或
- (iii) 如 SEQ ID NO: 26 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及如 SEQ ID NO: 27 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR。

在一些实施方案中，本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)，其中

(i) 所述 VH 包含互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 19 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR1 包含与 SEQ ID NO:1 或 19 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:2 或 4 或 12 或 13 或 20 或 22 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR2 包含与选自 SEQ ID NO:2 或 4 或 12 或 13 或 20 或 22 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 或 21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR3 包含与 SEQ ID NO:3 或 21 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；

和/或

(ii) 其中所述 VL 包含互补决定区域 (CDR) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:5 或 14 或 23 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR1 包含与 SEQ ID NO:5 或 14 或 23 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；LCDR2 包含 SEQ ID NO:6 或 24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR2 包含与 SEQ ID NO:6 或 24 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；LCDR3 包含选自 SEQ ID NO:7 或 25 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR3 包含与 SEQ ID NO:7 或 25 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中

(a) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中

在 Abm 规则下 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
在 Kabat 规则下 HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 或 12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

在 Kabat 规则下 HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

- (b) 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中
在 Kabat 规则下 LCDR1 包含 SEQ ID NO:5 或 14 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Kabat 规则下 LCDR2 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中

- (a) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中
在 Abm 规则下 HCDR1 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Kabat 规则下 HCDR2 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Kabat 规则下 HCDR3 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (b) 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中
在 Kabat 规则下 LCDR1 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Kabat 规则下 LCDR2 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中

- (a) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中
在 Abm 规则下 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Abm 规则下 HCDR2 包含 SEQ ID NO:4 或 13 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Abm 规则下 HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (b) 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中
在 Kabat 规则下 LCDR1 包含 SEQ ID NO:5 或 14 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Kabat 规则下 LCDR2 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中

- (a) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中
在 Abm 规则下 HCDR1 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Abm 规则下 HCDR2 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
在 Abm 规则下 HCDR3 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

- (b) 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中
 - 在 Kabat 规则下 LCDR1 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
 - 在 Kabat 规则下 LCDR2 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
 - 在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中

- (a) 所述 VH 包含
 - (i)表 A 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的组合;或
 - (ii) (i)的 HCDR 组合的变体,所述变体在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换);
 和/或
- (b) 所述 VL 包含
 - (i) 表 A 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的组合;或者
 - (ii) (i)的 LCDR 组合的变体,所述变体在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中所述 VH 包含互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 并且所述 VL 包含 (CDR) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述抗体或其抗原结合片段所包含的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的组合如下表 (表 A) 所示:

表 A: 本发明抗体或其抗原结合片段中 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的示例性组合

组合	HCDR1, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成	HCDR2, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成	HCDR3, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成	LCDR1, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成	LCDR2, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成	LCDR3, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成
(1)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7
(2)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7
(3)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7
(4)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7
(5)	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25
(6)	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25

在一些实施方案中，本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL，其中，

- (a) 重链可变区 VH

- (i)包含与选自 SEQ ID NO: 8、15 或 26 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者
 - (ii) 包含选自 SEQ ID NO: 8、15 或 26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者
 - (iii)包含与选自 SEQ ID NO: 8、15 或 26 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中;
- 和/或

(b)轻链可变区 VL

- (i)包含与选自 SEQ ID NO:9、16 或 27 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (ii) 包含选自 SEQ ID NO: 9、16 或 27 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者
- (iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 9、16 或 27 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中, 本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL, 其中,

(a) 重链可变区 VH

- (i)包含与选自 SEQ ID NO: 8 或 15 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者
 - (ii) 包含选自 SEQ ID NO: 8 或 15 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者
 - (iii)包含与选自 SEQ ID NO: 8 或 15 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中;
- 和/或

(b)轻链可变区 VL

- (i)包含与选自 SEQ ID NO:9 或 16 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成;
- (ii) 包含选自 SEQ ID NO: 9 或 16 的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成; 或者
- (iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 9 或 16 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中所述抗体或其抗原结合片段所包含的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 的组合如下表 (表 B) 所示:

表 B: 本发明抗体或其抗原结合片段中重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 的示例性组合

组合	VH, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成	VL, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成
(1)	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9
(2)	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16
(3)	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27

在一些实施方案中, 本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含重链和/或轻链, 其中

(a)重链

- (i)包含与选自 SEQ ID NO:10、17 或 28 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:10、17 或 28 的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:10、17 或 28 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中；

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:11、18 或 29 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:11、18 或 29 的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:11、18 或 29 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段包含重链和/或轻链，其中

(a) 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:10 或 17 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:10 或 17 的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:10 或 17 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中；

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:11 或 18 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:11 或 18 的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:11 或 18 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中所述抗体或其抗原结合片段所包含的重链和轻链的组合如下表（表 C）所示：

表 C：本发明抗体或其抗原结合片段中重链和轻链的示例性组合

组合	重链，其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成	轻链，其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或或由所述氨基酸序列组成
(1)	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11
(2)	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
(3)	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29

在一些实施方案中，本发明抗 TIM-3 抗体或其片段的重链和/或轻链还包含信号肽序列，例如 METDTLLLWVLLLWVPGSTG（SEQ ID NO:35）。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。

优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在优选的实施方案中，本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域(例如在 FR 中)。更优选地，本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。

在一些实施方案中，置换为保守性置换。保守置换是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸置换，例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸置换，一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸置换，或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸置换。示例性的置换如下表 D 所示：

表 D

原始残基	示例性置换	优选的保守氨基酸置换
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、正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸、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、正亮氨酸	Leu

在某些实施方案中，置换发生在抗体的 CDR 区。通常，获得的变体相对于亲本抗体在某些生物学特性方面(例如，增加的亲和力)具有修饰(例如，改善)和/或将具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体经改变以增加或降低抗体经糖基化的程度。对抗体的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一或多个糖基化位点而方便地实现。当抗体包含 Fc 区时，可以改变附着于其的糖类。在一些应用中，除去不想要的糖基化位点的修饰可以是有用的，例如除去岩藻糖模块以提高抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)功能(参见 Shield 等(2002)JBC277:26733)。在其它应用中，可以进行半乳糖苷化修饰以修饰补体依赖性细胞毒性(CDC)。

在某些实施方案中，可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生 Fc 区变体，以改变抗体的一种或多种功能特性，例如血清半衰期、补体结合、Fc 受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。Fc 区变体可包括在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换)的人 Fc 区序列(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。

在本发明的一个实施方案中，本文所述抗体在 Fc 区引入取代突变，来提高与人 FcRn 的结合能力，以期延长其在体内的半衰期。

在某些实施方案中，可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体，例如“硫代 MAb”，其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。可以如，例如美国专利号 7,521,541 中所述地生成半胱氨酸改造的抗体。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括，但不限于，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二烷、聚-1,3,6-三烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

在一些实施方案中，本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段具有以下一个或多个特性：

(i)显示与本发明抗体(例如 CH4-3、Hz4-3.6 或 CH5-17)对 TIM-3 相同或相似的结合亲和力和/或特异性；

(ii)抑制(例如，竞争性抑制)本发明抗体(例如 CH4-3、Hz4-3.6 或 CH5-17)与 TIM-3 的结合；

(iii)与本发明抗体(例如 CH4-3、Hz4-3.6 或 CH5-17)结合相同或重叠的表位；

(iv)与本发明抗体(例如 CH4-3、Hz4-3.6 或 CH5-17)竞争结合 TIM-3；

(v)具有本发明抗体(例如 CH4-3、Hz4-3.6 或 CH5-17)的一个或多个生物学特性。

在一些实施方案中，本发明的抗 TIM-3 抗体是 IgG1 形式的抗体或 IgG2 形式的抗体或 IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体。

在一些实施方案中，抗 TIM-3 抗体是单克隆抗体。

在一些实施方案中，抗 TIM-3 抗体是人源化的。

在一些实施方案中，抗 TIM-3 抗体是人抗体。

在一些实施方案中，抗 TIM-3 抗体是嵌合抗体。

在一些实施方案中，至少部分的抗 TIM-3 抗体的框架序列是人共有框架序列。

在一个实施方案中，本发明的抗 TIM-3 抗体还涵盖其抗体片段，优选地选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)或(Fab')₂、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体。

在某些实施方案中，抗 TIM-3 抗体分子处于双特异性或多特异性抗体分子形式。在一个实施方案中，双特异性抗体分子具有针对 TIM-3 的第一结合特异性和针对 PD-1 或其配体(例如 PD-L1 或 PD-L2)的第二结合特异性。在一个实施方案中，双特异性抗体分子与 TIM-3 和 PD-1、PD-L1 或 PD-L2 结合。多特异性抗体分子可以具有任何针对前述分子的结合特异性的组合。

III. 本发明的核酸以及包含其的宿主细胞

在一方面，本发明提供了编码以上任何抗 TIM-3 抗体或其片段的核酸。在一个实施方案中，提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如 pcDNA3.1。在一

个实施方案中，提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞(例如 CHO-S 或 ExpiCHO)或 293 细胞(例如 293F))或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在另一个实施方案中，宿主细胞是原核的。

在一方面，本发明提供了编码本文所述任何抗 TIM-3 抗体或其片段的核酸。所述核酸可以包含编码抗体的轻链可变区和/或重链可变区的氨基酸序列的核酸，或包含编码抗体的轻链和/或重链的氨基酸序列的核酸。

例如，本发明的核酸包含编码选自 SEQ ID NO:8-11、15-18、26-29 中任一项所示氨基酸序列的核酸，或编码与选自 SEQ ID NO:8-11、15-18、26-29 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列的核酸。

本发明还涵盖与下述核酸在严格性条件下杂交的核酸或与下述核酸具有一个或多个置换(例如保守性置换)、缺失或插入的核酸：包含编码选自 SEQ ID NO:8-11、15-18、26-29 中任一项所示氨基酸序列的核酸序列的核酸；或包含编码与选自 SEQ ID NO: 8-11、15-18、26-29 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列的核酸序列的核酸。

在一个实施方案中，提供包含所述核酸的一个或多个载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在一个实施方案中，载体是 pTT5 载体或 pcDNA3.1。

在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，抗体可在细菌中产生，特别当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达，见，例如，美国专利号 5,648,237，5,789,199 和 5,840,523，还见 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 卷 248(B.K.C.Lo, 编辑, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 页，其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在表达后，抗体可以从可溶级分中的细菌细胞糊状物分离，并且可以进一步纯化。

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。例如，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。例如，糖基化途径已经进行“人源化”的真菌和酵母菌株导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见 Gerngross, *Nat.Biotech.*22: 1409-1414(2004), 和 Li 等, *Nat.Biotech.*24: 210-215(2006)。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如，可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚肾系(293HEK 或 293F 或 293 细胞，如例如 Graham 等, *J.Gen Virol.* 36 : 59(1977) 中所描述的)等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，包括 DHFR-CHO 细胞(Urlaub 等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77 : 216(1980)、CHO-S 细胞、ExpiCHO 等；以及骨髓瘤细胞系如 Y0, NS0 和 Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述见例如 Yazaki 和 Wu, *Methods in Molecular Biology*, 卷 248 (B.K.C.Lo 编著, Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 页(2003)。

IV. 本发明的抗体分子的生产 and 纯化

在一个实施方案中，本发明提供制备本发明抗体分子或其片段（优选的抗原结合片段）的方法，其中所述方法包括在适于表达编码本发明抗体分子或其片段（优选的抗原结合片段）的核酸的条件下培养所述宿主细胞，以及任选地分离所述抗体或其片段（优选地抗原结合片段）。在某个实施方案中，所述方法还包括从宿主细胞回收本发明抗体分子或其片段（优选地抗原结合片段）。

在一个实施方案中，提供了制备本发明抗体分子的方法，其中所述方法包括，在适合抗体表达的条件下，培养包含编码所述抗体（例如任意一条多肽链和/或多条多肽链）的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从所述宿主细胞（或宿主细胞培养基）回收所述抗体。

为了重组产生本发明抗体分子，分离编码抗体（例如上文所描述的抗体，例如任意一条多肽链和/或多条多肽链）的核酸，并将其插入一个或多个载体，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序（例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针进行）。

如本文所述制备的抗体分子可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗体分子的纯度，所述熟知分析方法包括尺寸排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

V. 测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的抗 TIM-3 抗体鉴定，筛选，或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。一方面，对本发明的抗体测试其抗原结合活性，例如通过已知的方法诸如 ELISA，Western 印迹，等来进行。可使用本领域已知方法来测定对 TIM-3 的结合，本文中公开了例示性方法。在一些实施方案中，使用放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法（SPR）测量的。

另一方面，可使用竞争测定法来鉴定与本文中公开的任何抗 TIM-3 抗体竞争对 TIM-3 的结合的抗体。在某些实施方案中，此类竞争性抗体结合与本文中公开的任何抗 TIM-3 抗体所结合表位相同或重叠的表位（例如线性或构象表位）。用于定位抗体所结合表位是已知的，例如例示性方法见 Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”, Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press, Totowa, NJ)。

本发明还提供了用于鉴定具有生物学活性的抗 TIM-3 抗体的测定法。生物学活性可以包括例如结合 TIM-3（例如结合人和/或食蟹猴 TIM-3），对细胞表面 TIM-3 的结合，对 T 细胞的结合、对 TIM-3 与其配体的阻断作用、对 T 细胞的激活和 NK 细胞的激活。还提供在体内和/或在体外具有此类生物学活性的抗体。

在某些实施方案中，对本发明的抗体测试此类生物学活性。

本发明还提供用于鉴定抗体的性质，例如成药性相关性质的方法。所述成药性相关性质

包括例如热稳定性，例如长期热稳定性和加速稳定性。

供任何上述体外测定法使用的细胞包括天然表达 TIM-3 或经改造而表达 TIM-3 细胞系。此类细胞还包括表达 TIM-3 和并非正常情况下表达 TIM-3 的编码 TIM-3 DNA 转染的细胞系。

可以理解的是，能够使用本发明的免疫缀合物替换或补充抗 TIM-3 抗体来进行任何上述测定法。

可以理解的是，能够使用抗 TIM-3 抗体和别的活性剂的组合来进行任何上述测定法。

VI. 免疫缀合物

在一些实施方案中，本发明提供了免疫缀合物，其包含本文中提供的任何抗 TIM-3 抗体和其它物质，例如治疗剂，包括化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂(例如抗炎剂或免疫抑制剂)。在一个实施方案中，所述其它物质例如细胞毒性剂，其包括任何对细胞有害的药剂。

在一些实施方案中，所述免疫缀合物用于预防或治疗癌症。

VII. 药物组合物和药物制剂

在一些实施方案中，本发明提供包含本文所述的任何抗 TIM-3 抗体或其片段(优选地其抗原结合片段)或其免疫缀合物的组合物，优选地组合物为药物组合物。在一个实施方案中，所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中，组合物，例如，药物组合物，包含本发明的抗 TIM-3 抗体或其片段或其免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂的组合。

本发明还包括包含抗 TIM-3 抗体或其免疫缀合物的组合物(包括药物组合物或药物制剂)，或包含编码抗 TIM-3 抗体的多核苷酸的组合物(包括药物组合物或药物制剂)。在某些实施方案中，组合物包含一种或多种结合 TIM-3 的抗体或其片段，或一种或多种编码一种或多种抗 TIM-3 的抗体或其片段的多核苷酸。这些组合物还可以包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。

如本文所用，“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。适用于本发明的药用载体可以是无菌液体，如水和油，包括那些石油、动物、植物或合成来源的，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时，水是优选的载体。还可以将盐水溶液和水性右旋糖以及甘油溶液用作液体载体，特别是用于可注射溶液。

合适的赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、干燥的脱脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。对于赋形剂的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第五版，R.C.Rowe,P.J.Seskey 和 S.C.Owen,Pharmaceutical Press,London,Chicago。

若期望的话，所述组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉末、持续释放配制剂等。口服配制剂可以包含标准药用载体和/或赋形剂，如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、

糖精。

本发明的组合物可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂(例如，可注射用溶液剂和可输注溶液剂)、分散体剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。常见的优选组合物处于可注射用溶液剂或可输注溶液剂形式。优选的施用模式是肠胃外(例如，静脉内、皮下、腹腔(i.p.)、肌内)注射。在一个优选实施方案中，通过静脉内输注或注射施用抗体分子。在另一个优选实施方案中，通过肌内、腹腔或皮下注射施用抗体分子。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗体与一种或多种任选的药用辅料(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编(1980)) 混合来制备包含本文所述的抗体的药物制剂，优选地以冻干制剂或水溶液的形式。

本发明的药物组合物或制剂还可以包含超过一种活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的，优选具有不会不利地彼此影响的互补活性的那些活性成分。例如，理想的是还提供其它治疗剂，例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、疫苗、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂等。所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。在一个实施方案中，所述其他抗体是 PD-1 途径抗体。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质，所述基质呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

VIII. 药物组合和药盒

在一些实施方案中，本发明还提供了药物组合，其包含本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段，或其免疫缀合物，以及 PD-1 途径抗体，以及任选的一种或多种其它治疗剂(例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂等)。

本发明的另一个目的是提供一种成套药盒，其包含本发明的药物组合，优选地所述药盒为药物剂量单元形式。由此可以依据给药方案或药物施用间隔提供剂量单元。

在一个实施方案中，本发明的成套药盒在同一包装内包含：

- 含有包含抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段的药物组合物的第一容器；
- 含有包含 PD-1 途径抗体的药物组合物的第二容器。

在一些实施方案中，PD-1 途径抗体包括抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。

在一个具体的实施方案中，PD-1 抗体包括描述于 WO2017025016、CN108473977B 和 WO2017133540 中及其他同族专利申请/专利中的抗 PD-1 抗体，所述专利或专利申请的全部内容(包括术语定义)被引入本文。其中，优选地，所述抗 PD-1 抗体是 WO2017025016A1 中公开的抗 PD-1 抗体 D-S228P IgG4，在本申请中也称为 PD-1 抗体 IBI308 或是 WO2017133540A1 中公开的抗 PD-1 抗体 C-S228P IgG4，在本申请中也称为 PD-1 抗体 11430。

IX. 用途和方法

本发明一方面提供了在受试者中预防或治疗肿瘤（例如癌症）的方法，包括向受试者施用有效量的本发明的抗 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、药物组合物、药物组合或药盒。

在一些实施方案中，所述肿瘤（例如癌症）患者中具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平的）TIM-3。在一些实施方案中，所述肿瘤（例如癌症）患者中具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平的）PD-L1 或 PD-1 或 PD-L2。在一些实施方案中，所述肿瘤（例如癌症）患者中同时具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平的）TIM-3 和（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平的）PD-L1 或 PD-1 或 PD-L2。

在一些实施方案中，所述癌症是针对 PD-1 途径抗体治疗产生耐药性的癌症。

在一些实施方案中，所述肿瘤例如癌症包括实体肿瘤和血液肿瘤以及转移性病灶。在一个实施方案中，实体瘤的例子包括恶性肿瘤。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是需要激活 T 细胞的肿瘤，例如癌症，例如具有 T 细胞功能障碍的肿瘤或癌症。

在一些实施方案中，所述肿瘤治疗将受益于抑制核酸或蛋白质水平的 PD-L1 或 PD-1 或 PD-L2。在一些实施方案中，所述肿瘤治疗受益于阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合，或 PD-1 与 PD-L2 结合。

在一些实施方案中，所述肿瘤治疗将受益于抑制核酸或蛋白质水平的 TIM-3。在一些实施方案中，所述肿瘤治疗受益于阻断 TIM-3 与其配体，例如磷酸酰丝氨酸的结合。

在一个具体的的实施方案中，所述肿瘤治疗将受益于

- (i) 抑制核酸或蛋白质水平的 PD-L1 或 PD-1 或 PD-L2;
- (ii) 阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合，或 PD-1 与 PD-L2;
- (iii) 抑制核酸或蛋白质水平的 TIM-3;
- (iv) 阻断 TIM-3 与其配体，例如磷酸酰丝氨酸的结合;
- (v) 上述一种或多种的组合。

在一个具体的实施方案中，本发明的抗 TIM-3 抗体能够激活 T 细胞（例如 CD4+T 细胞）或 NK 细胞。

在一个具体的实施方案中，本发明的抗 TIM-3 抗体增强 CD4+ T 细胞功能，例如通过提高 CD4+ T 细胞增殖和/或提高 CD4+ T 细胞的细胞因子生成。在一些实施方案中，该细胞因子是白细胞介素，例如 IL-2。

在一些实施方案中，肿瘤是肿瘤免疫逃逸。在一些实施方案中，所述肿瘤是癌症。

受试者可以是哺乳动物，例如，灵长类，优选地，高级灵长类，例如，人类（例如，患有本文所述疾病或具有患有本文所述疾病的风险的个体）。在一个实施方案中，受试者患有本文所述疾病（例如，癌症）或具有患有本文所述疾病的风险。在某些实施方案中，受试者接受或已经接受过其它治疗，例如化疗治疗和/或放射疗法。在一些实施方案中，受试者之前已经接受过或正在接受免疫疗法，例如用 PD-1 途径抗体进行。

在其他方面，本发明提供抗体分子或其片段或其免疫缀合物或药物组合物或药物组合或药盒在生产或制备药物中的用途，所述药物用于本文所述的用途，例如用于预防或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，本发明的抗体分子或其片段或其免疫缀合物或药物组合物或药物组

合或药盒会延迟病症和/或与病症相关的症状的发作。

在一些实施方案中，本发明的抗体分子或其片段或其免疫缀合物或药物组合物还能与PD-1途径抗体，以及任选的一种或多种其它疗法例如治疗方式和/或其它治疗剂组合施用，用于本文所述的用途，例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，治疗方式包括外科手术；放射疗法、局部照射或聚焦照射等。

在一些实施方案中，治疗剂选自化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、疫苗、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂。

示例性的免疫调节剂包括免疫抑制剂或抗炎剂。

在一些实施方案中，本文中描述的抗体组合可以分别施用，例如，作为单独的抗体分别施用，或连接时(例如作为双特异性或三特异性抗体分子)施用。

此类组合疗法涵盖组合施用(例如两种或更多种治疗剂包含在同一配制剂或分开的配制剂中)，和分开施用，在该情况中，可以在施用别的治疗剂和/或药剂之前，同时，和/或之后发生本发明的抗体的施用。

药物组合物的施用途径是根据已知方法，例如，经口、通过静脉内注射、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门脉内或病灶内途径；通过持续释放系统或通过植入装置。在某些实施方案中，组合物可通过弹丸注射或通过连续输注或通过植入装置施用。

组合物还可经由植入膜、海绵或其上吸收或胶囊包封所需分子的另一种适当的材料被局部施用。在某些实施方案中，当使用植入装置时，所述装置可被植入到任何合适的组织或器官中，并且可经由扩散、定时释放的大丸剂、或连续施用递送所需分子。

X. 用于诊断和检测的方法和组合物

在某些实施方案中，本文中提供的任何抗TIM-3抗体或其抗原结合片段可以用于检测TIM-3在生物样品中的存在。术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如，FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA测定法、PCR-技术(例如，RT-PCR)。在某些实施方案中，生物样品是血、血清或生物来源的其他液体样品。在某些实施方案中，生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中，生物样品来自过度增生性或癌性病灶相关病灶。

在一个实施方案中，提供用于诊断或检测方法的抗TIM-3抗体或其抗原结合片段。在另一个方面中，提供检测TIM-3在生物样品中的存在的方法。在某些实施方案中，方法包含检测TIM-3蛋白在生物样品中的存在。在某些实施方案中，TIM-3是人TIM-3或食蟹猴TIM-3。在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的抗TIM-3抗体或其抗原结合片段在允许抗TIM-3抗体或其抗原结合片段与TIM-3结合的条件下接触，并检测在抗TIM-3抗体或其抗原结合片段和TIM-3之间是否形成复合物。复合物的形成表示存在TIM-3。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，抗TIM-3抗体或其抗原结合片段被用于选择适合利用抗TIM-3抗体或其抗原结合片段的治疗的受试者，例如其中TIM-3是用于选择所述受试者的生物标记物。

在一个实施方案中，可以使用本发明抗体诊断肿瘤，例如癌症，例如评价(例如，监测)个体中本文所述疾病的治疗或进展、其诊断和/或分期。在某些实施方案中，提供标记的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记)，以及被间接检测的部分，如酶或配体，例如，通过酶促反应或分子相互作用。

在本文中提供的一些实施方案中，样品是在用抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段治疗之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用其他疗法之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用其他疗法治疗过程中，或者用其他疗法治疗后获得的。在一些实施方案中，样品是在用 PD-1 途径抗体或其抗原结合片段治疗之前、期间或之后获得的。

在一些实施方案中，样品是福尔马林固定、石蜡包膜(FFPE)的。在一些实施方案中，样品是活检(例如芯活检)，手术标本(例如来自手术切除的标本)，或细针吸出物。

在一些实施方案中，在治疗之前，例如，在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测 TIM-3。

在一些实施方案中，提供了一种治疗本发明疾病的方法，所述方法包括：对受试者(例如，样品)(例如，受试者样品)检验 TIM-3 的存在，因而确定 TIM-3 值，将 TIM-3 值与对照值比较，并且如果 TIM-3 值大于对照值，则向受试者施用治疗有效量的任选与一种或多种其他疗法组合的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段(例如，本文所述的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段)，因而治疗所述疾病。

本发明的这些以及其它方面和实施方案在附图(附图简述紧随其后)和以下的发明详述中得到描述并且示例于以下实施例中。上文以及整个本申请中所论述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以说明而非限定的方式来描述，并且本领域技术人员可以进行多种修改。

实施例

实施例 1. 杂交瘤细胞的制备

杂交瘤技术是通过融合两种细胞而同时保持两者的主要特征。这两种细胞分别是经抗原免疫的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞。被特异性抗原免疫的小鼠脾细胞(B 淋巴细胞)的主要特征是它的抗体分泌功能，但不能在体外连续培养，小鼠骨髓瘤细胞则可在培养条件下无限分裂、增殖，即具有所谓永生性。在选择培养基的作用下，只有 B 细胞与骨髓瘤细胞融合的杂交细胞才能具有持续培养的能力，形成同时具备抗体分泌功能和保持细胞永生性两种特征的细胞克隆。本实验通过人 Tim-3 蛋白免疫小鼠，再获取小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞融合，获得能够表达阳性抗体的杂交瘤细胞。

杂交瘤融合

实验动物及免疫信息

小鼠类型	Balb/c (北京维通利华实验动物技术有限公司)
免疫抗原	人 Tim-3 蛋白, Novoprotein, 货号: C356
免疫方法	50 µg /只, 皮下注射 (SC), 50 µl 每点, 2 点
免疫次数	5

电融合皿准备：用 70%乙醇彻底浸泡电融合皿，并于超净台中吹干备用。

分离脾细胞：颈脱位将小鼠处死，用 75%酒精消毒体表 5 min，随即放入超净台内小鼠解剖板上，左侧卧位，用 7 号针头固定四肢。无菌打开腹腔取出脾脏，用基础培养基（配置方法如下表）洗涤，并仔细去掉周围附着的结缔组织。随后将脾脏转移到另一个盛有基础培养基的平皿中。以弯头针头压住脾脏，用小针头在脾脏上插孔，并用镊子挤压，使脾细胞充分释放，制成脾细胞悬液。细胞悬液经 70 μ M 细胞筛网过滤后用 30 ml 基础培养基洗一遍，1200 rpm 离心 6 min。

名称	组成	配制方法
基础培养基	FBS (Hyclone,SH30084.03)	10%
	GlutaMAX™ Supplement (Gibco, 35050-079)	1×
	RPMI-1640 (Hyclone, SH30809.01)	90%

裂解红细胞：去除上清，用 10 ml RBC 裂解缓冲液(GIBCO, A10492-01)重悬细胞。然后再加入 20 ml RBC 裂解缓冲液。悬液静置 5 min 后 1100 rpm 离心 6 min。去上清后用 10 ml 基础培养基重悬细胞，然后再加入 30 ml 基础培养基，1100 rpm 离心 6 min。去除上清后，细胞重悬于 20 ml 基础培养基中并计数。

电融合：用 20 ml 基础培养基重悬小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞 (ATCC, CRL-1581) 并计数。将 SP2/0 和脾细胞以 1:2~1:1 的比例混合，1000 rpm 离心 6 min。去除上清后将混合的细胞重悬于 10 ml 融合缓冲液(BTXpress,47-0001)中。再加入 15 ml 融合缓冲液，1000 rpm 离心 5 min，去除上清。重复上述步骤一遍后，用适量融合缓冲液重选细胞，调整混合细胞密度至 1×10^7 个细胞/ml。电融合仪的参数设置如下。每个电融合皿中加入 2 ml 细胞悬液进行电融合。

Condition	Mouse (SP2/0-ECF-F)
Alignment:	60v, 30 sec
Membrane breaking:	1500V, 30 μ s, 3X
Post-fusion pulse:	60V, 3 sec

电融合后铺板：细胞于电融合皿中室温静置 5 min。将细胞转移入离心管中，用筛选培养基（配置方法如下表）稀释细胞至 $1 \sim 2 \times 10^4$ 个细胞/ml。96 孔板中每孔加入 100 μ l 细胞悬液。融合后第 7 天更换筛选培养基。培养第 10 天（或更久，根据细胞生长状态）后进行筛选。通过 FACS (C6 (BD Biosciences)) 检测筛选出表达特异性抗 Tim-3 抗体的杂交瘤细胞。

细胞冻存：观察细胞状态，等细胞生长良好，活力 >90% 时，1000 rpm 离心 5 min，去除上清。用冻存液(45.5%FBS (Hyclone), 44.5%RPMI-1640(Hyclone), 10%DMSO (SIGMA)) 重悬细胞至 1×10^7 个细胞/ml，分装至冻存管，放入程序降温盒中，-80 $^{\circ}$ C 冻存。

名称	组成	配制方法
筛选培养基	RPMI-1640 (Hyclone, SH30809.01)	80%
	FBS(Hyclone,SH30084.03)	20%
	HAT 培养基 (Gibco,21060-017)	1×
	GlutaMAX™ Supplement (Gibco Gibco, 35050-079)	1×

实施例 2. 嵌合抗体的生产和纯化

本发明利用分子生物学技术，获得实施例 1 中杂交瘤细胞产生的抗 Tim-3 抗体的抗体序列，并利用其构建人鼠嵌合抗体。

杂交瘤测序

RNA 抽提：对实施例 1 中获得的新鲜细胞，300 g 离心 5 min，去除上清，沉淀中加入 500 μ l LY 缓冲液(Biomiga, R6311-02)(在使用前每 1 ml 加入 20 μ l β 巯基乙醇)，混匀至澄清。

加入到 DNA 去除管中, 13000 rpm 离心 2 min, 收集流穿液。按 1/2 的比例向流穿液中加入 100% 乙醇, 混匀 5 次至澄清。将澄清的溶液加入到 RNA 收集管中, 13000 rpm 离心 1 min 去除液体, 加入 500 μ l RB(Recovery Buffer, 回收缓冲液)(Takara), 13000 rpm 离心 30 s, 再加入 500 μ l RNA 洗涤缓冲液(Biomiga) (用之前加入乙醇), 离心 30 s, 重复一遍上述过程后, 离心彻底挥发去除乙醇后, 向收集柱中加入 30 μ l DEPC 水, 12000 g 离心 2 min, 收集洗脱液。测定 RNA 浓度。

利用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, 6210A) 反转录获得 cDNA: 配置反应体系 I 如下:

名称	使用量
Oligo dT Primer	1 μ l
dNTP	1 μ l
模板 RNA(上述获得的 RNA)	5 μ g
RNase free ddH ₂ O	补至 10 μ l

65°C 温育 5 min 后, 迅速置冰上冷却。向反应体系 I 中加入下列反转录体系, 总量为 20 μ l:

名称	使用量
反应体系 I	10 μ l
5×PrimeScript II Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	0.5 μ l (20 U)
PrimeScript II RTase (200U/ μ l)	1 μ l (200U)
RNase free ddH ₂ O	补至 20 μ l

缓慢混匀后按下述条件进行反转录翻译: 42°C 60 min → 95°C 5 min, 然后放冰上冷却, 获得 cDNA。

利用 TaKaRa EX Tag 试剂盒将 cDNA 连接 T 载体:

PCR 分别扩增重链和轻链可变区, PCR 反应体系如下:

名称	使用量
TaKaRa EX Tag HS	0.25 μ l
Primer Mix 1 (见下表)	1 μ l
Primer Mix 2 (见下表)	1 μ l
cDNA (如上所述获得)	1 μ l
10×Ex Tag 缓冲液	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
RNase free ddH ₂ O	补至 50 μ l

小鼠抗 Tim-3 抗体的重链可变区(VH)引物(Primer Mix 1, 按下述比例混合后, 获得 Primer Mix 1 用于后续 VH 的 PCR 扩增):

名称		比例
OVH1	SAGGTCCAGCTGCAGCAGYYTGG	28.6
OVH2	CAGGTRCAGCTGAAGSAGTCAGG	10.7
OVH3	GAKGTGCAGCTTCAGCAGTCRGG	8.9
OVH5	GAVGTGAWGCTGGTGGAGTCTGR	7.1
OVH11	GAAGTGCAGCTGTTGGAGACTGG	3.6
OVH14	GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGK	16.1

名称		比例
OVH15	CAGGTTACCTACAACAGTCTGG	3.5
REVESE-6	CTGAGGARACGGTGACCG	6
REVESE-4	CTGAGGAGACTGTGAGAGWGGT	4
REVESE-2-1	CTGAGGAGACGGTGACTGAGGT	2
REVESE-2-2	CTGCAGAGACAGTGACCAGAGT	2
ddH ₂ O	/	q.s

小鼠抗 Tim-3 抗体的轻链可变区(VL)引物(Primer Mix 2, 按下述比例混合后, 获得 Primer Mix 2 用于后续 VL 的 PCR 扩增。):

名称		比例
IGKV1	GATGYTKTGATGACCCAAACTCCA	17.65
IGKV2-109	GATATTGTGATGACGCAGGCTGCA	5.88
IGKV2-112	GATATTGTGATAACCCAGGATGAA	5.88
IGKV3-7	GACATTGTGCTAACACAGTCTCCT	2.94
IGKV3-1-5.10	RACATTGTGCTSACCCAATCTCCA	29.41
IGKV5-48	GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCA	2.94
IGKV6-13	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAA	2.94
IGKV6-32	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCC	2.94
IGKV14	GACATCMAGATGACMCAGTCTCCA	11.76
IGKV4-51.86	GAAAATGTGCTCACYCAGTCTCCA	2.94
IGKV7-33	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCA	2.94
IGKV9-123	GACATCCAGATGATTCAGTCTCCA	2.94
IGKV9-124	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCA	2.94
IGKV10-95	GATATCCAGATGACACAGACTACT	2.94
IGKV11-125	GATGTCCAGATGATTCAGTCTCCA	2.94
mK-Rev	TACAGTTGGTGCAGCATCAG	/

PCR 反应条件如下:

94°C	5 min	
94°C	30 s	
55°C	30 s	30 个循环
72°C	60 s	
72°C	5 min	

取 4.5 μ l 上述 PCR 反应获得的 PCR 产物, 加入 0.5 μ l pMD20-T 载体(Clontech), 5 μ l Ligation Mighty Mix (Takara,6028), 轻轻混匀, 于 37°C 反应 2 h, 获得连接产物。

转化细胞:

-80°C 取出 TOP10 感受态 (天根生化科技 (北京) 有限公司, CB104-02), 冰上融化, 取上述获得的连接产物 5 μ l 加入到融化的 TOP10 感受态中, 混匀后冰上孵育 30 min。42°C 热激 90 s 后迅速冰上冷却 2 min, 向 EP 管中补加 900 μ l LB 培养基 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司), 37°C, 220 rpm 摇床培养 1 h。3000 g 离心 2 min, 吸除 800 μ l 上清, 用剩余的培养基将菌体重悬并涂布在氨苄青霉素抗性的平板上。于 37°C 培养过夜, 挑克隆测序。

构建嵌合抗体

PCR 扩增已经测序的实施例 1 中杂交瘤产生的鼠抗 Tim-3 抗体 VH 及 VL 区。
PCR 体系如下:

名称	使用量
2×Taq PCR Mastermix(天根,KT201-01)	25 μ l
Primer Mix*	2 μ l
质粒模板	0.5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
RNase free ddH ₂ O	补至 50 μ l

*对于 VH 链扩增, 应用 Primer Mix 1; 对于 VL 链扩增, 应用 Primer Mix 2。
切胶回收 PCR 扩增产物。

同源重组反应:

同源重组体系如下:

名称	使用量
回收片段	1 μ l
pTT5 载体	2 μ l
5×Buffer (Takara)	2 μ l
同源重组酶 (Takara)	1 μ l
ddH ₂ O	补至 10 μ l

37°C反应 30 min, 获得重组产物。重组产物转化 TOP10(天根, CB104-02)感受态, 并挑取单克隆测序, 选择包含插入方向正确的质粒的克隆作为阳性克隆, 保存阳性克隆。

嵌合抗体的表达和纯化

从上文获得的阳性克隆中提取包含抗 Tim-3 抗体的质粒。

根据所需转染体积传代 293F 细胞 (Invitrogen), 转染前一天将细胞密度调整至 1.5×10^6 个细胞/ml。转染当天细胞密度约为 3×10^6 个细胞/ml。取终体积 1/10 的 Opti-MEM 培养基 (Gibco, 31985-070) 作为转染缓冲液, 按 1.0 μ g/ml 转染细胞加入上述获得的质粒, 混匀。加合适的聚乙烯亚胺(PEI) (Polysciences, 23966) 到质粒中(质粒与 PEI 的比例在 293F 细胞中为 1:3), 混匀后室温孵育 20 min, 获得 DNA/PEI 混合物。将 DNA/PEI 混合物缓慢加入细胞中, 边加边轻轻晃动摇瓶, 于 36.5°C, 120 rpm, 8%的 CO₂ 条件下培养。18 h 后补加转染体积 0.1% 的 2 M 丙戊酸钠溶液 (Sigma) 以及 2.5% 的自制 Feed, 于 36.5°C, 120 rpm, 8%的 CO₂ 条件下培养。连续培养至第 6 天或者细胞活力 $\leq 60\%$ 时, 收集细胞上清进行纯化。

将纯化使用的层析柱使用 0.1 M NaOH 处理 2 h, 玻璃瓶等用蒸馏水洗净后在 180°C 干烤 4h, 获得纯化柱。纯化前将收集的细胞料液 4500 rpm 离心 30 min, 弃掉细胞。再将上清使用 0.22 μ m 的滤器过滤。使用 10 个柱体积的结合缓冲液 (磷酸钠 20mM, NaCl 150mM, PH7.0) 平衡 Protein A 柱 (Hitrap Mabselect Sure 5*5ml, GE, 11-0034-95)。将过滤后的上清加入纯化柱后使用 10 个柱体积的结合缓冲液平衡。加 5 ml 洗脱缓冲液(柠檬酸+柠檬酸钠 0.1M, pH3.5), 收集洗脱液, 每 1 ml 的洗脱液加入 80 μ l 浓度为 2M Tris-HCl。Tris-HCl。将收集的抗体超滤浓缩交换到 PBS (Gibco, 70011-044) 中, 并检测浓度。

本发明获得的 2 个嵌合抗体 (CH4-3 和 CH5-17), 其 CDR 序列、轻链可变区和重链可变区, 轻链和重链的氨基酸序列, 以及序列编号请参见所附序列列表。

本发明所用的对照抗体来自 Tesaro, Inc 公司的专利 WO2016161270 的 TIM-3 抗体, 以下简称 TSR-022, 阴性对照应用抗体 IgG1, 其序列参见所附序列列表。所述对照的表达和纯化方法同本发明抗体。

实施例3 生物膜薄层干涉技术测定本发明的嵌合抗体与抗原的结合动力学

采用生物膜薄层干涉测定技术(BLI)测定本发明抗体结合人 Tim-3 的平衡解离常数 (K_D)。BLI 法亲和力测定按照现有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MABs, 2013.5(2): 第 270-8 页) 进行。

实验开始前半个小时, 根据样品数量, 取合适数量的 AHC (Foertbio, 18-5060) 传感器浸泡于 SD buffer (PBS 1×, BSA 0.1%, Tween-20 0.05%) 中。

取 100 μ l 的 SD 缓冲液、抗体 (CH4-3、CH5-17 和 TSR-022, 浓度相同)、抗原 (包括人 Tim-3、及食蟹猴 Tim-3, 均自 Novoprotein 购买) 分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板 (Greiner, 675076) 中。使用 ForteBio Octet Red96 进行检测, 根据样品位置布板, 选择传感器位置。仪器设置参数如下: 运行步骤: Baseline、Loading ~1 nm、Baseline、Association 和 Dissociation; 各个步骤运行时间取决于样品结合和解离速度, 转速为 1000 rpm, 温度为 30°C。使用 ForteBio Octet 分析软件分析 K_D 值。

在以上测定法所述的实验中, 抗体 CH4-3、CH5-17 的亲和力如表 1 所示:

表 1. ForteBio 检测抗原抗体结合的亲和力常数 (平衡解离常数)

Antibody	Antigen	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
CH4-3	人 Tim-3	2.02E-09	4.79E+05	9.68E-04
CH5-17		5.36E-09	6.56E+05	3.51E-03
TSR-022		6.47E-09	4.67E+05	3.02E-03

在以上试验中, 嵌合抗体 CH4-3、CH5-17 与人 Tim-3 的 K_D 值分别为 2.02E-09 M、5.36E-09 M, 与对照组 TSR-022 相比, 本研究中的抗体具有相似或更优的 K_D 值。

实施例4 嵌合抗体和过表达人 Tim-3 的 CHO-S 细胞的结合实验

本研究利用流式细胞仪检测了梯度稀释的本发明的嵌合抗体与表面过表达人 Tim-3 的 CHO-S 稳定细胞株的结合情况。

将编码人 Tim-3 (SEQ ID NO:34) 的 cDNA 克隆到 pCHO1.0 载体 (Invitrogen) 上, 转染到 CHO-S 细胞 (Invitrogen), 产生过表达人 Tim-3 的 CHO-S 细胞 (CHOS-hTim-3)。

将 CHOS-hTim-3 细胞计数, 并稀释至 2×10^6 个细胞/ml, 向 U 型底 96 孔板中加入 100 μ l/孔。300 g 离心 5 min, 去除细胞培养基。将样品 (分别是嵌合抗体 CH4-3、CH5-17, 以及阳性对照抗体 TSR-022) (抗体稀释方法为: 最高抗体浓度为 400 nM, 三倍梯度稀释在 PBS 中, 总共测试了 12 个浓度) 加入 U 型板并重悬细胞, 100 μ l/孔, 冰上静置 30min。400g 离心 5min 去除上清, PBS 洗细胞 2 遍。300 g 离心 5min, 去除 PBS, 每孔加入 100 μ l 抗人 Fc 的 PE 标记的二抗 (SouthernBiotech; 2040-09) (1:100 稀释于 PBS 中), 在冰上避光孵育 30 min。400g 离心 5min 去除上清, PBS 洗细胞 3 遍。用 200 μ l 1×PBS 重悬细胞, FACS 检测。

在以上测定法所述的实验中, 抗体 CH4-3、CH5-17 和 CHOS-hTim-3 细胞的结合情况如图 1 所示。

在以上测定法所述的实验中, 检测结果如图 1 所示, 抗体 CH4-3、CH5-17 均结合 CHO-S 细胞上过表达的人 Tim-3 分子, EC50 分别为 0.7943nM、0.6521nM, 与对照抗体 TSR-022 相比, 结合能力相似。

实施例5 嵌合抗体的人源化

将实施例 2 得到的抗体 CH4-3 嵌合抗体进行人源化。并经过以下步骤进行人源化:

- ①确定 CDR 环结构;
- ②在人种系序列数据库为重链和轻链的每个 V/J 区域找到最接近的同源序列;
- ③筛选与重链轻链最匹配的人种系以及最低量的回复突变;

- ④将嵌合抗体的 CDR 区构建至人的骨架区上;
- ⑤使用序列和结构特征, 确定骨架区中起到维持 CDR 功能的氨基酸位置;
- ⑥在确定为重要的序列位置进行回复突变 (返回到输入氨基酸类型);
- ⑦优化风险位点的氨基酸。

本发明获得的 1 个人源化抗体 Hz4-3.6 的 CDR、轻链可变区和重链可变区, 轻链和重链的氨基酸序列请参见所附序列列表。

实施例 6 人源化抗体生产与纯化

将上文获得的人源化抗体 Hz4-3.6 序列克隆到 pcDNA3.1(Invitrogen), 获得质粒 DNA。

采用 The ExpiCHO™ Expression system(Gibco, A29133)表达系统生产蛋白, 具体而言: 根据所需转染体积传代 ExpiCHO 细胞 (Gibco), 转染前一天将细胞密度调整至 3.5×10^6 个细胞/ml。转染当天将细胞密度调整为 6×10^6 个细胞/ml。取一支 50 ml 的离心管, 按 8% 转染细胞体积加入转染缓冲试剂 OptiPRO SFM (Gibco, 12309019), 按 0.8 μg/ml 转染细胞计算总的所需质粒量 (轻重链比例为 1:1), 利用 0.22 μm 滤膜过滤含所获得的质粒 DNA 的转染缓冲液至另一个新的 50 ml 离心管中, 按 DNA:Reagent=1:4 比例向过滤后的混合物中加入 ExpiFectamine™ CHO reagent(Gibco, 100033022), 充分混合, 将转染试剂与质粒 DNA 混合后立即缓慢加到细胞中, 边加边轻轻晃动摇瓶, 控制转染试剂与质粒孵育的时间不要超过 5 min; 36.5°C, 8% CO₂, 摇床培养。18-22h 后, 按 6 μl/ml 细胞体积加入 Enhancer (Gibco, 100033019), 300 μl/ml 细胞体积加入 Feed (Gibco, A29101-01), 于 36.5°C, 120 rpm, 8% 的 CO₂ 条件下培养。连续培养至第 6 天或者细胞活力 ≤ 60% 时, 收集细胞上清进行纯化。

将纯化使用的的层析柱使用 0.1 M NaOH 处理 2 h, 玻璃瓶等用蒸馏水洗净后在 180°C 干烤 4h, 获得纯化柱。纯化前将收集的细胞料液 4500 rpm 离心 30 min, 弃掉细胞。再将上清使用 0.22 μm 的滤器过滤。使用 10 个柱体积的结合缓冲液 (磷酸钠 20mM, NaCl 150mM, pH7.0) 平衡预装 Protein A 柱 (Hitrap Mabsselect Sure 5*5ml, GE, 11-0034-95)。将过滤后的上清加入纯化柱后使用 10 个柱体积的结合缓冲液平衡。加 5 ml 洗脱缓冲液 (柠檬酸+柠檬酸钠 0.1M, pH3.5), 收集洗脱液, 每 1 ml 的洗脱液加入 80 μl 浓度为 2M Tris-HCl。将收集的抗体超滤浓缩交换到 PBS (Gibco, 70011-044) 中, 并检测浓度。

实施例 7 生物膜薄层干涉技术测定本发明的人源化抗体与食蟹猴抗原的结合动力学

采用生物膜薄层干涉测定技术(BLI)测定本发明抗体结合食蟹猴 Tim-3 的平衡解离常数 (K_D)。BLI 法亲和力测定按照现有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页) 进行。

实验开始前半个小时, 根据样品数量, 取合适数量的 AHC (Foertbio, 18-5060) 传感器浸泡于 SD buffer (PBS 1x, BSA 0.1%, Tween-20 0.05%) 中。

取 100 μl 的 SD 缓冲液、抗体 (相同浓度的 Hz4-3.6 和 TSR-022)、抗原 (食蟹猴 Tim-3, NOVOPROTEIN, CU83) 分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板 (Greiner, 675076) 中。使用 Fortebio Octet Red96 进行检测, 根据样品位置布板, 选择传感器位置。仪器设置参数如下: 运行步骤: Baseline、Loading ~1 nm、Baseline、Association 和 Dissociation; 各个步骤运行时间取决于样品结合和解离速度, 转速为 400 rpm, 温度为 30°C。使用 ForteBio Octet 分析软件分析 K_D 值。

在以上测定法所述的实验中, 人源化抗体 Hz4-3.6 的亲和力如表 2 所示:

表 2. ForteBio 检测抗原抗体结合的亲和力常数 (平衡解离常数)

抗体	抗原	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
----	----	-----------	-----------------	-----------------

H4-3.6	食蟹猴	1.04E-8	1.69E+5	1.76E-3
TSR-022	Tim-3	1.28E-8	1.71E+5	2.18E-3

在以上试验中，人源化抗体 H4-3.6 的 K_D 值为 1.04E-08M，与对照抗体 TSR-022 相比，本研究中的抗体具有相似 K_D 值。

实施例 8 人源化抗体的亲和力的 SPR 测定

采用表面等离子共振法 (SPR) 测定本发明抗体结合人 Tim-3 的平衡解离常数 (K_D)。基于 SPR 原理，当一束偏振光以一定的角度入射到棱镜端面，在棱镜与金膜的界面将产生表面等离子波，引起金属膜内自由电子产生共振，即表面等离子共振。分析时，先在传感芯片表面固定一层生物分子识别膜，然后将待测样品流过芯片表面，若样品中有能够与芯片表面的生物分子识别膜相互作用的分子，会引起金膜表面折射率变化，最终导致 SPR 角变化，通过检测 SPR 角度变化，获得被分析物的亲和力、动力学常数等信息。

本实施例通过 Biacore (GE Healthcare, T200) 测定人源化抗体的 K_D ，具体方法如下：抗体 (相同浓度的 H4-3.6 和 TSR-022) 被抗人 Fc 抗体捕获到芯片之后，通过检测抗原与被捕获的抗体之间的结合与解离获得亲和力及动力学常数。该方法包括芯片制备和亲和力检测。测定过程使用 10 倍稀释后的 10×HBS-EP+ (BR-1006-69, GE Healthcare) 作为实验缓冲液。芯片制备过程使用氨基偶联试剂盒 (BR-1006-33, GE Healthcare)，将其中的人 Fc 抗体偶联在 CM5 芯片 (29-1496-03, GE Healthcare) 表面。然后将抗人 Fc 抗体稀释于 10 mM Acetate (pH 5.0) 中，注入 CM5 芯片双通道，使蛋白共价偶联在芯片通道表面，偶联高度约 6000 RU。最后注入 1 M 乙醇胺，对剩余的活化位点进行封闭。亲和力检测每个循环包括捕获抗体、结合一种浓度抗原及芯片再生。首先将稀释后抗体，以 10 μ l/min 的流速，捕获在 CM5 芯片第四通道，捕获时间 60 s，3 通道为空白对照通道。然后根据方法开发后的最佳浓度范围，将梯度稀释后的抗原 (人 Tim-3 (SINO, 10390-H08H-50))，从低浓度到高浓度的顺序，注入芯片双通道，结合时间 180 s，解离时间 600 s。最后使用 10 mM Glycine pH 1.5 (BR-1003-54, GE Healthcare) 对芯片进行再生。数据结果使用 Biacore T200 分析软件，所用的分析模型为 1:1 结合模型进行动力学的分析。

在以上测定法所述的实验中，抗体 H4-3.6 的亲和力如表 3 所示：

表 3. Biacore 检测抗原抗体结合的亲和力常数 (平衡解离常数)

抗体	抗原	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
H4-3.6	人 Tim-3	3.768E-9	2.390E+5	9.005E-4
TSR-022		5.470E-8	2.388E+5	1.306E-2

在以上试验中，人源化抗体 H4-3.6 的 K_D 值分别为 3.768E-09 M，与对照抗体 TSR-022 相比，本研究中的抗体具有更优的 K_D 值。

实施例 9 人源化抗体和表达人 Tim-3 的细胞的结合实验

本研究利用流式细胞仪检测了梯度稀释的本发明的人源化抗体与表面过表达人 Tim-3 的 CHO-S 稳定细胞株的结合情况。

将编码人 Tim-3 (SEQ ID NO:34) 的 cDNA 克隆到 pCHO1.0 载体 (Invitrogen) 上，转染到 CHO-S 细胞 (Invitrogen)，产生过表达人 Tim-3 的 CHO-S 细胞 (CHOS-hTim-3)。

检测步骤：400g，5 min，离心，去除细胞培养基，PBS 重悬 CHOS-hTim-3 细胞，计数后，调整细胞密度为 2×10^6 个/ml，向 U 型底 96 孔板中加入 100 μ l/孔。加入待测抗体，三倍梯度稀释，冰上静置 30 min。300 g，5 min 去除上清，PBS 洗细胞 1 遍。300g，5 min 去除 PBS，每孔加入 100 μ l 1:200 稀释的 PE-抗人 Fc 抗体 (SOUTHERN BIOTECH, 2040-09)。冰上避光孵育 30 min。400 g，5 min 去除上清，PBS 洗细胞 2 遍。用 100 μ l PBS 重悬细胞，流

式细胞仪 (BD, FACSCELESTA) 检测。

在以上测定法所述的实验中, 检测结果如图 2 所示在, 人源化抗体 Hz4-3.6 结合 CHO-S 细胞上过表达的人 Tim-3, 与对照抗体 TSR-022 相比, 具有相当的结合能力。

实施例 10 人源化抗体和 CD4+ T 细胞的结合实验

本研究利用流式细胞仪检测了梯度稀释的本发明的人源化抗体与 CD4+T 的结合情况。

复苏人的 PBMC 细胞 (ALLCELLS, PB005F), 使用 Human T cell enrichment kit (STEMCELL, 19052) 分离出 CD4+T 细胞, 在 AIM V® Medium CTS (GIBCO, A3021002) 培养基中培养, 按照 CD4+:抗-CD3/CD28 Beads=1:1 加入 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 Beads (Gibco, 11131D), 刺激 4 天。

检测步骤: 400g, 5 min, 离心, 去除细胞培养基, PBS 重悬细胞, 计数后, 调整细胞密度为 2×10^6 个/ml, 向 U 型底 96 孔板中加入 100 μ l/孔。加入待测抗体, 三倍梯度稀释, 冰上静置 30 min。300 g, 5 min 去除上清, PBS 洗细胞 1 遍。300g, 5 min 去除 PBS, 每孔加入 100 μ l 1:200 稀释的 PE-抗人 Fc 抗体 (SOUTHERN BIOTECH, 2040-09)。冰上避光孵育 30 min。400 g, 5 min 去除上清, PBS 洗细胞 2 遍。用 100 μ l PBS 重悬细胞, 流式细胞仪 (BD, ACCURIC6 plus) 检测。

在以上试验中, 结果如图 3 所示, 人源化抗体 Hz4-3.6 结合 CD4+T 细胞能力与对照抗体 TSR-022 相当。

实施例 11 MOA 方法检测抗体的生物学活性

TIM-3 的配体之一为凋亡细胞表面的 PtdSer。本实验利用凋亡的 L363 细胞检测抗 TIM-3 抗体阻断 TIM-3 与 PtdSer 结合的能力。首先使用 H_2O_2 诱导 L363 细胞 (科佰, CBP60240) 凋亡, 然后通过流式方法检测抗 Tim-3 抗体阻断 hTim-3 蛋白 (R&D, 2365-TM-050) 结合凋亡细胞的能力, 从而判断抗 Tim-3 抗体阻断 Tim-3 与配体 PtdSer 结合的能力。

取对数生长期的 L363 细胞, 400 g, 离心 5 min, 弃培养上清。使用凋亡诱导培养基 (见下表) 重悬成 2×10^6 个细胞/ml, $37^\circ C$, 5% CO_2 培养箱, 过夜培养。

名称	组成	配制方法
	FBS (Hyclone,SH30084.03)	10%
凋亡诱导培养基	过氧化氢 30% (沪试, 10011208)	10000×
	RPMI-1640 (Hyclone, SH30809.01)	90%

400g 离心, 弃上清, $1 \times$ binding buffer ($10 \times$ Annexin V Binding Buffer, BD, 51-66121E) 重悬成 2×10^6 个/ml; 50μ l/孔加入 $1 \times$ binding buffer 稀释的 hTim-3 蛋白 (R&D, 2365-TM-050) 浓度 8μ g/ml, 加入待测抗体起始浓度 200nM, 两倍稀释, 共十个浓度点, 每孔加入 50μ l 重悬好的细胞, 室温孵育 30 分钟, 200μ l/孔加入 $1 \times$ binding buffer 洗 2 遍。400 g 离心 5min 去除 PBS, 每孔加入 100 μ l 抗人 Fc 的 PE 标记的二抗 (SouthernBiotech; 2040-09) (1:200 稀释于 PBS 中), 在冰上避光孵育 30 min。400g 离心 5min 去除上清, PBS 洗细胞 1 遍。用 100 μ l $1 \times$ PBS 重悬细胞, FACS 检测。

在以上试验中, 实验结果如图 4 所示, 抗体 Hz4-3.6 可以有效阻断 Tim-3 与配体 PtdSer 的结合, 与对照抗体 TSR-022 相比, 具有相似的阻断能力。

实施例 12 CD4+ T 激活细胞实验

本研究将抗体和 CD4+ T 细胞与诱导成熟的 DC 细胞共同孵育, 通过检测体系中 IL-2 的表达量, 从而反应出不同抗体对 CD4+ T 细胞的激活作用, 详细实验过程如下:

复苏人的 PBMC 细胞 (ALLCELLS, PB005F), 静置 3 小时贴壁后即单核细胞, 添加

10 ml AIM V® Medium CTS (GIBCO, A3021002) 培养基, 加入 IL4(20 ng/ml) (R&D, 204-IL), GM-CSF(10 ng/ml) (R&D, 215-GM) 诱导单核细胞分化为 DC 细胞, 培养至第 5 天, 添加诱导 DC 成熟的细胞因子 TNF α (1000U/ml, 10ng/ml) (R&D, 210-TA), RhIL-1 β (5 ng/ml) (R&D, 201-LB), RhIL-6 (10 ng/ml) (R&D, 206-IL), 1 μ M PGE (Tocris, 2296), 二氧化碳培养箱中 37°C, 5% CO₂ 培养条件下继续培养 2 天, 作为淋巴细胞混合反应 (MLR) 的成熟 DC 细胞;

复苏人的 PBMC 细胞 (ALLCELLS, PB005F), 按照 Human CD4+T 细胞 enrichment kit (STEMCELL, 19052) 的说明书, 实施 CD4+T 细胞分离。简而言之, 上述将 PBMC 静置培养 2 小时后吸取的悬浮细胞液置于 20 ml 离心管中, 300 g 离心 10 分钟, 向细胞沉淀物中加入 500 μ l 分离液和 100 μ l 试剂盒中配备的纯化抗体, 4°C 孵育 20 分钟, 用分离液清洗一次, 再加入 500 μ l 珠缓冲液孵育 15 分钟, 磁场去除珠, 用 AIM V® Medium CTS (GIBCO, A3021002) 培养基洗一次, 使用 8 ml AIM V® Medium CTS (GIBCO, A3021002) 培养基细胞, 培养获得的 CD4+T 细胞;

将上述诱导成熟的 DC 细胞与 CD4+T 细胞混合, 每孔体积 200 μ l, DC 细胞 12000 个, CD4+细胞 120000 个, 加入抗体 (梯度稀释的抗体 Hz4-3.6、TSR-022、IBI308 和 IgG1), 混合培养 4 天, 使用 Human IL-2 Uncoated ELISA Kit (2nd Gen) 检测试剂盒 (EBIOSCIENCE, 88-7025-77) 检测每个样品中的 IL2 表达量, 不同抗体 IL2 表达量反应了对 T 细胞的激活能力。

实验结果如图 5 所示, Hz4-3.6 与抗 PD-1 抗体 IBI308 (sintilimab) 联合用药可以在体外有效激活 T 细胞, 其激活效果比抗 PD-1 抗体 IBI308 抗体单独使用更强。

实施例 13 NK 细胞激活实验

抗 Tim-3 抗体可以与 NK 细胞表面表达的 Tim-3 分子结合, 进而介导 NK 细胞的激活。本研究在 NK 细胞和肿瘤细胞 K562(ATCC) 的混合体系中, 通过检测 NK 细胞表面表征激活的 NKG2D 和 CD107a 来反应出 NK 细胞的激活情况, 从而检测抗体对 NK 细胞的激活活性。

取新鲜的 NK 细胞 (ALLCELLS, PB012-C), 调整细胞密度 1.6x10⁶/ml, 每孔铺板 50 μ l, 加入待测抗体, 37°C、5% CO₂ 培养 30 分钟, 加入靶细胞 K562 (ATCC)(密度 4 x10⁵/ml), 每孔 50 μ l, 37°C、5% CO₂ 培养 5 小时。400g, 离心 5 分钟, PBS 重悬细胞, 加入荧光抗体 FITC anti-human CD314 (NKG2D) Antibody (BIOLEGEND, 320820), PerCP/Cy5.5 anti-human CD56 (NCAM) (BIOLEGEND, 318322) 和 Brilliant Violet 421™ anti-human CD107a (BIOLEGEND, 328626), 4°C 孵育 30 分钟, PBS 洗一遍后流式仪器 (BD, FACSCELESTA) 读数。

在以上试验中, 实验结果如图 6 所示, 抗体 Hz4-3.6 可以有效增强表征 NK 激活的细胞表面 NKG2D 和 CD107a 的表达, 且增强作用与对照抗体 TSR-022 相似。

实施例 14. 抗肿瘤药效试验

本实验采用 MC38 细胞接种 hTim-3 基因敲入小鼠测定本发明的抗 Tim-3 抗体联合抗 PD-1 抗体 11430 (WO2017/133540) 的抗肿瘤作用。

人 Tim-3 基因敲入小鼠:

雌性 C57BL/6 背景的人 Tim-3 基因敲入小鼠购自上海南方模式生物科技股份有限公司, 等级为 SPF 级, 质检单位为苏州西山生物技术有限公司, 合格证编号为 NO.20170010001249。小鼠在到达后驯化 7 天, 随后开始研究。

细胞:

小鼠 MC38 细胞购自上海和元生物(CAT#:HYC3401), 并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 5x10⁶ 个/ml。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至人 Tim-3 基因敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 MC38-hTim-3 荷瘤小鼠模型。

给药:

肿瘤细胞接种 7 天后检测各只小鼠瘤体积, 挑选出瘤体积在 $25.23 \text{ mm}^3 \sim 108.66 \text{ mm}^3$ 范围内的小鼠, 按瘤体积平均分组 (每组 7 只小鼠), 给药剂量和方式如表 4 所示, h-IgG (购自 EQUITECH-BIO) 作为阴性对照, 分别在接种后第 7、10、14、17、21 天给药, 每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积, 接种后第 25 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%), 计算公式如下:

$$\text{TGI}\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$$

肿瘤体积测定: 采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W), 肿瘤体积按如下公式计算: $V = L \times W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。

表 4. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	10 mg/kg	Q3-4Dx5	腹腔注射
TSR-022	10 mg/kg	Q3-4Dx5	腹腔注射
11430	0.5 mg/kg	Q3-4Dx5	腹腔注射
H4-3.6	10 mg/kg	Q3-4Dx5	腹腔注射
TSR-022+11430	10 mg/kg+0.5 mg/kg	Q3-4Dx5	腹腔注射
H4-3.6+11430	10 mg/kg+0.5 mg/kg	Q3-4Dx5	腹腔注射

肿瘤抑制率结果如图 7 和表 5 所示: 在接种后第 25 天, TSR-022 和 H4-3.6 单药均未能显示肿瘤抑制效果。抗 PD-1 抗体 11430 单药肿瘤抑制率为 41%, TSR-022 和 H4-3.6 与抗-PD-1 抗体 11430 联合用药肿瘤抑制率分别为 60% 和 73%。TSR-022 和 H4-3.6 与抗-PD-1 抗体 11430 联合用药肿瘤抑制效果强于与抗-PD-1 抗体 11430, TSR-022, H4-3.6, 以及 h-IgG 单药组。同时我们对小鼠体重进行检测, 结果如图 8 所示, 小鼠体重无显著差异。因此, 本发明针对 Tim-3 分子的抗体与 PD-1 抗体联合用药对肿瘤有明显的抑制效果。

表 5. 第 25 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积 (mm^3)	TGI (%)
h-IgG, 10 mg/kg	1004	/
TSR-022, 10 mg/kg	1172	None
H4-3.6, 10 mg/kg	1142	None
11430, 0.5 mg/kg	616	41
TSR-022 + 11430, 10 + 0.5 mg/kg	429	60
H4-3.6 + 11430, 10 + 0.5 mg/kg	308	73

实施例 15 抗体的热稳定性检测

差示扫描荧光法 (differential scanning fluorimetry; DSF) 能够根据蛋白质图谱中的荧光变化过程提供有关蛋白质结构稳定性的信息, 检测蛋白的构型变化, 获得蛋白质的溶解温度 (T_m)。本实施例采用 DSF 法测定了本发明抗体的 T_m 值。

将本发明的抗体 H4-3.6 用 PBS 溶液稀释至 1 mg/ml。

向 4 μl SYPRO Orange Protein Gel Stain (Gibco, 目录号: S6650) 中加入 196 μl PBS, 将 SYPRO Orange Protein Gel Stain 稀释 200 倍。

向 50 μl 的上述浓度为 1 mg/ml 的抗体, 加入 10 μl 的上述 50 倍稀释的 SYPRO Orange Protein Gel Stain, 然后加入 40 μl 水, 混匀后取 50 μl 加入 96 孔 PCR 板 (Applied Biosystems life technologies, 4306737) 中。将 PCR 板置于 7500 Real Time PCR 系统 (Applied Biosystems, AB/7500) 进行检测。设置系统温度为每分钟升高 0.5°C , 荧光曲线绝对值出现峰值时对应的温度即为该蛋白质的 T_m 。

实验结果如下表 6 和图 9 所示。本发明的抗体 T_m 值 $>65^\circ\text{C}$, 因此, 具有较好的热稳定性。

表 6. 差示扫描荧光法检测抗体 T_m

抗体	T _m
H _z 4-3.6	69.60°C

在以上试验中，本文所述的人源化抗体 H_z4-3.6 的 T_m 大于 65°C，具有较好的热稳定。

实施例 16 抗体的加速稳定性检测

为了确认抗体的稳定性，本实施例通过检测制备的一批抗体在 40°C 放置 0、7、14 天之后的纯度的变化以及细胞结合活性变化，从而评价了抗体的长期热稳定性。

浓缩前述获得的抗体 H_z4-3.6 样品至 10 mg/ml (溶于 PBS 中)，分装于 EP 管中，200 μl/管，避光置于 40°C。

在第 0、7、14 天各取一管利用体积排阻层析 (size exclusion chromatography; SEC) 检测其单体主峰纯度。采用流式细胞仪测定本发明的人源化抗体结合人 Tim-3 的细胞能力，测定方法同实施例 9。在以上测定法所述的实验中，抗体 H_z4-3.6 的主峰纯度如见表 7。细胞结合活性检测如图 10 所示：

表 7. 抗体 40°C 培养时单体主峰比例变化

放置 40°C (天)	主峰比例 (%)
0	98.62
7	98.11
14	97.97

在以上试验中，本文所述的人源化抗体 H_z4-3.6 在 40°C 放置 14 天，其单体主峰比例降低幅度仅为 0.65%，且结合表达人 Tim-3 的细胞能力未有显著变化。结果表明本文所述的人源化抗体 H_z4-3.6 具有较好的加速稳定性。

序列表

SEQ ID NO		CH4-3 嵌合抗体序列
1	HCDR1 (Abm)	GFSLTTFNLH
2	HCDR2(Kabat)	VIWSDGSTTYNSALKS
3	HCDR3(Kabat)	QRGYRYDEALDY
1	HCDR1(AbM)	GFSLTTFNLH
4	HCDR2(AbM)	VIWSDGSTT
3	HCDR3(AbM)	QRGYRYDEALDY
5	LCDR1(Kabat)	KASQSVSYDADSYMN
6	LCDR2(Kabat)	AASNLES
7	LCDR3(Kabat)	QQSNEDPFT
8	VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLTCTISGFSLTTFNLHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSTTYNSALKSRLSI SKDNSKSQVFLKMNSLQTDAMYYCARQRGYRYDEALDYWGQGTSLTVSS
9	VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVSYDADSYMNWYQQKPRPPKLLIYAASNLESVIPARFSGS GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPFTFGSGTKLEIK
10	HC	QVQLKESGPGLVAPSQSLTCTISGFSLTTFNLHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSTTYNSALKSRLSI SKDNSKSQVFLKMNSLQTDAMYYCARQRGYRYDEALDYWGQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI

		KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGK
11	LC	DIVLTQSPASLAVALGQRATISCKASQSVSYDADSYMNWYQQKPRPPKLLIYAASNLESGIPARFSGS GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
		Hz4-3.6 人源化抗体序列
1	HCDR1 (Abm)	GFSLTTFNLH
12	HCDR2(Kabat)	VIWSDISTYNSALKS
3	HCDR3(Kabat)	QRGYRYDEALDY
1	HCDR1(AbM)	GFSLTTFNLH
13	HCDR2(AbM)	VIWSDISTT
3	HCDR3(AbM)	QRGYRYDEALDY
14	LCDR1(Kabat)	KASQSVSYDAESYMN
6	LCDR2(Kabat)	AASNLES
7	LCDR3(Kabat)	QQSNEDPFT
15	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAISGFSLTTFNLHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDISTTYNSALKSRF TISKDNSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARQGRGYRYDEALDYWGQGTLLVTVSS
16	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSYDAESYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQQSNEDPFTFGQGTKLEIK
17	HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAISGFSLTTFNLHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDISTTYNSALKSRF TISKDNSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARQGRGYRYDEALDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDMLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
18	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSYDAESYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQQSNEDPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
		CH5-17 嵌合抗体序列
19	HCDR1 (Abm)	GYTFTSYWIQ
20	HCDR2(Kabat)	EIYPSDTYTNYNQRFKG
21	HCDR3(Kabat)	PHDFWFAY
19	HCDR1(AbM)	GYTFTSYWIQ
22	HCDR2(AbM)	EIYPSDTYTN
21	HCDR3(AbM)	PHDFWFAY
23	LCDR1(Kabat)	KSSQSLLNSSNQKNYLA
24	LCDR2(Kabat)	LASTRES
25	LCDR3(Kabat)	QQYYSTPLT
26	VH	QVQLQQFGAELVKPGASVNLSCASGYTFTSYWIKRPGQGLEWIGEIYPSDTYTNYNQRFKG

		KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASP HDFWFAYWGQGLTVTSA
27	VL	DIVLTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYLASTRESGVPDR FIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQYYSTPLTFGAGTKLELK
28	HC	QVQLQQFGAELVKPGASVNLSCASGYFTFSYWIQWIKRPGQGLEWIGEIYPSDITYTNYNQRFK KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASP HDFWFAYWGQGLTVTSAASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGK
29	LC	DIVLTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYLASTRESGVPDR FIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQYYSTPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
		对照 TSR-022 抗体序列
30	HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFTFSYDMSWVRQAPGKGLDWVSTISGGGTYTYYQDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASMDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNV D HK PSNTKVKDRVESKYGPPCPPAPEFLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF N WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKA KG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGK
31	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIIRYLNWYHQKPGKAPKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGG S G TDFTLTISLQPEDFAVYYCQQSHSAPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
		IgG1 阴性对照抗体
32	HC	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGGGTYTYYADSVK GRFTTSRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLG TQT YICNVN HKPSNTKVDKKAEPKCDKHTCPPAPELGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
33	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGG S G TDFTLTISLQPEDFATYYCQQADLPFAFAFGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
		人 Tim-3 序列
34		MFSHLPFDVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVV LRTDERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIKPAKVT PAPTRQRDFTAAFPRLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIY GAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVEVEE PNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP

权利要求

- 1、结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其包含
如 SEQ ID NO: 8、15 或 26 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及如 SEQ ID NO: 9、16 或 27 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR。
- 2、权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段，其包含
 - (i) 如 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR；
 - (ii) 如 SEQ ID NO: 15 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及如 SEQ ID NO: 16 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR；或
 - (iii) 如 SEQ ID NO: 26 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及如 SEQ ID NO: 27 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR。
- 3、结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，其中
 - (a) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中
在 Abm 规则下 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
在 Kabat 规则下 HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 或 12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
在 Kabat 规则下 HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且
 - (b) 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中
在 Kabat 规则下 LCDR1 包含 SEQ ID NO:5 或 14 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
在 Kabat 规则下 LCDR2 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
或者
 - (a) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中
在 Abm 规则下 HCDR1 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
在 Kabat 规则下 HCDR2 包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
在 Kabat 规则下 HCDR3 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且
 - (b) 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中
在 Kabat 规则下 LCDR1 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
在 Kabat 规则下 LCDR2 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
或者
 - (a) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中
在 Abm 规则下 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

- 在 Abm 规则下 HCDR2 包含 SEQ ID NO:4 或 13 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- 在 Abm 规则下 HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (b) 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中
- 在 Kabat 规则下 LCDR1 包含 SEQ ID NO:5 或 14 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- 在 Kabat 规则下 LCDR2 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- 在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- 或者
- (a) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中
- 在 Abm 规则下 HCDR1 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- 在 Abm 规则下 HCDR2 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- 在 Abm 规则下 HCDR3 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (b) 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中
- 在 Kabat 规则下 LCDR1 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- 在 Kabat 规则下 LCDR2 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- 在 Kabat 规则下 LCDR3 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4、权利要求 1 至 3 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其包含轻链可变区和/或重链可变区, 其中,

(a)重链可变区

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 8、15 或 26 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 8、15 或 26 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 8、15 或 26 所示的氨基酸序列相比具有 1-10 个的氨基酸置换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 和/或

(b)轻链可变区

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 9、16 或 27 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 9、16 或 27 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 9、16 或 27 所示的氨基酸序列相比具有 1-10 个的氨基酸置换、插入或缺失的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

5、权利要求 1 至 3 中任一项的的抗体或其抗原结合片段, 其包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区, 和/或包含与 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区;

(ii) 包含与 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区,

和/或包含与 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区；或

(iii) 包含与 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/或包含与 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区。

6、权利要求 1 至 3 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含

(i) 含有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/或含有 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区；

(ii) 含有 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/或含有 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区；或

(iii) 含有 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和/或含有 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区。

7、权利要求 1 至 6 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含

(a) 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 10、17 或 28 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 10、17 或 28 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 10、17 或 28 所示的氨基酸序列相比具有 1-20 个的氨基酸改变的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 11、18 或 29 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 11、18 或 29 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 11、18 或 29 所示的氨基酸序列相比具有 1-20 个的氨基酸改变的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

8、权利要求 1 至 6 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链和/或轻链，其中

(i) 重链包含与 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含与 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 重链包含与 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含与 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(iii) 重链包含与 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

9、权利要求 1 至 6 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链和/或轻链，其中

(i) 重链包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包

含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 重链包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(iii) 重链包含 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和/或轻链包含 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

10、权利要求 1 至 9 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是 IgG1 形式或 IgG2 形式或 IgG3 形式或 IgG4 形式的抗体或抗原结合片段。

11、权利要求 1 至 10 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是单克隆抗体。

12、权利要求 1 至 11 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是人源化的抗体或人抗体或嵌合抗体。

13、权利要求 1 至 12 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段是选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)或(Fab')₂、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体。

14、权利要求 1 至 13 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为双特异性或多特异性抗体分子，优选地，双特异性抗体分子还与 PD-1、PD-L1 或 PD-L2 结合。

15、分离的核酸，其编码权利要求 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段中的轻链可变区或重链可变区，或轻链或重链。

16、包含权利要求 15 的核酸的载体，优选地所述载体是表达载体。

17、包含权利要求 15 的核酸或权利要求 16 的载体的宿主细胞，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，更优选的选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 293F 细胞或 CHO-S 细胞或 ExpiCHO 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。

18、制备结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括在适于表达编码权利要求 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养权利要求 17 的宿主细胞，任选地分离所述抗体或其抗原结合片段，任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段。

19、免疫缀合物，其包含权利要求 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段和其它物质，例如细胞毒性剂。

20、药物组合物，其包含权利要求 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段或权利要求 19 的免疫缀合物，以及任选地一种或多种其它治疗剂，例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂，以及任选地药用辅料。

21、药物组合，其包含权利要求 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段或权利要求 19 的免疫缀合物，以及 PD-1 途径抗体例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体，以及任选的一种或多种其它治疗剂，例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂。

22、预防或治疗受试者中肿瘤的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1 至 14 中任一项的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段、或权利要求 19 的免疫缀合物、或权利要求 20 的药物组合物。

23、权利要求 22 所述的方法，其还包括向所述受试者联合施用 PD-1 途径抗体例如抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。

24、预防或治疗受试者中肿瘤的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 21 的药物组合。

25、权利要求 22-24 中任一项的方法，其中所述肿瘤为癌症，更优选的，所述癌症具有升高水平的(例如核酸或蛋白质水平的)TIM-3 和/或升高水平的(例如核酸或蛋白质水平的)PD-L1 或 PD-1 或 PD-L2。

26、权利要求 22-25 中任一项的方法，其中所述肿瘤是对 PD-1 途径抗体例如抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体治疗产生耐药性的肿瘤。

27、权利要求 22-26 中任一项的方法，其中所述方法还包括向患者施用一种或多种疗法，例如治疗方式和/或其它治疗剂，优选地，治疗方式包括手术治疗和/或放射疗法，其它治疗剂选自化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂。

28、检测样品中 TIM-3 的方法，所述方法包括

(a)将样品与根据权利要求 1 至 14 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段接触；以及

(b)检测抗体或其抗原结合片段与 TIM-3 间的复合物的形成；任选地，抗体是被可检测地标记的。

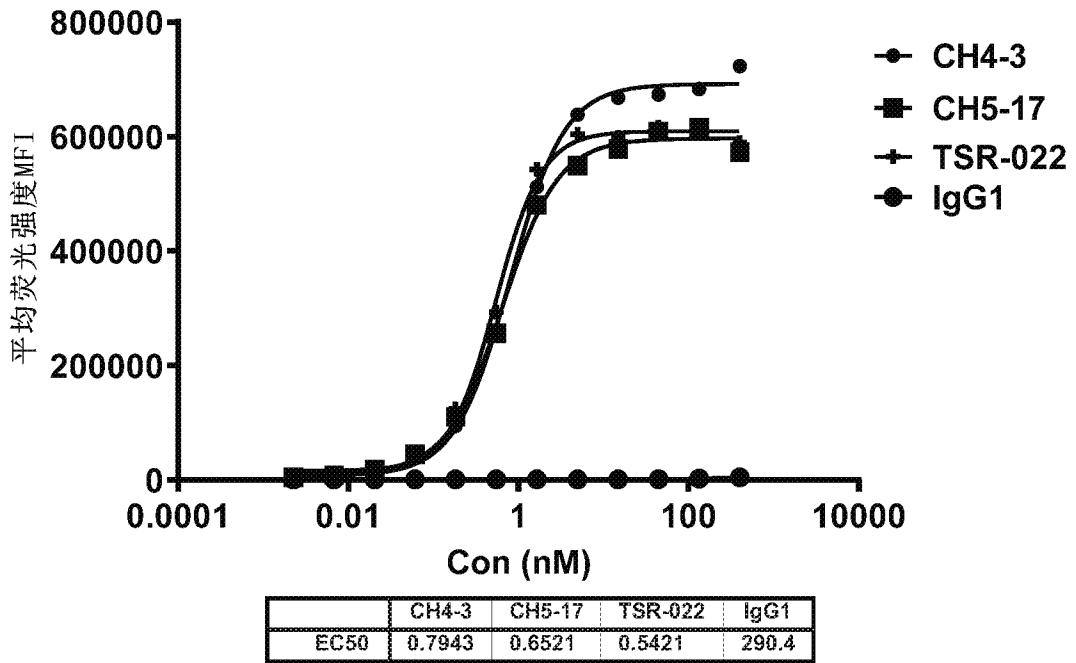


图 1

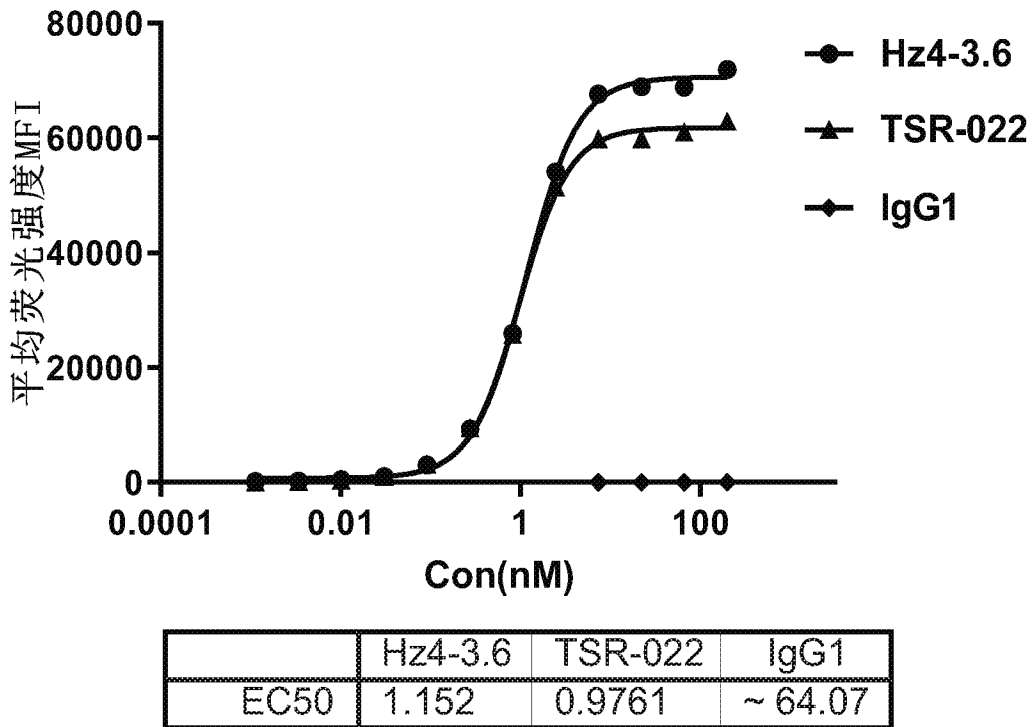
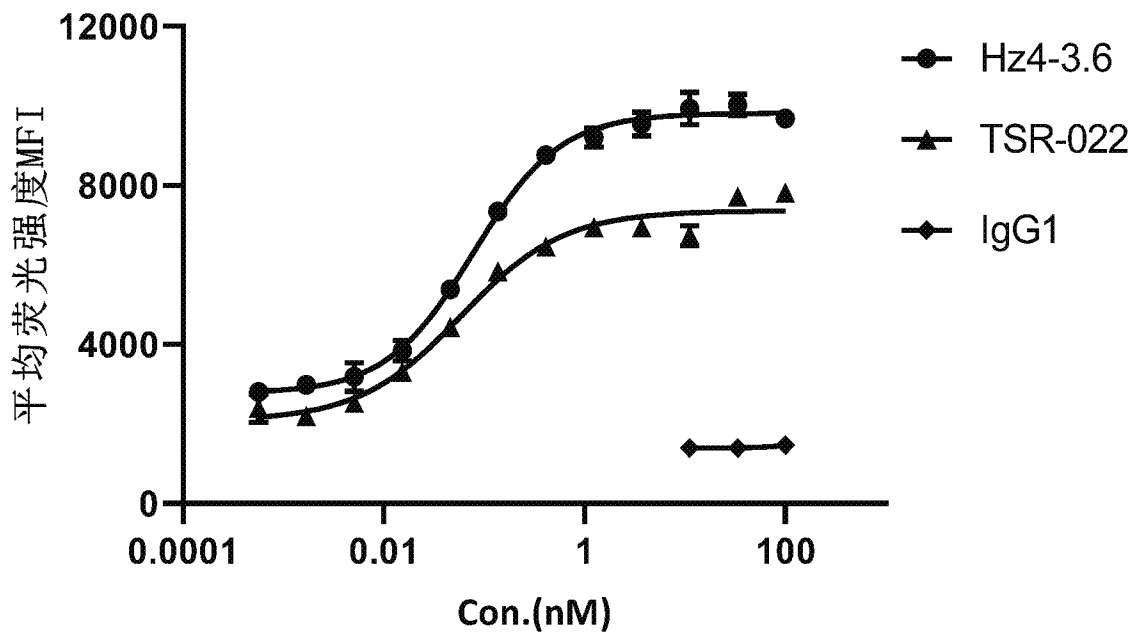
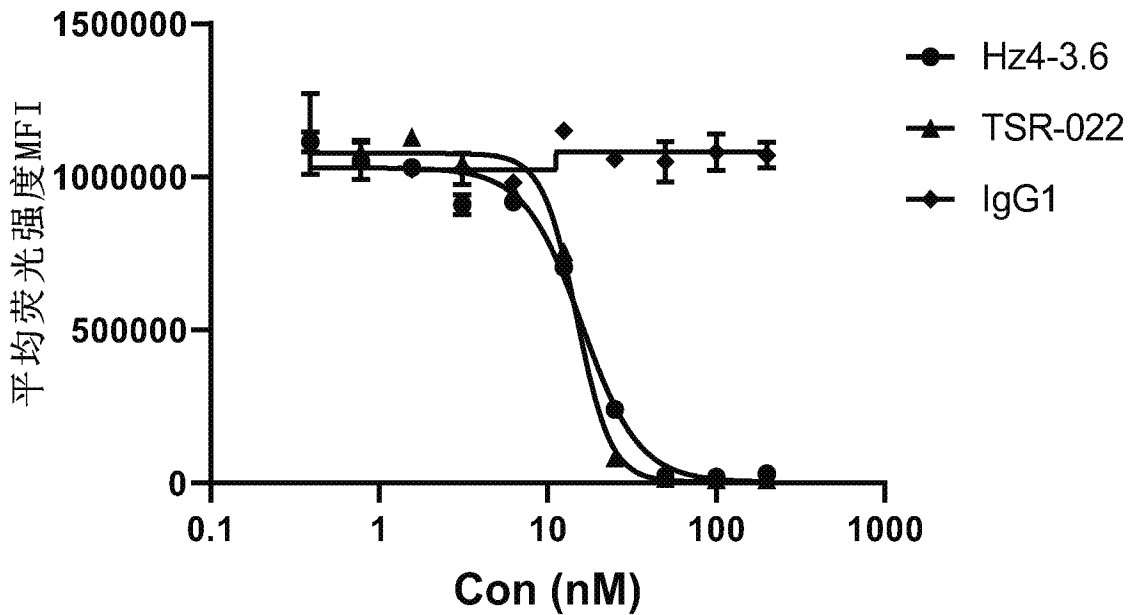


图 2



	Hz4-3.6	TSR-022	IgG1
EC50	0.07745	0.05898	~ 79.28

图 3



	Hz4-3.6	TSR-022	IgG1
IC50	15.98	14.91	~ 11.21

图 4

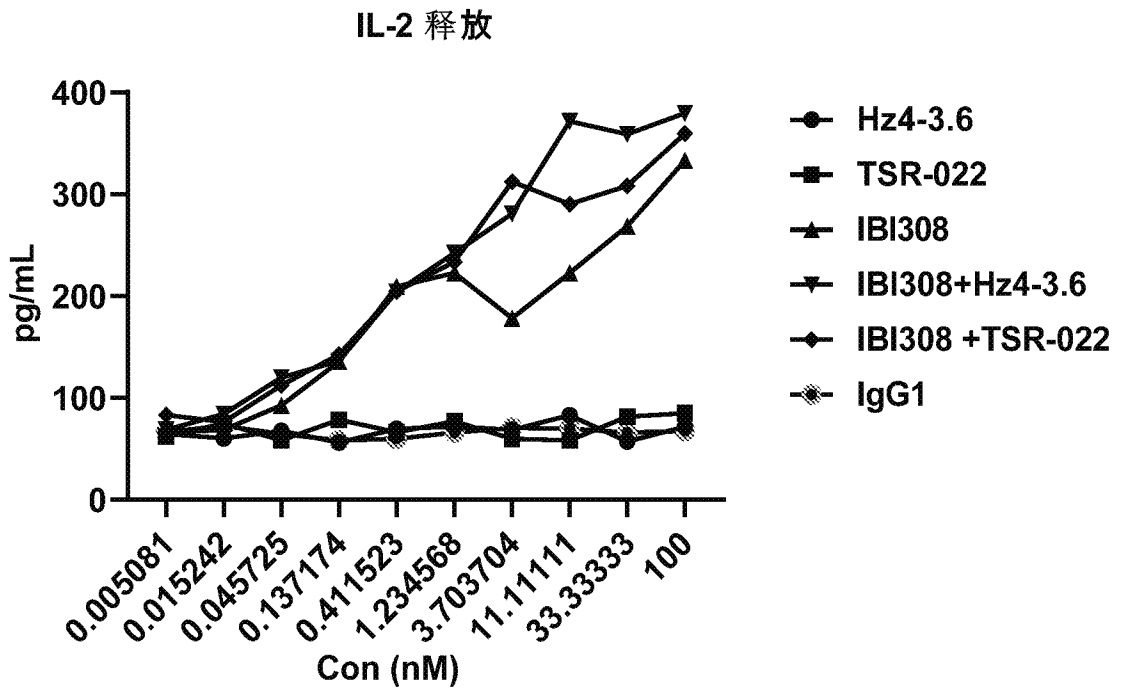


图 5

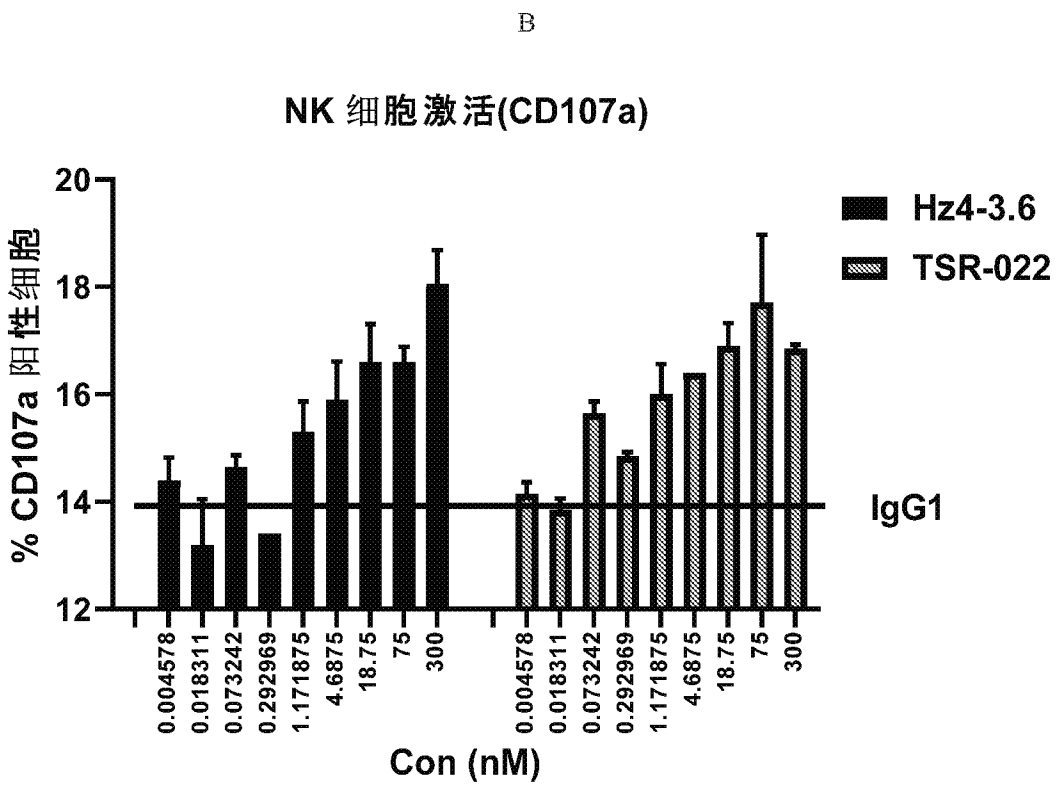
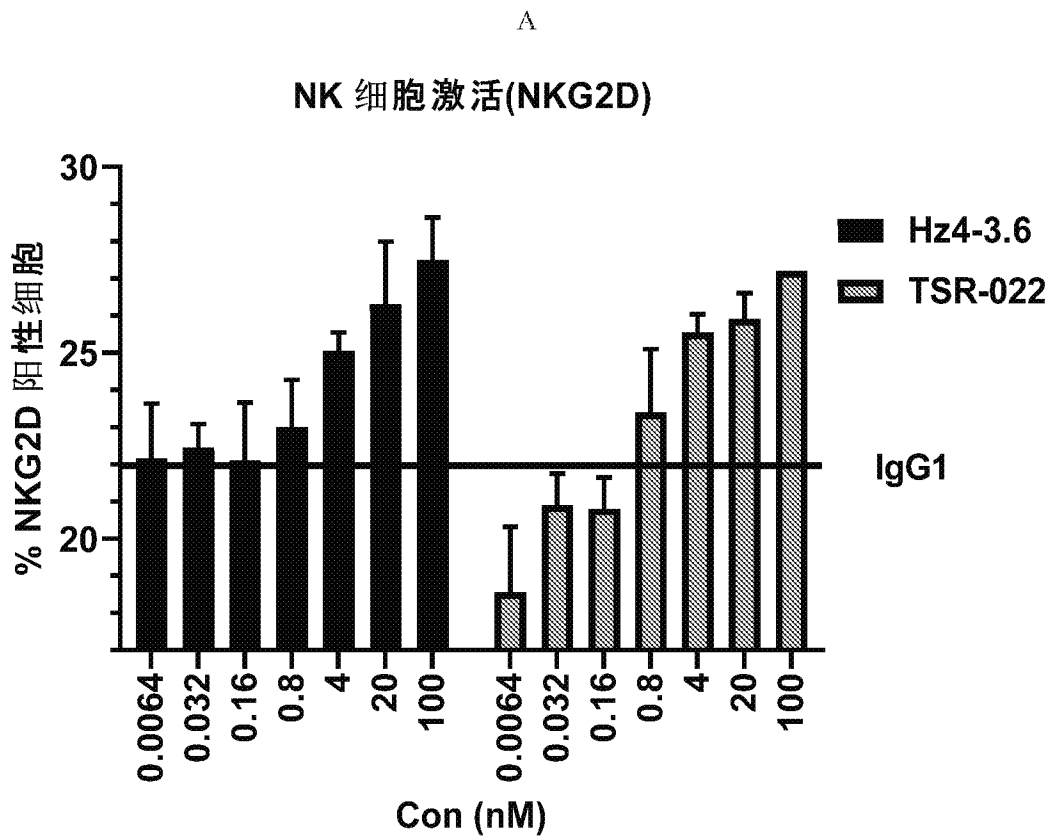


图 6

Tim-3 (Hz4-3.6) 在MC38荷瘤的hTim-3转基因小鼠模型中的肿瘤抑制活性

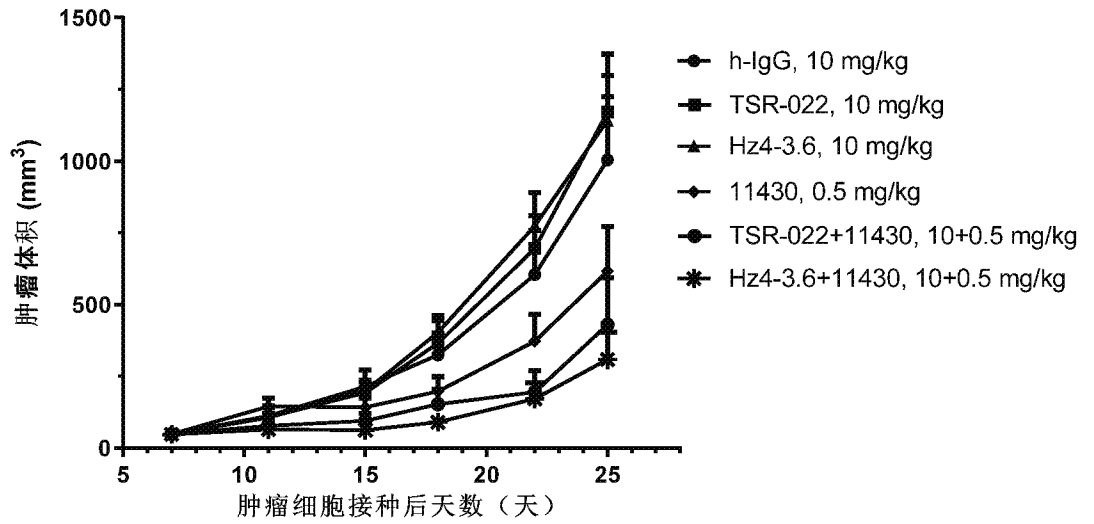


图 7

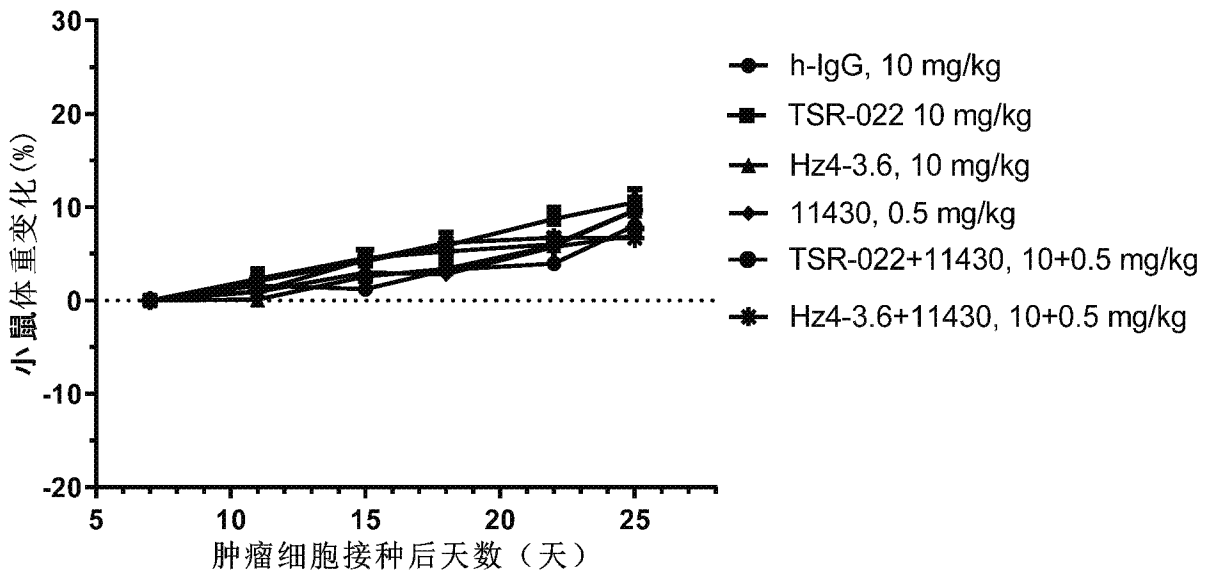


图 8

HZ4-3.6

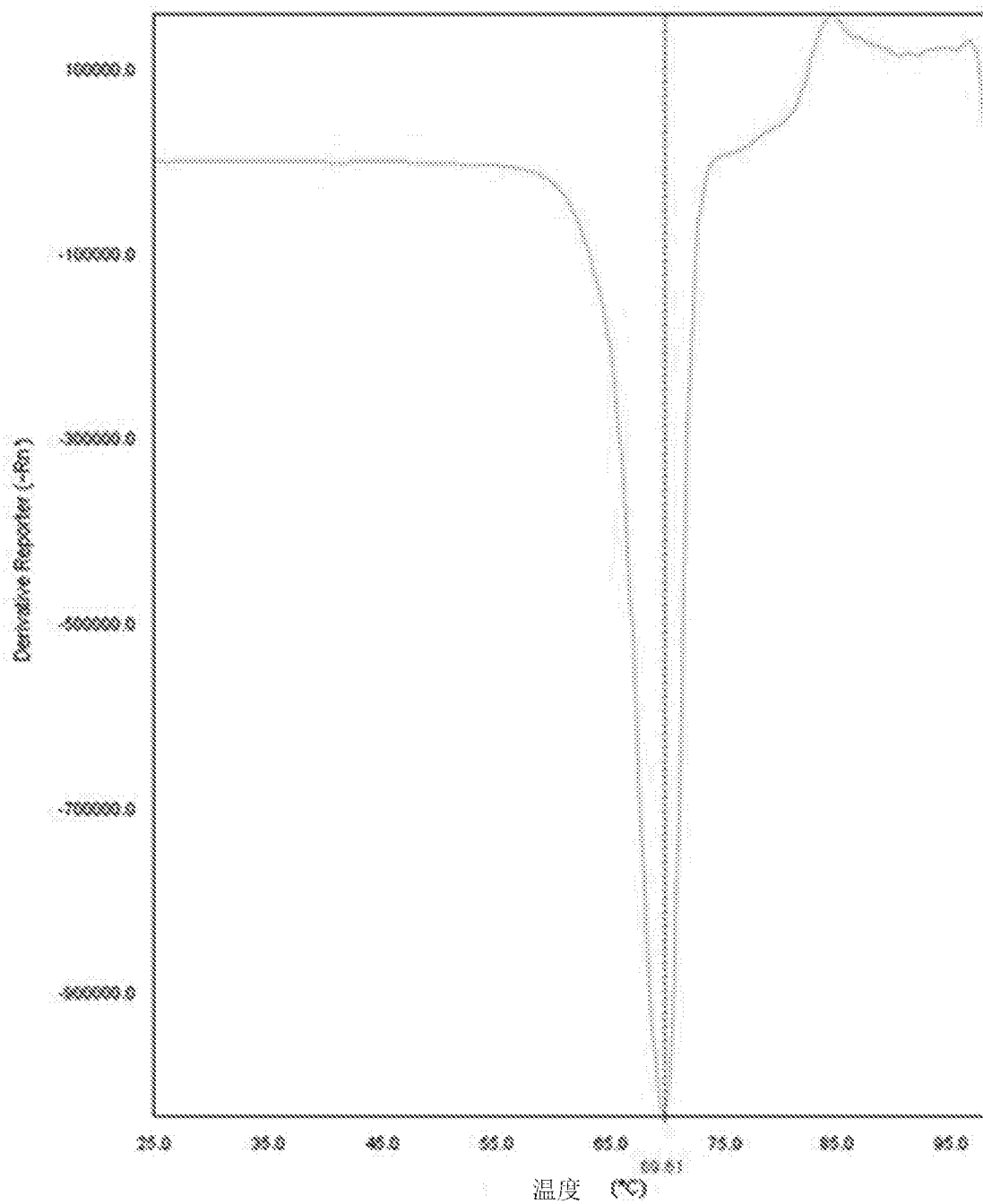


图 9

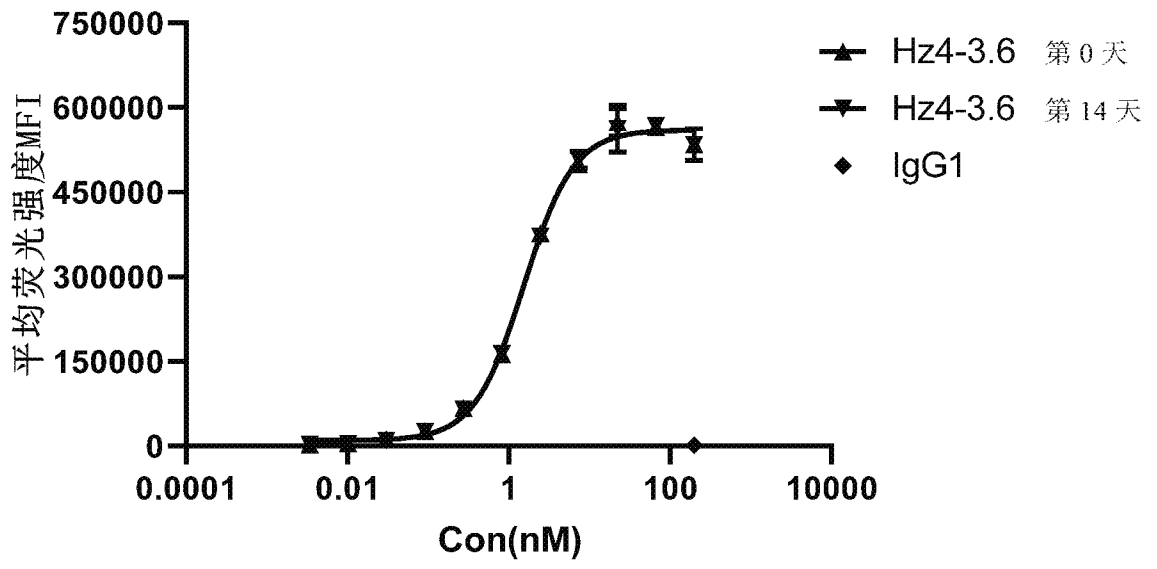


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/078473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, C12N, A61K, A61P, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, WANFANG, ISI Web of Science, BAIDU and Search Terms: T细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域 3, TIM3, TIM-3, 甲型肝炎病毒细胞受体2, HAVCR2, 抗体, 抗原结合片段, T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule 3, hepatitis A virus cellular receptor 2, antibody, antigen binding fragment etc.; Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, STN和检索的序列, STN and search sequence: SEQ ID NOS: 1-18		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110267988 A (ELI LILLY AND COMPANY; INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 20 September 2019 (2019-09-20) see entire document	1-28 (in part)
A	CN 107001475 A (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 01 August 2017 (2017-08-01) see entire document	1-28 (in part)
A	WO 2020041520 A1 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE) 27 February 2020 (2020-02-27) see entire document	1-28 (in part)
A	CN 108794630 A (ZHENJIANG AIBIMENG BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.) 13 November 2018 (2018-11-13) see entire document	1-28 (in part)
A	TW 202009241 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 01 March 2020 (2020-03-01) see entire document	1-28 (in part)
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 May 2021		Date of mailing of the international search report 04 June 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/078473

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103079644 A (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.; KYUSHU UNIVERSITY) 01 May 2013 (2013-05-01) see entire document	1-28 (in part)
.....		

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **22-27**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] PCT Rule 39.1(iv) - methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
 - [2] A search on claims 22-27 is made on the basis of reasonably anticipated subject matter: the use of the antibody or antigen-binding fragment thereof binding TIM-3 of any of claims 1-14 or the immunoconjugate of claim 19 in the preparation of a drug for the prevention or treatment of tumors.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: Claims 1-28 (in part).
- [2] Relating to antibodies that bind TIM-3 and corresponding nucleic acids, vectors, host cells, methods of preparation, immunoconjugates, pharmaceutical compositions, and uses thereof; said antibodies comprising (i) 3 HCDRs of a heavy chain variable region as shown in SEQ ID NO:8, and 3 LCDRs of a light chain variable region as shown in SEQ ID NO:9; or (ii) 3 LCDRs of a heavy chain variable region as shown in SEQ ID NO:15 for the heavy chain variable region, and (ii) 3 LCDRs for the light chain variable region as shown in SEQ ID NO:16.
- [3] Invention 2: Claims 1-28 (in part).
- [4] The same subject matter as in Invention 1, but said antibody comprises: three HCDRs in the heavy chain variable region as shown in SEQ ID NO:26, and three LCDRs in the light chain variable region as shown in SEQ ID NO:27.
- [5] The same or corresponding technical feature between Invention 1 and Invention 2 is: antibodies that specifically bind TIM-3. However, this feature has been disclosed by the prior art, such as Document 1 (CN107001475 A, publication date August 1st, 2017) (see claims 1-27, and embodiments 1-15). Therefore, the 2 inventions do not share a same or corresponding specific technical feature therebetween that makes the invention's contribution over the prior art, and therefore do not comply with the requirement of unity of invention as defined in PCT Rule 13.1.

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **claims 1-28 (in part)**

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/078473

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110267988	A	20 September 2019	AR	110203	A1	06 March 2019
				KR	20190076029	A	01 July 2019
				EP	3551662	A1	16 October 2019
				TW	201831198	A	01 September 2018
				CO	2019005846	A2	19 June 2019
				IL	267025	D0	31 July 2019
				PH	12019501253	A1	11 December 2019
				BR	112019009617	A2	13 August 2019
				CL	2019001459	A1	15 November 2019
				WO	2018106588	A1	14 June 2018
				JP	2020504171	A	06 February 2020
				EA	201991156	A1	29 November 2019
				CR	20190266	A	22 August 2019
				CA	3043763	A1	14 June 2018
				US	2019276534	A1	12 September 2019
				EC	SP19040905	A	30 June 2019
				TW	I648065	B	21 January 2019
				PE	20191106	A1	23 August 2019
				DO	P2019000142	A	15 August 2019
				AU	2017372709	A1	16 May 2019
MX	2019006723	A	22 August 2019				
CN	107001475	A	01 August 2017	CN	107001475	B	29 January 2021
				PL	3215532	T3	31 March 2020
				TW	I618717	B	21 March 2018
				LT	3215532	T	10 January 2020
				RS	59664	B1	31 January 2020
				JP	6517357	B2	22 May 2019
				EP	3215532	A1	13 September 2017
				KR	20170080662	A	10 July 2017
				KR	102011205	B1	14 August 2019
				ES	2763548	T3	29 May 2020
				TW	201629101	A	16 August 2016
				RU	2017119543	A	06 December 2018
				US	2016257749	A1	08 September 2016
				ZA	201702789	B	25 September 2019
				EP	3632935	A1	08 April 2020
				CA	2964830	A1	12 May 2016
				RU	2723708	C2	17 June 2020
				EP	3215532	B1	23 October 2019
				PT	3215532	T	18 December 2019
				IL	251868	D0	29 June 2017
				BR	112017008986	A2	30 January 2018
				MX	2017005920	A	27 June 2017
				SI	3215532	T1	28 February 2020
				US	2018072804	A1	15 March 2018
				RU	2017119543	A3	06 June 2019
				DK	3215532	T3	02 January 2020
HU	E047784	T2	28 May 2020				
JP	2018503396	A	08 February 2018				
US	2019382480	A1	19 December 2019				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/078473

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				WO	2016071448	A1	12 May 2016
				AU	2015341801	A1	27 April 2017
				SG	11201703561Q	A	30 May 2017
WO	2020041520	A1	27 February 2020	AU	2019325558	A1	17 December 2020
				SG	11202012148R	A	28 January 2021
				CA	3108879	A1	27 February 2020
CN	108794630	A	13 November 2018	None			
TW	202009241	A	01 March 2020	WO	2020043095	A1	05 March 2020
CN	103079644	A	01 May 2013	AU	2011262758	B8	04 September 2014
				EP	2581113	A4	25 December 2013
				WO	2011155607	A1	15 December 2011
				CA	2814155	A1	15 December 2011
				AU	2011262758	A1	10 January 2013
				US	2017088616	A1	30 March 2017
				PT	2581113	T	04 July 2018
				EP	3363499	A1	22 August 2018
				KR	101846590	B1	09 April 2018
				TR	201807750	T4	21 June 2018
				EP	2581113	A1	17 April 2013
				TW	201207397	A	16 February 2012
				HU	E040213	T2	28 February 2019
				AU	2011262758	B2	24 April 2014
				US	8552156	B2	08 October 2013
				US	2012189617	A1	26 July 2012
				US	10550181	B2	04 February 2020
				CN	103079644	B	15 February 2017
				CA	2814155	C	22 October 2019
				AU	2011262758	A8	04 September 2014
				JP	WO2011155607	A1	15 August 2013
				ES	2682078	T3	18 September 2018
				US	2014044728	A1	13 February 2014
				US	9556270	B2	31 January 2017
				EP	2581113	B1	09 May 2018
				TW	I629483	B	11 July 2018
				PL	2581113	T3	30 November 2018
				KR	20130132695	A	05 December 2013
				JP	2017189168	A	19 October 2017
				JP	6158511	B2	05 July 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/078473

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K, C12N, A61K, A61P, G01N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, ISI Web of Science, BAIDU和检索词: T细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域 3, TIM3, TIM-3, 甲型肝炎病毒细胞受体2, HAVCR2, 抗体, 抗原结合片段, T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule 3, hepatitis A virus cellular receptor 2, antibody, antigen binding fragment等; Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统, STN和检索的序列: SEQ ID NOs:1-18。</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 110267988 A (伊莱利公司, 信达生物制药苏州有限公司) 2019年 9月 20日 (2019 - 09 - 20) 参见全文</td> <td>1-28 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107001475 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 参见全文</td> <td>1-28 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2020041520 A1 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE) 2020年 2月 27日 (2020 - 02 - 27) 参见全文</td> <td>1-28 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108794630 A (镇江爱必梦生物科技有限公司) 2018年 11月 13日 (2018 - 11 - 13) 参见全文</td> <td>1-28 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>TW 202009241 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO LTD等) 2020年 3月 1日 (2020 - 03 - 01) 参见全文</td> <td>1-28 (部分)</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 110267988 A (伊莱利公司, 信达生物制药苏州有限公司) 2019年 9月 20日 (2019 - 09 - 20) 参见全文	1-28 (部分)	A	CN 107001475 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 参见全文	1-28 (部分)	A	WO 2020041520 A1 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE) 2020年 2月 27日 (2020 - 02 - 27) 参见全文	1-28 (部分)	A	CN 108794630 A (镇江爱必梦生物科技有限公司) 2018年 11月 13日 (2018 - 11 - 13) 参见全文	1-28 (部分)	A	TW 202009241 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO LTD等) 2020年 3月 1日 (2020 - 03 - 01) 参见全文	1-28 (部分)
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 110267988 A (伊莱利公司, 信达生物制药苏州有限公司) 2019年 9月 20日 (2019 - 09 - 20) 参见全文	1-28 (部分)																		
A	CN 107001475 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 参见全文	1-28 (部分)																		
A	WO 2020041520 A1 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE) 2020年 2月 27日 (2020 - 02 - 27) 参见全文	1-28 (部分)																		
A	CN 108794630 A (镇江爱必梦生物科技有限公司) 2018年 11月 13日 (2018 - 11 - 13) 参见全文	1-28 (部分)																		
A	TW 202009241 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO LTD等) 2020年 3月 1日 (2020 - 03 - 01) 参见全文	1-28 (部分)																		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2021年 5月 11日	2021年 6月 4日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																			
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	马振莲 电话号码 62412131																			

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103079644 A (协和发酵麒麟株式会社, 国立大学法人九州大学) 2013年 5月 1日 (2013 - 05 - 01) 参见全文	1-28 (部分)

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求: 22-27
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
[1] PCT细则39.1(iv) — 处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。
[2] 对权利要求22-27的检索基于以下合理预期的主题作出: 权利要求1-14中任一项的结合TIM-3的抗体或其抗原结合片段或权利要求19的免疫缀合物在制备预防或治疗肿瘤的药物中的用途。
2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 发明1: 权利要求1-28(部分):
- [2] 涉及结合TIM-3的抗体以及相应的核酸、载体、宿主细胞、制备方法、免疫缀合物、药物组合物及其用途; 所述抗体包含: (i) 如SEQ ID NO:8所示的重链可变区的3个HCDR, 以及如SEQ ID NO:9所示的轻链可变区的3个LCDR; 或者(ii) 如SEQ ID NO:15所示的重链可变区的3个HCDR, 以及如SEQ ID NO:16所示的轻链可变区的3个LCDR;
- [3] 发明2: 权利要求1-28(部分):
- [4] 与发明1的主题相同, 但所述抗体包含: 如SEQ ID NO:26所示的重链可变区的3个HCDR, 以及如SEQ ID NO:27所示的轻链可变区的3个LCDR。
- [5] 发明1与发明2之间相同或相应的技术特征是: 特异性结合TIM-3的抗体。然而, 该特征已经被现有技术, 如文献1(CN107001475 A, 公开日2017-08-01)公开(参见权利要求1-27, 实施例1-15)。因此, 这2项发明之间不具有相同或相应的体现发明对现有技术作出贡献的特定技术特征, 因而不满足发明单一性的要求, 不符合《PCT实施细则》13.1的规定。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 权利要求1-28（部分）

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/078473

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110267988	A	2019年 9月 20日	AR	110203	A1	2019年 3月 6日
				KR	20190076029	A	2019年 7月 1日
				EP	3551662	A1	2019年 10月 16日
				TW	201831198	A	2018年 9月 1日
				CO	2019005846	A2	2019年 6月 19日
				IL	267025	D0	2019年 7月 31日
				PH	12019501253	A1	2019年 12月 11日
				BR	112019009617	A2	2019年 8月 13日
				CL	2019001459	A1	2019年 11月 15日
				WO	2018106588	A1	2018年 6月 14日
				JP	2020504171	A	2020年 2月 6日
				EA	201991156	A1	2019年 11月 29日
				CR	20190266	A	2019年 8月 22日
				CA	3043763	A1	2018年 6月 14日
				US	2019276534	A1	2019年 9月 12日
				EC	SP19040905	A	2019年 6月 30日
				TW	1648065	B	2019年 1月 21日
				PE	20191106	A1	2019年 8月 23日
				DO	P2019000142	A	2019年 8月 15日
				AU	2017372709	A1	2019年 5月 16日
				MX	2019006723	A	2019年 8月 22日
CN	107001475	A	2017年 8月 1日	CN	107001475	B	2021年 1月 29日
				PL	3215532	T3	2020年 3月 31日
				TW	1618717	B	2018年 3月 21日
				LT	3215532	T	2020年 1月 10日
				RS	59664	B1	2020年 1月 31日
				JP	6517357	B2	2019年 5月 22日
				EP	3215532	A1	2017年 9月 13日
				KR	20170080662	A	2017年 7月 10日
				KR	102011205	B1	2019年 8月 14日
				ES	2763548	T3	2020年 5月 29日
				TW	201629101	A	2016年 8月 16日
				RU	2017119543	A	2018年 12月 6日
				US	2016257749	A1	2016年 9月 8日
				ZA	201702789	B	2019年 9月 25日
				EP	3632935	A1	2020年 4月 8日
				CA	2964830	A1	2016年 5月 12日
				RU	2723708	C2	2020年 6月 17日
				EP	3215532	B1	2019年 10月 23日
				PT	3215532	T	2019年 12月 18日
				IL	251868	D0	2017年 6月 29日
				BR	112017008986	A2	2018年 1月 30日
				MX	2017005920	A	2017年 6月 27日
				SI	3215532	T1	2020年 2月 28日
				US	2018072804	A1	2018年 3月 15日
				RU	2017119543	A3	2019年 6月 6日
				DK	3215532	T3	2020年 1月 2日
				HU	E047784	T2	2020年 5月 28日
				JP	2018503396	A	2018年 2月 8日
				US	2019382480	A1	2019年 12月 19日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/078473

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				WO	2016071448	A1	2016年 5月 12日
				AU	2015341801	A1	2017年 4月 27日
				SG	11201703561Q	A	2017年 5月 30日
WO	2020041520	A1	2020年 2月 27日	AU	2019325558	A1	2020年 12月 17日
				SG	11202012148R	A	2021年 1月 28日
				CA	3108879	A1	2020年 2月 27日
CN	108794630	A	2018年 11月 13日	无			
TW	202009241	A	2020年 3月 1日	WO	2020043095	A1	2020年 3月 5日
CN	103079644	A	2013年 5月 1日	AU	2011262758	B8	2014年 9月 4日
				EP	2581113	A4	2013年 12月 25日
				WO	2011155607	A1	2011年 12月 15日
				CA	2814155	A1	2011年 12月 15日
				AU	2011262758	A1	2013年 1月 10日
				US	2017088616	A1	2017年 3月 30日
				PT	2581113	T	2018年 7月 4日
				EP	3363499	A1	2018年 8月 22日
				KR	101846590	B1	2018年 4月 9日
				TR	201807750	T4	2018年 6月 21日
				EP	2581113	A1	2013年 4月 17日
				TW	201207397	A	2012年 2月 16日
				HU	E040213	T2	2019年 2月 28日
				AU	2011262758	B2	2014年 4月 24日
				US	8552156	B2	2013年 10月 8日
				US	2012189617	A1	2012年 7月 26日
				US	10550181	B2	2020年 2月 4日
				CN	103079644	B	2017年 2月 15日
				CA	2814155	C	2019年 10月 22日
				AU	2011262758	A8	2014年 9月 4日
				JP	W02011155607	A1	2013年 8月 15日
				ES	2682078	T3	2018年 9月 18日
				US	2014044728	A1	2014年 2月 13日
				US	9556270	B2	2017年 1月 31日
				EP	2581113	B1	2018年 5月 9日
				TW	1629483	B	2018年 7月 11日
				PL	2581113	T3	2018年 11月 30日
				KR	20130132695	A	2013年 12月 5日
				JP	2017189168	A	2017年 10月 19日
				JP	6158511	B2	2017年 7月 5日