

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 005 961**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2017** **PCT/US2017/041946**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018** **WO18013818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2017** **E 17742626 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024** **EP 3484920**

54 Título: **Anticuerpos contra la TIM3 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

14.07.2016 US 201662362541 P
15.02.2017 US 201762459499 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.03.2025

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.00%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

SCHEBYE, XIAO MIN;
SELBY, MARK J.;
HAN, MICHELLE MINHUA;
BEE, CHRISTINE;
DENG, ANDY X.;
CHUNTHARAPAI, ANAN;
DEVAUX, BRIGITTE;
LI, HUIMING;
SHEPPARD, PAUL O.;
KORMAN, ALAN J.;
ARDOUREL, DANIEL F.;
DEYANOVA, EKATERINA;
HUANG, RICHARD;
CHEN, GUODONG;
KUHNE, MICHELLE y
TRUONG, HONG-AN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 3 005 961 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la TIM3 y usos de los mismos

5 Antecedentes de la divulgación

La inmunoglobulina de linfocitos T y el dominio que contiene mucina-3 (TIM3), también conocido como receptor celular 2 del virus de la hepatitis A (HAVCR2), es una proteína transmembranaria de tipo I que funciona como regulador clave de las respuestas inmunitarias. La TIM3 se identificó inicialmente en los linfocitos T productores de IFN- γ activados (por ejemplo, linfocitos T auxiliares CD4⁺ de tipo 1 y linfocitos T citotóxicos CD8⁺), y se demostró que inducía la muerte o el agotamiento de los linfocitos T después de unirse a la galectina-9. Estudios más recientes han indicado que la expresión de la TIM3 también es importante para regular las actividades de muchas células inmunitarias innatas (por ejemplo, macrófagos, monocitos, células dendríticas, mastocitos y linfocitos citolíticos naturales). Véase Han G *et al.*, Front Immunol. 4: 449 (2013).

Como muchos receptores inhibidores (por ejemplo, PD-1 y CTLA-4), la expresión de la TIM3 se ha asociado a muchos tipos de enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer. Se han detectado linfocitos T TIM3⁺ en pacientes con melanoma avanzado, cáncer de pulmón no microcítico o linfoma no hodgkiniano folicular de linfocitos B. Y se ha descrito que la presencia de linfocitos T reguladores TIM3⁺ es un indicador eficaz de la progresión del cáncer de pulmón. Véase Anderson AC. Cancer Immunol Res. 2: 393-8 (2014).

Se han identificado varios ligandos posibles para la TIM3: galectina-9, HMGB1, semaforina-4A, CEACAM-1, ILT-4 y fosfatidilserina (PtdSer o PS). La PS es un importante componente de las membranas celulares, y normalmente se localiza en la lámina interna de las membranas celulares. Pero cuando una célula experimenta apoptosis, la PS se redistribuye y se expone en la membrana externa. Esta redistribución también se observa en muchas estirpes celulares tumorales. Véase Riedl S *et al.*, Biochim Biophys Acta. 1808: 2638-2645 (2011). La unión de la TIM3 a la PS puede ser crítica para la fagocitosis y la presentación cruzada. Véase Nakayama M *et al.*, Blood. 113: 3821-30 (2009).

Hay estudios que han demostrado una estrecha relación entre la TIM3 y el receptor inhibidor PD-1. Por ejemplo, muchos linfocitos T específicos de tumores expresan tanto el PD-1 como la TIM3, y se ha demostrado que estos linfocitos T son más disfuncionales en comparación con los linfocitos T que expresan únicamente el PD-1 o la TIM3. Véase Fourcade J *et al.*, J Exp Med. 207: 2175-2186 (2010).

Por consiguiente, los agentes dirigidos contra la TIM3 y los métodos de utilización de dichos agentes, son muy deseables para diseñar nuevas inmunoterapias antineoplásicas y perfeccionar las inmunoterapias antineoplásicas tradicionales.

El documento WO 2013/006490 A2 describe anticuerpos específicos para la TIM3 que pueden utilizarse para detectar células cancerosas. Los anticuerpos también pueden utilizarse en composiciones terapéuticas para tratar el cáncer y reducir la inflamación. La unión del anticuerpo específico de la TIM3 al dominio extracelular de la TIM3 produce la internalización del anticuerpo en una célula que expresa la TIM3.

El documento US 2012/189617 A1 describe un anticuerpo anti-TIM3 humana que se une a la secuencia de aminoácidos de la región extracelular de la TIM3. El anticuerpo anti-TIM3 humana muestra una elevada actividad efectora, tal como una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad ADCC).

El documento WO 2016/068802 A1 describe anticuerpos anti-TIM3 que son útiles en métodos que implican una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

El documento WO 2016/071448 A1 describe anticuerpos monoclonales anti-TIM3 que muestran una internalización rápida y fuerte en células cancerosas que expresan la TIM3.

El documento US 2015/218274 A1 describe moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a la TIM3 y de las que se dice que tienen diversas propiedades funcionales. Por ejemplo, se ensayó la capacidad del anticuerpo murino anti-TIM3 ABTIM3 para inducir la proliferación en un cocultivo de linfocitos T indiferenciados y células dendríticas convencionales. En el párrafo [0769] del documento US 2015/218274 A1 se afirma que la Fig. 22 muestra que ABTIM3 "a cada dosis ensayada dio como resultado un aumento de las células en proliferación". Sin embargo, la Figura 22 no muestra un efecto dependiente de la dosis.

Sumario de la invención reivindicada

La invención reivindicada se refiere a un anticuerpo aislado, que se une a la TIM3 humana, que comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 41, una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 122, y una CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 126, y una CDR1 de la

cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 64, una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 66 y una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 68. La invención reivindicada también se refiere a un ácido nucleico que codifica el anticuerpo; a un vector de expresión que comprende el ácido nucleico; a una célula que comprende el vector de expresión; y al anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite. Las realizaciones particulares de la invención reivindicada se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la divulgación

- 10 A continuación se describe la invención reivindicada, así como otros aspectos de los anticuerpos anti-TIM3 y la materia objeto relacionada.

En el presente documento se describen anticuerpos aislados, tales como anticuerpos monoclonales, en particular anticuerpos humanos (por ejemplo, monoclonales), que se unen específicamente a la TIM3 y que tienen unas propiedades funcionales deseables. Estas propiedades incluyen, por ejemplo, unión de alta afinidad a la TIM3 humana, unión a la TIM3 de mono (por ejemplo, la TIM3 de macaco cangrejero), y la capacidad de estimular respuestas inmunitarias, por ejemplo, respuestas de linfocitos T específicos de antígeno, tal como en un sujeto portador de un tumor o de un virus (infectado por virus), y detectar la proteína TIM3 en una muestra.

- 20 En un aspecto, los anticuerpos aislados, o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen a la TIM3, presentan al menos una de las siguientes propiedades:

- (a) unión a la TIM3 humana soluble y/o unida a membrana;
- (b) unión a la TIM3 soluble de macaco y/o unida a la membrana;
- 25 (c) inducir o estimular una respuesta inmunitaria;
- (d) inducir o estimular la activación de los linfocitos T, por ejemplo, la activación de los linfocitos Th1, (como se evidencia, por ejemplo, por un aumento de la secreción y/o proliferación de citocinas);
- (e) inducir o estimular la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+, CD8+, linfocitos Th1 o TIL), por ejemplo, en un ensayo de cocultivo, tal como se describe en los Ejemplos;
- 30 (f) inducir o estimular la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T, por ejemplo, linfocitos Th1 o linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), tales como los TIL de tumores humanos renales, de pulmón, de páncreas o de mama, como se determina, por ejemplo, en el ensayo descrito en los Ejemplos;
- (g) bloquear o inhibir la unión de la TIM3 humana a PtdSer, como se determina, por ejemplo, en el ensayo descrito en los Ejemplos;
- 35 (h) no internalizar ni regular por disminución la TIM3 de la superficie celular cuando se une a la TIM3 de las células;
- (i) unirse al dominio extracelular de la TIM3 humana (a) CPVFECG (SEQ ID NO: 296); (b) RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298); (c) CPVFECG y RIQIPGIMND (SEQ ID NOs: 296 y 298, respectivamente); o (d) WTSRYWLNGDFR (SEQ ID NO: 297);
- (j) competir o presentar un bloqueo cruzado con, la unión a la TIM3 humana de un anticuerpo de unión a la TIM3 descrito en el presente documento (por ejemplo, 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6 o cualquiera de los TIM3.2 a la TIM3.18), según se determine, por ejemplo, en el ensayo descrito en los Ejemplos;
- 40 (k) unión a la TIM3 humana, pero no a la TIM3 humana que tiene una sustitución aminoacídica de uno o más de los siguientes restos aminoácidos: L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120, según la numeración de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20);
- 45 (l) unión a las regiones de la TIM3 humana ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373) como se determina mediante HDX-EM;
- (m) tener las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5, 10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía; y/o
- 50 (n) competir o bloquear de forma cruzada la unión a la TIM3 humana de 13A3 o TIM3.18.IgG1.3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

- 55 En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno de los mismos, estimulan una respuesta inmunitaria antitumoral, por ejemplo, una respuesta de los linfocitos T específica de antígeno. En otros aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, aumentan la producción de citocinas (por ejemplo, IFN- γ) en los linfocitos T que expresan la TIM3 y/o aumentan la proliferación de linfocitos T. En algunos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, no se unen a los receptores Fc.

- En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, se unen a la TIM3 humana soluble con una K_D de 10 nM o menor como se mide mediante Biacore, se unen a la TIM3 humana unida a la membrana con una K_D de 1 nM o menor, como se mide mediante Scatchard, se unen a la TIM3 soluble de macaco cangrejero con una K_D de 100 nM o menor como se mide mediante Biacore, se unen a la TIM3 humana unida a la membrana con una CE_{50} de 1 μ g/ml o menor, como se mide mediante citometría de flujo, se unen

a la TIM3 humana unida a la membrana con una CE_{50} de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o menor, como se mide mediante citometría de flujo, se unen al TIM3 de macaco cangrejero unida a la membrana con una CE_{50} de 1 $\mu\text{g/ml}$ o menor, como se mide mediante citometría de flujo, se unen a la TIM-3 de macaco cangrejero unida a la membrana con una K_D de 1 nM o menor, como se mide mediante Scatchard.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, que se unen a la TIM3 humana y comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera, en donde la CDR3 de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128 y SEQ ID NO: 129.

En ciertos aspectos de la descripción, la CDR1 de la cadena pesada comprende X1, X2, X3, X4, Y, X5 y X6, y en donde X1 es S o ninguno, X2 es R o ninguno, X3 es S, R o D, X4 es Y o H, X5 es W o M, y X6 es G, N, S o H. En otros aspectos de la descripción, la CDR1 de la cadena pesada comprende X1, Y, Y, M y X2, y en donde X1 es S o D y X2 es H o S. En algunos aspectos de la descripción, la CDR1 de la cadena pesada comprende R, X1, Y, W y X2, y en donde X1 es H o Y y X2 es N o S.

En un aspecto de la descripción, la CDR2 de la cadena pesada comprende X1, I, X2, X3, X4, G, X5, X6, X7, X8, Y, X9, X10, X11, X12, X13 y X14, y en donde X1 es S, Y, I o F, X2 es Y, H, N o S, X3 es Y, P, G, T o S, X4 es S, T, R o G, X5 es F, S o D, X6 es S, T o I, X7 es I o ninguno, X8 es Y, N o I, X9 es N, Q, S o A, X10 es P, S, Q o D, X11 es S o K, X12 es L, F o V, X13 es K o Q, y X14 es S o G. En otro aspecto de la descripción, la CDR2 de la cadena pesada comprende Y, I, H, Y, X1, G, S, T, N, Y, N, X2, S, L, K y S, y en donde X1 es S o T y X2 es S o P. En algunos aspectos de la descripción, la CDR2 de la cadena pesada comprende F, I, S, X1, X2, G, S, X3, I, Y, Y, A, D, S, V, K y G, y en donde X1 es G, T o S, X2 es G o S, y X3 es T o I. En otros aspectos de la descripción, la CDR2 de la cadena pesada comprende I, I, N, P, R, G, D, S, I, I, Y, A, Q, K, F, Q y G.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, comprenden una CDR1 de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65, una CDR2 de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67, y/o una CDR3 de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, que se unen a la TIM3 humana y comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera, en donde

- (a) la CDR1 de la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; y SEQ ID NO: 45;
- (b) la CDR2 de la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 52; SEQ ID NO: 122; SEQ ID NO: 123; SEQ ID NO: 124 y SEQ ID NO: 125;
- (c) la CDR3 de la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 126; SEQ ID NO: 127; SEQ ID NO: 128 y SEQ ID NO: 129;
- (d) la CDR1 de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65;
- (e) la CDR2 de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67; y
- (f) la CDR3 de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, que se unen a la TIM3 humana y comprenden:

- (a1) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 46, 53, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a2) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 122, 53, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a3) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 123, 53, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a4) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 124, 53, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a5) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 46, 126, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a6) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 46,

127, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;

(a7) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 46, 128, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;

(a8) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 46, 129, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;

(a9) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 122, 128, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;

(a10) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 41, 122, 126, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;

(b1) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 42, 47, 54, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 69, respectivamente;

(b2) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 42, 125, 54, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 69, respectivamente;

(c) secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las SEQ ID NOs: 43, 48 y 55, respectivamente, y/o secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66 y 69, respectivamente;

(d) secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las SEQ ID NOs: 44, 49 y 56, respectivamente, y/o secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66 y 68, respectivamente;

(e) secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las SEQ ID NOs: 45, 50 y 57, respectivamente, y/o secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66 y 69, respectivamente;

(f) secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las SEQ ID NOs: 45, 50 y 57, respectivamente, y/o secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66 y 71, respectivamente;

(g) secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las SEQ ID NOs: 45, 50 y 57, respectivamente, y/o secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 65, 67 y 70, respectivamente;

(h) secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las SEQ ID NOs: 45, 51 y 58, respectivamente, y/o secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66 y 68, respectivamente;

(i) secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las SEQ ID NOs: 45, 52 y 59, respectivamente, y/o secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66 y 69, respectivamente.

Los anticuerpos aislados de la invención reivindicada comprenden una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 41, una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 122, y una CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 126, y una CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 64, una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 66 y una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 68.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, que se unen a la TIM3 humana y que comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121 y 364, y/o en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 60, 61, 62 y 63.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, que se unen a la TIM3 humana y compiten de forma cruzada por unirse a la TIM3 humana con un anticuerpo de referencia que comprende una VH y una VL, en donde la VH y la VL se seleccionan del grupo que consiste en:

- (a) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 34 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60;
- 5 (b) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 35 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61;
- (c) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 36 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61;
- (d) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 37 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60;
- 10 (e) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61;
- (f) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 62;
- 15 (g) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63;
- (h) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 39 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60;
- (i) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 40 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61;
- 20 (j) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 121 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 63, respectivamente;
- (k) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 120 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 61, respectivamente;
- (l) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 112 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
- 25 (m) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 113 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
- (n) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 114 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
- 30 (o) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 115 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
- (p) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 116 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
- 35 (q) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 117 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
- (r) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 118 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
- (s) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 119 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente; y
- 40 (t) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 364 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente.

En un aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 aislados, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, se unen a la TIM3 en el mismo epítipo que el anticuerpo de referencia.

En otros aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 aislados, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, comprenden una VH y una VL, seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 34 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60;
- 50 (b) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 35 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61;
- (c) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 36 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61;
- 55 (d) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 37 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60;
- (e) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61;
- (f) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 62;
- 60 (g) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63;
- (h) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 39 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60;
- 65 (i) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 40 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 61;

(j) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 121 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 63, respectivamente;
 (k) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 120 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 61, respectivamente;
 5 (l) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 112 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
 (m) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 113 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
 10 (n) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 114 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
 (o) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 115 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
 (p) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 116 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
 15 (q) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 117 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
 (r) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 118 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente;
 20 (s) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 119 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente; y
 (t) una VH que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 364 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en 60, respectivamente.

Los anticuerpos aislados de la invención reivindicada comprenden una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL), en donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 364 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60.

En ciertas realizaciones de la invención reivindicada, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, se seleccionan del grupo que consiste en una IgG1, una IgG2, una IgG3, una IgG4 o una variante de las mismas. En algunas realizaciones de la invención reivindicada, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, comprenden una Fc de un IgG1 sin efector que comprende las siguientes mutaciones: L234A, L235E, G237A, y opcionalmente A330S y P331S. En otros aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, en donde la región constante de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 130-133. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, son anticuerpos humanos o humanizados.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, se unen específicamente a la TIM3 humana y comprenden

(a1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 301 (o 302) y 29, respectivamente;
 (a2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 1 (u 8) y 29, respectivamente;
 (a3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 15 (o 22) y 29, respectivamente;
 45 (a4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 303 (o 304) y 29, respectivamente;
 (a5) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 72 (u 82) y 29, respectivamente;
 50 (a6) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 92 (o 102) y 29, respectivamente;
 (a7) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 305 (o 306) y 29, respectivamente;
 (a8) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 73 (u 83) y 29, respectivamente;
 55 (a9) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 93 (o 103) y 29, respectivamente;
 (a10) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 307 (o 308) y 29, respectivamente;
 60 (a11) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 74 (u 84) y 29, respectivamente;
 (a12) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 94 (o 104) y 29, respectivamente;
 (a13) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 309 (o 310) y 29, respectivamente;
 65 (a14) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 75 (u 85) y 29,

- respectivamente;
- 5 (a15) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 95 (o 105) y 29, respectivamente;
- (a16) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 311 (o 312) y 29, respectivamente;
- (a17) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 76 (u 86) y 29, respectivamente;
- 10 (a18) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 96 (o 106) y 29, respectivamente;
- (a19) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 313 (o 314) y 29, respectivamente;
- (a20) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 77 (u 87) y 29, respectivamente;
- 15 (a21) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 97 (o 107) y 29, respectivamente;
- (a22) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 315 (o 316) y 29, respectivamente;
- (a23) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 78 (u 88) y 29, respectivamente;
- 20 (a24) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 98 (o 108) y 29, respectivamente;
- (a25) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 317 (o 318) y 29, respectivamente;
- 25 (a26) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 79 (u 89) y 29, respectivamente;
- (a27) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 99 (o 109) y 29, respectivamente;
- (a28) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 319 (o 320) y 29, respectivamente;
- 30 (a29) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 349 (o 350) y 29, respectivamente;
- (a30) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 351 (o 352) y 29, respectivamente;
- 35 (a31) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 353 (o 354) y 29, respectivamente;
- (b1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 321 (o 322) y 30, respectivamente;
- (b2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 2 (o 9) y 30, respectivamente;
- 40 (b3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 16 (o 23) y 30, respectivamente;
- (b4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 323 (o 324) y 30, respectivamente;
- (b5) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 80 (o 90) y 30, respectivamente;
- 45 (b6) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 100 (o 110) y 30, respectivamente;
- (b7) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 325 (o 326) y 30, respectivamente;
- 50 (c1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 327 (o 328) y 30, respectivamente;
- (c2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 3 (o 10) y 30, respectivamente;
- (c3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 17 (o 24) y 30, respectivamente;
- 55 (c4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 329 (o 330) y 30, respectivamente;
- (d1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 331 (o 332) y 29, respectivamente;
- (d2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 4 (u 11) y 29, respectivamente;
- 60 (d3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 18 (o 25) y 29, respectivamente;
- (d4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 333 (o 334) y 29, respectivamente;
- (e11) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 335 (o 336) y 32, respectivamente;
- 65 (e12) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 335 (o 336) y 33, respectivamente;

(e13) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 335 (o 336) y 33, respectivamente;
 (e2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 5 (o 12) y 33, respectivamente;
 (e3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 19 (o 26) y 33, respectivamente;
 (e4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 337 (o 338) y 33, respectivamente;
 (e5) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 81 (o 91) y 33, respectivamente;
 (e6) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 101 (o 111) y 33, respectivamente;
 (e7) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 339 (o 340) y 33, respectivamente;
 (f1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 341 (o 342) y 29, respectivamente;
 (f2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 6 (o 13) y 29, respectivamente;
 (f3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 20 (o 27) y 29, respectivamente;
 (f4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 343 (o 344) y 29, respectivamente;
 (g1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 345 (o 346) y 30, respectivamente;
 (g2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 7 (o 14) y 30, respectivamente;
 (g3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 21 (o 28) y 30, respectivamente; o
 (g4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 347 (o 348) y 30, respectivamente.

Los anticuerpos aislados de la invención reivindicada comprenden

una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 349 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29;
 una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 351 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29;
 una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 353 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29;
 una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 350 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29;
 una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 352 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29; o
 una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 354 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.

En otros aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno de los mismos, tienen una o más de las siguientes propiedades:

(1) se unen a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
 (2) se unen a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 100 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 100 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
 (3) se unen a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 1 $\mu\text{g/ml}$ o menor (por ejemplo, de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);
 (4) se unen a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
 (5) se unen a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 20 $\mu\text{g/ml}$ o menor (por ejemplo, de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 20 $\mu\text{g/ml}$), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);
 (6) se unen a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como

se describe en los Ejemplos;

(7) inducen o mejoran la activación de los linfocitos T (por ejemplo, bloqueando o reduciendo el efecto inhibitor de la TIM3), como lo demuestra (i) el aumento de la producción de IFN- γ en linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL) y/o (ii) el aumento de la proliferación de linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(8) estimular la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(9) inhibir la unión de la fosfatidilserina a la TIM3, por ejemplo, como se mide mediante el ensayo de bloqueo "en tándem" de PS-hTIM3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(10) no internalizar ni regular por disminución la TIM3 de la superficie celular cuando se unen a la TIM3 de las células;

(11) se unen a una de las siguientes regiones del dominio extracelular de la TIM3 humana (SEQ ID NO: 290): (a) CPVFECG (SEQ ID NO: 296); (b) RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298); (c) CPVFECG y RIQIPGIMND (SEQ ID NOs: 296 y 298, respectivamente); y (d) WTSRYWLNGDFR (SEQ ID NO: 297), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(12) tener una unión reducida a la TIM3 humana en la que uno o más de los aminoácidos L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120 (como se numeran en la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) está sustituido por otro aminoácido relativo a la unión con la TIM3 humana natural, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(13) competir en cualquier dirección o en ambas direcciones por la unión a la TIM3 humana con un anticuerpo que comprende los dominios VH y VL de una cualquiera de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o TIM3.7, TIM3.8, TIM3.10, TIM3.11, TIM3.12, TIM3.13, TIM3.14, TIM3.15, TIM3.16, TIM3.17 y TIM3.18, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(14) se unen a las regiones de la TIM3 humana ⁴⁹VPVCWKGKACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) como se determina mediante HDX-EM, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(15) tener las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5, 10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos; numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)); y/o

(16) (a) tener una unión reducida a la TIM3 humana en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, R111, D120, y opcionalmente D104 y Q113 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) están sustituidos por otro aminoácido relativo a la unión con TIM3 humana natural; (b) se unen a ⁴⁹VPVCWKGKACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), como se determina mediante HDX-EM, como se describe en los Ejemplos; y/o (c) competir o bloquear de forma cruzada la unión a la TIM3 humana de 13A3 o TIM3.18.IgG1.3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

En el presente documento se describen moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-TIM3 unido a una molécula que tiene una segunda especificidad de unión.

En el presente documento se describen ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos anti-TIM3, o porciones de unión al antígeno de las mismas, vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos y células transformadas con los vectores de expresión.

En el presente documento se describen inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, unidos a un agente.

En el presente documento se describen composiciones que comprenden anticuerpos anti-TIM3, o porciones de unión al antígeno de los mismos, moléculas biespecíficas o inmunoconjugados descritos en el presente documento, y un portador. También se describen en el presente documento kits que comprenden los anticuerpos anti-TIM3, o porciones de unión al antígeno de los mismos, moléculas biespecíficas o inmunoconjugados descritos en el presente documento, e instrucciones de uso.

En el presente documento se describe un método para preparar anticuerpos anti-TIM3, o porciones de unión al antígeno de los mismos, que comprende un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, en una célula y aislar el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno del mismo, a partir de la célula.

En el presente documento se describe un método de estimulación de una respuesta de linfocitos T específica del antígeno que comprende poner contacto el linfocito T con un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, moléculas biespecíficas o inmunoconjugados descritos en el presente documento de modo que se estimule una respuesta de linfocitos T específica del antígeno (por ejemplo, inhibiendo el efecto negativo de la TIM3 en las células, por ejemplo, linfocitos T).

En el presente documento se describe un método para activar o coestimular un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T

efector (por ejemplo, un linfocito Th1), que comprende poner en contacto una célula, por ejemplo, un linfocito T efector, con un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, moléculas biespecíficas o inmunoconjugados descritos en el presente documento, y CD3, en donde el linfocito T efector es activado o coestimulado (por ejemplo, inhibiendo el efecto negativo de la TIM3 en las células, por ejemplo, linfocitos T).

En el presente documento se describe un método para aumentar la producción de IFN- γ y/o la proliferación de un linfocito T, por ejemplo, un linfocito Th1 o TIL, que comprende poner en contacto el linfocito T con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, moléculas biespecíficas o inmunoconjugados descritos en el presente documento.

En el presente documento se describe un método para aumentar la producción de IFN- γ en linfocitos T en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, molécula biespecífica o inmunoconjugado descritos en el presente documento para aumentar la producción de IFN- γ de los linfocitos T.

En el presente documento se describe un método para estimular la actividad de los TIL en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, descrito en el presente documento, de modo que los TIL proliferen o secreten una citocina, por ejemplo, IFN- γ .

En el presente documento se describen métodos para estimular los linfocitos NK (por ejemplo, aumentando la actividad citotóxica de los linfocitos NK) y/o los macrófagos u otras células presentadoras del antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-TIM3 o una porción de unión al antígeno del mismo, molécula biespecífica o inmunoconjugado descritos en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento puede aumentar la secreción de IL-12 por parte de las células presentadoras de antígeno que han entrado en contacto con el anticuerpo TIM3.

En el presente documento se describe un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, molécula biespecífica o inmunoconjugado descritos en el presente documento, de modo que se estimule una respuesta inmunitaria en el sujeto. En ciertos aspectos de la descripción, el sujeto tiene un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor.

En el presente documento se describe un método para inhibir el crecimiento de tumores o reducir el tamaño de tumores en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, molécula biespecífica o inmunoconjugado descritos en el presente documento, de modo que se inhiba el crecimiento del tumor en el sujeto.

En el presente documento se describe un método de tratamiento del cáncer, por ejemplo, mediante inmunoterapia, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TIM3, o de una porción de unión al antígeno del mismo, molécula biespecífica o inmunoconjugado descritos en el presente documento, para tratar el cáncer. En ciertos aspectos de la descripción, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino/cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de células germinativas, cáncer óseo, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de piel, neoplasia del sistema nervioso central, linfoma, leucemia, mieloma, sarcoma, cáncer relacionado con virus, y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos de la descripción, el cáncer es un cáncer metastásico, un cáncer resistente o un cáncer recurrente. En algunos aspectos de la descripción, el cáncer es un tumor frío.

En ciertos aspectos de la descripción, los métodos descritos en el presente documento comprenden además la administración de una o más opciones terapéuticas adicionales con un anticuerpo anti-TIM3, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-LAG-3, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-PD-L1.

En el presente documento se describe un método para detectar la presencia de una proteína TIM3 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, en unas condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, y la TIM3, y detectar la formación de un complejo.

Breve descripción de los dibujos/las figuras

En la FIG. 1A se muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 167) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 34) de la región variable de la cadena pesada (VH) madura del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 13A3. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 41), CDR2 (SEQ ID NO: 46) y CDR3 (SEQ ID NO: 53), y se indican las derivaciones de la estirpe germinal V, D y J.

señalización (SEQ ID NOs: 275 y 270, respectivamente), y las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NOs: 195, 196 y 194, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOs: 62, 63 y 61, respectivamente) de la región VL de la cadena ligera de VK1, VK2 y VK3 del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 9F6 con una secuencia de señalización (SEQ ID NOs: 276 y 271, respectivamente).

En la FIG. 6A se muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 172) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 39) de la región variable de la cadena pesada (VH) madura del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 3G4. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 45), CDR2 (SEQ ID NO: 51) y CDR3 (SEQ ID NO: 58), y se indican las derivaciones de la estirpe germinal V, D y J.

En la FIG. 6B se muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 193) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 60) de la región variable de la cadena ligera (VL) madura del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 3G4. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 64), CDR2 (SEQ ID NO: 66) y CDR3 (SEQ ID NO: 68), y se indican las derivaciones de la estirpe germinal V y J.

En la FIG. 6C se muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 172) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 39) de la región VH de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 3G4 con una secuencia de señalización (SEQ ID NOs: 275 y 270, respectivamente), y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 193) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 60) de la región VL de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 3G4 con una secuencia de señalización (SEQ ID NOs: 273 y 268, respectivamente).

En la FIG. 7A se muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 173) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) de la región variable de la cadena pesada (VH) madura del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 17C8. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 45), CDR2 (SEQ ID NO: 52) y CDR3 (SEQ ID NO: 59), y se indican las derivaciones de la estirpe germinal V, D y J.

En la FIG. 7B se muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 194) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 61) de la región variable de la cadena ligera (VL) madura del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 17C8. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 64), CDR2 (SEQ ID NO: 66) y CDR3 (SEQ ID NO: 69), y se indican las derivaciones de la estirpe germinal V y J.

En la FIG. 7C se muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 173) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) de la región VH de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 17C8 con una secuencia de señalización (SEQ ID NOs: 275 y 270, respectivamente), y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 194) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 61) de la región VL de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 17C8 con una secuencia de señalización (SEQ ID NOs: 273 y 268, respectivamente).

En la FIG. 8A se muestra una alineación de secuencias de la región variable de la cadena pesada (VH) de los anticuerpos monoclonales 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) aparecen en recuadros.

En la FIG. 8B se enumeran las SEQ ID NOs de las regiones VH, cada una de las CDR, y mutantes de las mismas, de los anticuerpos.

En la FIG. 9A se muestra una alineación de secuencias de la región variable de la cadena ligera (VL) de los anticuerpos monoclonales 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6_VK1, 9F6_VK2, 9F6_VK3, 3G4 y 17C8. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) aparecen en recuadros.

En la FIG. 9B se enumeran las SEQ ID NOs de las regiones VL y cada una de las CDR de los anticuerpos.

En la FIG. 10 se muestra una alineación de secuencias de la cadena pesada madura completa (HC) del anticuerpo monoclonal TIM3.5 (13A3) y variantes ilustrativas del mismo: TIM3.13 (D101E), TIM3.14 (P102V), TIM3.15 (P102Y), TIM3.16 (P102L), TIM3.17 (N60Q/P102Y), TIM3.18 (N60Q/D101E), TIM3.10 (N60Q), TIM3.11 (N60S) y TIM3.12 (N60A). La región VH de cada una de las cadenas pesadas está subrayada.

En la FIG. 11 se muestra una alineación de secuencias de la HC madura completa del anticuerpo monoclonal 9F6 y una variante ilustrativa TIM3.7 (A108T) de la misma. La región VH de cada cadena pesada está subrayada.

En la FIG. 12 se muestra una alineación de secuencias de la HC madura completa del monoclonal 8B9 y una variante ilustrativa TIM3.8 (S61P) de la misma. La región VH de cada cadena pesada está subrayada.

En la FIG. 13 se enumeran las SEQ ID NOs de las cadenas pesadas y ligeras completas, las regiones variables y las CDR de anticuerpos derivados de hibridomas (13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8) y anticuerpos recombinantes anti-TIM3 humana (TIM3.2-TIM3.18). Se indica también el isotipo de las cadenas pesada y ligera. "H.n." se refiere al nombre del hibridoma. Las cadenas pesadas y ligeras a las que se hace referencia en la FIG. 13 pueden derivar de sus elementos, por ejemplo, regiones variables y constantes que se divulgan en el presente documento. Cuando una SEQ ID NO no aparece en una columna dada de la segunda o tercera página de la tabla, se proporciona en esa columna en la página anterior o en la página anterior a ésta.

En las FIGS. 14A-14B se muestran las curvas de unión y las CE_{50} de los anticuerpos anti-TIM3 a células CHO humanas transfectadas con la TIM-3 (FIG. 14A) y linfocitos T humanos activados (FIG. 14B).

En las FIGS. 15A-15B se muestran las curvas de unión y las CE_{50} de los anticuerpos anti-TIM3 a una estirpe celular de macaco CHO transfectada con la TIM3 (FIG. 15A) y linfocitos T de macaco activados (FIG. 15B).

En la FIG. 16 se muestra la actividad anti-TIM3 (a diferentes concentraciones de anticuerpo) en la promoción de la producción de IFN- γ a partir de leucocitos infiltrantes de tumores (TIL) en el carcinoma de células renales (RCC). Las 8 barras de cada anticuerpo representan diferentes concentraciones de anticuerpo, como se indica.

En las FIGS. 17A-17B se muestra la actividad anti-TIM3 (a diferentes concentraciones de anticuerpo) en la promoción de la producción de IFN- γ a partir de TIL de cáncer de pulmón (FIG. 17A, ELISA de IFN- γ ; en la FIG. 17B, tinción de IFN- γ intracelular). En la FIG. 17A, la barra individual para cada anticuerpo representa diferentes concentraciones de anticuerpo, como se indica. En la FIG. 17B, en el panel superior se muestran linfocitos CD4⁺ y en el panel inferior linfocitos CD8⁺. El nivel de TIM3 se midió con 8B9 (eje x).

En la FIG. 18 se muestran los anticuerpos anti-TIM-3 (es decir, los anticuerpos 13A3 y 3G4) en la promoción de la secreción de IFN- γ a partir de TIL aislados a partir de diferentes tejidos en presencia de células CHO-OKT3

En la FIG. 19 se muestra el bloqueo cruzado anti-TIM-3 de los anticuerpos TIM-3 en linfocitos T humanos activados.

En la FIG. 20 se muestran los restos de aminoácidos que son necesarios para la unión de los anticuerpos monoclonales anti-TIM3 13A3, 3G4, 17C3 y 8B9 a la TIM3 humana. La secuencia de señalización y los dominios transmembranarios están subrayados.

En las FIGS. 21A-21B se muestra que ciertos anticuerpos anti-TIM3 bloquean la interacción entre la TIM3 humana y la PS-liposoma. En la FIG. 21A se muestra un diagrama esquemático del ensayo de bloqueo "en tándem" con fosfatidilserina (PS)-hTIM3. En la FIG. 21B se muestra el bloqueo de la unión del hTIM3-Fc a la PS-liposoma por parte de ciertos anticuerpos anti-TIM3, como se mide mediante el ensayo de bloqueo "en tándem" de PS-hTIM3 mostrado en la FIG. 21A.

En la FIG. 22 se muestra un resumen de la actividad funcional de diferentes anticuerpos anti-TIM3 (por ejemplo, TIM3.5, TIM3.4, TIM3.2, TIM3.9, 9F6, TIM3.8 y TIM3.6). Se proporcionan los datos del ensayo de unión, del ensayo de linfocitos T, del ensayo de TIL y del ensayo de bloqueo de PS-TIM3.

En la FIG. 23 se proporciona un listado de todos los números de SEQ ID con una descripción de las secuencias representadas por los números de SEQ ID.

En las FIGS. 24A-24B se muestra la actividad antitumoral de la administración combinada de anticuerpos anti-PD1 y anti-TIM3 en el modelo de ratón de tumor colorrectal CT26. En la FIG. 24A se muestra el volumen tumoral en diferentes puntos temporales después de la implantación del tumor en ratones (n = 10/grupo) tratados con (i) IgG de control (panel superior izquierdo), (ii) anticuerpo RMT3-23 anti-TIM3 solo (panel superior derecho), (iii) anticuerpo RMP1-14 anti-PD1 solo (panel inferior izquierdo) y (iv) combinación de los anticuerpos RMT3-23 anti-TIM3 y RMP1-14 anti-PD1 (panel inferior derecho). En la FIG. 24B se muestra el volumen tumoral medio en función del tiempo (días después de la implantación del tumor) en ratones tratados con (i) anticuerpo RMT3-23 anti-TIM3 solo, (ii) anticuerpo AcM anti-TIM3 solo, (iii) anticuerpo RMP1-14 anti-PD1 solo, (iv) combinación de anticuerpos RMT3-23 anti-TIM3 y RMP1-14 anti-PD1, (v) combinación de anticuerpos Ac M anti-TIM3 y RMP1-14 anti-PD1 y (vi) anticuerpo de control del isotipo.

En la FIG. 25 se muestra la lista de los péptidos comunes de la hTIM-3 que se usaron para cartografiar los epítomos de los anticuerpos anti-TIM3 (13A3 y 3G4) mediante espectrometría de masas con intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-EM). Cada barra indica un péptido péptico. Los restos marcados con un círculo (es decir, N99, T145 y N172) indican los sitios de glicosilación.

En la FIG. 26 se muestran las regiones de unión a la TIM-3 humana de los anticuerpos anti-TIM3 (13A3 y 3G4) identificados usando HDX-MX. El panel superior muestra la región de unión del anticuerpo 13A3 anti-TIM3. El panel inferior muestra la región de unión del anticuerpo 3G4 anti-TIM3.

En las FIGS. 27A-27B se muestran los resultados de un análisis de Scatchard de TIM3.18.IgG1.3 contra células CHO que expresan ectópicamente la TIM3 humana o de macaco. En la FIG. 27A se muestra una curva patrón del Ac con 125 I-TIM3. En la FIG. 27B se muestra la cantidad de anticuerpo TIM3.18.IgG1.3 unido a células CHO que expresan la TIM3 humana (panel izquierdo) y de macaco (panel derecho).

En la FIG. 28 se muestran los resultados de un análisis de Scatchard de TIM3.18.IgG1.3 contra linfocitos Th1 activados de dos donantes (paneles izquierdo y derecho).

En las FIGS. 29A y 29B se muestra que TIM3.18.IgG1.3 y TIM3.18.IgG1.3 Fab aumentaron la proliferación de linfocitos T Th1 en el ensayo de cocultivo Th1 polarizados/CHO-OKT3 irradiadas. En la FIG. 29A se muestra la proliferación de linfocitos Th1 observada con diferentes concentraciones de TIM3.18.IgG1.3, 13A3 ("13A3-g4") o sin anticuerpo ni anticuerpos de control de isotipo (hIgG 11 y hIgG4). En la FIG. 29B se muestra la proliferación de linfocitos Th1 observada con diferentes concentraciones de TIM3.18.IgG1.3 Fab o sin anticuerpo ni anticuerpo de control del isotipo IgG1.3.

En la FIG. 30 se muestra que el anticuerpo anti-TIM3 TIM3.18.IgG1.3 mejoró la proliferación de linfocitos T Th1 en el ensayo de cocultivo Th1 polarizados/CHO-OKT3-PD-L1 irradiadas junto con nivolumab.

En la FIG. 31 se muestra que el anticuerpo anti-TIM3 TIM3.18.IgG1.3 mejoró la secreción de interferón- γ de los linfocitos infiltrantes de tumores de carcinoma de células renales (TIL) estimulados con células CHO-OKT3 irradiadas

En la FIG. 32 se muestra que el anticuerpo TIM3.18.IgG1.3 anti-TIM3 aumentó la secreción de interferón- γ de los TIL de cáncer de mama estimulados con células CHO-OKT3 irradiadas.

En la FIG. 33 se muestra la expresión de CD163, CD206 y TIM3 en los macrófagos M0 que se utilizaron en un ensayo AlloMLR (reacción linfocitaria mixta), cuyos resultados se muestran en la FIG. 34.

En la FIG. 34 se muestra la proliferación de células en un ensayo AlloMLR realizado en presencia del anticuerpo TIM3.18.IgG1.3 anti-TIM3, un control de isotipo o en ausencia de anticuerpo.

La FIG. 35 es un diagrama de cinta de la estructura de un complejo TIM3:TIM3.18 Fab, como se determina mediante cristalografía. El fragmento Fab se muestra en gris claro y la TIM3 se muestra en gris oscuro.

En la FIG. 36 se muestra la estructura del complejo TIM3:TIM3.18 Fab, como se determina mediante cristalografía. El fragmento Fab se muestra como un diagrama de cinta. La TIM3 se muestra en una representación de superficie blanca, con los restos de contacto Fab representados en gris oscuro.

La FIG. 37 es un diagrama del ensayo que se usó para medir la posible internalización por parte de anticuerpos anti-TIM3.

En la FIG. 38 se muestra que los anticuerpos 13A3 anti-TIM3 (panel inferior izquierdo) y ciertas variantes (D101E - panel superior izquierdo; N60Q - panel superior derecho) de los mismos no activan la internalización mediada por el receptor (es decir, la TIM3).

En las FIGS. 39A y 39B se muestran un diagrama de cinta que representa los epítomos de los anticuerpos anti-TIM3 13A3 (FIG. 39A) y 3G4 (FIG. 39B). Las secuencias de aminoácidos de los epítomos de cada uno de los anticuerpos figuran debajo del diagrama de cinta. Los diferentes patrones identifican las regiones específicas de los anticuerpos anti-TIM3 que corresponden a los epítomos específicos.

Descripción detallada de la divulgación

Para que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar, se definen ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Cabe señalar que el término "un" o "uno/a" se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, "una secuencia de nucleótidos", se entiende que representa una o más secuencias de nucleótidos. Como tales, los términos "un" (o "uno/a"), "uno/a o más" y "al menos uno" pueden utilizarse indistintamente en el presente documento.

Asimismo, cuando se utiliza en el presente documento, "y/o" debe interpretarse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados, con o sin el otro. Por lo tanto, la expresión "y/o" como se usa en una expresión tal como "A y/o B" en el presente documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Asimismo, la expresión "y/o" como se usa en una expresión tal como "A, B y/o C" pretende englobar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Se entiende que dondequiera que se describa en el presente documento aspectos con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia con la que está relacionada esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en la presente divulgación.

Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican en su forma aceptada del Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Salvo que se indique lo contrario, las secuencias de nucleótidos están escritas de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3'. Las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxi. Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diferentes aspectos de la divulgación, que pueden obtenerse por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen con más detalle por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

El término "aproximadamente", como se utiliza en el presente documento, significa aproximadamente, más o menos, en torno a, o en las regiones de. Cuando el término "aproximadamente" se utiliza junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo al extender los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término "aproximadamente" puede modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado en una variación de, por ejemplo, el 10 por ciento, hacia arriba o hacia abajo (mayor o menor).

La expresión "inmunoglobulina de linfocitos T y dominio 3 que contiene mucina" o "TIM3", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un receptor que es un miembro de la familia de proteínas de inmunoglobulina de linfocitos T y dominio de mucina (TIM). Algunos ligandos principales de la TIM3 incluyen fosfatidilserina (TIM3-L). La TIM3 también se denomina receptor celular 2 del virus de la hepatitis A (HAVCR2), receptor 3 de mucina de inmunoglobulina de linfocitos T, TIM-3, TIMD3, TIMD-3, molécula 3 de lesión renal, KIM-3 y CD366. El término "TIM3" incluye cualquier variante o isoforma de la TIM3 que las células expresen de forma natural. Por consiguiente, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden presentar reacción cruzada con la TIM3 de especies distintas a la humana (por ejemplo, la TIM3 de macaco cangrejero). Alternativamente, los anticuerpos pueden ser específicos para la TIM3 humana y no presentar ninguna reactividad cruzada con otras especies. La TIM3 o cualquiera de las variantes e isoformas de la misma, puede aislarse a partir de células o tejidos que las expresen de forma natural o ser producidas de manera recombinante utilizando técnicas bien conocidas en la técnica y/o las descritas en el presente documento.

Se han identificado dos isoformas de la TIM3 humana. La isoforma 1 (n.º de registro NP_116171; SEQ ID NO: 286) consiste en 301 aminoácidos y representa la secuencia canónica. La isoforma 2 (n.º de registro AAH20843; SEQ ID NO: 287) consiste en 142 aminoácidos y es soluble. Carece de los restos de aminoácidos 143-301, que codifican el dominio transmembranario, el dominio citoplásmico y parte del dominio extracelular de la TIM3. Los restos de aminoácidos 132-142 también difieren de la secuencia canónica descrita anteriormente.

A continuación se muestran las secuencias de aminoácidos de las dos isoformas humanas conocidas de la TIM3.

(A) isoforma 1 de la TIM3 humana (n.º de registro NP_116171; SEQ ID NO: 286; codificada por la secuencia de nucleótidos que tiene el número de registro NM_032782.4; SEQ ID NO: 288; FIG. 20):

MFSLPFDCVLLLLLLLLLTSSEVEYRAEVGQNAVLPFCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECCGNVVLRTDERDV
 NYWTSRYWLNQDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTAPTRQRDFTAAPPR
 MLTTRGHGPAETQTLLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYICAGICAGLALALIFGALIFK
 WYSHSKEKIQNLSLISLANLPSSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAM
 P

(B) isoforma 2 de la TIM3 humana (n.º de registro AAH20843; SEQ ID NO: 287; codificada por la secuencia de nucleótidos que tiene el número de registro BC020843.1; SEQ ID NO: 289):

MFSLPFDCVLLLLLLLLLTSSEVEYRAEVGQNAVLPFCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECCGNVVLRTDERDV
 NYWTSRYWLNQDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPGEWTFACHLYE

La secuencia de señalización de las isoformas 1 y 2 corresponde a los aminoácidos 1-21 (subrayados). Por lo tanto, las isoformas maduras 1 y 2 consisten en los aminoácidos 22 a 301 o 142, respectivamente. El dominio extracelular de la TIM3 humana madura consiste en los aminoácidos 22-202 de la SEQ ID NO: 286 y tiene la secuencia de aminoácidos:

SEVEYPAEVGQNAVLPFCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECCGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNQDFRKGDVSLT
 IENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTAPTRQRDFTAAPPRMLTTRGHGPAETQTLLGSLPD
 IMLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIG (SEQ ID NO: 290).

La proteína TIM3 de macaco cangrejero consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos (incluye una secuencia de señalización):

MFSLPFD

CVLLLLLLLLLTSSEVEYRAEVGQNAVLPFCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECCGNVVLRTDERDV
 NDRTSGRYWLNQDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTAPTRQRDFTAAPPR
 MLTTRGHGPAETQTLLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYICAGICAGLALALIFGALIFK
 WYSHSKEKIQNLSLISLANLPSSGLANAVARGIRSEENIYTIENVEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAM (SEQ
 ID NO: 360)

El término "anticuerpo" se refiere, en un aspecto de la descripción, a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante puentes de disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como CH). En ciertos anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales, la región constante de la cadena pesada comprende una bisagra y tres dominios, CH1, CH2 y CH3. En ciertos anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales, cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (abreviado en el presente documento como CL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR, del inglés "framework regions"). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amínico a extremo carboxílico en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden participar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas diferentes células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Una cadena pesada puede tener o no la lisina carboxiterminal. Salvo que se indique lo contrario en el presente documento, los aminoácidos de las regiones variables se numeran según el sistema de numeración de Kabat, y los de las regiones constantes según el sistema UE.

Un "anticuerpo IgG", por ejemplo, un anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, como se utiliza en el presente documento tiene, en ciertos aspectos de la descripción, la estructura de un anticuerpo IgG natural, es decir, tiene la misma cantidad de cadenas pesadas y ligeras y puentes de disulfuro que un anticuerpo IgG natural de la misma subclase. Por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 anti-TIM3 consiste en dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC), en donde las dos cadenas pesadas y ligeras están unidas por el mismo número y localización de puentes de disulfuro que se dan en los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 naturales, respectivamente (a menos

que el anticuerpo haya sido mutado para modificar los puentes de disulfuro).

Los anticuerpos normalmente se unen específicamente a su antígeno afin con alta afinidad, reflejada por una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-11} M o menor. Se considera que cualquier K_D mayor de aproximadamente 10^{-4} M indica generalmente una unión inespecífica. Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno, se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno y a antígenos sustancialmente idénticos con alta afinidad, lo que significa que tiene una K_D de 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 5×10^{-9} M o menor, o entre 10^{-8} M y 10^{-10} M o menor, pero que no se une con alta afinidad a antígenos no relacionados. Un antígeno es "sustancialmente idéntico" a un antígeno dado en caso de que muestre un alto grado de identidad de secuencia con el antígeno dado, por ejemplo, si presenta al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia del antígeno dado. A modo de ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a la TIM3 humana puede, en ciertos aspectos de la descripción, también presentar reactividad cruzada con antígenos de la TIM3 de ciertas especies de primates (por ejemplo, la TIM3 de macaco cangrejero), pero no pueden presentar reacción cruzada con antígenos de la TIM3 de otras especies o con un antígeno distinto de la TIM3.

Una inmunoglobulina puede ser de cualquiera de los isotipos habitualmente conocidos, incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. El isotipo IgG se divide en subclases en ciertas especies: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en seres humanos, e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en ratones. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento son del subtipo IgG1. Las inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG1, existen en varios alotipos, que difieren entre sí como mucho en unos pocos aminoácidos. "Anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, anticuerpos tanto naturales como no naturales; anticuerpos monoclonales y policlonales; anticuerpos quiméricos y humanizados; anticuerpos humanos y no humanos y anticuerpos totalmente sintéticos.

La expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, la TIM3 humana). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo completo. Algunos ejemplos de fragmentos de unión englobados en la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento, incluyen (i) un fragmento Fab (fragmento procedente de la escisión con papaína) o un fragmento monovalente similar consistente en los dominios V_L , V_H , LC y $CH1$; (ii) un fragmento $F(ab')_2$ (fragmento de escisión con pepsina) o un fragmento bivalente similar que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y $CH1$; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de dAb (Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada y (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas por un conector sintético. Asimismo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , estén codificados por genes independientes, pueden unirse utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenaria (scFv, del inglés *single chain Fv*); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén englobados en la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

Un "anticuerpo bifuncional" o "biespecífico" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una diversidad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales comprendidos en la población son sustancialmente similares y se unen al mismo epítipo o epítopos (por ejemplo, los anticuerpos muestran una única especificidad y afinidad de unión), excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes dichas variantes generalmente en cantidades minoritarias. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo mediante un método particular. La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea que muestra una especificidad de unión única y que tiene regiones constantes variables y opcionales derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la estirpe germinal humana. En un aspecto de la descripción, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada y un transgén de la cadena ligera humanas fusionados a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para que exprese el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca recombinante y combinatoria de anticuerpos humanos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes comprenden regiones variables y constantes que utilizan secuencias particulares de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana que están codificadas por genes de la estirpe germinal, pero incluyen reordenaciones y mutaciones posteriores que se producen, por ejemplo, durante la maduración del anticuerpo. Como se sabe en la técnica (véase, por ejemplo, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23 (9): 1117-1125), la región variable contiene el dominio de unión al antígeno, que está codificado por diferentes genes que se transponen para formar un anticuerpo específico para un antígeno extraño. Además de la transposición, la región variable puede modificarse adicionalmente con múltiples cambios de un único aminoácido (conocidos como mutación somática o hipermutación) para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno extraño. La región constante cambiará en respuesta adicional a un antígeno (es decir, cambio de isotipo). Por consiguiente, las moléculas de ácidos nucleicos transpuestas y mutadas somáticamente que codifican los polipéptidos de la cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulinas en respuesta a un antígeno no pueden tener identidad de secuencia con las moléculas de ácidos nucleicos originales, sino que serán sustancialmente idénticas o similares (es decir, tendrán una identidad de al menos un 80 %).

Un anticuerpo "humano" (HuMAb) se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en las que tanto las regiones estructurales como las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Asimismo, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también procede de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Los anticuerpos anti-TIM3 que se describen en el presente documento pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específicas de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como el ratón, en secuencias estructurales humanas. Las expresiones anticuerpos "humanos" y anticuerpos "completamente humanos" se utilizan indistintamente.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios de CDR de un anticuerpo no humano son reemplazados por los correspondientes aminoácidos derivados de inmunoglobulinas humanas. En un aspecto de la descripción de una forma humanizada de un anticuerpo, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios de CDR se han reemplazado por aminoácidos de inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR permanecen sin cambios. Están permitidas pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos, siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno concreto. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que las regiones variables proceden de una especie y las regiones constantes proceden de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las regiones variables proceden de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes proceden de un anticuerpo humano.

Como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

"Alotipo" se refiere a variantes naturales dentro de un grupo de isotipo específico, cuyas variantes difieren en unos pocos aminoácidos (véase, por ejemplo, Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1: 1). Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento pueden ser de cualquier alotipo. Como se utiliza en el presente documento, los anticuerpos denominados "IgG1f", "IgG1.1f", o isotipo "IgG1.3f" son anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG1.1 sin efector y IgG1.3 sin efector, respectivamente, del alotipo "f", es decir, que tiene 214R, 356E y 358M según el índice de la EU como en Kabat, como se muestra, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 3.

En el presente documento, las expresiones "un anticuerpo que reconoce a un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otras proteínas y material celular.

Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo que "inhibe la unión del TIM3-L a TIM3" se refiere a un anticuerpo que inhibe la unión de la TIM3 a su ligando, por ejemplo, fosfatidilserina, por ejemplo, en ensayos de unión utilizando células CHO transfectadas con TIM3 humana o linfocitos T activados que expresan la TIM3, con una CE₅₀

de aproximadamente 1 µg/ml o menor, tal como de aproximadamente 0,9 µg/ml o menor, aproximadamente 0,85 µg/ml o menor, aproximadamente 0,8 µg/ml o menor, aproximadamente 0,75 µg/ml o menor, aproximadamente 0,7 µg/ml o menor, aproximadamente 0,65 µg/ml o menor, aproximadamente 0,6 µg/ml o menor, aproximadamente 0,55 µg/ml o menor, aproximadamente 0,5 µg/ml o menor, aproximadamente 0,45 µg/ml o menor, aproximadamente 0,4 µg/ml o menor, aproximadamente 0,35 µg/ml o menor, aproximadamente 0,3 µg/ml o menor, aproximadamente 0,25 µg/ml o menor, aproximadamente 0,2 µg/ml o menor, aproximadamente 0,15 µg/ml o menor, aproximadamente 0,1 µg/ml o menor o aproximadamente 0,05 µg/ml o menor, en métodos reconocidos en la técnica, por ejemplo, en los ensayos de unión basados en FACS descritos en el presente documento.

- 10 Una "función efectora" se refiere a la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor o ligando de Fc, o un acontecimiento bioquímico que resulte de la misma. Algunas "funciones efectoras" ilustrativas incluyen unión a C1q, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión al receptor de Fc, funciones efectoras mediadas por el FcγR tales como la ADCC y la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), y la regulación por disminución de un receptor de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de los linfocitos B; BCR). Dichas
- 15 funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo).

- Un "receptor de Fc" o "FcR" es un receptor que se une a la región Fc de una inmunoglobulina. Los FcR que se unen a anticuerpo IgG comprenden receptores de la familia del FcγR, incluyendo las variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. La familia del FcγR consiste en tres receptores activadores (FcγRI, FcγRIII y FcγRIV en ratones; FcγRIA, FcγRIIA y FcγRIIIA en seres humanos) y un receptor inhibidor (FcγRIIB). En la técnica se conocen diferentes propiedades de los FcγR humanos. La mayoría de los tipos de células efectoras innatas coexpresan uno o más FcγR activadores y el FcγRIIB inhibidor, mientras que los linfocitos citolíticos naturales (NK) expresan selectivamente un receptor de Fc activador (FcγRIII en ratones y FcγRIIIA en seres humanos) pero no el FcγRIIB inhibidor en ratones y seres humanos. La IgG1 humana se une a la mayoría de los receptores de Fc humanos, y se considera que es equivalente a la IgG2a murina con respecto a los tipos de receptores de Fc activadores a los que se une.

- Una "región Fc" (región del fragmento cristizable) o "dominio Fc" o "Fc" se refiere a la región carboxiterminal de la cadena pesada de un anticuerpo que participa en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo la unión a receptores de Fc ubicados en diferentes células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) o al primer componente del sistema del complemento clásico (C1q). Por lo tanto, una región Fc comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante (por ejemplo, CH1 o CL). En los isotipos de anticuerpos IgG, IgA e IgD, la región Fc comprende dos fragmentos proteicos idénticos, derivados de los dominios constantes segundo (CH2) y tercero (CH3) de las dos cadenas pesadas del anticuerpo; las regiones Fc de IgM e IgE comprenden tres dominios constantes de la cadena pesada (los dominios CH 2-4) en cada cadena polipeptídica. Para la IgG, la región Fc comprende los dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina y la bisagra entre los dominios CH1 y CH2. Aunque la definición de los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina puede variar, como se define en el presente documento, se define que la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde un resto de aminoácido en la posición D221 para la IgG1, V222 para la IgG2, L221 para la IgG3 y P224 para la IgG4 hasta el carboxiterminal de la cadena pesada, en donde la numeración es según el índice EU de Kabat. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana se extiende desde el aminoácido 237 hasta el aminoácido 340, y el dominio CH3 se sitúa en el extremo carboxiterminal de un dominio CH2 en una región Fc, es decir, se extiende desde el aminoácido 341 hasta el aminoácido 447 o 446 (si el resto de lisina carboxiterminal está ausente) o 445 (si los restos de glicina y lisina carboxiterminales están ausentes) de una IgG. Como se utiliza en el presente documento, la región Fc puede ser una Fc de secuencia nativa, incluyendo cualquier variante alotípica, o una Fc variante (por ejemplo, una Fc no natural). Fc también puede referirse a esta región de forma aislada o en el contexto de un polipéptido de proteína que comprende una Fc, tal como una "proteína de unión que comprende una región Fc", denominada también "proteína de fusión Fc" (por ejemplo, un anticuerpo o un inmunoadhesión).

- Una "región Fc de secuencia nativa" o "Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes naturales de las mismas. Una Fc de secuencia nativa incluye los diferentes alotipos de Fc (véase, por ejemplo, Jefferis *et al.* (2009) mAbs 1: 1).

- El término "epítipo" o la expresión "determinante antigénico" se refieren a un lugar en un antígeno (por ejemplo, la TIM3) al que se une específicamente una inmunoglobulina o un anticuerpo, por ejemplo, como se define en el método específico utilizado para identificarlo. Los epítopos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos (normalmente un epítipo lineal) como de aminoácidos no contiguos juxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína (normalmente un epítipo conformacional). Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos generalmente, pero no siempre, se conservan después de la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden al tratarlos con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye normalmente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación

espacial única. Los métodos para determinar a qué epítomos se une un anticuerpo dado (es decir, cartografiado de epítomos) son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunotransferencia y de inmunoprecipitación, en donde se ensaya la reactividad de los péptidos que se solapan o son contiguos (por ejemplo, de la TIM3) con un anticuerpo dado (por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM3). Algunos métodos para determinar la conformación espacial de epítomos incluyen las técnicas de la técnica y las descritas en el presente documento, por ejemplo, radiocristalografía, análisis mutacional de antígenos, resonancia magnética nuclear bidimensional y HDX-EM (por las siglas del inglés *Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry*, espectrometría de masas con intercambio de hidrógeno/deuterio) (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

El término "cartografía de epítomos" se refiere al proceso de identificación de los determinantes moleculares para el reconocimiento antígeno-anticuerpo.

La expresión "se une al mismo epítomo" en referencia a dos o más anticuerpos significa que los anticuerpos se unen al mismo segmento de los restos de aminoácidos, como se determina mediante un método dado. Algunas técnicas para determinar si los anticuerpos se unen al "mismo epítomo de la TIM3" con los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, métodos de cartografiado de epítomos, tales como, tales como análisis mediante rayos X de cristales de complejos antígeno:anticuerpo que proporcionan una resolución atómica del epítomo, y espectrometría de masas con intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-EM). Otros métodos controlan la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno en las que la pérdida de unión debida a una modificación de un resto de aminoácido dentro de la secuencia del antígeno se considera a menudo una indicación de un componente de epítomo. Además, para el cartografiado de epítomos, también pueden utilizarse métodos combinatorios informáticos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos de bibliotecas combinatorias de péptidos de expresión en fagos. Es de esperar que los anticuerpos que tienen las mismas VH y VL o las mismas secuencias de CDR1, 2 y 3 se unan al mismo epítomo.

Anticuerpos que "compiten con otro anticuerpo por la unión a un objetivo" se refiere a anticuerpos que inhiben (parcial o completamente) la unión del otro anticuerpo al objetivo. Si dos anticuerpos compiten entre sí por la unión a un objetivo, es decir, si un anticuerpo inhibe la unión del otro anticuerpo a un objetivo y en qué medida, se puede determinar utilizando experimentos de competición conocidos, por ejemplo, análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) BIACORE®. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo compete con un objetivo e inhibe la unión de otro anticuerpo a un objetivo en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o del 100 %. El grado de inhibición o de competición puede ser diferente dependiendo de qué anticuerpo sea el "anticuerpo bloqueante" (es decir, el anticuerpo frío que se incubaba en primer lugar con el objetivo). Los ensayos de competición se pueden realizar como se describe, por ejemplo, en Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi: 10. 1 101/pdb.prot4277 o en el capítulo 11 de "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Dos anticuerpos "compiten de forma cruzada" si los anticuerpos se bloquean mutuamente al menos un 50 %, es decir, independientemente de si uno o el otro anticuerpo entra en contacto en primer lugar con el antígeno en el experimento de competición.

Los ensayos de unión competitiva para determinar si dos anticuerpos compiten o compiten de forma cruzada por la unión incluyen: competencia por unirse a los linfocitos T que expresan la TIM3, por ejemplo, mediante citometría de flujo, tal como se describe en los ejemplos. Otros métodos incluyen: SPR (por ejemplo, BIACORE®), radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competición en sándwich (véase Stahli *et al.*, Methods in Enzymology 9: 242 (1983)); EIA directo en fase sólida con biotina-avidina (véase, Kirkland *et al.*, J. Immunol. 137: 3614 (1986)); ensayo de marcaje directo en fase sólida, ensayo de marcaje directo en sándwich en fase sólida (véase Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcaje directo en fase sólida usando un marcador de I-125 (véase Morel *et al.*, Mol. Immunol. 25 (1): 7 (1988)); EIA directo en fase sólida con biotina-avidina (Cheung *et al.*, Virology 176: 546 (1990)); y RIA de marcaje directo. (Moldenhauer *et al.*, Scand. J. Immunol. 32: 77 (1990)).

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "unión específica", "unión selectiva", "se une selectivamente", y "se une específicamente", se refieren a la unión del anticuerpo a un epítomo en un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo (i) se une con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menor de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso inferior cuando se determina mediante, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) en un instrumento BIACORE® 2000 que usa el antígeno predeterminado, por ejemplo, la TIM3 humana recombinante, como analito, y el anticuerpo como ligando, o un análisis de Scatchard de unión del anticuerpo a células positivas para el antígeno, y (ii) se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad de unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Por consiguiente, un anticuerpo que "se une específicamente a la TIM3 humana" se refiere a un anticuerpo que se une a TIM3 humana soluble o unida a célula con una K_D de 10^{-7} M o menor, tal como aproximadamente menor de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso inferior. Un anticuerpo que "presenta reacción cruzada con la TIM3 de macaco cangrejero" se refiere a un anticuerpo que se une a la TIM3 de macaco cangrejero con una K_D de 10^{-7} M o menor, tal como aproximadamente menor de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso inferior. En ciertos aspectos de la descripción, dichos anticuerpos que no presentan reacción cruzada con la TIM3 de una especie

no humana presentan una unión esencialmente indetectable contra estas proteínas en ensayos de unión convencionales.

El término " k_{asoc} " o " k_a ", como se utiliza en el presente documento, pretende hacer referencia a la velocidad de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular, mientras que el término " k_{dis} " o " k_d ", como se utiliza en el presente documento, pretende hacer referencia a la velocidad de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. El término " K_D ", como se utiliza en el presente documento, pretende hacer referencia a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de la k_d con respecto a la k_a (es decir, k_d/k_a) y se expresa como una concentración molar (M). Utilizando métodos bien establecidos en la técnica pueden determinarse los valores de la K_D de los anticuerpos. Algunos métodos disponibles para determinar la K_D de un anticuerpo incluyen resonancia de plasmón superficial, un sistema biosensor como un sistema BIACORE® o citometría de flujo y análisis de Scatchard.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "alta afinidad" por un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M o menor o 10^{-10} M o menor para un antígeno objetivo. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la unión de alta afinidad para un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-10} M o menor o 10^{-8} M o menor.

El término " CE_{50} ", en el contexto de un ensayo *in vitro* o *in vivo* que utiliza un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se refiere a la concentración de un anticuerpo, o de una porción de unión al antígeno del mismo, que induce una respuesta que es el 50 % de la respuesta máxima, es decir, la mitad entre la respuesta máxima y el valor inicial.

El término "natural", como se utiliza en el presente documento, aplicado a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que el ser humano no ha modificado intencionadamente en el laboratorio, es natural.

Un "polipéptido" se refiere a una cadena que comprende al menos dos restos de aminoácido unidos consecutivamente, sin límite superior en la longitud de la cadena. Uno o más restos de aminoácido de la proteína pueden contener una modificación, tal como, pero sin limitación, glicosilación, fosforilación o formación de puentes de disulfuro. Una "proteína" puede comprender uno o más polipéptidos.

La expresión "molécula de ácido nucleico", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, y puede ser ADNc.

Las "sustituciones conservadoras de aminoácidos" se refieren a las sustituciones de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). En ciertos aspectos de la descripción, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-TIM3 se reemplaza preferentemente por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell *et al.*, Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* Protein Eng. 12 (10): 879-884 (1999); y Burks *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)).

Para los ácidos nucleicos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan, son idénticos, con las inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos, al menos de aproximadamente el 90 % al 95 %, o al menos de aproximadamente el 98 % al 99,5 % de los nucleótidos. Alternativamente, existe una homología sustancial cuando los segmentos hibriden en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la cadena.

Para los polipéptidos, la expresión "homología sustancial" indica que dos polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan, son idénticos, con las inserciones o deleciones de aminoácidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80 % de los aminoácidos, al menos de aproximadamente el 90 % al 95 %, o al menos de aproximadamente el 98 % al 99,5 % de los aminoácidos.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el porcentaje de homología = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones $\times 100$), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los siguientes ejemplos no

limitantes.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar con el programa GAP del paquete de programas informáticos GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. También se puede determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos con el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de ponderación de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse con el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP del paquete de programas informáticos GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas descritas en el presente documento se pueden utilizar además como una "secuencia problema" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 20) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Con el programa NBLAST, pueden realizarse búsquedas de nucleótidos por BLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento. Las búsquedas de proteínas por BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las de las moléculas proteicas descritas en el presente documento. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares o de otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, las otras partes del cromosoma) o proteínas, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeo con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Los ácidos nucleicos, por ejemplo, ADNc, pueden mutarse, de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para las secuencias codificantes, estas mutaciones, pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de V, D, J, constante y otras secuencias nativas de este tipo descritas en el presente documento (donde "derivada" indica que una secuencia es idéntica o está modificada a partir de otra secuencia).

El término "vector", como se utiliza en el presente documento, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN al genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de realizar una replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora después de su introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Por otra parte, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. En el presente documento, dichos vectores se denominan "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, también se incluyen otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se utiliza en el presente documento, pretende hacer referencia a una célula que comprende un ácido nucleico que no está presente de forma natural en la célula, y puede ser una célula dentro de la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichas expresiones pretenden referirse no solo a la célula en cuestión sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que en generaciones sucesivas pueden producirse ciertas modificaciones debido a mutaciones o a influencias ambientales, dicha progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula progenitora, pero aun así se incluye en el alcance de la expresión "célula hospedadora" como se utiliza en el presente documento.

Una "respuesta inmunitaria" es como se entiende en la técnica, y generalmente se refiere a una respuesta biológica dentro de un vertebrado contra agentes extraños o anormales, por ejemplo, células cancerosas, dicha respuesta protege al organismo frente a estos agentes y enfermedades causadas por los mismos. Una respuesta inmunitaria está mediada por la acción de una o más células del sistema inmunitario (por ejemplo, un linfocito T, un linfocito B, linfocito citolítico natural (NK), macrófago, eosinófilo, mastocito, célula dendrítica o neutrófilo) y de macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complemento) que da como resultado el direccionamiento selectivo, la unión a, el daño a, la destrucción de y/o eliminación del cuerpo del vertebrado de los patógenos invasores, las células o tejidos infectados por patógenos, las células cancerosas u otras anómalas, o, en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, las células o tejidos humanos normales.

Una reacción inmunitaria incluye, por ejemplo, la activación o la inhibición de un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T efector, un linfocito Th, un linfocito CD4+, un linfocito T CD8+ o un linfocito Treg, o la activación o la inhibición de cualquier otra célula del sistema inmunitario, por ejemplo, un linfocito NK.

Un "inmunomodulador" o "inmunorregulador" se refiere a un agente, por ejemplo, un agente dirigido a un componente de una vía de señalización que puede estar implicado en la modulación, regulación o modificación de una respuesta inmunitaria. "Modulación", "regulación", o "modificación" de una respuesta inmunitaria, se refiere a cualquier alteración de una célula del sistema inmunitario o de la actividad de dicha célula (por ejemplo, un linfocito T efector), tal como un linfocito Th1). Dicha modulación incluye una estimulación o supresión del sistema inmunitario que se puede manifestar por un aumento o una disminución en el número de diferentes tipos de células, un aumento o una disminución en la actividad de estas células o cualquier otro cambio que pueda producirse en el sistema inmunitario. Se han identificado inmunomoduladores tanto inhibidores como estimuladores, algunos de los cuales pueden mejorar su función en un microambiente tumoral. En algunos aspectos de la descripción, el inmunomodulador se dirige a una molécula de la superficie de un linfocito T. Un "objetivo inmunomodulador" u "objetivo inmunorregulador" es una molécula, por ejemplo, una molécula de la superficie celular, que es objeto de unión por parte de, y cuya actividad se ve alterada por la unión de, una sustancia, agente, resto, compuesto o molécula. Algunos objetivos inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, receptores de la superficie de una célula ("receptores inmunomoduladores") y ligandos de receptores ("ligandos inmunomoduladores").

"Inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto afectado por, o en riesgo de, contraer o padecer una recaída de, una enfermedad mediante un método que comprende inducir, mejorar, suprimir o modificar de otro modo el sistema inmunitario o una respuesta inmunitaria.

"Terapia inmunoestimulante" o "terapia inmunoestimuladora" se refiere a una terapia que da como resultado el aumento (inducción o mejora) de una respuesta inmunitaria en un sujeto para, por ejemplo, tratar un cáncer.

"Potenciar una respuesta inmunitaria endógena" quiere decir aumentar la eficacia o la potencia de una respuesta inmunitaria existente en un sujeto. Este aumento de eficacia y de potencia puede conseguirse, por ejemplo, superando los mecanismos que suprimen la respuesta inmunitaria endógena del hospedador o estimulando mecanismos que aumenten la respuesta inmunitaria endógena del hospedador.

Linfocitos "T efectores" ("T_{ef}") se refiere a linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+ y CD8+) con actividades citolíticas, así como a linfocitos T auxiliares (Th, *helper*), por ejemplo, linfocitos Th1, que secretan citocinas y activan y dirigen otras células inmunitarias, pero no incluyen los linfocitos T reguladores (linfocitos Treg). Ciertos anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento activan los linfocitos T_{ef}, por ejemplo, los linfocitos T_{ef} CD4+ y CD8+ y los linfocitos Th1.

Un aumento de la capacidad para estimular una respuesta inmunitaria, o del sistema inmunitario, puede dar como resultado una actividad agonista mejorada de los receptores coestimuladores y/o una actividad antagonista mejorada de los receptores inhibidores de los linfocitos T. Un aumento de la capacidad para estimular una respuesta inmunitaria, o del sistema inmunitario, puede estar reflejado por un aumento múltiple de la CE₅₀ o del nivel máximo de actividad en un ensayo que mida una respuesta inmunitaria, por ejemplo, un ensayo que mida los cambios en la liberación de citocinas o de quimiocinas, la actividad citolítica (determinada directamente en las células objetivo o indirectamente, detectando CD107a o granzimas) y la proliferación. La capacidad para estimular una respuesta inmunitaria o la actividad del sistema inmunitario se puede aumentar en al menos un 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces o más.

Como se utiliza en el presente documento, el término "unido" se refiere a la asociación de dos o más moléculas. El enlace puede ser covalente o no covalente. El enlace también puede ser genético (es decir, fusionado de manera recombinante). Dichos enlaces se pueden conseguir utilizando una amplia diversidad de técnicas reconocidas en este campo, tales como la conjugación química y la producción de proteínas recombinantes.

Como se utiliza en el presente documento, "administrar" se refiere a la introducción física en un sujeto de una composición que comprende un agente terapéutico, utilizando cualquiera de los diferentes métodos y sistemas de administración conocidos por los expertos en la materia. Algunas de las diferentes vías de administración de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento incluyen intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La

expresión "administración parenteral", como se utiliza en el presente documento, significa modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, así como electroporación *in vivo*. Alternativamente, un anticuerpo descrito en el presente documento puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, por vía vaginal, por vía rectal, por vía sublingual o por vía tópica. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "respuesta mediada por linfocitos T" se refiere a una respuesta mediada por linfocitos T, incluyendo linfocitos T efectores (por ejemplo, linfocitos CD8⁺) y linfocitos T auxiliares (por ejemplo, linfocitos CD4⁺). Algunas respuestas mediadas por linfocitos T incluyen, por ejemplo, citotoxicidad y proliferación de linfocitos T.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "respuesta de linfocito T citotóxico (CTL)" se refiere a una respuesta inmunitaria inducida por linfocitos T citotóxicos. Las respuestas de los CTL están mediadas principalmente por linfocitos T CD8⁺.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "inhibe" o "bloquea" (por ejemplo, en referencia a la inhibición/bloqueo de la unión del TIM3-L a la TIM3 de las células) se usan indistintamente y engloban tanto inhibición/bloqueo parcial como completo. En algunos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 inhibe la unión del TIM3-L a la TIM3 en al menos aproximadamente un 50 %, por ejemplo, aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 %, determinada, por ejemplo, como se describe adicionalmente en el presente documento. En algunos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 inhibe la unión del TIM3-L a la TIM3 como máximo un 50 %, por ejemplo, en aproximadamente un 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 %, determinada, por ejemplo, como se describe adicionalmente en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "inhibe el crecimiento de un tumor" incluye cualquier disminución medible en el crecimiento de un tumor, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de un tumor en al menos aproximadamente un 10 %, por ejemplo, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 99 % o un 100 %.

Como se utiliza en el presente documento, "cáncer" se refiere a un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anómalas en el cuerpo. La división celular no regulada puede dar como resultado la formación de tumores o células malignas que invaden los tejidos contiguos y también pueden metastatizar a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo.

Las expresiones "tratar", "tratando", y "tratamiento", como se utilizan en el presente documento, se refieren a cualquier tipo de intervención o proceso realizado en, o administración de un agente activo a, el sujeto con el objetivo de revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o impedir el avance, el desarrollo, la gravedad o la reparación de un síntoma, una complicación, una afección o indicio bioquímico asociado a una enfermedad o a la mejora de la supervivencia global. El tratamiento puede ser de un sujeto que tiene una enfermedad o de un sujeto que no tiene una enfermedad (por ejemplo, como profilaxis).

Una "neoplasia hemática" incluye un linfoma, leucemia, mieloma o una neoplasia linfoide, así como un cáncer de bazo y de ganglios linfáticos. Algunos ejemplos de linfomas incluyen tanto linfomas de linfocitos B (un cáncer hemático de linfocitos B) como linfomas de linfocitos T. Los linfomas de linfocitos B incluyen tanto linfomas de Hodgkin como la mayoría de los linfomas no hodgkinianos. Algunos ejemplos no limitativos de linfomas de linfocitos B incluyen linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, linfoma de tejido linfático asociado a mucosa, linfoma linfocítico microcítico (se solapa con la leucemia linfocítica crónica), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de Burkitt, linfoma mediastínico de linfocitos B grandes, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de linfocitos B de la zona marginal nodular, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma exudativo primario, granulomatosis linfomatoide. Algunos ejemplos no limitativos de linfomas de linfocitos T incluyen linfoma extranodular de linfocitos T, linfomas cutáneos de linfocitos T, linfoma anaplásico de células grandes y linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T. Algunas neoplasias hemáticas también incluyen leucemia, tales como, pero sin limitación, leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica y leucemia linfoblástica aguda. Algunas neoplasias hemáticas incluyen además mielomas, tales como, pero sin limitación, mieloma múltiple y mieloma múltiple latente. Otros cánceres hemáticos asociados a linfocitos B y/o a linfocitos T están englobados por la expresión neoplasia hemática.

La expresión "dosis eficaz" o "posología eficaz" se define como una cantidad suficiente para conseguir, o conseguir al menos parcialmente, un efecto deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "posología terapéuticamente eficaz" de un fármaco o un agente terapéutico es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se utiliza sola o junto

con otro agente terapéutico, promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por un descenso en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y la duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o la discapacidad debidos al padecimiento de la enfermedad. Una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un fármaco incluye una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "dosis profilácticamente eficaz", que es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se administra sola o junto con otro agente terapéutico a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad o de padecer una recaída de la enfermedad, inhibe el desarrollo o la recaída de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad o inhibir el desarrollo o la recaída de la enfermedad puede evaluarse mediante diversos métodos conocidos para el experto en la materia, tal como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales que predicen la eficacia en seres humanos o ensayando la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

A modo de ejemplo, un agente antineoplásico es un fármaco que promueve la regresión del cáncer en un sujeto. En algunos aspectos de la descripción, una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco promueve la regresión del cáncer hasta el punto de eliminar el cáncer. "Promover la regresión de un cáncer" significa que la administración de una cantidad eficaz del fármaco, sola o junto con un agente antineoplásico, da como resultado una reducción en el crecimiento o el tamaño del tumor, la necrosis del tumor, una reducción en la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y la duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, una prevención del deterioro o la discapacidad debidos al sufrimiento por la enfermedad, o de otro modo, la mejoría de los síntomas de la enfermedad en el paciente. Además, los términos "eficaz" y "eficacia", con respecto a un tratamiento, incluyen tanto la eficacia farmacológica como la seguridad fisiológica. La eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del fármaco para promover la regresión del cáncer en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al grado de toxicidad o de otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órgano y/o de organismo (efectos adversos) resultantes de la administración del fármaco.

A modo de ejemplo para el tratamiento de tumores, una cantidad o posología terapéuticamente eficaz del fármaco inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente un 20 %, en al menos aproximadamente un 40 %, en al menos aproximadamente un 60 % o en al menos aproximadamente un 80 % con respecto a los sujetos no tratados. En algunos aspectos de la descripción, una cantidad o posología terapéuticamente eficaz del fármaco inhibe completamente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral, es decir, inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en un 100 %. Utilizando los ensayos descritos más adelante puede evaluarse la capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral. Alternativamente, puede evaluarse esta propiedad de una composición analizando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, dicha inhibición puede medirse *in vitro* mediante ensayos conocidos por el profesional cualificado. En otros aspectos descritos en el presente documento, se puede observar regresión tumoral y continúa durante un período de al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 40 días o al menos aproximadamente 60 días.

El término "paciente" incluye seres humanos y otros sujetos mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden utilizar para tratar a un sujeto que tiene cáncer. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, oveja, perro, vaca, pollos, anfibios, reptiles, etc.

La expresión dosis o posología "basada en el peso", como se menciona en el presente documento, significa que una dosis que se administra a un paciente se calcula en función del peso del paciente. Por ejemplo, cuando un paciente con 60 kg de peso corporal requiere 3 mg/kg de un anticuerpo anti-TIM3, se puede calcular y utilizar la cantidad adecuada del anticuerpo anti-TIM3 (es decir, 180 mg) para la administración.

El uso del término "dosis fija" con respecto a un método de la divulgación significa que dos o más anticuerpos diferentes en una única composición (por ejemplo, anticuerpo anti-TIM3 y un segundo anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo PD-1 o PD-L1) están presentes en la composición en unas proporciones particulares (fijas) entre sí. En algunos aspectos de la descripción, la dosis fija se basa en el peso (por ejemplo, mg) de los anticuerpos. En ciertos aspectos de la descripción, la dosis fija se basa en la concentración (por ejemplo, mg/ml) de los anticuerpos. En algunos aspectos de la descripción, la relación de los dos anticuerpos (por ejemplo, anti-TIM3 y anti-PD1 o anti-PD-L1) es al menos de aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:15, aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:30, aproximadamente 1:40, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:60, aproximadamente 1:70, aproximadamente 1:80, aproximadamente 1:90, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:120, aproximadamente 1:140, aproximadamente 1:160, aproximadamente 1:180, aproximadamente 1:200, aproximadamente 200:1, aproximadamente 180:1, aproximadamente 160:1, aproximadamente 140:1, aproximadamente 120:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 90:1, aproximadamente 80:1, aproximadamente 70:1, aproximadamente 60:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 40:1, aproximadamente 30:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 15:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1 o aproximadamente

2:1 mg del primer anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-TIM3) y mg del segundo anticuerpo. Por ejemplo, una relación 2:1 de un anticuerpo anti-TIM3 y un anticuerpo PD-1, tal como nivolumab, puede significar que un vial o una inyección puede contener aproximadamente 480 mg del anticuerpo anti-TIM3 y 240 mg del anticuerpo anti-PD-1, o aproximadamente 2 mg/ml del anticuerpo anti-TIM3 y 1 mg/ml del anticuerpo anti-PD-1.

El uso de la expresión "dosis constante" con respecto a los métodos y posologías descritos en el presente documento significa una dosis que se administra a un paciente sin tener en cuenta el peso o el área de superficie corporal (BSA, del inglés "body surface area") del paciente. Por lo tanto, la dosis constante no se proporciona como una dosis en mg/kg, sino más bien como una cantidad absoluta del agente (por ejemplo, el anticuerpo anti-TIM3). Por ejemplo, una persona de 60 kg y una persona de 100 kg recibirían la misma dosis de un anticuerpo (por ejemplo, 480 mg de un anticuerpo anti-TIM3).

Como se utiliza en el presente documento, los términos "ug" y "uM" se usan indistintamente con "µg" y "µM", respectivamente.

En la siguientes subsecciones se describen con más detalle diferentes aspectos descritos en el presente documento.

I. Anticuerpos anti-TIM3 humana

En el presente documento se describen anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, que se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a la TIM3 humana, y más específicamente, a un dominio en particular (por ejemplo, un dominio funcional) dentro del dominio extracelular de la TIM3 humana. En un aspecto particular de la descripción, los anticuerpos se unen específicamente al sitio de la TIM3 al que se une el TIM3-L. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos son anticuerpos antagonistas, es decir, inhiben o suprimen la actividad inhibidora de la TIM3 sobre los linfocitos T en las células, por ejemplo, linfocitos T. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 presentan reacción cruzada con la TIM3 de uno o más primates no humanos, tal como la TIM3 de macaco cangrejero. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos se unen específicamente a la región extracelular de la TIM3 humana y a la región extracelular de la TIM3 de macaco cangrejero. En un aspecto de la descripción, los anticuerpos se unen a la TIM3 humana con alta afinidad.

Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento presentan una o más de las siguientes propiedades funcionales:

- (a) unión a la TIM3 humana soluble y/o unida a membrana;
- (b) unión a la TIM3 soluble de macaco y/o unida a la membrana;
- (c) inducir o estimular una respuesta inmunitaria;
- (d) inducir o estimular la activación de los linfocitos T, por ejemplo, activación de los linfocitos Th1 (como se evidencia, por ejemplo, por un aumento de la secreción y/o proliferación de citocinas);
- (e) inducción o estimulación de la proliferación de los linfocitos T (por ejemplo, CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos Th1 o TIL), por ejemplo, en un ensayo de cocultivo, tal como se describe en los Ejemplos;
- (f) inducir o estimular la producción de IFN-γ por parte de los linfocitos T, por ejemplo, linfocitos Th1 o linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), tales como los TIL de tumores humanos renales, de pulmón, de páncreas o de mama, como se determina, por ejemplo, en el ensayo descrito en los Ejemplos;
- (g) bloquear o inhibir la unión de la TIM3 humana a PtdSer, como se determina, por ejemplo, en el ensayo descrito en los Ejemplos;
- (h) no internalizar ni regular por disminución la TIM3 de la superficie celular cuando se une a la TIM3 de las células;
- (i) unión al dominio extracelular de la TIM3 humana (a) CPVFECG (SEQ ID NO: 296); (ii) RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298); (iii) CPVFECG y RIQIPGIMND (SEQ ID NOs: 296 y 298, respectivamente); o (iv) WTSRYWLNGDFR (SEQ ID NO: 297);
- (j) competir o presentar un bloqueo cruzado con, la unión a la TIM3 humana de un anticuerpo de unión a la TIM3 descrito en el presente documento (por ejemplo, 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6 o cualquiera de los TIM3.2 a la TIM3.18), según se determine, por ejemplo, en el ensayo descrito en los Ejemplos;
- (k) unión a la TIM3 humana, pero no a la TIM3 humana que tiene una sustitución aminoacídica de uno o más de los siguientes restos aminoacídicos: L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120, según la numeración de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20); y
- (l) unión a regiones de la TIM3 humana ⁴⁹VPVCWVGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) como se determina mediante HDX-EM;
- (m) tener las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5, 10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía; y/o
- (n) competir o bloquear de forma cruzada la unión a la TIM3 humana de 13A3 o TIM3.18.IgG1.3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

En algunos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se unen a la

TIM3 humana con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M o menor, 10^{-10} M o menor, 10^{-11} M o menor, 10^{-12} M o menor, de 10^{-12} M a 10^{-7} M, de 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M o de 10^{-9} M a 10^{-7} M. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, como se determina mediante BIACORE™ (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos), con una K_D de 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M (1 nM) o menor, 10^{-10} M o menor, de 10^{-12} M a 10^{-7} M, de 10^{-11} M a 10^{-7} M, de 10^{-10} M a 10^{-7} M, 10^{-9} M a 10^{-7} M o de 10^{-8} M a 10^{-7} M. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3, se une a la TIM3 humana unida (por ejemplo, unida a la membrana celular), tal como en linfocitos T humanos activados, por ejemplo, como se determina mediante citometría de flujo y gráfico de Scatchard, con una K_D de 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M (1 nM) o menor, 5×10^{-10} M o menor, 10^{-10} M o menor, de 10^{-12} M a 10^{-7} M, de 10^{-11} M a 10^{-8} M, de 10^{-10} M a 10^{-8} M, de 10^{-9} M a 10^{-8} M, 10^{-11} M a 10^{-9} M o de 10^{-10} M a 10^{-9} M. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3, se une a la TIM3 humana unida (por ejemplo, unida a la membrana celular), tal como en linfocitos T humanos activados, por ejemplo, como se determina mediante citometría de flujo, con una CE_{50} de 10 μ g/ml o menor, 5 μ g/ml o menor, 1 μ g/ml o menor, 0,9 μ g/ml o menor, 0,8 μ g/ml o menor, 0,7 μ g/ml o menor, 0,6 μ g/ml o menor, 0,5 μ g/ml o menor, 0,4 μ g/ml o menor, 0,3 μ g/ml o menor, 0,2 μ g/ml o menor, 0,1 μ g/ml o menor, 0,05 μ g/ml o menor o 0,01 μ g/ml o menor. En algunos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se unen a la TIM3 de macaco cangrejero, por ejemplo, con una K_D de 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M o menor, 10^{-10} M o menor, 10^{-11} M o menor, 10^{-12} M o menor, de 10^{-12} M a 10^{-7} M, de 10^{-11} M a 10^{-7} M, 10^{-10} M a 10^{-7} M o de 10^{-9} M a 10^{-7} M. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a la TIM3 de macaco cangrejero soluble, por ejemplo, como se determina mediante BIACORE™ (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos), con una K_D de 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M (1 nM) o menor, 10^{-10} M o menor, de 10^{-12} M a 10^{-7} M, de 10^{-11} M a 10^{-7} M, de 10^{-10} M a 10^{-7} M, de 10^{-9} M a 10^{-7} M o de 10^{-8} M a 10^{-7} M. Los anticuerpos anti-TIM3 pueden unirse a la TIM3 unida a la membrana de macaco cangrejero, por ejemplo, con una CE_{50} de 100 nM o menor, 10 nM o menor, de 100 nM a 0,01 nM, de 100 nM a 0,1 nM, de 100 nM a 1 nM o de 10 nM a 1 nM, por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3, se une a la TIM3 de macaco cangrejero unida (por ejemplo, unida a la membrana celular), tal como en linfocitos T humanos activados, por ejemplo, como se determina mediante citometría de flujo y gráfico de Scatchard, con una K_D de 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M (1 nM) o menor, 5×10^{-10} M o menor, 10^{-10} M o menor, de 10^{-12} M a 10^{-7} M, de 10^{-11} M a 10^{-8} M, de 10^{-10} M a 10^{-8} M, de 10^{-9} M a 10^{-8} M, de 10^{-11} M a 10^{-9} M o de 10^{-10} M a 10^{-9} M.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento estimulan o mejoran una respuesta inmunitaria, por ejemplo, activando los linfocitos T, por ejemplo, en el tumor. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TIM3 pueden activar o coestimular las células, como se demuestra, por ejemplo, por la mejora en la secreción y/o la proliferación de citocinas (por ejemplo, IFN- γ), que puede dar como resultado la inhibición de la actividad inhibidora de los linfocitos T mediada por la TIM3. En ciertos aspectos de la descripción, la activación o la coestimulación de los linfocitos T por parte de un anticuerpo TIM3 se produce en presencia de estimulación CD3. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 aumenta la secreción del IFN- γ en un factor del 50 %, 100 % (es decir, 2 veces), 3 veces, 4 veces, 5 veces o más, opcionalmente con un máximo de hasta 10 veces, 30 veces, 100 veces, como se mide, por ejemplo, en linfocitos T humanos primarios y/o en linfocitos T que expresan la TIM3 humana, tales como los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL).

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 inhiben la unión de la fosfatidilserina a la TIM3 humana en las células, por ejemplo, células CHO o linfocitos T activados que expresan la TIM3 humana, por ejemplo, con una CE_{50} de 10 μ g/ml o menor, 1 μ g/ml o menor, de 0,01 μ g/ml a 10 μ g/ml, de 0,1 μ g/ml a 10 μ g/ml o de 0,1 μ g/ml a 1 μ g/ml.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se unen a un epítipo, por ejemplo, un epítipo conformacional, en la porción extracelular de la TIM3 humana, por ejemplo, en el dominio de tipo Ig de la región extracelular, es decir, los aminoácidos 22 a 202 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo situado dentro de los aminoácidos 22 a 120 del dominio extracelular de la TIM3 humana (SEQ ID NO: 286) o 1-99 de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290) (véanse los Ejemplos). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a, o a un epítipo dentro de, una región que consiste en los aminoácidos 58-64 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286, que corresponde a los restos de aminoácido 37-43 de la TIM3 humana madura (CPVFECG, SEQ ID NO: 296; véase la FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a, o a un epítipo dentro de, una región que consiste en los aminoácidos 111-120 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286, que corresponde a los restos de aminoácido 90-99 de la TIM3 humana madura (RIQIPGIMND, SEQ ID NO: 298; véase la FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a, o a un epítipo dentro de, una región que consiste en los aminoácidos 58-64 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286 (CPVFECG, SEQ ID NO: 296) y a, o a un epítipo dentro de, una región que consiste en los aminoácidos 111-120 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286 (RIQIPGIMND, SEQ ID NO: 298; véase la FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a, o a un epítipo dentro de, una región que consiste en los aminoácidos 78-89 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286, que corresponde a los restos de aminoácido 57-83 de la TIM3 humana madura (WTSRYWLNNGDFR, SEQ ID NO: 297; véase la FIG. 20).

En un aspecto de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 13A3,

es decir, un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, F61, E62, C63, R111 y D120 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, D104, R111, Q113 y D120 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, F61, E62, C63, R111 y D120 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora.

En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 3G4, es decir, un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, V60, F61, E62, C63, G116 y M118 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, V60, F61, E62, C63, D104, G116 y M118 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, V60, F61, E62, C63, G116 y M118 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora.

En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 17C3, es decir, un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64 y G116 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, D104 y G116 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64 y G116 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, D104 y G116 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora.

En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 8B9, es decir, un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos L48, W78, S80, R81, W83, G86, D87 y R89 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos L48, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87 y R89 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 8B9, es decir, un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos L48, W78, S80, R81, W83, G86, D87, R89 y D104 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido L48, W78, S80, R81, W83, G86, D87 y R89 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20) se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido L48, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87 y R89 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20) se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora. En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido L48, W78, S80, R81, W83, G86, D87, R89 y D104 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20) se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 compiten por la unión a la TIM3 humana con (o inhiben la unión de) anticuerpos anti-TIM3 que comprenden las CDR o las regiones variables descritas en el presente documento, por ejemplo, las de los anticuerpos 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 y cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 inhiben la unión de los anticuerpos 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 a la TIM3 humana en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o en un 100 %. En ciertos aspectos de la descripción, 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 inhiben la unión de los anticuerpos anti-TIM3 a la TIM3 humana en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o en un 100 %. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 inhiben la

unión de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 a la TIM3 humana en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o en un 100 %, y 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 inhiben la unión de los anticuerpos anti-TIM3 a la TIM3 humana en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % (por ejemplo, compiten en ambas direcciones).

5 En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o todas las características siguientes:

- 10 (1) se unen a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (2) se unen a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 100 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 100 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- 15 (3) se unen a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 1 μ g/ml o menor (por ejemplo, de 0,01 μ g/ml a 1 μ g/ml), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);
- (4) se unen a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- 20 (5) se unen a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 20 μ g/ml o menor (por ejemplo, de 0,01 μ g/ml a 20 μ g/ml), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);
- (6) se unen a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- 25 (7) inducen o mejoran la activación de los linfocitos T (por ejemplo, bloqueando o reduciendo los efectos inhibidores de la TIM3), como lo demuestra (i) el aumento de la producción de IFN- γ en linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL) y/o (ii) el aumento de la proliferación de linfocitos T que expresan la TIM-3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (8) estimular la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- 30 (9) inhibir la unión de la fosfatidilserina a la TIM3, por ejemplo, como se mide mediante el ensayo de bloqueo "en tándem" de PS-hTIM3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (10) no internalizar ni regular por disminución la TIM3 de la superficie celular cuando se unen a la TIM3 de las células;
- 35 (11) se unen a una de las siguientes regiones del dominio extracelular de la TIM3 humana (SEQ ID NO: 290): (a) CPVFECG (SEQ ID NO: 296); (b) RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298); (c) CPVFECG y RIQIPGIMND (SEQ ID NOs: 296 y 298, respectivamente); y (d) WTSRYWLNGDFR (SEQ ID NO: 297), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (12) tienen una unión reducida a la TIM3 humana en la que uno o más de los aminoácidos L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120 (según la numeración de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) se sustituyen por otro aminoácido relativo a la unión a la TIM3 humana natural, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- 40 (13) competir en cualquier dirección o en ambas direcciones por la unión a la TIM3 humana con un anticuerpo que comprende los dominios VH y VL de una cualquiera de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o TIM3.7, TIM3.8, TIM3.10, TIM3.11, TIM3.12, TIM3.13, TIM3.14, TIM3.15, TIM3.16, TIM3.18, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- 45 (14) se unen a las regiones de la TIM3 humana ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) como se determina mediante HDX-EM, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- 50 (15) tener las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5, 10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos; numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)); y/o
- 55 (16) (a) tener una unión reducida a la TIM3 humana en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, R111, D120, y opcionalmente D104 y Q113 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) están sustituidos por otro aminoácido relativo a la unión con TIM3 humana natural; (b) se unen a ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), como se determina mediante HDX-EM, como se describe en los Ejemplos; y/o (c) competir o bloquear de forma cruzada la unión a la TIM3 humana de 13A3 o TIM3.18.IgG1.3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.
- 60

65 Por consiguiente, un anticuerpo que presenta una o más de estas propiedades funcionales (por ejemplo, bioquímicas, inmunoquímicas, celulares, fisiológicas u otras actividades biológicas, o similares) determinadas según las metodologías conocidas en la técnica y descritas en el presente documento, se entenderá que presenta una diferencia estadísticamente significativa en la actividad particular en relación a la observada en ausencia del anticuerpo (por

ejemplo, o cuando hay presente un anticuerpo de control de especificidad irrelevante). En algunos aspectos de la descripción, los aumentos inducidos por el anticuerpo anti-TIM3 en un parámetro medido (por ejemplo, proliferación de linfocitos T, producción de citocinas) en un ensayo dado producen un aumento estadísticamente significativo en al menos el 10 % del parámetro medido, por ejemplo, en al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % (es decir, 2 veces), 3 veces, 5 veces o 10 veces, y en ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo descrito en el presente documento puede aumentar el parámetro medido, por ejemplo, en más del 92 %, 94 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % (es decir, 2 veces), 3 veces, 5 veces o 10 veces, en relación con el mismo ensayo realizado en ausencia del anticuerpo. Por el contrario, las disminuciones inducidas por anticuerpos anti-TIM3 en un parámetro medido (por ejemplo, volumen tumoral, unión del TIM3-L a la TIM3 humana) en un ensayo dado producen una disminución estadísticamente significativa en al menos el 10 % del parámetro medido, por ejemplo, en al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, y en ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo descrito en el presente documento puede disminuir el parámetro medido, por ejemplo, en más del 92 %, 94 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 %, en relación con el mismo ensayo realizado en ausencia del anticuerpo.

En la técnica se conocen ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos contra la TIM3 de diferentes especies, que incluyen, por ejemplo, ensayos ELISA, inmunoelectrotransferencias y RIA. En los Ejemplos se describen con detalle ensayos adecuados. Las cinéticas de unión (por ejemplo, la afinidad de unión) de los anticuerpos también se pueden evaluar mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tal como mediante el análisis Biacore. Los ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos en las propiedades funcionales de la TIM3 (por ejemplo, unión del ligando, proliferación de linfocitos T, producción de citocinas) se describen con más detalle más abajo y en los Ejemplos.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 no son anticuerpos nativos o no son anticuerpos naturales. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TIM3 tienen modificaciones postraduccionales que son diferentes de las de los anticuerpos naturales, como por ejemplo, por tener más, menos o un tipo diferente de modificación postraduccional.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 no tienen actividad agonista, como se determina, por ejemplo, en la reticulación de anticuerpos anti-TIM3 en experimentos de cocultivo de células CHO-OKT3-CD32:T, en los que dichos anticuerpos no mejoran la actividad más allá de los anti-TIM3 solos. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 bloquean la interacción de la TIM3 con su ligando sin promover la actividad agonista.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 aumentan la producción de IL-12 por parte de monocitos o células dendríticas tratados con LPS.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 reactivan los linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumores que coexpresan PD-1 y TIM3 mediante un tratamiento combinado, evitando así el agotamiento de los linfocitos T CD8⁺.

II. Anticuerpos anti-TIM3 ilustrativos

Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en particular en el presente documento son anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, recombinantes y/o humanos, que tienen las secuencias de la CDR y/o de la región variable de los anticuerpos 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o uno cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18, aislados y caracterizados estructuralmente como se describe en el presente documento, así como anticuerpos que tienen una identidad de al menos un 80 % (por ejemplo, de al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad) con las secuencias de su región variable o CDR. Las secuencias de aminoácidos de la VH de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8 se exponen en las SEQ ID NOs: 34-40, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la VH de las versiones mutadas de 13A3, 8B9 y 9F6 se exponen en las SEQ ID NOs: 112-121 y 364. Las secuencias de aminoácidos de la VL de 13A3, 17C3 y 3G4 se exponen en la SEQ ID NO: 60. Las secuencias de aminoácidos de la VL de 8B9, 8C4 y 17C8 se exponen en la SEQ ID NO: 61. La secuencia de aminoácidos de la VL de 9F6 se expone en las SEQ ID NOs: 61, 62 y 63. Las secuencias de aminoácidos de la VL de las versiones mutadas de 13A3, 8B9 y 9F6 son las de los correspondientes anticuerpos no mutados. En la FIG. 13 se ofrece un sumario de la identidad de las SEQ ID NOs.

Por consiguiente, en el presente documento se describen anticuerpos aislados, o una porción de unión al antígeno de los mismos, que comprenden regiones variables de cadena pesada y ligera, en donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 34-40, 112-121 y 364.

También se describen anticuerpos aislados, o porciones de unión al antígeno de los mismos, que comprenden regiones variables de cadena pesada y ligera, en donde la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 60-63.

En el presente documento se describen anticuerpos anti-TIM3 humana aislados, o la porción de unión al antígeno de

los mismos, que comprenden:

- (a) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 34 y 60, respectivamente;
- 5 (b) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 35 y 61, respectivamente;
- (c) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 36 y 61, respectivamente;
- 10 (d) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 37 y 60, respectivamente;
- (e) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 38 y 61, respectivamente;
- (f) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 38 y 62, respectivamente;
- 15 (g) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 38 y 63, respectivamente;
- (h) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 39 y 60, respectivamente;
- 20 (i) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 40 y 61, respectivamente;
- (j) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 121 y 63, respectivamente;
- (k) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 120 y 61, respectivamente;
- 25 (l) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 112 y 60, respectivamente;
- (m) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 113 y 60, respectivamente;
- (n) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 114 y 60, respectivamente;
- 30 (o) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 115 y 60, respectivamente;
- (p) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 116 y 60, respectivamente;
- 35 (q) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 117 y 60, respectivamente;
- (r) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 118 y 60, respectivamente;
- (s) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 119 y 60, respectivamente; o
- 40 (t) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 364 y 60, respectivamente.

Los anticuerpos anti-TIM3 pueden comprender las CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesada y ligera de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8 o uno cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de la VH de 13A3, 8B9, 8C4 y 17C3 se exponen en las SEQ ID NOs: 41-44, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de la VH de 9F6, 3G4 y 17C8 se exponen en la SEQ ID NO 45. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de los anticuerpos 13A3 mutados (es decir, TIM3.10-45
TIM3.18) es la misma que la del anticuerpo 13A3 no mutado, es decir, la SEQ ID NO: 41. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH del anticuerpo 8B9 mutado (es decir, TIM3.8) es la misma que la del anticuerpo 8B9 no mutado, es decir, la SEQ ID NO: 42. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH del anticuerpo 9F6 mutado (es decir, TIM3.7) es la misma que la del anticuerpo 9F6 no mutado, es decir, la SEQ ID NO: 45. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de la VH de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8 se exponen en las SEQ ID NOs: 46-52, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las CDR2 de la VH de los anticuerpos 13A3 mutados TIM3.10, 55
TIM3.17 y TIM3.18 se expone en la SEQ ID NO: 122. La secuencia de aminoácidos de las CDR2 de la VH de los anticuerpos 13A3 mutados TIM3.11 y TIM3.12 se expone en las SEQ ID NOs: 123 y 124, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de los anticuerpos 13A3 mutados TIM3.13 y TIM3.16 es la del anticuerpo 13A3 no mutado, es decir, la SEQ ID NO: 46. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH del anticuerpo 8B9 mutado (es decir, TIM3.8) se expone en la SEQ ID NO: 125. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH del anticuerpo 9F6 mutado (es decir, TIM3.7) es la misma que la del anticuerpo 9F6 no mutado, es decir, la 60
SEQ ID NO: 45. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de la VH de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8 se exponen en las SEQ ID NOs: 53-59, respectivamente.

La secuencia de aminoácidos de las CDR3 de la VH de los anticuerpos 13A3 mutados (es decir, de TIM3.10 a TIM3.12) es la del anticuerpo 13A3 no mutado, es decir, la SEQ ID NO: 53. La secuencia de aminoácidos de las CDR3 de la VH de los anticuerpos 13A3 mutados TIM3.13 y TIM3.18 se expone en la SEQ ID NO: 126. La secuencia de 65

aminoácidos de las CDR3 de la VH de los anticuerpos 13A3 mutados TIM3.15 y TIM3.17 se expone en la SEQ ID NO: 128. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de la VH de los anticuerpos 13A3 mutados TIM3.14 y TIM3.16 se exponen en las SEQ ID NOs: 127 y 129, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH del anticuerpo 8B9 mutado (es decir, TIM3.8) es la del anticuerpo 8B9 no mutado, es decir, la SEQ ID NO: 54. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH del anticuerpo 9F6 mutado (es decir, TIM3.7) es la misma que la del anticuerpo 9F6 no mutado, es decir, la SEQ ID NO: 57. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de la VH de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8 se exponen en las SEQ ID NOs: 53-59, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de la VL de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 3G4 y 17C8 se exponen en la SEQ ID NO: 64. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de la VL de 9F6 se exponen en las SEQ ID NOs: 64 y 65. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de la VL de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 3G4 y 17C8 se exponen en la SEQ ID NO: 66. Las secuencias de aminoácidos de la CDR2 de la VL de 9F6 se exponen en las SEQ ID NOs: 66 y 67. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de la VL de 13A3, 17C3 y 3G4 se exponen en la SEQ ID NO: 68. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de la VL de 8B9, 8C4 y 17C8 se exponen en la SEQ ID NO: 69. Las secuencias de aminoácidos de la CDR3 de la VL de 9F6 se exponen en las SEQ ID NOs: 69, 70 y 71. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de la VL de los anticuerpos mutados 13A3, 8B9 y 9F6 son las de los correspondientes anticuerpos no mutados. En la FIG. 13 se proporciona una lista de las SEQ ID NOs de las CDR de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento.

Las regiones CDR se definen utilizando el sistema de Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH n.º 91-3242). El sistema de Kabat es el sistema de numeración más común para un esquema denominado índice UE o sistema de numeración UE, que se basa en la numeración secuencial de la primera IgG1 humana secuenciada (the EU antibody; Edelman *et al.* 1969). Tomando como base el esquema de numeración de Kabat divulgado en el presente documento, la numeración de los anticuerpos puede convertirse a otros sistemas conocidos en la técnica, por ejemplo, el esquema de numeración Chotia, IMGT, Martin (Chothia mejorado) o AHO.

Dado que cada uno de estos anticuerpos se une a la TIM3 humana y que la especificidad de unión al antígeno la proporcionan principalmente las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de la VH y de las CDR1, 2 y 3 de la VL, por ejemplo, las de la FIG. 13, se pueden "mezclar y emparejar" (es decir, se pueden mezclar y emparejar CDR de diferentes anticuerpos, aunque cada anticuerpo debe contener las CDR1, 2 y 3 de la VH y las CDR1, 2 y 3 de la VL) para crear otras moléculas de unión al anti-TIM3 descritas en el presente documento. La unión a la TIM3 de dichos anticuerpos "mezclados y emparejados" puede analizarse utilizando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, ensayos ELISA). En algunos aspectos de la descripción, cuando las secuencias de las CDR de la VH se mezclan y emparejan, la secuencia de las CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de la VH particular se reemplaza por una o más secuencias de CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias de las CDR de la VL se mezclan y emparejan, la secuencia de las CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de la VL particular se reemplaza por una o más secuencias de CDR estructuralmente similares. Será inmediatamente evidente para el experto en la materia que pueden crearse nuevas secuencias de VH y VL sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de VH y/o VL por secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR divulgadas en el presente documento para los anticuerpos monoclonales 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4, 17C8 y uno cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18.

En el presente documento se describen anticuerpos anti TIM3 humana aislados, o una porción de unión al antígeno de los mismos, que comprenden:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 41-45;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 46-52 y 122-125;
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 53-59 y 126-129;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 64-65;
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 66-67; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 68-71;

en donde el anticuerpo se une específicamente a la TIM3 humana.

En un aspecto de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 humana comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera, en donde las CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones variables de la cadena pesada comprenden:

- (a) las SEQ ID NOs: 41, 46, 53;
- (b) las SEQ ID NOs: 42, 47, 54;
- (c) las SEQ ID NOs: 43, 48, 55;

- (d) las SEQ ID NOS: 44, 49, 56;
- (e) las SEQ ID NOS: 45, 50, 57;
- (f) las SEQ ID NOS: 45, 51, 58;
- (g) las SEQ ID NOS: 45, 52, 59;
- 5 (h) las SEQ ID NOS: 41, 122, 53;
- (i) las SEQ ID NOS: 41, 123, 53;
- (j) las SEQ ID NOS: 41, 124, 53;
- (k) las SEQ ID NOS: 41, 46, 126;
- (l) las SEQ ID NOS: 41, 46, 127;
- 10 (m) las SEQ ID NOS: 41, 46, 128;
- (n) las SEQ ID NOS: 41, 46, 129;
- (o) las SEQ ID NOS: 41, 122, 128; o
- (p) las SEQ ID NOS: 41, 122, 126;

15 en donde el anticuerpo se une específicamente a la TIM3 humana.

En algunos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 humana comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera, en donde las CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones variables de la cadena ligera comprenden:

- 20 (a) las SEQ ID NOS: 64, 66, 68;
- (b) las SEQ ID NOS: 64, 66, 69;
- (c) las SEQ ID NOS: 65, 67, 70; o
- (d) las SEQ ID NOS: 64, 66, 71;

25 en donde el anticuerpo se une específicamente a la TIM3 humana.

En un aspecto particular de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera, en donde:

- 30 (a1) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 46, 53, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a2) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 122, 53, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID
- 35 NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a3) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 123, 53, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a4) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 124, 53, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID
- 40 NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a5) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 46, 126, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- 45 (a6) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 46, 127, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a7) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 46, 128, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ
- 50 ID NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a8) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 46, 129, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a9) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 122, 128, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ
- 55 ID NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- (a10) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 41, 122, 126, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOS: 64, 66, 68, respectivamente;
- 60 (b1) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 42, 47, 54, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOS: 64, 66, 69, respectivamente;
- (b2) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 42, 125, 54, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID
- 65 NOS: 64, 66, 69, respectivamente;
- (c) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOS: 43, 48, 55,

respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 69, respectivamente;

(d) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 44, 49, 56, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente;

(e) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 45, 50, 57, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 69, respectivamente;

(f) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 45, 50, 57, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 71, respectivamente;

(g1) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 45, 50, 57, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 65, 67, 70, respectivamente;

(g2) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 45, 50, 57, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 71, respectivamente;

(g3) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 45, 50, 57, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 69, respectivamente;

(h) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 45, 51, 58, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 68, respectivamente; o

(i) las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NOs: 45, 52, 59, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NOs: 64, 66, 69, respectivamente; en donde el anticuerpo se une específicamente a la TIM3 humana.

Un dominio VH, o una o más CDR del mismo, descrito en el presente documento, puede estar unido a un dominio constante para formar una cadena pesada, por ejemplo, una cadena pesada completa. De manera similar, un dominio VL, o una o más CDR del mismo, descrito en el presente documento, puede estar unido a un dominio constante para formar una cadena ligera, por ejemplo, una cadena ligera completa. Una cadena pesada completa (con la excepción de la lisina (K) carboxiterminal o con la excepción de la glicina y la lisina (GK) carboxiterminales, que pueden estar ausentes) y la cadena ligera completa, se combinan para formar un anticuerpo completo.

Un dominio VH descrito en el presente documento puede fusionarse con el dominio constante de una IgG humana, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que son naturales o modificadas, por ejemplo, como se describe adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, un dominio VH puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VH descrito en el presente documento fusionado con una IgG humana, por ejemplo, una IgG1, región constante, tal como la siguiente secuencia de aminoácidos del dominio constante de la IgG1 humana natural:

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 291)
```

o la de una variante alotípica de la SEQ ID NO: 291, y tiene las siguientes secuencias de aminoácidos: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 277; los restos de aminoácidos específicos del alotipo están en negra y subrayados)

Un dominio VH de un anticuerpo anti-TIM3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VH descrito en el presente documento fusionado con una región constante sin efector, por ejemplo, las siguientes secuencias de aminoácidos del dominio constante de la IgG1 humana sin efector:

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG
Q
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
W QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 294; "IgG1.1f", que comprende las sustituciones
```

L234A, L235E, G237A, A330S y P331S, que están subrayadas)

o

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
Q
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
W QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 295; "IgG1.3F", que comprende las sustituciones
L234A, L235E y G237A, que están subrayadas)

Por ejemplo, una variante alotípica de la IgG1 comprende una K97R, D239E y/o L241M (subrayadas y negrita arriba) y con la numeración según la de las SEQ ID NOs: 277, 294 y 295. Dentro de la región pesada completa, por ejemplo, 8C4 (SEQ ID NO: 3) y según la numeración EU, estas sustituciones de aminoácidos se numeran K214R, D356E y L358M. En algunos aspectos de la descripción, la región constante de un anticuerpo anti-TIM3 puede comprender además una o más mutaciones o sustituciones en los aminoácidos L117, A118, G120, A213 y P214 (subrayados arriba) como se numeran en las SEQ ID NO: 277, 294 y 295, o L234, A235, G237, A330 y P331, según la numeración EU. En aspectos adicionales de la descripción, la región constante de un anticuerpo anti-TIM3 comprende una o más mutaciones o sustituciones en los aminoácidos L117A, A118E, G120A, A213S y P214S de la SEQ ID NO: 291, o L234A, L235E, G237A, A330S y P331S, según la numeración EU. La región constante de un anticuerpo anti-TIM3 también puede comprender una o más mutaciones o sustituciones L117A, A118E y G120A de la SEQ ID NO: 291, o L234A, L235E y G237A, según la numeración EU.

Alternativamente, un dominio VH de un anticuerpo anti-TIM3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VH descrito en el presente documento fusionado con una región constante de la IgG4 humana, por ejemplo, la siguiente secuencia de aminoácidos de la IgG4 humana o variantes de la misma:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGRTYTCNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVQED
FEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKQPRE
PQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGK (SEQ ID NO: 292, que comprende S228F).

Un dominio VL descrito en el presente documento puede fusionarse con el dominio constante de una cadena ligera kappa o lambda humana. Por ejemplo, un dominio VL de un anticuerpo anti-TIM3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VL descrito en el presente documento fusionado con la siguiente secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa de la IgG1 humana:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 278)

En ciertos aspectos de la descripción, la región constante de la cadena pesada comprende una lisina u otro aminoácido en el extremo carboxílico, por ejemplo, comprende los últimos aminoácidos siguientes: LSPGK (SEQ ID NO: 279) de la cadena pesada. En ciertos aspectos de la descripción, la región constante de la cadena pesada carece de uno o más aminoácidos en el extremo carboxílico y tiene, por ejemplo, la secuencia carboxiterminal LSPG (SEQ ID NO: 280) o LSP (SEQ ID NO: 281).

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera ilustrativas corresponden a las SEQ ID NOs: 1-28, 72-111, 301-354, para las cadenas pesadas, y las SEQ ID NOs: 29-30 y 32-33 para las cadenas ligeras.

En el presente documento se describen anticuerpos anti-TIM3 humana aislados, o la porción de unión al antígeno de los mismos, que comprenden:

- (a1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 301 (o 302) y 29, respectivamente;
- (a2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 1 (u 8) y 29, respectivamente;
- (a3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 15 (o 22) y 29, respectivamente;
- (a4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 303 (o 304) y 29, respectivamente;
- (a5) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 72 (u 82) y 29, respectivamente;
- (a6) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 92 (o 102) y 29, respectivamente;
- (a7) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 305 (o 306) y 29,

- respectivamente;
- (a8) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 73 (u 83) y 29, respectivamente;
- 5 (a9) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 93 (o 103) y 29, respectivamente;
- (a10) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 307 (o 308) y 29, respectivamente;
- (a11) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 74 (u 84) y 29, respectivamente;
- 10 (a12) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 94 (o 104) y 29, respectivamente;
- (a13) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 309 (o 310) y 29, respectivamente;
- 15 (a14) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 75 (u 85) y 29, respectivamente;
- (a15) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 95 (o 105) y 29, respectivamente;
- (a16) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 311 (o 312) y 29, respectivamente;
- 20 (a17) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 76 (u 86) y 29, respectivamente;
- (a18) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 96 (o 106) y 29, respectivamente;
- 25 (a19) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 313 (o 314) y 29, respectivamente;
- (a20) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 77 (u 87) y 29, respectivamente;
- (a21) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 97 (o 107) y 29, respectivamente;
- 30 (a22) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 315 (o 316) y 29, respectivamente;
- (a23) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 78 (u 88) y 29, respectivamente;
- 35 (a24) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 98 (o 108) y 29, respectivamente;
- (a25) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 317 (o 318) y 29, respectivamente;
- (a26) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 79 (u 89) y 29, respectivamente;
- 40 (a27) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 99 (o 109) y 29, respectivamente;
- (a28) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 319 (o 320) y 29, respectivamente;
- 45 (a29) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 349 (o 350) y 29, respectivamente;
- (a30) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 351 (o 352) y 29, respectivamente;
- (a31) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 353 (o 354) y 29, respectivamente;
- 50 (b1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 321 (o 322) y 30, respectivamente;
- (b2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 2 (o 9) y 30, respectivamente;
- (b3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 16 (o 23) y 30, respectivamente;
- 55 (b4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 323 (o 324) y 30, respectivamente;
- (b5) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 80 (o 90) y 30, respectivamente;
- 60 (b6) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 100 (o 110) y 30, respectivamente;
- (b7) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 325 (o 326) y 30, respectivamente;
- (c1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 327 (o 328) y 30, respectivamente;
- 65 (c2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 3 (o 10) y 30, respectivamente;
- (c3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 17 (o 24) y 30,

respectivamente;

(c4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 329 (o 330) y 30, respectivamente;

(d1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 331 (o 332) y 29, respectivamente;

(d2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 4 (o 11) y 29, respectivamente;

(d3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 18 (o 25) y 29, respectivamente;

(d4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 333 (o 334) y 29, respectivamente;

(e1.1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 335 (o 336) y 32, respectivamente;

(e1.2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 335 (o 336) y 33, respectivamente;

(e1.3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 335 (o 336) y 31, respectivamente;

(e2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 5 (o 12) y 33, respectivamente;

(e3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 19 (o 26) y 33, respectivamente;

(e4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 337 (o 338) y 33, respectivamente;

(e5) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 81 (o 91) y 33, respectivamente;

(e6) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 101 (o 111) y 33, respectivamente;

(e7) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 339 (o 340) y 33, respectivamente;

(f1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 341 (o 342) y 29, respectivamente;

(f2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 6 (o 13) y 29, respectivamente;

(f3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 20 (o 27) y 29, respectivamente;

(f4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 343 (o 344) y 29, respectivamente;

(g1) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 345 (o 346) y 30, respectivamente;

(g2) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 7 (o 14) y 30, respectivamente;

(g3) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 21 (o 28) y 30, respectivamente; o

(g4) las secuencias de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 347 (o 348) y 30, respectivamente;

en donde el anticuerpo se une específicamente a la TIM3 humana.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una combinación de secuencias de la cadena pesada y ligera expuestas en el presente documento, por ejemplo, en el párrafo anterior, en donde el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y puede comprender además al menos un enlace por puente de disulfuro que une las dos cadenas pesadas entre sí. Los anticuerpos también pueden comprender enlaces por puentes de disulfuro que unen cada una de las cadenas ligeras con cada una de las cadenas pesadas.

Las cadenas pesada y ligera comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 % o 70 % idéntica a cualquiera de las cadenas pesada o ligera expuestas en el presente documento (o sus regiones variables), por ejemplo, las SEQ ID NOs: 1-33, 72-111 y 301-354 pueden utilizarse para formar anticuerpos anti-TIM3 humana que tengan las características deseadas, por ejemplo, las que se describen adicionalmente en el presente documento. Algunas variantes ilustrativas son aquellas que comprenden una variación alotípica, por ejemplo, en el dominio constante, y/o una mutación en las región variable o constante, tal como las mutaciones divulgadas en el presente documento. Las cadenas pesadas y ligeras que comprenden una secuencia de aminoácidos que difiere como máximo en 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos (por sustitución, adición o delección) de cualquiera de las cadenas pesadas o ligeras expuestas en el presente documento (o sus regiones variables) pueden utilizarse para formar anticuerpos anti-TIM3 humana que tengan las características deseadas, por ejemplo, las que se describen adicionalmente en el presente documento.

En diferentes aspectos de la descripción, los anticuerpos anteriormente descritos presentan una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, o todas las propiedades funcionales siguientes:

(1) se unen a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una KD de 10 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a

10 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(2) se unen a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 100 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 100 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(3) se unen a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 1 $\mu\text{g/ml}$ o menor (por ejemplo, de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);

(4) se unen a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(5) se unen a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 20 $\mu\text{g/ml}$ o menor (por ejemplo, de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 20 $\mu\text{g/ml}$), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);

(6) se unen a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(7) inducen o mejoran la activación de los linfocitos T (por ejemplo, bloqueando o reduciendo el efecto inhibitor de la TIM3), como lo demuestra (i) el aumento de la producción de IFN- γ en linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL) y/o (ii) el aumento de la proliferación de linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(8) estimular la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(9) inhibir la unión de la fosfatidilserina a la TIM3, por ejemplo, como se mide mediante el ensayo de bloqueo "en tándem" de PS-hTIM3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(10) no internalizar ni regular por disminución la TIM3 de la superficie celular cuando se unen a la TIM3 de las células;

(11) se unen a una de las siguientes regiones del dominio extracelular de la TIM3 humana (SEQ ID NO: 290): (a) CPVFECG (SEQ ID NO: 296); (b) RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298); (c) CPVFECG y RIQIPGIMND (SEQ ID NOs: 296 y 298, respectivamente); y (d) WTSRYWLNQDFR (SEQ ID NO: 297), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(12) tienen una unión reducida a la TIM3 humana en la que uno o más de los aminoácidos L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120 (según la numeración de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) se sustituyen por otro aminoácido relativo a la unión a la TIM3 humana natural, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(13) competir en cualquier dirección o en ambas direcciones por la unión a la TIM3 humana con un anticuerpo que comprende los dominios VH y VL de una cualquiera de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o TIM3.7, TIM3.8, TIM3.10, TIM3.11, TIM3.12, TIM3.13, TIM3.14, TIM3.15, TIM3.16, TIM3.17 y TIM3.18, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(14) se unen a las regiones de la TIM3 humana ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) como se determina mediante HDX-EM, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(15) tener las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5, 10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos; numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)); y/o

(16) (a) tener una unión reducida a la TIM3 humana en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, R111, D120, y opcionalmente D104 y Q113 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) están sustituidos por otro aminoácido relativo a la unión con TIM3 humana natural; (b) se unen a ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), como se determina mediante HDX-EM, como se describe en los Ejemplos; y/o (c) competir o bloquear de forma cruzada la unión a la TIM3 humana de 13A3 o TIM3.18.IgG1.3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

En un aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se unen a un epítipo conformacional.

En un aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se unen a restos de aminoácido dentro de la siguiente región del dominio extracelular de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290): SEVEYRAEYVGNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNQDFRKGDVSLT IENVTLADSGIYCCRIQIPGIMND (SEQ ID NO: 299), correspondiente a los restos de aminoácidos 1-99 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290) o a los aminoácidos 22 a 120 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286.

En un aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se unen a restos de

aminoácido dentro de la siguiente región del dominio extracelular de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290): CPVFECG (SEQ ID NO: 296), correspondiente a los restos de aminoácidos 37-43 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290).

5 En un aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se unen a restos de aminoácido dentro de la siguiente región del dominio extracelular de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290): WTSRYWLNGLDFR (SEQ ID NO: 297), correspondiente a los restos de aminoácidos 57-83 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290).

10 En un aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se unen a restos de aminoácido dentro de la siguiente región del dominio extracelular de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290): RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298), correspondiente a los restos de aminoácidos 90-99 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290).

15 En un aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 tienen el mismo patrón de unión a la TIM3 humana natural y mutada que uno o más de los anticuerpos 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 y TIM3.2 a TIM3.18. En un aspecto de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a restos de aminoácidos dentro de las siguientes regiones del dominio extracelular de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290): CPVFECG (SEQ ID NO: 296), WTSRYWLNGLDFRKGDVSLTIENVTLD (SEQ ID NO: 297) y/o RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298).

20 En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a (1) ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) o (2) ⁴⁰YTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 369), ⁶⁶VVLRTDERDVNY⁷⁷ (SEQ ID NO: 370), ⁷⁸WTSRYWLNGLDFRKGDVSL⁹⁵ (SEQ ID NO: 371), ¹¹⁰CRIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 372) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), como se determina mediante HDX-EM, como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 interactúa con regiones de los restos aminoácidos 40-62 y 111-127 de hTIM3, pero no interactúa significativamente con otras regiones, tales como la región que es aminoterminal al resto de aminoácido Y40, la región que está situada entre los restos de aminoácidos E62 y R111 y la región que es carboxiterminal al resto de aminoácido L127, según se determina mediante HDX-EM, como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos.

30 En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 tiene una unión reducida a la TIM3 humana en la que uno o más de los aminoácidos L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120 (numerados según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20) están sustituidos por otro aminoácido relativo a la unión con la TIM3 humana natural y el anticuerpo se une a (1) ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) o (2) ⁴⁰YTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 369), ⁶⁶VVLRTDERDVNY⁷⁷ (SEQ ID NO: 370), ⁷⁸WTSRYWLNGLDFRKGDVSL⁹⁵ (SEQ ID NO: 371), ¹¹⁰CRIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 372) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), como se determina mediante HDX-EM, como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos.

40 En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 tiene un patrón de unión a la TIM3 humana natural y mutada similar al de TIM3.18.IgG1.3 o 13A3, es decir, el anticuerpo:

(i) se une a (1) ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368), y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), y, por ejemplo, pero no se une significativamente a (a) péptidos que tienen secuencias situadas en aminoterminal al resto de aminoácido 49; (b) péptidos que tienen secuencias situadas entre los restos de aminoácidos 62 y 111 (por ejemplo, ⁷⁸WTSRYWLNGLDFRKGDVSL⁹⁵ (SEQ ID NO: 371)); y (c) péptidos que tienen secuencias situadas en carboxiterminal al resto de aminoácido 127, como se determina mediante HDX-EM (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);

45 (ii) no se une a la TIM3 humana, o tiene una unión significativamente reducida a la TIM3 humana, que tiene una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos, como se determina, por ejemplo, utilizando un método de expresión en la superficie de levadura (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos): C58, P59, F61, E62, C63, R111, D120, y opcionalmente D104 y Q113 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)); y/o

50 (iii) tiene las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5, 10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos; numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)).

55

60 En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 72-111, 305-354, 325-326 y 339-340, y/o la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29-33.

65 Como se analiza adicionalmente en el presente documento, la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o combinaciones de los mismos y/o modificaciones de los mismos. Un anticuerpo anti-TIM3 puede tener una función efectora o puede tener una función efectora reducida o ausente. En ciertos aspectos de la descripción,

los anticuerpos anti-TIM3 comprenden una región constante de la cadena pesada modificada que proporciona propiedades mejoradas al anticuerpo.

- 5 En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 72-111 y 349-352, y/o la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29-33.

III. Anticuerpos que tienen secuencias particulares de la estirpe germinal

- 10 En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una región variable de la cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de la cadena pesada de la estirpe germinal particular y/o una región variable de la cadena ligera de un gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal particular.

- 15 Como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos humanos específicos para la TIM3 se han preparado de manera que comprenden una región variable de la cadena pesada que es el producto o deriva de un gen 4-39 de la VH de la estirpe germinal humana, gen 4-59 de la VH, gen 1-46 de la VH, 3-11 de la VH, gen 4-17 de la VH, gen 3-10 de la VH, gen 6-19 de la VH, gen 6-13 de la VH, gen JH5b de la VH y/o gen JH6b de la VH. Por consiguiente, en el presente documento se describen anticuerpos monoclonales aislados, o porciones de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de la cadena pesada que es el producto o deriva de un gen de la estirpe germinal de la VH humana seleccionado del grupo que consiste en: 4-39 de la VH, 4-59 de la VH, 1-46 de la VH, 3-11 de la VH, 4-17 de la VH, 3-10 de la VH, VH6-19, 6-13 de la VH, JH5b de la VH, JH6b de la VH, y cualquier combinación de los mismos.

- 25 Los anticuerpos humanos específicos para la TIM3 se han preparado de manera que comprenden una región variable de la cadena ligera que es el producto o deriva de un gen A27 de la VK de la estirpe germinal humana, gen JK5 de la VK, gen JK4 de la VK, gen L18 de la VK y/o gen JK1 de la VK. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, o porciones de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de la cadena ligera que es el producto o deriva de un gen de la estirpe germinal VK humana seleccionado del grupo que consiste en: A27 de la VK, JK5 de la VK, JK4 de la VK, L18 de la VK, JK1 de la VK, y cualquier combinación de los mismos.

- 30 Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento incluyen aquellos que comprenden una región variable de la cadena pesada que es el producto o deriva de uno de los genes de la VH de la estirpe germinal humana anteriormente enumerados, y también los que comprenden una región variable de la cadena ligera que es el producto o deriva de uno de los genes VK de la estirpe germinal humana anteriormente enumerados, como se muestra en las Figuras.

- 40 Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera que son "el producto de" o "derivan de" una secuencia de la estirpe germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Dichos sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o el cribado de una genoteca de inmunoglobulina humana expresada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o que "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas de la estirpe germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana que sea más parecida en secuencia (es decir, el mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o que "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la estirpe germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas naturales o a la introducción intencionada de una mutación dirigida. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado normalmente es al menos un 90 % idéntico en las secuencias de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana y contiene restos de aminoácido que identifican el anticuerpo humano como de ser humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la estirpe germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la estirpe germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 95 % o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de la estirpe germinal humana particular no mostrará más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5 o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 aminoácidos de diferencia respecto de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal.

IV. Anticuerpos homólogos

- 65 En el presente documento se engloban anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos

anti-TIM3 descritos en el presente documento, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento.

Por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM3 aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde:

(a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 34-40, 112-121 y 364, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 cambios de aminoácido (es decir, sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos) en relación a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34-40, 112-121 y 364, en donde opcionalmente la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de CDR de uno de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento;

(b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 60-63, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 cambios de aminoácido (es decir, sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos) en relación a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 60-63, en donde opcionalmente la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de CDR de uno de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento;

(c) el anticuerpo se une específicamente a la TIM3 humana, y

(d) el anticuerpo presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o todas las propiedades funcionales siguientes:

(1) se une a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(2) se une a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 100 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 100 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(3) se une a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 1 μ g/ml o menor (por ejemplo, de 0,01 μ g/ml a 1 μ g/ml), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);

(4) se une a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(5) se une a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 20 μ g/ml o menor (por ejemplo, de 0,01 μ g/ml a 20 μ g/ml), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);

(6) se une a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(7) inducen o mejoran la activación de los linfocitos T (por ejemplo, bloqueando o reduciendo el efecto inhibitor de la TIM3), como lo demuestra (i) el aumento de la producción de IFN- γ en linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL) y/o (ii) el aumento de la proliferación de linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(8) estimular la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(9) inhibir la unión de la fosfatidilserina a la TIM3, por ejemplo, como se mide mediante el ensayo de bloqueo "en tándem" de PS-hTIM3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(10) no internalizar ni regular por disminución la TIM3 de la superficie celular cuando se unen a la TIM3 de las células;

(11) se une a una de las siguientes regiones del dominio extracelular de la TIM3 humana (SEQ ID NO: 290): (a) CPVFECG (SEQ ID NO: 296); (b) RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298); (c) CPVFECG y RIQIPGIMND (SEQ ID NOs: 296 y 298, respectivamente); y (d) WTSRYWLNDFR (SEQ ID NO: 297), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(12) tienen una unión reducida a la TIM3 humana en la que uno o más de los aminoácidos L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120 (según la numeración de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) se sustituyen por otro aminoácido relativo a la unión a la TIM3 humana natural, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(13) competir en cualquier dirección o en ambas direcciones por la unión a la TIM3 humana con un anticuerpo que comprende los dominios VH y VL de una cualquiera de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o TIM3.7, TIM3.8, TIM3.10, TIM3.11, TIM3.12, TIM3.13, TIM3.14, TIM3.15, TIM3.16, TIM3.17 y TIM3.18, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(14) se une a las regiones de la TIM3 humana ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) como se determina mediante HDX-EM, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(15) tener las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5,

10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos; numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)); y/o

(16) (a) tener una unión reducida a la TIM3 humana en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, R111, D120, y opcionalmente D104 y Q113 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) están sustituidos por otro aminoácido relativo a la unión con TIM3 humana natural; (b) se une a ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), como se determina mediante HDX-EM, como se describe en los Ejemplos; y/o (c) competir o bloquear de forma cruzada la unión a la TIM3 humana de 13A3 o TIM3.18.IgG1.3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

En diferentes aspectos de la descripción, el anticuerpo puede presentar una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o todas las propiedades funcionales enumeradas de (1) a (16) anteriormente. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

Un anticuerpo anti-TIM3 aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera, en donde:

(a) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-28, 72-111 y 349-352, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 cambios de aminoácido (es decir, sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos) en relación a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-28, 72-111 y 349-352, con la condición de que, en ciertos aspectos de la descripción, si la secuencia es la de una cadena pesada sin efector, las mutaciones que dejan sin efector a la cadena pesada no se modifican (por ejemplo, no se realiza ninguna modificación en R214, A234, E235, A237, S330 y S331) para las regiones constantes de IgG1.1, y no se realiza ninguna modificación en R214, A234 y E235 para las regiones constantes de IgG1.3, en donde opcionalmente la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de CDR de uno de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento;

(b) la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29-31, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 cambios de aminoácido (es decir, sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos) en relación a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29-31, en donde opcionalmente la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de CDR de uno de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento;

(c) el anticuerpo se une específicamente a la TIM3 humana, y

(d) el anticuerpo presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o todas las propiedades funcionales siguientes:

(1) se une a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(2) se une a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 100 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 100 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(3) se une a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 1 µg/ml o menor (por ejemplo, de 0,01 µg/ml a 1 µg/ml), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);

(4) se une a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(5) se unen a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 20 µg/ml o menor (por ejemplo, de 0,01 µg/ml a 20 µg/ml), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);

(6) se une a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(7) inducen o mejoran la activación de los linfocitos T (por ejemplo, bloqueando o reduciendo el efecto inhibitor de la TIM3), como lo demuestra (i) el aumento de la producción de IFN-γ en linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL) y/o (ii) el aumento de la proliferación de linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(8) estimular la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(9) inhibir la unión de la fosfatidilserina a la TIM3, por ejemplo, como se mide mediante el ensayo de bloqueo "en tandem" de PS-hTIM3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(10) no internalizar ni regular por disminución la TIM3 de la superficie celular cuando se unen a la TIM3 de las células;

(11) se une a una de las siguientes regiones del dominio extracelular de la TIM3 humana (SEQ ID NO: 290):

(a) CPVFECG (SEQ ID NO: 296); (b) RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298); (c) CPVFECG y RIQIPGIMND (SEQ ID NOs: 296 y 298, respectivamente); y (d) WTSRYWLNQDFR (SEQ ID NO: 297), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(12) tienen una unión reducida a la TIM3 humana en la que uno o más de los aminoácidos L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120 (según la numeración de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) se sustituyen por otro aminoácido relativo a la unión a la TIM3 humana natural, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(13) competir en cualquier dirección o en ambas direcciones por la unión a la TIM3 humana con un anticuerpo que comprende los dominios VH y VL de una cualquiera de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4, TIM3.7, TIM3.8, TIM3.10, TIM3.11, TIM3.12, TIM3.13, TIM3.14, TIM3.15, TIM3.16, TIM3.17 y TIM3.18, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(14) se une a las regiones de la TIM3 humana ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) como se determina mediante HDX-EM, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(15) tener las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5, 10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos; numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)); y/o

(16) (a) tener una unión reducida a la TIM3 humana en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, R111, D120, y opcionalmente D104 y Q113 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) están sustituidos por otro aminoácido relativo a la unión con TIM3 humana natural; (b) se une a ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), como se determina mediante HDX-EM, como se describe en los Ejemplos; y/o (c) competir o bloquear de forma cruzada la unión a la TIM3 humana de 13A3 o TIM3.18.IgG1.3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

También se describen anticuerpos anti-TIM3 que comprenden una CDR1 de la VH, CDR2 de la VH, CDR3 de la VH, CDR1 de la VL, CDR2 de la VL y/o CDR3 de la VL que difieren de la CDR correspondiente de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 en 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, o 1-5 cambios de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende 1-5 cambios de aminoácidos en cada una de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las CDR en relación con la secuencia correspondiente de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende un total de 1-5 cambios de aminoácidos en todas las CDR en relación con las CDR de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende las CDR de VH y VL que consisten en las de 13A3, en donde uno o más de los aminoácidos de una o más CDR son los de uno de los otros anticuerpos anti-TIM3 divulgados en el presente documento.

Por ejemplo, en ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una CDR1 de VH que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a SRSYYWG (SEQ ID NO: 41), y puede comprender, por ejemplo, la siguiente secuencia degenerada: X₁X₂X₃X₄YX₅X₆ (SEQ ID NO: 282), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S o ninguno; X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, R o ninguno; X₃ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S, R o D; X₄ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y o H; X₅ es cualquier aminoácido, por ejemplo, W o M; y X₆ es cualquier aminoácido, por ejemplo, G, N, S o H.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una CDR2 de VH que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a SIYYSGFTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 46), y puede comprender, por ejemplo, la siguiente secuencia degenerada: X₁I₂X₃X₄GX₅X₆X₇X₈YX₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄ (SEQ ID NO: 283), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S, Y, I o F; X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y, H, N o S; X₃ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y, P, G, T o S; X₄ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S, T, R o G; X₅ es cualquier aminoácido, por ejemplo, F, S o D; X₆ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S, T o I; X₇ es cualquier aminoácido, por ejemplo, I o ninguno; X₈ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y, N o I; X₉ es cualquier aminoácido, por ejemplo, N, Q, S o A; X₁₀ es cualquier aminoácido, por ejemplo, P, S, Q o D; X₁₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S o K; X₁₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, L, F o V; X₁₃ es cualquier aminoácido, por ejemplo, K o Q; y X₁₄ es cualquier aminoácido, por ejemplo, S o G.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una CDR3 de VH que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a GPGYGDYAHWFDP (SEQ ID NO: 53), y puede comprender, por ejemplo, la siguiente secuencia degenerada: X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀YGX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈ (SEQ ID NO: 284), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, D, E o ninguno; X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, F, G o ninguno; X₃ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y o ninguno; X₄ es cualquier aminoácido, por ejemplo, G, S o

ninguno; X5 es cualquier aminoácido, por ejemplo, G, T o S; X6 es cualquier aminoácido, por ejemplo, G o S; X7 es cualquier aminoácido, por ejemplo, N, W o ninguno; X8 es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y, S, E o ninguno; X9 es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y o ninguno; X10 es cualquier aminoácido, por ejemplo, P o Y; X11 es cualquier aminoácido, por ejemplo, D o ninguno; X12 es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y o ninguno; X13 es cualquier aminoácido, por ejemplo, A o ninguno; X14 es cualquier aminoácido, por ejemplo, H o ninguno; X15 es cualquier aminoácido, por ejemplo, W o ninguno; X16 es cualquier aminoácido, por ejemplo, F o M; X17 es cualquier aminoácido, por ejemplo, D o E; y X18 es cualquier aminoácido, por ejemplo, P, I, V, Y o L.

En ciertos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 comprende una CDR3 de VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 53-59 y 126-129.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una CDR1 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una CDR2 de VL que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 67.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una CDR3 de VL que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 68), y puede comprender, por ejemplo, la siguiente secuencia degenerada: QQX₁X₂SX₃X₄X₅T (SEQ ID NO: 285), en donde X₁ es cualquier aminoácido, por ejemplo, F o Y; X₂ es cualquier aminoácido, por ejemplo, N o G; X₃ es cualquier aminoácido, por ejemplo, Y o S; X₄ es cualquier aminoácido, por ejemplo, P o ninguno; X₅ es cualquier aminoácido, por ejemplo, I, R o L.

Los anticuerpos que tienen secuencias con homología con las de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18, por ejemplo, las regiones VH y VL de las SEQ ID NOs: 34-40, 112-121 o 364, y las SEQ ID NOs: 60-63, respectivamente, o las cadenas pesada y ligera de las SEQ ID NOs: 1-28, 72-111 o 349-352, y las SEQ ID NOs: 29-33, respectivamente, o las CDR pueden obtenerse mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida o mediada por PCR) de moléculas de ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 167-173 y/o las SEQ ID NOs: 193-196 o las SEQ ID NOs: 134-161 y/o las SEQ ID NOs: 162-166, seguido del análisis del anticuerpo alterado codificado para determinar la función conservada (es decir, las funciones expuestas en los puntos (1) a (16) anteriores) utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

V. Anticuerpos con modificaciones conservadoras

Los anticuerpos anti-TIM3 pueden comprender una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR comprenden secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento (por ejemplo, 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18) o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento. Por consiguiente, un anticuerpo anti-TIM3 aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde:

(a) la secuencia de CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 53-59 y 126-129, y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones de aminoácidos conservadoras, en donde opcionalmente la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de CDR de uno de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento;

(a) la secuencia de CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 68-71, y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones de aminoácidos conservadoras, en donde opcionalmente la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de CDR de uno de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento;

(c) el anticuerpo se une específicamente a la TIM3 humana, y

(d) el anticuerpo presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todas las siguientes características:

(1) se une a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 10 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(2) se une a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una K_D de 100 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 100 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(3) se une a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una CE₅₀ de 1 µg/ml o menor (por ejemplo, de 0,01 µg/ml a 1 µg/ml), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);

(4) se une a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se

describe en los Ejemplos;

(5) se une a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una CE_{50} de 20 $\mu\text{g/ml}$ o menor (por ejemplo, de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 20 $\mu\text{g/ml}$), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);

(6) se une a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(7) inducen o mejoran la activación de los linfocitos T (por ejemplo, bloqueando o reduciendo el efecto inhibitor de la TIM3), como lo demuestra (i) el aumento de la producción de IFN- γ en linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL) y/o (ii) el aumento de la proliferación de linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(8) estimular la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(9) inhibir la unión de la fosfatidilserina a la TIM3, por ejemplo, como se mide mediante el ensayo de bloqueo "en tándem" de PS-hTIM3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(10) no internalizar ni regular por disminución la TIM3 de la superficie celular cuando se unen a la TIM3 de las células;

(11) se une a una de las siguientes regiones del dominio extracelular de la TIM3 humana (SEQ ID NO: 290): (a) CPVFECG (SEQ ID NO: 296); (b) RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298); (c) CPVFECG y RIQIPGIMND (SEQ ID NOs: 296 y 298, respectivamente); y (d) WTSRYWLNQDFR (SEQ ID NO: 297), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(12) tienen una unión reducida a la TIM3 humana en la que uno o más de los aminoácidos L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120 (como se numeran en la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) está sustituido por otro aminoácido relativo a la unión con la TIM3 humana natural, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(13) competir en cualquier dirección o en ambas direcciones por la unión a la TIM3 humana con un anticuerpo que comprende los dominios VH y VL de una cualquiera de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o TIM3.7, TIM3.8, TIM3.10, TIM3.11, TIM3.12, TIM3.13, TIM3.14, TIM3.15, TIM3.16, TIM3.17 y TIM3.18, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(14) se une a las regiones de la TIM3 humana ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) como se determina mediante HDX-EM, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

(15) tener las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5, 10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos; numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)); y/o

(16) (a) tener una unión reducida a la TIM3 humana en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, R111, D120, y opcionalmente D104 y Q113 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) están sustituidos por otro aminoácido relativo a la unión con TIM3 humana natural; (b) se une a ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), como se determina mediante HDX-EM, como se describe en los Ejemplos; y/o (c) competir o bloquear de forma cruzada la unión a la TIM3 humana de 13A3 o TIM3.18.IgG1.3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

En un aspecto de la descripción, la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 46-52 y 122-125, y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos; y la secuencia de CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 66-67, y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

En otro aspecto de la descripción, la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41-45, y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos; y la secuencia de CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 64-65, y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

En diferentes aspectos de la descripción, el anticuerpo puede presentar una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o todas las propiedades funcionales enumeradas de (1) a (16) anteriormente. Dichos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos también se pueden realizar en porciones de los anticuerpos distintas, o adicionales a, las CDR. Por ejemplo, las modificaciones de aminoácidos conservadoras se pueden realizar en una región estructural o en la región Fc. Una región variable o una cadena pesada o ligera puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 o 1-50 sustituciones de aminoácidos conservadoras en relación con las secuencias del anticuerpo anti-TIM3 descritas en el presente documento. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una combinación de modificación de aminoácido conservadora y no conservadora.

VI. Anticuerpos que se unen al mismo epítipo o que compiten por la unión

También se describen anticuerpos que compiten por la unión a la TIM3 humana con uno o más de los anticuerpos anti-TIM3 particulares descritos en el presente documento (por ejemplo, los anticuerpos 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 y/o TIM3.2-TIM3.18). Dichos anticuerpos competitivos pueden identificarse en función de su capacidad para inhibir competitivamente la unión a la TIM3 humana de uno o más de los anticuerpos monoclonales 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 y/o TIM3.2-TIM3.18 en ensayos convencionales de unión a la TIM3. Por ejemplo, se pueden utilizar ensayos ELISA convencionales o ensayos ELISA competitivos en los que una proteína TIM3 humana recombinante se inmoviliza sobre la placa, se añaden diferentes concentraciones del primer anticuerpo sin marcar, la placa se lava, se añade el segundo anticuerpo marcado y se mide la cantidad de marcador. Si el aumento de la concentración del (primer) anticuerpo sin marcar (denominado también "anticuerpo bloqueante") inhibe la unión del (segundo) anticuerpo marcado, se dice que el primer anticuerpo inhibe la unión del segundo anticuerpo al objetivo de la placa, o se dice que compete por la unión del segundo anticuerpo. Adicionalmente o como alternativa, puede utilizarse un análisis Biacore para evaluar la capacidad de los anticuerpos para competir. La capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión de un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento a la TIM3 demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con el anticuerpo por la unión a la TIM3 humana.

Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-TIM3 que inhiben la unión de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento a la TIM3 de las células, por ejemplo, linfocitos T activados, en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % y/o cuya unión a la TIM3 humana de las células, por ejemplo, linfocitos T activados, se inhibe al menos en un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, por ejemplo, como se mide mediante ELISA o FACS, tal como utilizando el ensayo descrito en el siguiente párrafo.

Un experimento de competición ilustrativo para determinar, por ejemplo, si un primer anticuerpo bloquea la unión de (es decir, "compite con") un segundo anticuerpo, puede realizarse como se describe en los Ejemplos, o como se indica a continuación: los linfocitos T humanos activados se preparan del siguiente modo: se aíslan monomorfonucleares periféricos (PBMC) a partir de sangre humana completa mediante gradiente de Ficoll y se activan con 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA-L) (USBiol#P3370-30) y 200 UI/ml de IL-2 recombinante (Peprotech#200-02) durante 3 días. Los linfocitos T activados se resuspenden en tampón de FACS (PBS con un 5 % de suero bovino fetal) y se siembran a 10⁵ células por pocillo de muestra en una placa de 96 pocillos. La placa se coloca en hielo y después se añade el primer anticuerpo no conjugado a unas concentraciones que varían de 0 a 50 µg/ml (valoración por triplicado partiendo de una concentración máxima de 50 µg/ml). Puede utilizarse una IgG no relacionada como control de isotipo para el primer anticuerpo y añadirse a las mismas concentraciones (valoración por triplicado partiendo de una concentración máxima de 50 µg/ml). Se puede incluir una muestra preincubada con 50 µg/ml de segundo anticuerpo sin marcar como control positivo para un bloqueo completo (100 % de inhibición) y se puede usar una muestra sin anticuerpo en la incubación primaria como control negativo (sin competencia); 0 % de inhibición). Después de 30 minutos de incubación, el segundo anticuerpo marcado, por ejemplo, biotinilado, se añade a una concentración de 2 µg/ml por pocillo sin lavado. Las muestras se incuban durante otros 30 minutos en hielo. Los anticuerpos no unidos se eliminan lavando las células con tampón de FACS. El segundo anticuerpo marcado unido a la célula se detecta con un agente que detecta el marcador, por ejemplo, estreptavidina conjugada con PE (Invitrogen, catálogo#S21388) para detectar biotina. Las muestras se adquieren en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD, San José) y se analizan con el programa informático FLOWJO® (Tree Star, Inc, Ashland, OR). Los resultados pueden representarse como el % de inhibición (es decir, restando del 100 % la cantidad de marcador a cada concentración dividida por la cantidad de marcador obtenida sin anticuerpo de bloqueo). Normalmente, a continuación se realiza el mismo experimento a la inversa, es decir, el primer anticuerpo es el segundo anticuerpo y el segundo anticuerpo es el primer anticuerpo.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo bloquea al menos parcialmente (por ejemplo, al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %) o completamente (100 %) la unión del otro anticuerpo al objetivo, por ejemplo, la TIM3 humana o una porción de la misma, e independientemente de si la inhibición se produce cuando uno u otro anticuerpo es el primer anticuerpo. Un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo bloquean de forma cruzada entre sí la unión al objetivo, cuando los anticuerpos compiten entre sí en ambos sentidos, es decir, en experimentos de competición en los que el primer anticuerpo se añade primero y en experimentos de competición en los que el segundo anticuerpo se añade primero.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 se unen al mismo epítipo que el de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento (por ejemplo, 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 y/o TIM3.2-TIM3.18), por ejemplo, como se determina mediante una técnica de cartografiado de epítopos dada. Las técnicas para

determinar los anticuerpos que se unen al "mismo epítipo de la TIM3" con los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, métodos de cartografiado de epítopos, tales como, el análisis por rayos X de cristales de complejos de antígeno:anticuerpo, que proporciona una resolución atómica del epítipo. Otros métodos controlan la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno en las que la pérdida de unión debida a una modificación de un resto de aminoácido dentro de la secuencia del antígeno se considera a menudo una indicación de un componente de epítipo (véase la FIG. 20). Además, para el cartografiado de epítopos, también pueden utilizarse métodos combinatorios informáticos. Los métodos también pueden basarse en la capacidad de un anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos (ya sea en forma tridimensional nativa o en forma desnaturalizada) a partir de bibliotecas combinatorias de péptidos de expresión en fagos. Por tanto, los péptidos se consideran guías para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo usado para el cribado de la biblioteca de péptidos. Para el cartografiado de epítopos, también se han desarrollado algoritmos informáticos que se ha demostrado que cartografiaban epítopos conformacionales discontinuos.

Los anticuerpos que compiten por la unión a, o se unen al mismo epítipo que, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, pueden identificarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden inmunizar ratones con la TIM3 humana como se describe en el presente documento, produciendo hibridomas, y cribarse los anticuerpos monoclonales resultantes en función de su capacidad para competir con un anticuerpo descrito en el presente documento por la unión a la TIM3 humana. Los ratones también se pueden inmunizar con un fragmento más pequeño de la TIM3 que contiene el epítipo al que se une el anticuerpo. El epítipo o la región que comprende el epítipo se puede identificar mediante, por ejemplo, un cribado en función de su unión a una serie de péptidos solapados que engloban la TIM3. Alternativamente, se puede utilizar el método de Jespers *et al.*, Biotechnology 12: 899, 1994, para guiar la selección de los anticuerpos que tienen el mismo epítipo y, por lo tanto, propiedades similares al anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento. Utilizando la expresión en fagos, se empareja en primer lugar la cadena pesada del anticuerpo anti-TIM3 con un repertorio de cadenas ligeras (humanas) para seleccionar un anticuerpo de unión a la TIM3, y a continuación la nueva cadena ligera se empareja con un repertorio de cadenas pesadas (humanas) para seleccionar un anticuerpo de unión a la TIM3 (humana) que tiene el mismo epítipo o región de epítipo que un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento. Se pueden obtener variantes alternativas de un anticuerpo descrito en el presente documento mediante mutagénesis del ADNc que codifica las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo.

La mutagénesis por cribado con alanina, como describen Cunningham y Wells (1989) Science 244: 1081-1085, o alguna otra forma de mutagénesis puntual de restos de aminoácidos de la TIM3, también puede utilizarse para obtener características de unión de anticuerpos TIM3.

Las características de unión de un anticuerpo específico también pueden determinarse evaluando la unión del anticuerpo a péptidos que comprenden fragmentos de la TIM3, por ejemplo, fragmentos no desnaturalizados o desnaturalizados. Se puede sintetizar una serie de péptidos solapados que engloban la secuencia de la TIM3 (por ejemplo, la TIM3 humana) y cribar su unión, por ejemplo, en un ELISA directo, un ELISA competitivo (donde se evalúa la capacidad del péptido para impedir la unión de un anticuerpo a la TIM3 unida a un pocillo de una placa de microtitulación) o en un chip.

Las características de unión de los anticuerpos anti-TIM3 también pueden obtenerse mediante la huella proteica basada en EM, tal como espectrometría de masas con intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-EM) y oxidación fotoquímica rápida de proteínas (FPOP, *Fast Photochemical Oxidation of Proteins*). La HDX-EM puede realizarse, por ejemplo, como se describe en el documento WO2015/18735 y en Wei *et al.* (2014) Drug Discovery Today 19: 95. La FPOP se puede llevar a cabo como se describe, por ejemplo, en Hambley y Gross (2005) J. American Soc. Mass Spectrometry 16: 2057.

Las características de unión de los anticuerpos anti-TIM3 también pueden obtenerse mediante métodos estructurales, tales como determinación de la estructura cristalina por rayos X (por ejemplo, documento WO2005/044853), modelado molecular y espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN), incluyendo la determinación por RMN de las tasas de intercambio de H-D de los hidrógenos de amida lábiles de la TIM3 cuando están libres y cuando están unidos en un complejo con un anticuerpo de interés (Zinn-Justin *et al.* (1992) Biochemistry 31: 11335-11347; Zinn-Justin *et al.* (1993) Biochemistry 32, 6884-6891).

Con respecto a la cristalografía por rayos X, la cristalización se puede conseguir mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Giege *et al.* (1994) Acta Crystallogr. D50: 339-350; McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189: 1-23), incluyendo microlote (por ejemplo, Chayen (1997) Structure 5: 1269-1274), difusión de vapor de gota colgante (por ejemplo, McPherson (1976) J. Biol. Chem. 251: 6300-6303), siembra y diálisis. Es deseable utilizar una preparación de proteínas que tenga una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml o de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. La cristalización puede lograrse mejor en una solución precipitante que contenga polietilenglicol 1000-20 000 (PEG; peso molecular medio que varía de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20 000 Da), de aproximadamente 5000 a aproximadamente 7000 Da o de aproximadamente 6000 Da, variando las concentraciones de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 30 % (p/v). También puede ser deseable incluir un agente estabilizante de proteínas, por ejemplo, glicerol, a una concentración que varíe de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 20 %. Una sal adecuada, tal como cloruro de sodio, cloruro de

litio o citrato de sodio, también puede ser deseable en la solución precipitante, en una concentración que varíe de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1000 mM. El precipitante se tampona preferentemente a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,0. Los tampones específicos útiles en la solución precipitante pueden variar y son bien conocidos en la técnica (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, tercera ed., (1994) Springer-Verlag, Nueva York). Algunos ejemplos de tampones útiles incluyen, pero sin limitación, HEPES, Tris, MES y acetato. Los cristales pueden crecer a un amplio intervalo de temperaturas, incluyendo 2 °C, 4 °C, 8 °C y 26 °C.

Anticuerpo: los cristales de antígeno se pueden estudiar mediante técnicas de difracción de rayos X bien conocidas, y pueden refinarse con un programa informático tal como X-PLOR (Universidad de Yale, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, por ejemplo, Blundell & Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 y 115, H. W. Wyckoff *et al.*, eds., Academic Press; la Publicación de Solicitud de Patente de EE UU n.º 2004/0014194) y BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49: 37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A: 361-423, Carter y Sweet, eds.; Roversi *et al.* (2000) *Acta Cryst.* D56: 1313-1323).

Los anticuerpos anti-TIM3 pueden unirse al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos anti-TIM3 que tienen las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, como se determina mediante una técnica de cartografiado de epítopos, tal como una técnica descrita en el presente documento.

Los anticuerpos que se unen a la TIM3 humana y opcionalmente a la TIM3 de macaco con características de unión similares a los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento y determinados mediante uno de los métodos utilizados en los Ejemplos, están incluidos en el presente documento.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se unen a un epítipo, por ejemplo, un epítipo conformacional, en la porción extracelular de la TIM3 humana, por ejemplo, en el dominio de tipo Ig o el dominio IgV de la región extracelular, es decir, los aminoácidos 22 a 130 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo situado dentro de los aminoácidos 22 a 120 del dominio extracelular de la TIM3 humana (SEQ ID NO: 286) o 1-99 de la TIM3 humana madura (SEQ ID NO: 290) (véanse los Ejemplos). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a, o a un epítipo dentro de, una región que consiste en los aminoácidos 58-64 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286, que corresponde a los restos de aminoácido 37-43 de la TIM3 humana madura (CPVFECG, SEQ ID NO: 296; véase la FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a, o a un epítipo dentro de, una región que consiste en los aminoácidos 111-120 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286, que corresponde a los restos de aminoácido 90-99 de la TIM3 humana madura (RIQIPGIMND, SEQ ID NO: 298; véase la FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a, o a un epítipo dentro de, una región que consiste en los aminoácidos 58-64 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286 (CPVFECG, SEQ ID NO: 296) y una región que consiste en los aminoácidos 111-120 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286 (RIQIPGIMND, SEQ ID NO: 298; véase la FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a, o a un epítipo dentro de, una región que consiste en los aminoácidos 78-89 de la TIM3 humana que tiene la SEQ ID NO: 286, que corresponde a los restos de aminoácido 57-83 de la TIM3 humana madura (WTSRYWLNGDFR, SEQ ID NO: 297; véase la FIG. 20).

En un aspecto de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 13A3. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, R111 y D120 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, D104, R111, Q113 y D120 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, F61, E62, C63, R111 y D120 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, F61, E62, C63, D104, R111, Q113 y D120 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora.

En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 3G4. En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, V60, F61, E62, C63, G116 y M118 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, V60, F61, E62, C63, D104, G116 y M118 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, V60, F61, E62, C63, G116 y M118 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58,

P59, V60, F61, E62, C63, D104, G116 y M118 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora.

En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 17C3. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64 y G116 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, D104 y G116 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64 y G116 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, D104 y G116 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora.

En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 8B9. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos L48, W78, S80, R81, W83, G86, D87 y R89 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos L48, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87 y R89 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une sustancialmente al mismo epítipo que el de 8B9. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se une a un epítipo (o región de la TIM3 humana) que comprende uno o más de los restos de aminoácidos L48, W78, S80, R81, W83, G86, D87, R89 y D104 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20). En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido L48, W78, S80, R81, W83, G86, D87 y R89 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido L48, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87 y R89 de la SEQ ID NO: 286 se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 no se une significativamente, o únicamente con una afinidad de unión significativamente reducida, a una proteína TIM3 humana en la que uno o más de los restos de aminoácido L48, W78, S80, R81, W83, G86, D87, R89 y D104 de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20) se ha cambiado por otro aminoácido, por ejemplo, en una sustitución de aminoácidos no conservadora.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 compiten por la unión a la TIM3 humana con (o inhiben la unión de) anticuerpos anti-TIM3 que comprenden las CDR o las regiones variables descritas en el presente documento, por ejemplo, las de los anticuerpos 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 y cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 inhiben la unión de los anticuerpos 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 a la TIM3 humana en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o en un 100 %. En ciertos aspectos de la descripción, 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 inhiben la unión de los anticuerpos anti-TIM3 a la TIM3 humana en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o en un 100 %. En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 inhiben la unión de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 a la TIM3 humana en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o en un 100 %, y 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 inhiben la unión de los anticuerpos anti-TIM3 a la TIM3 humana en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % (por ejemplo, compiten en ambas direcciones).

VII. Anticuerpos genomodificados y modificados

También se describen anticuerpos genomodificados y modificados que pueden prepararse usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de la VH y/o la VL divulgadas en el presente documento como material de partida para genomodificar un anticuerpo modificado, anticuerpo modificado que puede tener unas propiedades alteradas con respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo se puede genomodificar modificando uno o más restos en una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo, en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones estructurales. Adicionalmente o como alternativa, se puede genomodificar un anticuerpo modificando los restos de la(s) región(es) constante(s), por ejemplo, para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de genomodificación de la región variable que puede realizarse es el injerto de una CDR. Los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivo predominantemente a través de restos de aminoácidos que están ubicados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones antígeno-anticuerpo,

es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos naturales construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias de CDR del anticuerpo natural específico injertadas en las secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. *et al.* (1986) Nature 321: 522-525; Queen, C. *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033; la Patente de EE. UU. n.º 5.225.539 a favor de Winter, y las Patentes de EE. UU. n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a favor de Queen *et al.*).

Por consiguiente, otro aspecto descrito en el presente documento concierne a un anticuerpo monoclonal aislado, o a una porción de unión al antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 41-45, las SEQ ID NOs: 46-52, 122-125 y las SEQ ID NOs: 53-59, 126-129, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 64-65, las SEQ ID NOs: 66-67 y las SEQ ID NOs: 68-71, respectivamente. Por lo tanto, dichos anticuerpos contienen las secuencias de CDR de la VH y la VL de los anticuerpos monoclonales 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o uno cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18, aunque pueden contener secuencias estructurales diferentes a las de estos anticuerpos.

Dichas secuencias estructurales pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o de referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de la estirpe germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la estirpe germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de la estirpe germinal humana "VBase" (disponible en internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH n.º 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops". Mol. Biol. 227: 776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24: 827-836.

En algunos aspectos de la descripción, las secuencias estructurales para su uso en los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias estructurales utilizadas por los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento. Las secuencias de la VH de las CDR1, 2 y 3, y las secuencias de la VL de las CDR1, 2 y 3, pueden injertarse en regiones estructurales que tengan una secuencia idéntica a la del gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal del que deriva la secuencia estructural, o pueden injertarse las secuencias de CDR en regiones estructurales que contengan una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la estirpe germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que en ciertos casos es beneficioso mutar los restos de las regiones estructurales para conservar o aumentar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a favor de Queen *et al.*).

Los anticuerpos anti-TIM3 genomodificados descritos en el presente documento incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones en los restos de la región estructural de la VH y/o la VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo, por ejemplo, una mutación en el aminoácido 107 en 9F6. Generalmente, dichas modificaciones estructurales se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "retromutar" uno o más restos de la región estructural a la correspondiente secuencia de la estirpe germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado a una mutación somática puede contener restos de la región estructural que difieran de la secuencia de la estirpe germinal de la que deriva el anticuerpo. Dichos restos pueden identificarse mediante la comparación de las secuencias estructurales del anticuerpo con las secuencias de la estirpe germinal de la que deriva el anticuerpo. Para restablecer las secuencias de la región estructural a su configuración de la estirpe germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" a la secuencia de la estirpe germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR. También se pretende que dichos anticuerpos "retromutados" estén englobados. Otro tipo de modificación estructural implica mutar uno o más restos de la región estructural o incluso de una o más regiones de CDR, para eliminar los epítomos de los linfocitos T y reducir de ese modo la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Esta estrategia también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de EE. UU. n.º 20030153043 a favor de Carr *et al.*

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar restos de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la VH y/o la VL para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, la afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida o la mutagénesis mediada por PCR se puede realizar para introducir la(s) mutación(es), y el efecto sobre la unión del anticuerpo y otra propiedad de interés, se puede evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en el presente documento y se proporciona en los Ejemplos. En algunos aspectos de la descripción, se introducen modificaciones conservadoras (como se ha analizado anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Por otra parte, generalmente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos de una región de CDR.

Por consiguiente, también se describen anticuerpos monoclonales anti-TIM3 aislados, o porciones de unión al antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende:

(a) una región CDR1 de la VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 41-45, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 41-45;

(b) una región CDR2 de la VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 46-52 y 122-125, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 46-52 y 122-125;

(c) una región CDR3 de la VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 53-59 y 126-129, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 53-59 y 126-129;

(d) una región CDR1 de la VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 64-65, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 64-65;

(e) una región CDR2 de la VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 66-67, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 66-67; y

y (f) una región CDR3 de la VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 68-71, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 68-71.

Los restos de metionina en las CDR de los anticuerpos pueden oxidarse, dando como resultado una potencial degradación química y la consiguiente reducción de la potencia del anticuerpo. Por consiguiente, también se proporcionan anticuerpos anti-TIM3 que tienen uno o más restos de metionina en las CDR de la cadena pesada y/o ligera reemplazados por restos de aminoácidos que no experimentan una degradación oxidativa. En un aspecto de la descripción, los restos de metionina de las CDR de los anticuerpos 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 están reemplazados por restos de aminoácidos que no experimentan una degradación oxidativa.

De manera similar, los sitios de desaminación se pueden eliminar de los anticuerpos anti-TIM3, particularmente en las CDR.

Las regiones variables de anti-TIM3 descritas en el presente documento pueden unirse (por ejemplo, de manera covalente unirse o fusionarse) a una región Fc, por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que puede ser de cualquier alotipo o isoalotipo, por ejemplo, para la IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); para la IgG2: G2m, G2m23(n); para la IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m1 l(b0), G3m5(bl), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v); y para K: Km, Km1, Km2, Km3 (véase, e.g., Jefferies *et al.* (2009) mAbs 1: 1).

En ciertos aspectos de la descripción, las regiones variables anti-TIM3 descritas en el presente documento están unidas a un Fc sin efector o mayoritariamente sin efector, por ejemplo, IgG1.

En general, las regiones variables descritas en el presente documento se pueden unir a un Fc que comprenda una o más modificaciones, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida sérica, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Asimismo, un anticuerpo descrito en el presente documento se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más restos químicos al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glicosilación, para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada uno de estos aspectos de la descripción se describe con más detalle a continuación. La numeración de los restos de la región Fc es la del índice EU de Kabat.

Un Fc engloba dominios derivados de la región constante de una inmunoglobulina, incluyendo un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. Algunas inmunoglobulinas adecuadas incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y otras clases tales como IgA, IgD, IgE e IgM. La región constante de una inmunoglobulina se define como un polipéptido natural o producido de forma sintética homólogo de la región carboxiterminal de la inmunoglobulina, y puede incluir un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio CH4, por separado o combinados.

Las moléculas de Ig interactúan con múltiples clases de receptores celulares. Por ejemplo, las moléculas de IgG interactúan con tres clases de receptores de Fc (FcγR) específicos para la clase de anticuerpo IgG, en concreto, FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Se ha informado que las secuencias importantes para la unión de la IgG a los receptores FcγR están ubicadas en los dominios CH2 y CH3. La semivida sérica de un anticuerpo está influida por la capacidad de dicho anticuerpo para unirse a un receptor de Fc (FcR).

En ciertos aspectos de la descripción, la región Fc es una región Fc variante, por ejemplo, una secuencia Fc que ha sido modificada (por ejemplo, por sustitución, deleción y/o inserción de aminoácidos) en relación con una secuencia Fc precursora (por ejemplo, un polipéptido Fc no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante), para proporcionar características estructurales y/o actividad biológica deseables,

En general, las variantes de la región constante o de porciones de la misma, por ejemplo, los dominios CH1, CL, bisagra, CH2 o CH3 pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mutaciones, y/o como mucho 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mutación, o 1-10 o 1-5 mutaciones, o comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la de la correspondiente región o dominio natural (dominio CH1, CL, bisagra, CH2 o CH3, respectivamente), siempre que la región constante de la cadena pesada que comprende la variante específica conserve la actividad biológica necesaria.

Por ejemplo, se pueden realizar modificaciones en la región Fc para generar una variante de Fc que (a) tiene mayor o menor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), (b) mayor o menor citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), (c) tiene mayor o menor afinidad por C1q y/o (d) tiene mayor o menor afinidad por un receptor de Fc con respecto al Fc precursor. Generalmente, dichas variantes de la región Fc comprenderán al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. Se considera que la combinación de modificaciones de aminoácidos es particularmente deseable. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc. sustituciones en la misma, por ejemplo, de las posiciones de la región Fc específicas identificadas en el presente documento.

Una región Fc variante también puede comprender una alteración de secuencia en donde los aminoácidos implicados en la formación de puentes de disulfuro se eliminan o reemplazan por otros aminoácidos. Dicha eliminación puede evitar la reacción con otras proteínas que contienen cisteína presentes en la célula hospedadora utilizadas para producir los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento. Incluso cuando se eliminan los restos de cisteína, los dominios Fc monocatenarios todavía pueden formar un dominio Fc dimérico que se mantiene unido de manera no covalente. En otros aspectos de la descripción, la región Fc puede modificarse para hacer que sea más compatible con una célula hospedadora seleccionada. Por ejemplo, se puede eliminar la secuencia PA próxima al extremo amínico de una región Fc nativa típica, que puede ser reconocida por una enzima digestiva en *E. coli*, tal como la prolina iminopeptidasa. En otros aspectos de la descripción, pueden eliminarse uno o más sitios de glicosilación del dominio Fc. Los restos que normalmente se encuentran glicosilados (por ejemplo, asparagina) pueden conferir una respuesta citolítica. Dichos restos pueden eliminarse o sustituirse por restos no glicosilados (por ejemplo, alanina). En otros aspectos de la descripción, los sitios implicados en la interacción con el complemento, tales como el sitio de unión al C1q, pueden eliminarse de la región Fc. Por ejemplo, se puede eliminar o sustituir la secuencia EKK de la IgG1 humana. En ciertos aspectos de la descripción, se pueden eliminar los sitios que afectan a la unión a los receptores de Fc, preferentemente sitios distintos de los sitios de unión al receptor de rescate. En otros aspectos de la descripción, se puede modificar una región Fc para eliminar un sitio de ADCC. Los sitios de ADCC son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) con respecto a los sitios de ADCC en la IgG1. Se divulgan ejemplos específicos de dominios variantes de Fc, por ejemplo, en los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478.

En un aspecto de la descripción, la región bisagra del Fc se modifica de tal forma que se altera el número de restos de cisteína en la región bisagra, por ejemplo, se aumenta o se reduce. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de EE. UU. n.º 5.677.425, a favor de Bodmer *et al.* Se altera el número de restos de cisteína en la región bisagra de Fc para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo. En un aspecto de la descripción, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra, de modo que el anticuerpo tenga una unión a la proteína A estafilocócica (SpA) deteriorada en relación con la unión al dominio Fc-bisagra de la SpA nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de EE. UU. n.º 6.165.745, a favor de Ward *et al.*

En otros aspectos más de la descripción, la región Fc se altera sustituyendo al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, pueden reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 330 y/o 331 por un resto de aminoácido diferente, de tal forma que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc del componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las Patentes de EE. UU. n.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas a favor de Winter *et al.*

En otro ejemplo, pueden reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos 329, 331 y 322 por un resto de aminoácido diferente, de tal forma que el anticuerpo tenga la unión al C1q alterada y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de EE. UU. n.º 6.194.551 a favor de Idusogie *et al.*

En otro ejemplo, se alteran uno o más restos de aminoácidos en las posiciones de aminoácido 231 y 239 para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe con más detalle en la Publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

En otro ejemplo más, la región Fc se puede modificar para disminuir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para disminuir la afinidad por un receptor de Fc modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264,

- 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 o 439. Algunas sustituciones ilustrativas incluyen 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D y 332E. Algunas variantes ilustrativas incluyen 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T y 267E/268F/324T. Otras modificaciones para potenciar las interacciones con el FcγR y el complemento incluyen, pero sin limitación, las sustituciones 298 A, 333A, 334A, 326A, 2471, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 3051 y 396L. Éstas y otras modificaciones se revisan en Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20: 685-691.
- 10 Las modificaciones del Fc que aumentan la unión a un receptor Fcγ incluyen modificaciones de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 324, 327, 329, 330, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, en donde la numeración de los restos de la región Fc es la del índice EU como en Kabat (documento WO00/42072).
- 15 Otras modificaciones del Fc que pueden realizarse en los Fc son aquellas para reducir o anular la unión a los FcγR y/o a las proteínas del complemento, reduciendo o anulando de este modo las funciones efectoras mediadas por el Fc, tales como ADCC, ADCCP y CDC. Algunas modificaciones ilustrativas incluyen, pero sin limitación, sustituciones, inserciones y delecciones en las posiciones 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325, 328, 330 y/o 331 (por ejemplo, 330 y 331), en donde la numeración es según el índice EU. Algunas sustituciones ilustrativas incluyen, pero sin limitación, 234A, 235E, 236R, 237A, 267R, 325L, 328R, 330S y 331S (por ejemplo, 330S y 331S, en donde la numeración es según el índice EU. Una variante de Fc puede comprender 236R/328R. Otras modificaciones para reducir las interacciones del FcγR y el complemento incluyen las sustituciones 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P y 234V, así como la eliminación de la glicosilación en la posición 297 por medios mutacionales o enzimáticos o mediante la producción en organismos, tales como bacterias, que no glicosilan las proteínas. Éstas y otras modificaciones se revisan en Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20: 685-691.
- 20 Opcionalmente, la región Fc puede comprender un resto de aminoácido no natural en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas por un experto en la materia (véanse, las Patentes de EE. UU. n.º 5.624.821; 6.277.375; 6.737.056; 6.194.551; 7.317.091; 8.101.720; las Publicaciones de Patente PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 y WO 06/0201 14).
- 30 También pueden utilizarse variantes del Fc que potencien la afinidad por un receptor inhibitor FcγRIIb. Dichas variantes pueden proporcionar una proteína de fusión Fc con actividades inmunomoduladoras relacionadas con células FcγRIIb, incluyendo, por ejemplo, linfocitos B y monocitos. En un aspecto de la descripción, las variantes de Fc proporcionan selectivamente una afinidad aumentada por FcγRIIb con respecto a uno o más receptores activadores. Las modificaciones para alterar la unión a FcγRIIb incluyen una o más modificaciones en una posición seleccionada del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, 330, 331 y 332, de acuerdo con el índice EU. Algunas sustituciones ilustrativas para potenciar la afinidad del FcγRIIb incluyen, pero sin limitación, 234A, 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235E, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237A, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, 330S, 331S y 332E. Algunas sustituciones ilustrativas incluyen 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W y 328Y. Otras variantes del Fc para mejorar la unión al FcγRIIb incluyen 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E y 267E/328F.
- 40 Las afinidades y propiedades de unión de una región Fc por su ligando pueden determinarse mediante diversos métodos de ensayo *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, métodos en equilibrio (por ejemplo, ensayo de inmuoadsorción enzimática (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o cinéticos (por ejemplo, análisis BIACORE) y otros métodos, tales como ensayos de unión indirectos, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar un marcador o uno o más de los componentes que se van a examinar y/o emplear una variedad de métodos de detección que incluyen, pero sin limitación, marcadores cromógenos, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicos. Puede encontrarse una descripción detallada de las afinidades y cinéticas de unión en Paul, W. E., ed., Fundamental immunology, 4ª ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (1999), que se centra en las interacciones anticuerpo-inmunógeno.
- 50 En ciertos aspectos de la descripción, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diferentes estrategias. Por ejemplo, esto puede realizarse aumentando la afinidad de unión de la región de Fc por el FcRn. Por ejemplo, pueden mutarse uno o más de los siguientes restos: 252, 254, 256, 433, 435, 436, como se describe en la Patente de EE. UU. n.º 6.277.375. Algunas sustituciones ilustrativas específicas incluyen una o más de las siguientes: T252L, T254S y/o T256F. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de EE. UU. n.º 5.869.046
- 60
- 65

y 6.121.022 a favor de Presta *et al.* Otras variantes ilustrativas que aumentan la unión al FcRn y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen sustituciones en las posiciones 259, 308, 428 y 434, incluyendo, por ejemplo, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434I, 434F, 434Y y 434X1. Otras variantes que aumentan la unión del Fc al FcRn incluyen: 250E, 250Q, 428 L, 428F, 250Q/428L (Hinton *et al.* 2004, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6216, Hinton *et al.* 2006 Journal of Immunology 176: 346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 31 1A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields *et al.* Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (9): 6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 31 1 S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall'Acqua *et al.* Journal of Immunology, 2002, 169: 5171-5180, Dall'Acqua *et al.*, 2006, Journal of Biological Chemistry 281: 23514-23524). Otras modificaciones para modular la unión al FcRn se describen en Yeung *et al.*, 2010, J Immunol, 182: 7663-7671.

En ciertos aspectos de la descripción, pueden utilizarse isotipos de IgG híbridos con las características biológicas particulares. Por ejemplo, se puede construir una variante híbrida de IgG1/IgG3 sustituyendo posiciones de la IgG1 en la región CH2 y/o CH3 por aminoácidos de la IgG3 en posiciones donde difieran los dos isotipos. Por tanto, se puede construir un anticuerpo de IgG variante híbrido que comprenda una o más sustituciones, por ejemplo, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R y 436F. En otros aspectos descritos en el presente documento, se puede construir una variante híbrida de IgG1/IgG2 sustituyendo posiciones de la IgG2 en la región CH2 y/o CH3 por aminoácidos de la IgG1 en posiciones donde difieran los dos isotipos. Por tanto, se puede construir un anticuerpo de IgG variante híbrido que comprenda una o más sustituciones, por ejemplo, una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 233E, 234L, 235L, -236G (que hace referencia a una inserción de una glicina en la posición 236) y 327A.

Por otra parte, los sitios de unión en la IgG1 humana para FcγR1, FcγR2, FcγR3 y FcRn se han cartografiado, y se han descrito variantes con una unión mejorada (véase Shields, R.L. *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604). Se ha demostrado que mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión al FcγR3. Adicionalmente, se ha demostrado que los siguientes mutantes de combinación mejoran la unión a FcγR3: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A, que, como se ha demostrado, presentan una unión al FcγR3 y una actividad ADCC mejoradas (Shields *et al.*, 2001). Se han identificado otras variantes de IgG1 con la unión al FcγR3 muy aumentada, incluyendo variantes con las mutaciones S239D/I332E y S239D/I332E/A330L que muestran el mayor aumento de afinidad por el FcγR3, una disminución de la unión al FcγR2 y una fuerte actividad citotóxica en macacos cangrejeros (Lazar *et al.*, 2006). La introducción de las mutaciones triples en anticuerpos tales como alemtuzumab (específico de CD52), trastuzumab (específico de HER2/neu), rituximab (específico de CD20) y cetuximab (específico del EGFR) se tradujo en una actividad ADCC muy aumentada *in vitro*, y la variante S239D/I332E mostró una capacidad mejorada para agotar los linfocitos B en monos (Lazar *et al.* 2006). Además, se han identificado mutantes de IgG1 que contienen las mutaciones L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L que presentan una unión al FcγR3 y una actividad ADCC concomitantemente mejoradas en ratones transgénicos que expresan el FcγR3 humano en modelos de neoplasias malignas de linfocitos B y cáncer de mama (Stavenghagen *et al.*, 2007; Nordstrom *et al.*, 2011). Otros mutantes de Fc que pueden utilizarse incluyen: S298A/E333A/L334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L y M428L/N434S.

En ciertos aspectos de la descripción, se elige un Fc que tiene una unión reducida a los FcγR. Un Fc ilustrativo, por ejemplo, el Fc de la IgG1, con una unión reducida al FcγR, comprende las tres sustituciones de aminoácidos siguientes: L234A, L235E y G237A.

En ciertos aspectos de la descripción, se elige un Fc que tiene una fijación reducida al complemento. Un Fc ilustrativo, por ejemplo, el Fc de la IgG1, con fijación reducida al complemento, tiene las dos sustituciones de aminoácidos siguientes: A330S y P331S.

En ciertos aspectos de la descripción, se elige un Fc que esencialmente no tiene función efectora, es decir, tiene una unión reducida a los FcγR y una fijación reducida al complemento. Un Fc ilustrativo, por ejemplo, el Fc de la IgG1, sin función efectora, comprende las siguientes mutaciones: L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.

Cuando se utiliza un dominio constante de la IgG4, puede incluir la sustitución S228P, que imita la secuencia de la bisagra de la IgG1 y, de este modo, estabiliza las moléculas de IgG4.

En otro aspecto más de la descripción, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). Se puede alterar la glicosilación para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por un antígeno. Dichas modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región estructural variable para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho enfoque se describe con más detalle en las Patentes de EE. UU. n.º 5.714.350 y 6.350.861 a favor de Co *et al.*

La glicosilación de la región constante en N297 puede impedirse mutando el resto N297 por otro resto, por ejemplo, N297A, y/o mutando un aminoácido adyacente, por ejemplo, 298, para reducir de este modo la glicosilación en N297.

Adicionalmente o como alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras de GlcNAc bisectantes aumentadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterada aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con la maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con la maquinaria de glicosilación alterada, y se pueden utilizar como células hospedadoras en las que expresar los anticuerpos recombinantes anti-TIM3 descritos en el presente documento para producir de este modo un anticuerpo con la glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hanai *et al.* describe una estirpe celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de manera que los anticuerpos expresados en dicha estirpe celular presentan hipofucosilación. La Publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la estirpe celular CHO, células Led 3, con capacidad reducida para unir fucosa a hidratos de carbono unidos a la Asn(297), que también da como resultado una hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). La Publicación PCT WO 99/54342 de Umana *et al.* describe estirpes celulares genomodificadas para que expresen glicosiltransferasas modificadoras de glicoproteínas {por ejemplo, la beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)}, de modo que los anticuerpos expresados en las estirpes celulares genomodificadas presentan un aumento de las estructuras de GlcNAc bisectantes que da como resultado un aumento de la actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17: 176-180).

Otra modificación de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento es la pegilación. Un anticuerpo puede pegarse para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento del mismo, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster o un derivado de aldehído reactivo de PEG, en unas condiciones en las que uno o más grupos de PEG comienzan a unirse al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. En algunos aspectos de la descripción, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Como se utiliza en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende incluir cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono alcoxi (C1-C10) o ariloxipolietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertos aspectos de la descripción, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. En la técnica se conocen métodos de pegilación de proteínas, y se pueden aplicar a los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura *et al.* y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa *et al.*

En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 comprende una región constante de la cadena pesada y una región constante de la cadena ligera, en donde la región constante de la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 263-266.

VIII. Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos anti-TIM3, por ejemplo, los descritos en el presente documento, tienen algunas o todas las características físicas de los anticuerpos específicos anti-TIM3 descritos en el presente documento, tales como las características descritas en los Ejemplos.

Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento pueden contener uno o más sitios de glicosilación en la región variable de la cadena ligera o de la pesada. Dichos sitios de glicosilación pueden dar como resultado un aumento de la inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración del pK del anticuerpo debido a una unión alterada con el antígeno (Marshall *et al.*, (1972) Annu Rev Biochem 41: 673-702; Gala y Morrison (2004) J. Immunol 172: 5489-94; Wallick *et al.*, (1988) J Exp Med 168: 1099-109; Spiro (2002) Glycobiology 12: 43R-56R; Parekh *et al.*, (1985) Nature 316: 452-7; Mimura *et al.*, (2000) Mol Immunol 37: 697-706). Se sabe que la glicosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. En algunos casos, el anticuerpo anti-TIM3 no contiene glicosilación en la región variable. Esto se puede conseguir seleccionando anticuerpos que no contienen el motivo de glicosilación en la región variable o mutando los restos de la región de glicosilación.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento no contienen sitios de isomería de asparagina. La desamidación de la asparagina puede producirse en secuencias N-G o D-G y puede dar como resultado la creación de un resto de ácido isoaspártico que introduce un pliegue en la cadena polipeptídica y disminuye su estabilidad (efecto del ácido isoaspártico).

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico (pI) único, que generalmente se encuentra en el intervalo de pH de entre 6 y 9,5. El pI de un anticuerpo IgG1 normalmente se encuentra en el intervalo de pH de 7-9,5 y el pI de un anticuerpo IgG4 generalmente se encuentra en el intervalo de pH de 6-8. Se especula que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden tener algún desplegamiento e inestabilidad en condiciones *in vivo*. Por lo tanto, un anticuerpo anti-TIM3 puede contener un valor del pI que esté dentro del intervalo normal. Esto se puede conseguir seleccionando anticuerpos con un pI en el intervalo normal o mutando restos de superficie cargados.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión característica, indicando una elevada temperatura de fusión una

mayor estabilidad global *in vivo* (Krishnamurthy R y Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3: 361-71). En general, la T_{mi} (la temperatura de desplegamiento inicial) puede ser mayor de 60 °C, mayor de 65 °C o mayor de 70 °C. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir mediante calorimetría diferencial de barrido (Chen *et al.*, (2003) *Pharm Res* 20: 1952-60; Ghirlando *et al.*, (1999) *Immunol Lett* 68: 47-52) o dicroísmo circular (Murray *et al.*, (2002) *J. Chromatogr Sci* 40: 343-9).

En un aspecto de la descripción, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La degradación de un anticuerpo puede medirse utilizando electroforesis capilar (EC) y MALDI-EM (Alexander A J y Hughes D E (1995) *Anal Chem* 67: 3626-32).

En otro aspecto de la descripción, se seleccionan anticuerpos que tienen unos efectos de agregación mínimos, que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria no deseada y/o unas propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. En general, son aceptables los anticuerpos que tienen una agregación del 25 % o menor, 20 % o menor, 15 % o menor, 10 % o menor o 5 % o menor. La agregación puede medirse mediante varias técnicas, incluyendo columna de exclusión por tamaño molecular (SEC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y dispersión de luz.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 tiene una combinación de estructuras y propiedades descritas en las secciones (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX) anteriores. En un aspecto de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 compite de forma cruzada con los anticuerpos 13A3, 17C3, 8B9, 8C4, 3G4, 17C8 y 9F6, como se describe en las Secciones I y/o VI, derivado de la secuencia de la estirpe germinal como se describe en la Sección III, tiene mutaciones conservadas como se describe en la Sección V, y/o tiene homología con los anticuerpos anti-TIM3 de las Secciones I y II, como se describe en la Sección IV, junto con una o más propiedades funcionales descritas en cualquier parte del presente documento.

IX. Métodos de genomodificación de anticuerpos

Como se ha comentado anteriormente, los anticuerpos anti-TIM3 que tienen las secuencias VH y VL divulgadas en el presente documento se pueden usar para crear nuevos anticuerpos anti-TIM3 modificando las secuencias VH y/o VL, o la(s) región(es) constante(s) unidas a las mismas. Por lo tanto, en otro aspecto descrito en el presente documento, las características estructurales de un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento se utilizan para crear anticuerpos anti-TIM3 estructuralmente relacionados que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, tales como unión a la TIM3 humana y a la TIM3 de macaco cangrejero. Por ejemplo, una o más regiones 17C3, 8B9, 8C4, 3G4, 17C8, 9F6, 13A3 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18 pueden combinarse recombinantemente con regiones estructurales conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-TIM3 genomodificados recombinantemente adicionales descritos en el presente documento, como se ha analizado anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de genomodificación es una o más de las secuencias de la VH y/o VL proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo genomodificado, no es necesario realmente preparar (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más secuencias de la VH y/o la VL descritas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la(s) secuencia(s) se usa como el material de partida para crear una(s) secuencia(s) de "segunda generación" derivada(s) de la(s) secuencia(s) original(es) y, a continuación, se prepara(n) la(s) secuencia(s) de "segunda generación" y se expresa(n) como una proteína.

Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos para preparar anticuerpo anti-TIM3 que comprende:

- (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 41 a 45, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 46 a 52 y 122-125, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 53 a 59 y 126-129; y (ii) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 64 y 65, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 66 y 67, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 68 a 71;
- (b) alterar al menos un resto de aminoácido de la secuencia del anticuerpo de la región variable de la cadena pesada y/o de la secuencia del anticuerpo de la región variable de la cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y
- (c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Las técnicas de biología molecular convencionales se pueden usar para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada. En algunos aspectos de la descripción, el anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) de anticuerpo alterada(s) es uno que conserva una, alguna o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, que incluyen:

- (1) se une a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una KD de 10 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;

- (2) se une a la TIM3 humana soluble, por ejemplo, con una KD de 100 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 100 nM), por ejemplo, como se mide mediante Biacore, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (3) se une a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una CE₅₀ de 1 µg/ml o menor (por ejemplo, de 0,01 µg/ml a 1 µg/ml), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);
- (4) se une a la TIM3 humana unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (5) se une a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una CE₅₀ de 20 µg/ml o menor (por ejemplo, de 0,01 µg/ml a 20 µg/ml), por ejemplo, como se mide mediante citometría de flujo (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos);
- (6) se une a la TIM3 de macaco cangrejero unida a membrana, por ejemplo, con una K_D de 1 nM o menor (por ejemplo, de 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante un análisis de Scatchard, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (7) inducen o mejoran la activación de los linfocitos T (por ejemplo, bloqueando o reduciendo el efecto inhibitor de la TIM3), como lo demuestra (i) el aumento de la producción de IFN-γ en linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL) y/o (ii) el aumento de la proliferación de linfocitos T que expresan la TIM3 (por ejemplo, linfocitos Th1 o TIL), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (8) estimular la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (9) inhibir la unión de la fosfatidilserina a la TIM3, por ejemplo, como se mide mediante el ensayo de bloqueo "en tándem" de PS-hTIM3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (10) no internalizar ni regular por disminución la TIM3 de la superficie celular cuando se unen a la TIM3 de las células;
- (11) se une a una de las siguientes regiones del dominio extracelular de la TIM3 humana (SEQ ID NO: 290): (a) CPVFECG (SEQ ID NO: 296); (b) RIQIPGIMND (SEQ ID NO: 298); (c) CPVFECG y RIQIPGIMND (SEQ ID NOs: 296 y 298, respectivamente); y (d) WTSRYWLNQDFR (SEQ ID NO: 297), por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (12) tienen una unión reducida a la TIM3 humana en la que uno o más de los aminoácidos L48, C58, P59, V60, F61, E62, C63, G64, W78, S80, R81, W83, L84, G86, D87, R89, D104, R111, Q113, G116, M118 y D120 (según la numeración de la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) se sustituyen por otro aminoácido relativo a la unión a la TIM3 humana natural, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (13) competir en cualquier dirección o en ambas direcciones por la unión a la TIM3 humana con un anticuerpo que comprende los dominios VH y VL de una cualquiera de 13A3, 3G4, 17C3, 17C8, 9F6, 8B9, 8C4 o TIM3.7, TIM3.8, TIM3.10, TIM3.11, TIM3.12, TIM3.13, TIM3.14, TIM3.15, TIM3.16, TIM3.17 y TIM3.18, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (14) se une a las regiones de la TIM3 humana ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367) y ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) como se determina mediante HDX-EM, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos;
- (15) tener las regiones variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera que interactúan con al menos 5, 10, 15, 20 o todos los aminoácidos siguientes de la TIM3 humana: P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120, y opcionalmente T70 y/o I112, como se determina mediante radiocristalografía (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos; numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)); y/o
- (16) (a) tienen una unión reducida a la TIM3 humana en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los aminoácidos C58, P59, F61, E62, C63, R111, D120, y opcionalmente D104 y Q113 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20)) están sustituidos por otro aminoácido relativo a la unión con TIM3 humana natural; (b) se une a ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368) y ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 373), como se determina mediante HDX-EM, como se describe en los Ejemplos; y/o (c) compiten o bloquean de forma cruzada la unión de 13A3 o TIM3.18.IgG1.3, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

El anticuerpo alterado puede presentar una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o todas las propiedades funcionales expuestas de (1) a (16) anteriormente. Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar mediante ensayos convencionales disponibles en la técnica y/o descritos en el presente documento, tales como los expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA, FACS).

En ciertos aspectos de la descripción de los métodos de genomodificación de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente o selectivamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante del anticuerpo anti-TIM3, y los anticuerpos anti-TIM3 modificados resultantes se pueden seleccionar en función de su actividad de unión y/o de otras propiedades funcionales como se describe en el presente documento. En la técnica se han descrito métodos mutacionales. Por ejemplo, en el documento Publicación PCT WO 02/092780 de Short se describen métodos para la creación y selección de mutaciones de anticuerpo utilizando mutagénesis de saturación, ensamblaje de ligación sintética o una combinación de los mismos. Alternativamente, en la Publicación PCT WO 03/074679 de Lazar *et al.* se describen métodos de uso de métodos de cribado informáticos para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

X. Moléculas de ácidos nucleicos

Otro aspecto descrito en el presente documento concierne a moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares o de otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, otro ADN cromosómico, por ejemplo, el ADN cromosómico que está unido al ADN aislado en la naturaleza) o proteínas, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeo con CsCl, cromatografía en columna, enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico descrito en el presente documento puede ser, por ejemplo, ADN o ARN, y puede contener o no secuencias intrónicas. En ciertos aspectos de la descripción, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se pueden obtener mediante técnicas convencionales de biología molecular. En el caso de anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos portadores de genes de inmunoglobulina humana, como se describe con más detalle más adelante), se pueden obtener ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo producidos por el hibridoma mediante una amplificación convencional por PCR o técnicas de clonación de ADNc. En el caso de anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulinas (por ejemplo, utilizando técnicas de expresión en fagos), se puede recuperar de la genoteca el ácido nucleico que codifica el anticuerpo.

Algunas moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento son las que codifican las secuencias de la VH y la VL de los anticuerpos 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4, 17C8 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18. Las secuencias de ADN ilustrativas que codifican las secuencias de la VH de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8 se exponen en las SEQ ID NOs: 167 a 173, 245 a 254 y 359. Las secuencias de ADN ilustrativas que codifican las secuencias de la VL de 13A3, 17C3 y 3G4 se exponen en la SEQ ID NO: 193. Las secuencias de ADN ilustrativas que codifican las secuencias de la VL de 8B9, 8C4 y 17C8 se exponen en la SEQ ID NO: 194. Las secuencias de ADN ilustrativas que codifican las secuencias de la VL de 9F6 se exponen en las SEQ ID NOs: 194 a 196. Las secuencias de ADN ilustrativas que codifican las secuencias de la cadena pesada de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8 se exponen en las SEQ ID NOs: 134 a 161, 205 a 244 y 355-358. Las secuencias de ADN ilustrativas que codifican las secuencias de la cadena ligera de 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8 se exponen en las SEQ ID NOs: 162-166.

Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican los dominios de la VH y la VL maduras de los anticuerpos 13A3.IgG1.1 y 13A3.IgG1.3 (misma región variable) se exponen como las SEQ ID NOs: 167 y 193, respectivamente. Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican las cadenas pesadas maduras de los anticuerpos 13A3.IgG1.1 y 13A3.IgG1.3 se exponen como las SEQ ID NOs: 134 y 148, respectivamente, y un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera madura de los anticuerpos 13A3.IgG1.1 y 13A3.IgG1.3 se expone como la SEQ ID NO: 162.

Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican los dominios de la VH y la VL maduras de los anticuerpos 8B9.IgG 11 y 8B9.IgG 13 (misma región variable) se exponen como las SEQ ID NOs: 168 y 194, respectivamente. Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican las cadenas pesadas maduras de los anticuerpos 8B9.IgG1.1 y 8B9.IgG1.3 se exponen como las SEQ ID NOs: 135 y 149, respectivamente, y un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera madura de los anticuerpos 8B9.IgG1.1 y 8B9.IgG1.3 se expone como la SEQ ID NO: 163.

Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican los dominios de la VH y la VL maduras de los anticuerpos 8C4.IgG 11 y 8C4.IgG 13 (misma región variable) se exponen como las SEQ ID NOs: 169 y 194, respectivamente. Ácidos nucleicos ilustrativos que codifican las cadenas pesadas maduras de los anticuerpos 8C4.IgG1.1 y 8C4.IgG1.3 se exponen como las SEQ ID NOs: 136 y 150, respectivamente, y un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera madura de los anticuerpos 8C4.IgG1.1 y 8C4.IgG1.3 se expone como la SEQ ID NO: 163.

Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican los dominios de la VH y la VL maduras de los anticuerpos 17C3.IgG1.1 y 17C3.IgG1.3 (misma región variable) se exponen como las SEQ ID NOs: 170 y 193, respectivamente. Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican las cadenas pesadas maduras de los anticuerpos 17C3.IgG1.1 y 17C3.IgG1.3 se exponen como las SEQ ID NOs: 137 y 151, respectivamente, y un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera madura de los anticuerpos 17C3.IgG1.1 y 17C3.IgG1.3 se expone como la SEQ ID NO: 162.

Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican los dominios de la VH y la VL maduras de los anticuerpos 9F6.IgG1.1 y 9F6.IgG 13 (misma región variable) se exponen como las SEQ ID NOs: 171 y 197, respectivamente. Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican las cadenas pesadas maduras de los anticuerpos 9F6.IgG1.1 y 9F6.IgG 13 se exponen como las SEQ ID NOs: 138 y 152, respectivamente, y un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera madura de los anticuerpos 9F6.IgG1.1 y 9F6.IgG1.3 se expone como la SEQ ID NO: 166.

Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican los dominios de la VH y la VL maduras de los anticuerpos 3G4.IgG 11 y 3G4.IgG 13 (misma región variable) se exponen como las SEQ ID NOs: 172 y 193, respectivamente. Los ácidos

nucleicos ilustrativos que codifican las cadenas pesadas maduras de los anticuerpos 3G4.IgG1.1 y 3G4.IgG1.3 se exponen como las SEQ ID NOs: 139 y 153, respectivamente, y un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera madura de los anticuerpos 3G4.IgG1.1 y 3G4.IgG1.3 se expone como la SEQ ID NO: 162.

- 5 Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican los dominios de la VH y la VL maduras de los anticuerpos 17C8.IgG1.1 y 17C8.IgG1.3 (misma región variable) se exponen como las SEQ ID NOs: 173 y 194, respectivamente. Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican las cadenas pesadas maduras de los anticuerpos 17C8.IgG1.1 y 17C8.IgG1.3 se exponen como las SEQ ID NOs: 140 y 154, respectivamente, y un ácido nucleico ilustrativo que codifica la cadena ligera madura de los anticuerpos 17C8.IgG1.1 y 17C8.IgG1.3 se expone como la SEQ ID NO: 163.

- 10 Los ácidos nucleicos ilustrativos anteriores pueden incluir además un péptido de señalización expuesto en las SEQ ID NOs: 267 a 271 y 361. Las secuencias de nucleótidos que codifican estos péptidos de señalización se exponen como las SEQ ID NOs: 272 a 276, 362 y 363.

- 15 Las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento pueden modificarse para delecionar secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción, o para optimizar los codones.

- 20 Un método para fabricar 13A3 IgG1.1, 8B9 IgG1.1, 8C4 IgG1.1, 17C3 IgG1.1, 9F6 IgG1.1, 3G4 IgG 1.1, 17C8 IgG1.1 y/o TIM3.2 a la TIM3.18 IgG1.1 puede comprender expresar la cadena pesada y las cadenas ligeras en una estirpe celular que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligeras con un péptido de señalización, por ejemplo, para 13A3 IgG1.1, las SEQ ID NOs: 269 y 268, respectivamente. Un método para fabricar 13A3 IgG1.3, 8B9 IgG1.3, 8C4 IgG1.3, 17C3 IgG1.3, 9F6 IgG1.3, 3G4 IgG1.3 y/o 17C8 IgG1.3 puede comprender expresar la cadena pesada y las cadenas ligeras en una estirpe celular que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras con un péptido de señalización, por ejemplo, para 13A3 IgG1.3, las SEQ ID NOs: 274 y 273, respectivamente. En el presente documento también se engloban células hospedadoras que comprenden estas secuencias de nucleótidos.

- 30 Una vez que se han obtenido los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo completo, en genes de fragmentos Fab o en un gen del scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica la VL o la VH se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. La expresión "unido operativamente", como se utiliza en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se juntan de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el mismo marco de lectura.

- 40 El ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir en un gen de la cadena pesada completa uniendo operativamente el ADN que codifica la VH con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (bisagra, CH1, CH2 y/o CH3). En la técnica se conocen las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH n.º 91-3242), y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones pueden obtenerse mediante una amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, por ejemplo, una región de IgG1. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica la VH puede estar unido operativamente a otra molécula de ADN que codifica únicamente la región constante CH1 de la cadena pesada.

- 50 El ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de la cadena ligera completa (así como en un gen de la cadena ligera del Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica la VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH n.º 91-3242), y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones pueden obtenerse mediante una amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

- 60 Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican la VH y la VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de manera que las secuencias de la VH y la VL puedan expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas por el conector flexible (véase, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348: 552-554).

- 65 También se describen en el presente documento moléculas de ácidos nucleicos que codifican secuencias VH y VL que son homólogas de las de los anticuerpos 17C3, 8B9, 8C4, 3G4, 17C8, 9F6, 13A3 y cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18. Las moléculas de ácidos nucleicos ilustrativas codifican secuencias de la VH y la VL que son idénticas en al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos

un 95 % o al menos un 99 % idénticas, a las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias VH y VL de los anticuerpos 17C3, 8B9, 8C4, 3G4, 17C8, 9F6, 13A3 o cualquiera de TIM3.2 a TIM3.18. En el presente documento también se describen moléculas de ácidos nucleicos con sustituciones conservadoras (es decir, sustituciones que no alteran la secuencia de aminoácidos resultante después de la traducción de la molécula de ácido nucleico), por ejemplo, para la optimización de codones.

También se describen ácidos nucleicos que codifican las regiones VH y/o VL de los anticuerpos anti-TIM3, tales como los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones VH y/o VL de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento.

También se describen ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y/o la cadena ligera de los anticuerpos anti-TIM3, tales como los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento.

XI. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales anti-TIM3 descritos en el presente documento se pueden producir utilizando una variedad de técnicas conocidas, tales como la técnica convencional de hibridación de células somáticas descrita por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, también se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación vírica u oncogénica de linfocitos B, técnica de expresión en fagos usando genotecas de anticuerpos humanos.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. En la técnica se conocen protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

Los anticuerpos anti-TIM3 quiméricos o humanizados descritos en el presente documento pueden prepararse tomando como base la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. Se puede obtener el ADN que codifica las inmunoglobulinas de la cadena pesada y ligera a partir del hibridoma murino de interés y se puede genomodificar para que contenga secuencias de inmunoglobulinas no murinas (por ejemplo, humanas) utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n.º 4.816.567 a favor de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden insertar en una región estructural humana utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n.º 5.225.539 a favor de Winter, y las Patentes de EE. UU. n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a favor de Queen *et al.*).

En un aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra la TIM3 se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos portadores partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema murino. En el presente documento, estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y en conjunto se denominan en el presente documento "ratones con Ig humana".

El HUMAB-MOUSE® (Medarex, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias desorganizadas de inmunoglobulina de la cadena pesada (μ y γ) y ligera k, junto con mutaciones dirigidas que activan los locus de la cadena μ y k endógena (véase, por ejemplo, Lonberg, *et al.*, (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de la IgM o k de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanas introducidos experimentan un intercambio de clase y una mutación somática para generar un monoclonal humano de IgGk de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764: 536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas que portan dichos ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J. *et al.*, (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *Immunol.* 152: 2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse además, las Patentes de EE. UU. n.º 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas a favor de Lonberg y Kay; la Patente de EE. UU. n.º 5.545.807 a favor de Surani *et al.*; las Publicaciones PCT n.º WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO

97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas a favor de Lonberg y Kay; y la Publicación PCT n.º WO 01/14424 a favor de Korman *et al.*

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se crean utilizando un ratón portador de secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en el presente documento "ratones KM", se describen con detalle en la Publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.*

Aún más, en la técnica se dispone de sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y que pueden utilizarse para crear los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede utilizarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. n.º 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 a favor de Kucherlapati *et al.*

Por otra parte, en la técnica se dispone de sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden utilizarse para crear los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden utilizar ratones que portan un transcromosoma de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; dichos ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727. Asimismo, en la técnica se han descrito vacas que portan transcromosomas de la cadena pesada y ligera humanas (Kuroiwa *et al.* (2002) Nature Biotechnology 20: 889-894) y pueden utilizarse para crear los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento.

Los sistemas de ratón adicionales descritos en la técnica para crear anticuerpos humanos, por ejemplo, anticuerpos anti-TIM3 humanos, incluyen (i) el ratón VELOCLMMUNE® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), en el que las regiones variables endógenas de la cadena pesada y ligera del ratón se han reemplazado, mediante recombinación homóloga, por regiones variables de la cadena pesada y ligera humanas, unidas operativamente a las regiones constantes de ratón endógenas, de manera que se crean los anticuerpos quiméricos (V humana/ C de ratón) en los ratones, y a continuación se convierten posteriormente en anticuerpos completamente humanos utilizando las técnicas de ADN recombinantes convencionales; y (ii) el ratón MEMO® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), en el que el ratón contiene regiones variables desorganizadas de la cadena pesada y ligera humanas pero una única región variable de la cadena ligera común humana reorganizada. Dichos ratones, y el uso de los mismos para crear los anticuerpos, se describen en, por ejemplo, el documento WO 2009/15777, el documento US 2010/0069614, el documento WO 2011/072204, el documento WO 2011/097603, el documento WO 2011/163311, el documento WO 2011/163314, el documento WO 2012/148873, el documento US 2012/0070861 y el documento US 2012/0073004.

Los anticuerpos monoclonales anti-TIM3 humana descritos en el presente documento también pueden prepararse utilizando métodos de expresión en fagos para el cribado de genotecas de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de expresión en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo: las Patentes de EE. UU. n.º 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 a favor de Ladner *et al.*; las Patentes de EE. UU. n.º 5.427.908 y 5.580.717 a favor de Dower *et al.*; las Patentes de EE. UU. n.º 5.969.108 y 6.172.197 a favor de McCafferty *et al.*; y las Patentes de EE. UU. n.º 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 a favor de Griffiths *et al.*

Los anticuerpos monoclonales anti-TIM3 humana descritos en el presente documento también pueden prepararse utilizando ratones SCID en los que las células inmunitarias humanas se han reconstituido de manera que se puede generar una respuesta de anticuerpo humano tras la inmunización. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. n.º 5.476.996 y 5.698.767 a favor de Wilson *et al.*

XI.A. Inmunizaciones

Para generar anticuerpos contra la TIM3 completamente humanos, se pueden inmunizar ratones transgénicos o transcromosómicos que contienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones HCol2, HCo7 o KM) con una preparación purificada o enriquecida en el antígeno TIM3 y/o en células que expresan la TIM3 o un fragmento de la misma, como se describe para otros antígenos, por ejemplo, por Lonberg *et al.*, (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild *et al.*, (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y el documento WO 98/24884. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica la TIM3 humana o un fragmento del mismo. En algunos aspectos de la descripción, los ratones tendrán 6-16 semanas de vida después de la primera infusión. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o enriquecida (5-50 µg) del antígeno contra la TIM3 recombinante para inmunizar los ratones HuMab por vía intraperitoneal. En caso de que las inmunizaciones que utilizan una preparación purificada o enriquecida del antígeno TIM3 no den como resultado anticuerpos, los ratones también se pueden inmunizar con células que expresen la TIM3, por ejemplo, una estirpe celular, para promover las respuestas inmunitarias. Algunas estirpes celulares ilustrativas incluyen estirpes celulares CHO y Raji estables que sobreexpresan la TIM3.

Las experiencia acumulada con diferentes antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuAmb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC) con antígeno en adyuvante de

Ribi, seguido de inmunizaciones IP/SC cada dos semanas (hasta un total de 10) con antígeno en adyuvante de Ribi. Se puede monitorizar la respuesta inmunitaria durante el protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por extracción de muestras de sangre retroorbitales. El plasma se puede cribar mediante ELISA y FACS (como se describe más adelante), y para las fusiones pueden utilizarse ratones con suficiente concentración de inmunoglobulina humana anti-TIM3. Los ratones se pueden revacunar por vía intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo y los ganglios linfáticos. Se espera que pueda ser necesario realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Normalmente, para cada antígeno se inmunizan entre 6 y 24 ratones. Normalmente, se utilizan las estirpes HCo7, HCo2 y KM. Además, tanto el transgén HCo7 como HCo2 se pueden crear juntos en un único ratón teniendo dos transgenes humanos diferentes de la cadena pesada (HCo7/HCo2).

XI.B. Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra la TIM3

Para generar los hibridomas que producen anticuerpos anti-TIM3 monoclonales humanos descritos en el presente documento, se pueden aislar esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse con una estirpe celular inmortalizada apropiada, tal como una estirpe celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden cribar en función de la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, se pueden fusionar suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con células de mieloma de ratón no secretoras de Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG. Las células pueden sembrarse en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación en medio selectivo. Después de varias semanas, las células pueden cultivarse en medio. Los pocillos individuales pueden cribarse a continuación mediante ELISA para detectar los anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce un crecimiento considerable del hibridoma, el medio puede observarse normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo se pueden volver a colocar en placas, cribarse de nuevo y, si siguen siendo positivos para la IgG humana, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar al menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, se pueden cultivar los subclones estables *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para la caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales, se pueden cultivar los hibridomas seleccionados en matraces rotatorios de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida se puede comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alta resolución para garantizar la pureza. La solución tampón se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar por DO280 utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en alícuotas y conservarse.

XI.C. Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales contra la TIM3

Los anticuerpos se pueden producir en un transfectoma de células hospedadoras utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinantes y métodos de transfección génica, como es bien conocido en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, para expresar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, los ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o completas, se pueden obtener mediante técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación del ADNc utilizando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés), y los ADN se pueden insertar en vectores de expresión de manera que los genes estén unidos operativamente a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "unido operativamente" pretende significar que un gen de un anticuerpo se liga en un vector de modo que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector cumplen con su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula de expresión hospedadora utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores distintos, o ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el(los) vector(es) de expresión mediante métodos convencionales (por ejemplo, unión de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y en el vector, o unión de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento pueden utilizarse para crear genes de anticuerpos completos de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en los vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera del isotipo deseado, de manera que el segmento V_H se une operativamente al segmento o segmentos C_H dentro del vector, y el segmento V_L se une operativamente al segmento C_L dentro del vector.

Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señalización que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula hospedadora. El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de modo que el péptido de señalización esté unido dentro del marco de lectura al extremo amínico del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de señalización puede ser un péptido de señalización de inmunoglobulina o un péptido de señalización heterólogo (es decir, un péptido de señalización de una proteína que no es una inmunoglobulina).

En aspectos ilustrativos de la descripción, pueden utilizarse los siguientes péptidos de señalización de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos humanos: MDWTWRVFCLLAVAPGAHS (SEQ ID NO: 267); METPAQLLFLLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 268); MKHLWFFLLLVAAAPRWLS (SEQ ID NO: 269); MEFGSLWWFLVAILKGVQC (SEQ ID NO: 270); MDMRVPAQLLGLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 271) o MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 361). En un aspecto particular de la descripción, una secuencia de señalización utilizada para la expresión de uno cualquiera de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento es la SEQ ID NO: 361. Las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos anti-TIM3 pueden expresarse con la secuencia de señalización respectiva que estaba unida a cada cadena en el hibridoma a partir del cual se clonaron. A continuación se muestran las secuencias de señalización de diferentes anticuerpos anti-TIM3 tal y como están presentes en el hibridoma a partir del cual se clonaron, secuencias de señalización que pueden utilizarse para expresar el mismo anticuerpo u otro anticuerpo:

(i) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VH de 13A3: MKHLWFFLLLVAAAPRWLS (SEQ ID NO: 269)

(ii) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VH de 13A3:

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCAGATGGGTCCTGTCC (SEQ ID NO: 274)

(iii) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VL de 13A3: METPAQLLFLLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 268)

(iv) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VL de 13A3:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 273)

(v) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VH de 8B9: MKHLWFFLLLVAAAPRWLS (SEQ ID NO: 269)

(vi) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VH de 8B9:

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCAGATGGGTCCTGTCC (SEQ ID NO: 274)

(vii) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VL de 8B9: METPAQLLFLLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 268)

(viii) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VL de 8B9:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 273)

(ix) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VH de 8C4: MKHLWFFLLLVAAAPRWLS (SEQ ID NO: 269)

(x) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VH de 8C4:

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCAGATGGGTCCTGTCC (SEQ ID NO: 274)

(xi) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VL de 8C4: METPAQLLFLLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 268)

(xii) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VL de 8C4:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 273)

(xiii) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VH de 17C3: MDWTWRVFCLLAVAPGAHS (SEQ ID NO: 267)

(xiv) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VH de 17C3:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 272)

(xv) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VL de 17C3: METPAQLLFLLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 268)

(xvi) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VL de 17C3:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 273)

(xvii) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VH de 9F6: MEFGSLWWFLVAILKGVQC (SEQ ID NO: 270)

(xviii) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VH de 9F6:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 275)

(xix) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VL1 de 9F6: MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO: 271)

(xx) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VL1 de 9F6:

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 276)

(xxi) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VL2 y la VL3 de 9F6: METPAQLLFLLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 268)

(xxii) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VL2 y la VL3 de 9F6:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 273)

(xxiii) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VH de 3G4: MEFGSLWWFLVAILKGVQC (SEQ ID NO: 270)

(xxiv) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VH de 3G4:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 275)

(xxv) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VL de 3G4: METPAQLLFLLLLWLPDITG (SEQ ID NO: 268)

(xxvi) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VL de 3G4:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 273)

(xxvii) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VH de 17C8: MEFGSLWWFLVAILKGVQC

(SEQ ID NO: 270)

(xxviii) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VH de 17C8:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 275)

(xxix) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de la VL de 17C8: METPAQLLLLLLWLPDTTG

(SEQ ID NO: 268)

(xxx) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la VL de 17C8:

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO: 273).

En otro aspecto de la descripción, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-TIM3 (por ejemplo, de TIM3.2 a TIM3.18) pueden genomodificarse con secuencias de señalización que difieren de las presentes en los hibridomas a partir de los que fueron clonados. Algunos ejemplos de dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, los siguientes:

(i) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la cadena pesada:

ATGAGGGCTTGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGAGAGCGCTCGCA (SEQ ID NO: 362)

(ii) Secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de señalización de la cadena ligera:

ATGAGGGCTTGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGCGCGCCTTGCC (SEQ ID NO: 363)

(iii) Secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización de las cadenas pesadas y ligeras:

MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 361).

Además de los genes de las cadenas de los anticuerpos, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de las cadenas de los anticuerpos en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar, el nivel de expresión deseado de la proteína, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus símico 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Alternativamente, pueden utilizarse secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la globina β . Aún más, los elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contienen secuencias del promotor temprano del SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466-472).

Además de los genes de las cadenas de los anticuerpos y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. n.º 4.399.216, 4.634.665, 5.179.017, todas a favor de Axel *et al.*). Por ejemplo, normalmente, el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diferentes formas del término "transfección" engloben una amplia variedad de técnicas utilizadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionte o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares.

Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento en células hospedadoras procariontes o eucariotas, la expresión de los anticuerpos en células eucariotas, y lo más preferentemente en células hospedadoras de mamífero, es la más preferida debido a que dichas células eucariotas, y en particular las células de mamífero, son más propensas que las células procariontes a ensamblar y secretar un anticuerpo adecuadamente plegado e inmunitariamente activo. Se ha notificado que la expresión procarionte de los genes de un anticuerpo es ineficaz para la producción de altas producciones de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6: 12-13).

Ciertas células hospedadoras de mamífero para la expresión de los anticuerpos anti-TIM3 recombinantes descritos en el presente documento incluyen de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, usadas con un marcador de selección de la DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 759: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión génica GS divulgado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP

338.841. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen mediante el cultivo de las células hospedadoras durante un periodo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo mediante los métodos de purificación de proteínas convencionales.

XII. Ensayos

Puede analizarse la unión de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento a la TIM3 mediante, por ejemplo, un ELISA convencional. En resumen, las placas de microtitulación se recubren con TIM3 purificada, y a continuación se bloquean con albúmina sérica bovina. Se añaden a cada pocillo diluciones de anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma de ratones inmunizados con TIM3) y se incuban. Se lavan las placas y se incuban con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal de cabra anti-IgG humana específico del Fc) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después del lavado, las placas pueden eluirse y analizarse con un espectrofotómetro. A continuación, los sueros de ratones inmunizados pueden cribarse adicionalmente mediante citometría de flujo para evaluar la unión a una estirpe celular que expresa la TIM3 humana, pero no a una estirpe celular control que no expresa la TIM3. En resumen, la unión de los anticuerpos anti-TIM3 puede evaluarse incubando células CHO que expresan la TIM3 con el anticuerpo anti-TIM3. Las células pueden lavarse, y la unión puede detectarse con un Ac anti-IgG humana. Los análisis de citometría de flujo pueden realizarse utilizando citometría de flujo FACSscan (Becton Dickinson, San José, CA). Para las fusiones pueden utilizarse los ratones que desarrollen las mayores concentraciones.

Puede utilizarse un ensayo ELISA como se ha descrito anteriormente para cribar los anticuerpos y, por lo tanto, los hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunógeno TIM3. A continuación, los hibridomas que producen anticuerpos que se unen con alta afinidad a la TIM3 pueden subclonarse y caracterizarse adicionalmente. Un clon de cada hibridoma, que conserva la reactividad de las células progenitoras (mediante ELISA), puede seleccionarse a continuación para preparar un banco de células, y para la purificación de los anticuerpos.

Para purificar los anticuerpos anti-TIM3, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad. La IgG eluida se puede comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alta resolución para garantizar la pureza. Se puede intercambiar la solución tampón y determinar la concentración. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en alícuotas y conservarse.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-TIM3 seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo se puede someter a una biotilación utilizando reactivos disponibles en el comercio (Pierce, Rockford, IL). La unión de un AcM biotilado se puede detectar con una sonda marcada con estreptavidina. Los estudios de competición que utilizan anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotilados se pueden realizar utilizando placas de ELISA recubiertas con TIM3, como se ha descrito anteriormente.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se pueden realizar ensayos ELISA de isotipo utilizando reactivos específicos para los anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, se pueden recubrir pocillos de placas de microtitulación con 1 µg/ml de anti-inmunoglobulina humana durante una noche a 4 °C. Después de bloquear con BSA al 1 %, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos de los anticuerpos monoclonales de ensayo o de controles de isotipo purificado, a la temperatura ambiente durante una o dos horas. A continuación, los pocillos se pueden hacer reaccionar con sondas conjugadas a fosfatasa alcalina específicas de la IgG1 humana o la IgM humana. Las placas se revelan y se analizan como se ha descrito anteriormente.

Para ensayar la unión de los anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan la TIM3, puede utilizarse citometría de flujo, como se describe en los Ejemplos. En resumen, las estirpes celulares que expresan la TIM3 unida a membrana (cultivo en condiciones de crecimiento convencionales) se mezclan con diferentes concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene BSA al 0,1 % a 4 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo anti-IgG marcado con fluoresceína en las mismas condiciones que las de la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar con el instrumento FACSscan utilizando las propiedades de dispersión lateral de la luz para clasificar células individuales, y se determina la unión de los anticuerpos marcados. Puede utilizarse un ensayo alternativo que usa microscopia de fluorescencia (además o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y analizarse mediante microscopia de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener una sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

La reactividad de los anticuerpos anti-TIM3 pueden analizarse adicionalmente con el antígeno TIM3 mediante inmunoelectrotransferencia. En resumen, pueden prepararse extractos de células que expresen la TIM3 y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con laurilsulfato de sodio. Tras la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con suero de ratón al 20 %, y sondeadas con los anticuerpos monoclonales que se van a analizar. La unión a la IgG puede detectarse utilizando fosfatasa alcalina anti-IgG y

revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Los métodos para analizar la afinidad de unión, la reactividad cruzada y las cinéticas de unión de diferentes anticuerpos anti-TIM3 incluyen los ensayos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) BIACORE™ utilizando un instrumento de SPR BIACORE™ 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia).

Pueden utilizarse diversos ensayos para caracterizar la actividad biológica de los anticuerpos anti-TIM3 (que pueden utilizarse, por ejemplo, para comparar diferentes anticuerpos anti-TIM3), tales como los se describen en el presente documento:

(1) Ensayos de activación de los linfocitos T, tales como los ensayos en los que se utilizan linfocitos T purificados obtenidos a partir de PBMC de donantes humanos. Los ensayos pueden realizarse con linfocitos T totales o subpoblaciones de los mismos, por ejemplo, linfocitos Th1, linfocitos T citotóxicos, linfocitos Treg, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, siempre que expresen la TIM3. La activación puede medirse determinando el nivel de secreción de ciertas citocinas, por ejemplo, interferón- γ o IL-2, o el nivel de proliferación de los linfocitos T. Sin desear limitarse a un mecanismo de acción en particular, la unión de los anticuerpos TIM3 a la TIM3 de los linfocitos T puede impedir la unión de la TIM3 a un ligando de la TIM3 (los posibles ligandos de la TIM3 incluyen galectina-9, HMGB1, semaforina-4A, CEACAM-1, ILT-4 y fosfatidilserina) e impedir de este modo la señalización mediada por la TIM3 en el linfocito T, impidiendo de este modo la regulación negativa de los linfocitos T por parte de la TIM3. Algunos ensayos ilustrativos, incluidos los ensayos con Th1, los ensayos con TIL y las reacciones linfocitarias mixtas (MLR) se proporcionan en los Ejemplos;

(2) ensayos de medición de la estimulación de los macrófagos, por ejemplo, macrófago M1 o M2; y

(3) ensayos de medición de la secreción de citocinas asociadas a mieloides, por ejemplo, TNF α , IL-1 β , GM-CSF, IL-6, IL-2, IL-10, CCL2, CCL3, CCL4 o CCL5 desde células mieloides positivas para la TIM3. En cierto aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 estimulan la secreción de TNF α , IL-1 β , GM-CSF, IL-6 e IL-2 y/o inhiben la secreción de IL-10, CCL2, CCL3, CCL4 o CCL5 desde células mieloides positivas para la TIM3.

En general, para caracterizar la actividad biológica de los anticuerpos anti-TIM3 puede utilizarse cualquier método para analizar la actividad biológica de un agente que inhibe las respuestas inmunitarias, por ejemplo, los descritos en la bibliografía (incluidas las patentes y las solicitudes de patentes) relacionados con la TIM3.

XIII. Inmunoconjugados, derivados de anticuerpos y diagnóstico

Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento pueden utilizarse para fines diagnósticos, incluyendo el ensayo de muestras y la obtención de imágenes *in vivo*, y con estos fines el anticuerpo (o el fragmento de unión del mismo) se puede conjugar a un agente detectable apropiado, para formar un inmunoconjugado. Para fines diagnósticos, los agentes apropiados son marcadores detectables que incluyen radioisótopos, para obtener imágenes de todo el cuerpo, y radioisótopos, enzimas, marcadores fluorescentes y otras etiquetas de anticuerpo adecuadas para el análisis de muestras.

Los marcadores detectables que pueden unirse a cualquier anticuerpo TIM3 descrito en el presente documento pueden ser cualquiera de los diferentes tipos utilizados actualmente en el campo del diagnóstico *in vitro*, incluidos marcadores particulados que incluyen soles metálicos tales como oro coloidal, isótopos tales como ^{125}I o Tc^{99} presentados, por ejemplo, con un agente quelante peptídico del tipo N_2S_2 , N_3S o N_4 , cromóforos, incluyendo marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores fosforescentes y similares, así como marcadores enzimáticos que convierten un sustrato dado en un marcador detectable, y etiquetas de polinucleótidos que se revelan después de la amplificación, tal como mediante una reacción en cadena de la polimerasa. Algunos marcadores enzimáticos adecuados incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y similares. Por ejemplo, el marcador puede ser la enzima fosfatasa alcalina, detectada midiendo la presencia o la formación de quimioluminiscencia después de la conversión de sustratos de 1,2 dioxetano, tal como adamantil metoxi fosforiloxi fenil dioxetano (AMPPD), 3-(4-(metoxiespiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-cloro)tricyclo{3.3.1.1 3,7}decan}-4-il) fosfato de fenilo disódico (CSPD), así como CDP y CDP-STAR® u otros sustratos luminiscentes bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, los quelatos de lantánidos adecuados tales como terbio (III) y europio (III). El medio de detección lo determina el marcador elegido. El aspecto del marcador o de sus productos de reacción se puede conseguir a simple vista, en el caso en el que el marcador esté en forma particulada y se acumule a unos niveles apropiados, o utilizando equipos tales como un espectrofotómetro, un luminómetro, un fluorímetro, y similares, todo ello de acuerdo con la práctica convencional.

En algunos aspectos de la descripción, los métodos de conjugación dan como resultado enlaces que son sustancialmente (o casi) no inmunógenos, por ejemplo, enlaces de péptidos (es decir, amida), de sulfuro, (estéricamente impedido), disulfuro, hidrazona y éter. Estos enlaces son poco inmunógenos y muestran una estabilidad razonable en el suero (véase, por ejemplo, Senter, P. D., Curr. Opin. Chem. Biol. 13 (2009) 235-244; el documento WO 2009/059278; el documento WO 95/17886).

Dependiendo de la naturaleza bioquímica del resto y del anticuerpo, se pueden emplear diferentes estrategias de

conjugación. En caso de que el resto sea natural o recombinante con entre 50 y 500 aminoácidos, existen procedimientos convencionales en los libros de texto que describen la química para la síntesis de conjugados proteicos, que pueden ser seguidos fácilmente por el experto (véase, por ejemplo, Hackenberger, C. P. R. y Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074). En un aspecto de la descripción, se utiliza la reacción de un

5 resto de maleinimido con un resto de cisteína del anticuerpo o el resto. Se trata de una química de acoplamiento especialmente adecuada en caso de que se utilice, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab' de un anticuerpo. Como alternativa, en aspecto de la descripción se realiza el acoplamiento en el extremo carboxiterminal del anticuerpo o del resto. La modificación carboxiterminal de una proteína, por ejemplo, de un fragmento Fab, puede realizarse como se describe (Sunbul, M. y Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

10 En general, la reacción específica de sitio y el acoplamiento covalente se basan en la transformación de un aminoácido natural en un aminoácido con una reactividad que es ortogonal con respecto a la reactividad de los otros grupos funcionales presentes. Por ejemplo, una cisteína específica dentro de un contexto de secuencia raro se puede convertir enzimáticamente en un aldehído (véase Frese, M. A. y Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009) 425-427). También es

15 posible obtener una modificación de aminoácido deseada utilizando la reactividad enzimática específica de ciertas enzimas con un aminoácido natural en un contexto de secuencia dado (véase, por ejemplo, Taki, M. *et al.*, *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. *et al.* *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; y Bordusa utiliza la formación catalizada por proteasa de enlaces C-N, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403). La reacción específica de sitio y el acoplamiento covalente también se pueden conseguir mediante la reacción selectiva de los aminoácidos terminales

20 con reactivos de modificación apropiados.

La reactividad de una cisteína aminoterminal con benzonitrilos (véase, Ren, H. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662) puede utilizarse para conseguir un acoplamiento covalente específico de sitio.

25 La unión química nativa también se puede basar en los restos de cisteína carboxiterminales (Taylor, E. Vogel; Imperial!, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (*Protein Engineering*), 65-96).

El documento US6437095 B1 describe un método de conjugación que se basa en la reacción más rápida de una cisteína de un tramo de aminoácidos cargados negativamente con una cisteína localizada en un tramo de aminoácidos

30 cargados positivamente.

El resto también puede ser un péptido sintético o un mimético peptídico. En caso de que un polipéptido se sintetice químicamente, pueden incorporarse aminoácidos con una reactividad química ortogonal durante dicha síntesis (véase, por ejemplo, de Graaf, A. J. *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Debido a que está en juego y se puede

35 introducir una gran diversidad de grupos funcionales ortogonales en un péptido sintético, la conjugación de dicho péptido con un conector es una química convencional.

Para obtener un polipéptido monomarcado, el conjugado con estequiometría 1:1 puede separarse por cromatografía de otros productos secundarios de la conjugación. Este procedimiento se puede facilitar utilizando un miembro del par

40 de unión marcado con un colorante y un conector cargado. Utilizando este tipo de miembro del par de unión marcado y cargado muy negativamente, los polipéptidos monoconjugados se separan fácilmente de los polipéptidos no marcados y de los polipéptidos portadores de más de un conector, ya que para la separación puede utilizarse la diferencia de carga y de peso molecular. El colorante fluorescente puede ser útil para purificar el complejo de los componentes no unidos, como un ligante monovalente marcado.

45 En un aspecto de la descripción, el resto unido a un anticuerpo anti-TIM3 se selecciona del grupo que consiste en un resto de unión, un resto de marcaje y un resto biológicamente activo.

Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento también pueden conjugarse con un agente terapéutico para formar un inmunoconjugado, tal como un conjugado de anticuerpo y fármaco (CAF). Algunos agentes

50 terapéuticos adecuados incluyen antimetabolitos, agentes alquilantes, ligantes del surco menor del ADN, intercaladores de ADN, interconectores de ADN, inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de la exportación nuclear, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la topoisomerasa I o II, inhibidores de las proteínas de choque térmico, inhibidores de la tirosina cinasa, antibióticos y agentes antimetabólicos. En el CAF, el anticuerpo y el agente terapéutico se conjugan preferentemente mediante un conector escindible, tal como un conector de peptidilo, disulfuro o hidrazona. En otros aspectos de la descripción, el conector es un conector de peptidilo tal como Val-Cit, Ala-Val,

55 Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 300), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser o Glu. Los CAF pueden prepararse como se describe en las Patentes de EE. UU. n.º 7.087.600; 6.989.452; y 7.129.261; en las publicaciones PCT WO 02/096910; el documento WO 07/038658; el documento WO 07/051081; el documento WO 07/059404; el documento WO 08/083312; y WO 08/103693; las Publicaciones de Patente de EE. UU. 20060024317; 20060004081; y 20060247295.

60

Los anticuerpos anti-TIM3, por ejemplo, los descritos en el presente documento, también puede utilizarse para detectar la TIM3, tal como la TIM3 humana, por ejemplo, la TIM3 humana en tejidos o muestras tisulares. Los anticuerpos

65 pueden utilizarse, por ejemplo, en un ensayo ELISA o en citometría de flujo. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se pone en contacto con las células, por ejemplo, células de un tejido, durante un tiempo

adecuado para que se produzca la unión específica y, a continuación, se añade un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo, que detecte el anticuerpo anti-TIM3. En los Ejemplos se proporcionan ensayos ilustrativos. El anticuerpo anti-TIM3 puede ser un anticuerpo totalmente humano o puede ser un anticuerpo quimérico, tal como un anticuerpo que tenga regiones variables humanas y regiones constantes murinas o una porción de las mismas. Algunos métodos ilustrativos para detectar la TIM3, por ejemplo, la TIM3 humana, en una muestra (muestra celular o tisular) comprenden (i) poner en contacto una muestra con un anticuerpo anti-TIM3, durante un tiempo suficiente para permitir la unión específica del anticuerpo anti-TIM3 a la TIM3 de la muestra, y (2) poner en contacto la muestra con un reactivo de detección, por ejemplo, un anticuerpo, que se una específicamente al anticuerpo anti-TIM3, tal como la región Fc del anticuerpo anti-TIM3, para detectar así la TIM3 unida por el anticuerpo anti-TIM3. Pueden incluirse etapas de lavado después de la incubación con el anticuerpo y/o con el reactivo de detección. Para su uso en estos métodos, los anticuerpos anti-TIM3 no tienen que estar unidos a un marcador ni a agentes de detección, ya que puede utilizarse un agente de detección independiente.

Otros usos para los anticuerpos anti-TIM3, por ejemplo, como monoterapia o combiterapia, se proporcionan en otra parte del presente documento, por ejemplo, en la sección que pertenece a los tratamientos combinados.

XIV. Moléculas biespecíficas

Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento pueden utilizarse para formar moléculas biespecíficas. Un anticuerpo anti-TIM3, o las porciones de unión al antígeno del mismo, puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, a otro péptido o proteína (por ejemplo, a otro anticuerpo o ligando de un receptor) para generar una molécula biespecífica que se una a al menos dos sitios de unión o moléculas objetivo diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TIM3 puede unirse a un anticuerpo o a un scFv que se una específicamente a cualquier proteína que pueda utilizarse como posible objetivo para tratamientos combinados, tales como las proteínas descritas en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos contra PD-1, PD-L 1, GITR o LAG-3). El anticuerpo descrito en el presente documento puede, de hecho, derivar o estar unido a más de una molécula funcional adicional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas objetivo diferentes; también se pretende que dichas moléculas multiespecíficas estén englobadas por la expresión "molécula biespecífica" como se utiliza en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica descrita en el presente documento, puede unirse funcionalmente un anticuerpo descrito en el presente documento (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de manera que se produzca una molécula biespecífica.

Por consiguiente, en el presente documento se describen moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión por la TIM3 y una segunda especificidad de unión por un segundo epítipo objetivo. En un aspecto descrito en el presente documento en el que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión.

En un aspecto de la descripción, las moléculas biespecíficas descritas en el presente documento comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o un Fv monocaténario (scFv). El anticuerpo también puede ser un dímero de la cadena ligera o la cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción monocaténaria, como describen Ladner *et al.* en la Patente de EE. UU. n.º 4.946.778.

Aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas descritas en el presente documento son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas descritas en el presente documento pueden prepararse conjugando las especificidades de unión del constituyente utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y, a continuación, conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, puede utilizarse una variedad de agentes de acoplamiento o de reticulación para la conjugación covalente. Algunos ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky *et al.*, (1984) J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, MA *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. n.º 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) Science 229: 81-83) y Glennie *et al.* (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Algunos agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, se pueden conjugar mediante enlaces de sulfhidrilo de las regiones bisagra del extremo carboxílico de las dos cadenas pesadas. En un aspecto particular de la descripción, la región bisagra se modifica para que contenga un número impar de restos sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es un AcM x AcM, AcM x Fab, AcM x (scFv)₂, Fab x F(ab')₂ o ligando x proteína de fusión de Fab. Un anticuerpo biespecífico puede comprender un anticuerpo que comprende un scFv en el extremo carboxílico de cada cadena pesada. Una molécula biespecífica descrita en el presente documento puede ser una molécula monocatenaria que comprenda un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprenda dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Algunos métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. número 5.260.203; Patente de EE. UU. número 5.455.030; Patente de EE. UU. número 4.881.175; Patente de EE. UU. número 5.132.405; Patente de EE. UU. número 5.091.513; Patente de EE. UU. número 5.476.786; Patente de EE. UU. número 5.013.653; Patente de EE. UU. número 5.258.498; y Patente de EE. UU. número 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos puede confirmarse utilizando métodos reconocidos en la técnica, tales como ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo

(RIA), análisis por FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento) o ensayo de inmunoelectrotransferencia. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de particular interés empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

XV. Composiciones

Se describen con más detalle las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que contienen uno o una combinación de anticuerpos anti-TIM3 o una combinación con anticuerpos contra otros objetivos, o porción(es) de unión al antígeno de los mismos, descritos en el presente documento, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas descritos en el presente documento. Por ejemplo, una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender una combinación de anticuerpos (inmunos conjugados o biespecíficos) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

En ciertos aspectos de la descripción, una composición comprende un anticuerpo anti-TIM3 a una concentración de al menos 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 1-300 mg/ml o 100-300 mg/ml.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden administrarse en combiterapia, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la combiterapia puede incluir un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento junto con al menos otro antineoplásico y/o inmunomodulador, por ejemplo, agente estimulador de linfocitos T (por ejemplo, activador). Algunos ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en la combiterapia se describen con más detalle a continuación en la sección de usos de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento.

En algunos aspectos de la descripción, las composiciones terapéuticas divulgadas en el presente documento pueden incluir otros compuestos, fármacos y/o agentes utilizados en el tratamiento del cáncer. Dichos compuestos, fármacos y/o agentes pueden incluir, por ejemplo, antineoplásicos, fármacos de molécula pequeña o anticuerpos que estimulan la respuesta inmunitaria contra un cáncer dado. En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir, por ejemplo, uno o más de un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-OX40 (también conocido como CD134, TNFRSF4, ACT35 y/o TXGP1L), un anticuerpo anti-CD137, un anticuerpo anti-LAG-3, un anticuerpo anti-GITR o cualquier combinación de los mismos.

Como se utiliza en el presente documento, un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que sean fisiológicamente compatibles. En algunos aspectos de la descripción, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmunos conjugado o molécula biespecífica, puede estar recubierto de un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos descritos en el presente documento pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no imparte ningún efecto toxicológico no deseable (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Algunos ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Algunas sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanólicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanólicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Algunas sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y

similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica descrita en el presente documento también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfato de sodio y similares; (2) antioxidantes liposolubles, tales como palmitato de ascorbilo, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Algunos ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse mediante procedimientos de esterilización, citados anteriormente, y mediante la inclusión de diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol de ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Algunos portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Una composición farmacéutica puede comprender un conservante o puede carecer de conservante. Pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y conservación. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, las composiciones pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Se puede conseguir una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados en el presente documento. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, algunos métodos de preparación son secado a vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma farmacéutica unitaria variará dependiendo del sujeto que se va a tratar y del modo de administración particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma farmacéutica unitaria será generalmente la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. En general, del cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente un 0,01 por ciento a aproximadamente un noventa y nueve por ciento de principio activo, de aproximadamente un 0,1 por ciento a aproximadamente un 70 por ciento, o de aproximadamente un 1 por ciento a aproximadamente un 30 por ciento de principio activo junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una única inyección en embolada, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según las exigencias de la

situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Como se utiliza en el presente documento, la forma farmacéutica unitaria se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario. La especificación de las formas farmacéuticas unitarias descritas en el presente documento viene dictada por, y depende directamente de, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se quiere conseguir, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de formulación de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Para la administración de un anticuerpo anti-TIM3, por ejemplo, descrito en el presente documento, la dosis varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y, más habitualmente, de 0,01 a 5 o 10 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o estar en el intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Algunas pautas posológicas ilustrativas para un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, utilizando uno de los siguientes esquemas posológicos para el anticuerpo que se está administrando: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, a continuación cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

Un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse a una dosis constante (pauta terapéutica constante). En otros aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse a una dosis fija con otro anticuerpo. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se administra a una dosis basada en el peso corporal.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso, la administración de cada anticuerpo administrado se encuentra en los intervalos indicados. El anticuerpo se administra normalmente en varias ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según lo indiquen las mediciones de los niveles sanguíneos de anticuerpo contra el antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para alcanzar una concentración plasmática de anticuerpos de aproximadamente 1-1000 µg/ml, y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse con otro anticuerpo con la pauta posológica del otro anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse con un anticuerpo anti-PD-1, tal como nivolumab (OPDIVO®), cada dos semanas en forma de una infusión i.v. durante 60 minutos hasta que se produzca una progresión de la enfermedad o una toxicidad inaceptable. Un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse con pembrolizumab (KEYTRUDA®) cada 3 semanas en forma de una infusión i.v. durante 30 minutos hasta que se produzca una progresión de la enfermedad o una toxicidad inaceptable. Un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse con atezolizumab (TECENTRIQ™) cada 3 semanas en forma de una infusión i.v. durante 60 o 30 minutos hasta que se produzca una progresión de la enfermedad o una toxicidad inaceptable.

Un anticuerpo se puede administrar en forma de una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a unos intervalos relativamente poco frecuentes durante un periodo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones es necesaria una dosis relativamente alta a unos intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, al paciente se le puede administrar una pauta terapéutica profiláctica.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden modificarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración en particular, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares descritas empleadas en el presente documento, o del éster, la sal o la amida de las mismas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados junto con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general y los antecedentes médicos previos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las Artes médicas.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento puede dar como

resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y la duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o la discapacidad debidos al padecimiento de la enfermedad. En el contexto del cáncer, una dosis terapéuticamente eficaz puede dar como resultado un aumento en la supervivencia, por ejemplo, la supervivencia global, y/o la prevención de un mayor deterioro de los síntomas físicos asociados al cáncer. Los síntomas del cáncer son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, rasgos inusuales en lunares, un cambio en el aspecto de un lunar, incluyendo asimetría, márgenes, color y/o diámetro, una zona cutánea recién pigmentada, un lunar anómalo, una zona oscurecida bajo las uñas, bultos mamarios, cambios en el pezón, quistes mamarios, dolor mamario, muerte, pérdida de peso, debilidad, cansancio excesivo, dificultad para comer, pérdida de apetito, tos crónica, empeoramiento de la disnea, hemoptisis, hematuria, hematoquecia, náuseas, vómitos, metástasis hepática, metástasis pulmonar, metástasis ósea, plenitud abdominal, meteorismo, líquido en la cavidad peritoneal, hemorragia vaginal, estreñimiento, distensión abdominal, perforación del colon, peritonitis aguda (infección, fiebre, dolor), dolor, hematemeses, sudoración intensa, fiebre, hipertensión arterial, anemia, diarrea, ictericia, mareos, escalofríos, espasmos musculares, metástasis en el colon, metástasis pulmonar, metástasis en la vejiga, metástasis hepática, metástasis ósea, metástasis renal y metástasis pancreática, dificultad al tragar, y similares.

Una dosis terapéuticamente eficaz puede evitar o retrasar la aparición del cáncer, lo cual puede ser deseable cuando se presenten signos tempranos o preliminares de la enfermedad. Las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico del cáncer incluyen análisis químicos (incluida la medición de los niveles de TIM3), hematología, serología y radiología. Por consiguiente, cualquier ensayo clínico o bioquímico que controle cualquiera de lo anterior puede utilizarse para determinar si un tratamiento particular es una dosis terapéuticamente eficaz para tratar el cáncer. Un experto en la materia debería poder determinar dichas cantidades tomando como base factores como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

Una composición descrita en el presente documento se puede administrar a través de una o más vías de administración utilizando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento pueden incluir intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral", como se utiliza en el presente documento, significa modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, un anticuerpo descrito en el presente documento podría administrarse potencialmente por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, por vía vaginal, por vía rectal, por vía sublingual o por vía tópica.

Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán al compuesto frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, polioleésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con productos sanitarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un aspecto particular de la descripción, se puede administrar una composición terapéutica descrita en el presente documento con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en patentes de EE. UU. n.º 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Algunos ejemplos de implantes y módulos bien conocidos para su uso con los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento incluyen: la patente de EE. UU. n.º 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar un medicamento a una velocidad controlada; la patente de EE. UU. n.º 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE. UU. n.º 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamentos para administrar un medicamento a una velocidad de infusión precisa; la patente de EE. UU. n.º 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente de EE. UU. n.º 4.439.196, que divulga un sistema de administración osmótica de fármacos que tiene compartimentos multicámara; y la patente de EE. UU. n.º 4.475.196, que divulga un sistema de administración osmótica de fármacos. Muchos otros de estos implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la materia.

En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se pueden formular para garantizar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos muy hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos descritos en el presente documento atraviesan la BHE (si se desea, por ejemplo, para cánceres cerebrales), pueden formularse, por ejemplo,

en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. 4.522.811; 5.374.548; y 5399331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de manera selectiva al interior de células u órganos específicos, mejorando por tanto la administración dirigida de fármacos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Algunos restos de direccionamiento ilustrativos incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 5.416.016 a favor de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); receptor de proteína tensioactiva A (Briscoe *et al.* (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134); p120 (Schreier *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090); véanse también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273.

XVI. Usos y Métodos

Los anticuerpos, las composiciones de anticuerpo y los métodos descritos en el presente documento tienen numerosas aplicaciones *in vitro* e *in vivo* que implican, por ejemplo, aumento de la respuesta inmunitaria, tal como inhibiendo (o antagonizando) la TIM3 (por ejemplo, la señalización), o la detección de la TIM3. En un aspecto de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento son anticuerpos humanos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para mejorar la inmunidad en una diversidad de enfermedades. Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos de modificación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprenden la administración al sujeto de un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, descrito en el presente documento, de manera que se modifique la respuesta inmunitaria en el sujeto. En algunos aspectos de la descripción, la respuesta se mejora, se estimula o se regula por aumento. En la medida en que dichos métodos pertenecen al tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia, y a métodos de diagnóstico realizados en el cuerpo humano o animal, debe entenderse que la divulgación se refiere a productos, en particular a anticuerpos, para usar en cualquiera de estos métodos.

Los sujetos adecuados para los presentes métodos incluyen pacientes humanos en los que sería deseable mejorar la respuesta inmunitaria. Los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos que tienen un trastorno que puede tratarse aumentando una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T, por ejemplo, una respuesta de linfocitos T específica de antígeno). En un aspecto particular de la descripción, los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento del cáncer *in vivo*. Para conseguir una mejora de la inmunidad específica de antígeno, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento pueden administrarse junto con un antígeno de interés, o el antígeno puede estar ya presente en el sujeto que se va a tratar (por ejemplo, un sujeto portador de un tumor o de un virus). Cuando los anticuerpos contra la TIM3 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse por separado o simultáneamente.

También están englobados métodos para detectar la presencia del antígeno TIM3 humana en una muestra, o para medir la cantidad de antígeno TIM3 humana, que comprenden poner en contacto la muestra y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a la TIM3 humana, en unas condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o una porción del mismo y la TIM3 humana. A continuación se detecta la formación de un complejo, en donde una formación de complejo diferente entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de antígeno TIM3 humana en la muestra. Por otra parte, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se pueden utilizar para purificar la TIM3 humana a través de una purificación por inmuoafinidad.

Dada la capacidad de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento para estimular o coestimular las respuestas de los linfocitos T, por ejemplo, las respuestas de los linfocitos T específicos de antígeno, tal como inhibiendo los efectos negativos de la TIM3, en el presente documento se proporcionan métodos *in vitro* e *in vivo* de uso de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento para estimular, mejorar o regular por aumento las respuestas de los linfocitos T específicos de antígeno, por ejemplo, las respuestas antitumorales de los linfocitos T. En ciertos aspectos de la descripción, también se proporciona la estimulación de CD3 (por ejemplo, mediante coinubación con una célula que expresa CD3 en la membrana), pudiendo proporcionarse la estimulación al mismo tiempo, antes o después de la estimulación con un anticuerpo anti-TIM3. Por ejemplo, en el presente documento se describen métodos de estimulación de una respuesta de los linfocitos T específica de antígeno que comprenden poner en contacto dichos linfocitos T con un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento, y opcionalmente, con un anticuerpo anti-CD3, de modo que se estimule una respuesta de los linfocitos T específica de antígeno.

Puede utilizarse cualquier indicador adecuado de una respuesta de los linfocitos T específica de antígeno para medir la respuesta de los linfocitos T específica de antígeno. Algunos ejemplos no limitativos de dichos indicadores adecuados incluyen una mayor proliferación de los linfocitos T en presencia del anticuerpo y/o una mayor producción de citocinas en presencia del anticuerpo. En algunos aspectos de la descripción, el linfocito T específico de antígeno estimula la producción de interleucina-2 y/o de interferón- γ .

Los linfocitos T que pueden potenciarse o coestimularse con anticuerpos anti-TIM3 incluyen linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺. Los linfocitos T pueden ser linfocitos Tef, por ejemplo, linfocitos Tef CD4⁺, linfocitos Tef CD8⁺,

linfocitos T auxiliares (Th) (por ejemplo, linfocitos Th1) o linfocitos T citotóxicos (Tc).

Además, se engloban métodos de estimulación de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de los linfocitos T específica de antígeno) en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento al sujeto de manera que se estimule una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de linfocito T específica de antígeno) en el sujeto. En algunos aspectos de la descripción, el sujeto es un sujeto portador de un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor. Un tumor puede ser un tumor sólido o un tumor líquido, por ejemplo, una neoplasia hemática. En ciertos aspectos de la descripción, un tumor es un tumor inmunógeno. En ciertos aspectos de la descripción, un tumor no es inmunógeno. En ciertos aspectos de la descripción, un tumor es positivo para PD-L 1. En ciertos aspectos de la descripción, un tumor es negativo para PD-L 1. Un sujeto también puede ser un sujeto portador de virus, y se estimula una respuesta inmunitaria contra el virus.

Se describen además métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto que comprenden administrar al sujeto un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento de modo que se inhiba el crecimiento del tumor en el sujeto. También se describen métodos para tratar una infección vírica en un sujeto que comprenden administrar al sujeto un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento de modo que se trate la infección vírica en el sujeto.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se administra a un sujeto como terapia complementaria. Los tratamientos de sujetos con cáncer con un anticuerpo anti-TIM3, pueden conducir a una supervivencia prolongada, por ejemplo, respuesta duradera a largo plazo en relación con el tratamiento de referencia actual; supervivencia duradera de al menos 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 10 o más años, o supervivencia sin recidiva de al menos 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1, 2, 3, 4, 5 o 10 o más años. En ciertos aspectos de la descripción, el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer con el anticuerpo anti-TIM3 impide la recidiva del cáncer o retrasa la recidiva del cáncer, por ejemplo, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1, 2, 3, 4, 5 o 10 o más años. Un tratamiento anti-TIM3 puede utilizarse como tratamiento de primera, segunda o tercera línea.

El tratamiento de un sujeto que tiene cáncer con un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento, por ejemplo, TIM3, 18.IgG1, puede dar lugar a, por ejemplo, una enfermedad estable, una respuesta parcial, un aumento de la supervivencia global, una mayor supervivencia sin enfermedad o una mayor supervivencia sin progresión.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento no es significativamente tóxico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM3 no es significativamente tóxico para un órgano de un ser humano, por ejemplo, uno o más del hígado, riñón, cerebro, pulmones y corazón, como se determina, por ejemplo, en ensayos clínicos. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo TIM3 no desencadena significativamente una respuesta inmunitaria no deseable, por ejemplo, autoinmunidad o inflamación.

En ciertos aspectos de la descripción, el tratamiento de un sujeto con un antagonista anti-TIM3 (por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento) no da como resultado una sobreestimulación del sistema inmunitario hasta el punto de que el sistema inmunitario del sujeto ataque a continuación al propio sujeto (por ejemplo, respuesta autoinmunitaria) ni da como resultado, por ejemplo, anafilaxia. Por lo tanto, en algunos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 no provocan anafilaxia.

En ciertos aspectos de la descripción, el tratamiento de un sujeto con un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de 13A3 o una variante de las mismas (por ejemplo, como se describe en el presente documento) u otros anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, no provoca reacciones inflamatorias significativas, por ejemplo, neumonitis inmunomediada, colitis inmunomediada, hepatitis inmunomediada, nefritis inmunomediada o disfunción renal, hipofisitis inmunomediada, hipotiroidismo e hipertiroidismo inmunomediados u otras reacciones adversas inmunomediadas. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 que comprende las CDR o las regiones variables de 13A3 o una variante de las mismas (por ejemplo, como se describe en el presente documento) provoca menos reacciones inflamatorias, por ejemplo, neumonitis inmunomediada, colitis inmunomediada, hepatitis inmunomediada, nefritis inmunomediada o disfunción renal, hipofisitis inmunomediada, hipotiroidismo e hipertiroidismo inmunomediados, anafilaxia u otras reacciones adversas inmunomediadas, que otros anticuerpos anti-TIM3. En ciertos aspectos de la descripción, el tratamiento de un sujeto con un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de 13A3 o una variante de las mismas (por ejemplo, como se describe en el presente documento) u otros anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, no provoca trastornos cardíacos significativos, por ejemplo, arritmia ventricular; trastornos oculares, por ejemplo, iridociclitis; reacciones relacionadas con la infusión; aumento de la amilasa, aumento de la lipasa; trastornos del sistema nervioso, por ejemplo, mareos, neuropatía periférica y sensorial; trastornos del tejido cutáneo y subcutáneo, por ejemplo, erupción cutánea, prurito, dermatitis exfoliativa, eritema multiforme, vitíligo o psoriasis; trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos, por ejemplo, tos; fatiga; náuseas; disminución del apetito; estreñimiento; artralgia; o diarrea.

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 proporciona efectos antitumorales sinérgicos junto con otra terapia antineoplásica, tal como un compuesto que estimula el sistema inmunitario (por ejemplo, un agente

inmuno-oncológico), por ejemplo, un compuesto descrito en el presente documento o un compuesto que modula un objetivo descrito en el presente documento.

El uso de anticuerpos humanos, por oposición a los anticuerpos quiméricos o humanizados, puede dar como resultado una disminución de los niveles de anticuerpos anti-fármacos (ADA). Por consiguiente, los anticuerpos anti-TIM3 humanos descritos en el presente documento, por ejemplo, TIM3.18.IgG1.3, puede tener menos ADA con respecto a anticuerpos anti-TIM3 que no son anticuerpos humanos (por ejemplo, con respecto a anticuerpos anti-TIM3 humanizados o quiméricos).

Éstos y otros métodos descritos en el presente documento se analizan con más detalle a continuación.

XVI.A. Cáncer

La inhibición de la TIM3 por parte de los anticuerpos anti-TIM3 también puede mejorar la respuesta inmunitaria en las células cancerosas de un paciente oncológico. En el presente documento se describen métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer, que comprenden la administración al sujeto de un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento, de tal manera que se trata al sujeto, por ejemplo, de tal forma que se inhiba o reduzca el crecimiento de tumores cancerosos y/o que los tumores remitan y/o que se logre prolongar la supervivencia. Un anticuerpo anti-TIM3 se puede utilizar solo para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. Alternativamente, un anticuerpo anti-TIM3 se puede utilizar junto con otro agente, por ejemplo, otro agente inmunógeno, un tratamiento antineoplásico convencional u otro anticuerpo, como se describe a continuación.

Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos de tratamiento del cáncer, por ejemplo, inhibiendo el crecimiento de células tumorales, en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento, por ejemplo, TIM3.2, TIM3.4, TIM3.5, TIM3.6, 9F6, 8B9, TIM3.9, TIM3.10, TIM3.11, TIM3.12, TIM3.13, TIM3.14, TIM3.15, TIM3.16, TIM3.17, TIM3.18, TIM3.7 y TIM3.8, que tienen una región constante IgG natural o una región constante que tiene una función efectora reducida, por ejemplo, IgG1.1 o IgG1.3, o una porción de unión al antígeno de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-TIM3 humana (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-TIM3 humana descritos en el presente documento). Los cánceres cuyo crecimiento se puede inhibir utilizando anticuerpos de la divulgación incluyen cánceres que normalmente responden a la inmunoterapia y aquellos que normalmente no responden a la inmunoterapia. Los cánceres que pueden tratarse también incluyen cánceres positivos para TIM3. Los cánceres pueden ser cánceres con tumores sólidos o neoplasias hemáticas (tumores líquidos). Algunos ejemplos no limitativos de cánceres para su tratamiento incluyen carcinoma epidermoide, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón epidermoide no microcítico (NSCLC), NSCLC no epidermoide, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales (RCC)), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente a hormonas), cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma (glioblastoma multiforme), cáncer cervicouterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer (o carcinoma) de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinativas, sarcoma pediátrico, linfocitos citolíticos naturales senonasaes, melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico, tal como melanoma maligno cutáneo o intraocular), cáncer óseo, cáncer de piel, cáncer de útero, cáncer de la región anal, cáncer de testículo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer de pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje medular, cáncer de cerebro, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer epidermoide, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente incluyendo los inducidos por amianto, cánceres relacionados con virus o cánceres de origen vírico (por ejemplo, virus del papiloma humano (tumores relacionados con el VPH o que se originan del mismo)) y neoplasias hemáticas derivadas de cualquiera de los dos linajes principales de células sanguíneas, es decir, la estirpe celular mieloide (que produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos) o la estirpe celular linfoide (que produce linfocitos B, T, NK y células plasmáticas), tales como todos los tipos de leucemias, linfomas y mielomas, por ejemplo, leucemias agudas, crónicas, linfocíticas y/o mielógenas, tales como leucemia aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mielógena crónica (CML), AML indiferenciada (MO), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica (M2; con maduración celular), leucemia promielocítica (M3 o variante de M3 [M3V]), leucemia mielomonocítica (M4 o variante de M4 con eosinofilia [M4E]), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica (M7), sarcoma granulocítico aislado y cloroma; linfomas, tales como linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no hodgkiniano (LNH), neoplasia hemática de linfocitos B, por ejemplo, linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T, linfoma linfoplasmocitoide, linfoma monocitoide de linfocitos B, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), linfoma anaplásico de células grandes (por ejemplo, Ki 1+), linfoma/leucemia de linfocitos T en adultos, linfoma de células del manto, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de linfocitos T, linfoma mediastínico primario de linfocitos B, linfoma linfoblástico de linfocitos T precursores, linfoblástico de linfocitos T; y linfoma/leucemia (T-Lbly/T-ALL), linfoma de linfocitos T periféricos, linfoma linfoblástico, trastorno linfoproliferativo después del trasplante, linfoma histiocítico verdadero, linfoma primario del

sistema nervioso central, linfoma exudativo primario, linfoma de linfocitos B, linfoma linfoblástico (LBL), tumores hematopoyéticos del linaje linfoide, leucemia linfoblástica aguda, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma histiocítico difuso (DHL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de linfocitos B precursores, linfoma de linfocitos T cutáneos (CTLC) (también denominado micosis fungoide o síndrome de Sezary) y linfoma linfoplasmocitoide (LPL) con macroglobulinemia de Waldenstrom; mielomas, tales como mieloma de IgG, mieloma de la cadena ligera, mieloma no secretor, mieloma latente (también denominado mieloma indolente), plasmocitoma solitario, y mielomas múltiples, leucemia linfocítica crónica (CLL), tricolinfoma; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide, tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; seminoma, teratocarcinoma, tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma, tumores hematopoyéticos del linaje linfoide, por ejemplo, tumores de linfocitos T y linfocitos B, incluyendo, pero sin limitación, trastornos de linfocitos T tales como leucemia prolinfocítica de linfocitos T (T-PLL), incluyendo del tipo microcítico y de células cerebriformes; leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) del tipo de linfocitos T; linfoma hepatosplénico a/d T-LNH; linfoma de linfocitos T periféricos/postímicos (subtipos pleomorfo e inmunoblástico); linfoma angiocéntrico (nasal) de linfocitos T; cáncer de cabeza o cuello, cáncer renal, cáncer de recto, cáncer de la glándula tiroides; linfoma mieloide agudo, así como cualquier combinación de dichos cánceres. Los métodos descritos en el presente documento también se pueden utilizar para el tratamiento de cánceres metastásicos, cánceres resistentes irresecables (por ejemplo, cánceres resistentes a una inmunoterapia previa, por ejemplo, con un anticuerpo CTLA-4 o PD-1 bloqueante), y/o cánceres recurrentes.

En ciertos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 se administra a pacientes que tienen un cáncer que mostró una respuesta inadecuada a, o progresó durante, un tratamiento previo, por ejemplo, un tratamiento previo con un fármaco inmunooncológico, o a pacientes que tienen un cáncer que es resistente, ya sea intrínsecamente resistente (por ejemplo, resistente a un antagonista de la vía PD-1), o en donde se adquiere el estado de resistencia. Por ejemplo, los sujetos que no responden o que no responden suficientemente a una primera terapia o que vean una progresión de la enfermedad después del tratamiento, por ejemplo, un tratamiento anti-PD-1, pueden tratarse mediante la administración de un anticuerpo anti-TIM3 solo o junto con otra terapia (por ejemplo, con una terapia anti-PD-1).

En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se administra a pacientes que no han recibido anteriormente (es decir, que no se han tratado con) un agente inmunooncológico, por ejemplo, un antagonista de la vía PD-1.

En ciertos aspectos de la descripción, un método para tratar el cáncer en un sujeto comprende en primer lugar determinar si el sujeto es positivo para TIM3, por ejemplo, tiene células tumorales o TIL que expresan la TIM3, y si el sujeto tiene células cancerosas o TIL positivas para TIM3, a continuación, administrar al sujeto un anticuerpo anti-TIM3, por ejemplo, descrito en el presente documento. Un método de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer con un anticuerpo anti-TIM3 puede comprender la administración a un sujeto que tiene células cancerosas o células TIL que expresan la TIM3, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo TIM3. También se describen en el presente documento métodos para predecir si un sujeto responderá al tratamiento con un anticuerpo anti-TIM3, en donde los métodos comprenden determinar el nivel de TIM3 en las células cancerosas o las células TIL del paciente, y si las células cancerosas o las células TIL del sujeto son positivas para TIM3, entonces es probable que el sujeto responda a un tratamiento con un anticuerpo TIM3.

En ciertos aspectos de la descripción, un método para tratar el cáncer en un sujeto comprende en primer lugar determinar si el sujeto es positivo para PD-L1 o PD-1, por ejemplo, tiene células tumorales o TIL que expresan PD-L1 o PD-1, y si el sujeto tiene células cancerosas o TIL positivas para PD-L1 o PD-1, a continuación, administrar al sujeto un anticuerpo anti-TIM3 (y opcionalmente un antagonista de PD-1 o PD-L1), por ejemplo, descrito en el presente documento. Un método de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer con un anticuerpo anti-TIM3 (y opcionalmente un antagonista de PD-1 o PD-L1) puede comprender la administración a un sujeto que tiene células cancerosas o células TIL que expresan PD-L1 o PD-1, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo TIM3 (y opcionalmente un antagonista PD-1 o PD-L1). También se describen en el presente documento métodos para predecir si un sujeto responderá al tratamiento con un anticuerpo anti-TIM3 (y opcionalmente un antagonista de PD-1 o PD-L1), en donde los métodos comprenden determinar el nivel de PD-L1 o PD-1 en las células cancerosas o las células TIL del paciente, y si las células cancerosas o TIL del sujeto son positivas para PD-L1 o PD-1, entonces es probable que el sujeto responda a un tratamiento con un anticuerpo TIM3 (y opcionalmente un antagonista PD-1 o PD-L1).

Un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse con un tratamiento de referencia. Un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse como una terapia de mantenimiento, por ejemplo, una terapia destinada a prevenir la aparición o la recidiva de tumores.

Un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse con otro tratamiento, por ejemplo, radiación, cirugía o quimioterapia. Por ejemplo, puede administrarse una terapia complementaria con anticuerpos anti-TIM3 cuando exista un riesgo de que pueda haber presentes micrometástasis y/o para reducir el riesgo de una recaída.

Un anticuerpo anti-TIM3 se puede administrar como monoterapia, o como la única terapia inmunoestimuladora. Los

anticuerpos contra la TIM3, por ejemplo, los anti-TIM3, también se pueden combinar con un agente inmunógeno, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de hidratos de carbono), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimuladoras (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173: 4919-28). Algunos ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que pueden utilizarse incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para que expresen la citocina GM-CSF (analizado con más detalle a continuación).

En los seres humanos, se ha demostrado que algunos tumores, tales como los melanomas, son inmunógenos. Al bajar el umbral de activación de los linfocitos T por la inhibición de la TIM3, se pueden activar las respuestas tumorales en el hospedador, permitiendo el tratamiento de tumores no inmunógenos o de los que tienen una inmunogenicidad limitada.

Un anticuerpo anti-TIM3, por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM3 descrito en el presente documento, se puede combinar con un protocolo de vacunación. Se han ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; véase también Restifo, N. y Sznol, M., *Cancer Vaccines*, cap. 61, págs. 3023-3043 en DeVita *et al.* (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, quinta edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna utilizando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha demostrado que estas vacunas celulares son más eficaces cuando las células tumorales se someten a una transducción para que expresen el GM-CSF. Se ha demostrado que el GM-CSF es un fuerte activador de la presentación de antígenos para la vacunación contra tumores (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

El estudio de la expresión génica y de los patrones de expresión génica a gran escala en diferentes tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumor (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que se originó el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Más importante aún, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son los objetivos de los linfocitos T específicos de tumor encontrados en el hospedador. La inhibición de la TIM3 se puede usar junto con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor para generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. Estas proteínas normalmente son vistas por el sistema inmunitario como antígenos propios, y por lo tanto, son tolerantes a ellas. El antígeno tumoral puede incluir la proteína telomerasa, que es necesaria para la síntesis de los telómeros de los cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los cánceres humanos, y únicamente en un número limitado de tejidos somáticos (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). Los antígenos tumorales también pueden ser "neoantígenos" expresados en las células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de la proteína o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Filadelfia), o el idiotipo de los tumores de linfocitos B.

Otras vacunas tumorales pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos, tales como el virus del papiloma humano (VPH), virus de la hepatitis (VHB y VHC) y herpesvirus del sarcoma de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico tumoral que se puede utilizar junto con la inhibición de la TIM3 es proteínas de choque térmico (HSP) purificadas aisladas a partir del propio tejido tumoral. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales, y estas HSP son sumamente eficientes en cuanto al suministro a las células presentadoras de antígeno para desencadenar la inmunidad tumoral (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269: 1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278: 117-120).

Las células dendríticas (CD) son potentes células presentadoras del antígeno que pueden utilizarse para cebar respuestas específicas de antígeno. Las CD pueden producirse *ex vivo* y cargarse con diferentes antígenos proteicos y peptídicos, así como con extractos de células tumorales (Nestle, F. *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). También, las CD también pueden someterse a transducción por medios genéticos para que expresen estos antígenos tumorales. Las CD también se han fusionado directamente con células tumorales con fines de inmunización (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6: 332-336). Como método de vacunación, la inmunización con CD puede combinarse eficazmente con la inhibición de la TIM3 para activar unas respuestas antitumorales más potentes.

La inhibición de la TIM3 también se puede combinar con tratamientos oncológicos convencionales (por ejemplo, cirugía, radiación y quimioterapia). La inhibición de la TIM3 se puede combinar eficazmente con regímenes quimioterápicos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis administrada del reactivo quimioterápico (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de dicha combinación es un anticuerpo anti-TIM3 junto con decarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo de dicha combinación es un anticuerpo anti-TIM3 junto con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. El fundamento científico subyacente detrás del uso combinado de inhibición de la TIM3 y quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterápicos, debería dar como resultado un aumento en los niveles de antígeno tumoral en la vía de presentación del antígeno. Otras combiterapias que pueden dar como resultado una sinergia con la inhibición de la TIM3 a través de la muerte celular son radiación, cirugía y privación de hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de la angiogénesis

también pueden combinarse con la inhibición de la TIM3. La inhibición de la angiogénesis provoca la muerte de las células tumorales, lo que puede introducir el antígeno tumoral en las vías de presentación del antígeno del hospedador

Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento también pueden utilizarse junto con anticuerpos
 5 biospecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor Fc α o Fc γ a las células tumorales (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. n.º 5.922.845 y 5.837.243). Pueden utilizarse anticuerpos biospecíficos para dirigirse a dos antígenos distintos. Por ejemplo, se han utilizado anticuerpos biospecíficos anti-receptor de Fc/anti-antígeno tumoral (por ejemplo, Her-2/neu) para dirigir macrófagos a sitios de tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas específicas tumorales. El grupo de linfocitos T de estas respuestas aumentaría
 10 con la inhibición de la TIM3. Alternativamente, el antígeno puede administrarse directamente a las CD utilizando anticuerpos biospecíficos que se unen al antígeno tumoral y a un marcador de la superficie celular específico de las células dendríticas.

Los tumores evaden la vigilancia inmunitaria del hospedador mediante una gran variedad de mecanismos. Muchos de
 15 estos mecanismos pueden superarse mediante la inactivación de proteínas que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Éstas incluyen, entre otras, el TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), la IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200) y el ligando Fas (Hahne *et al.* (1996) Science 274: 1363-1365). Los anticuerpos contra cada una de estas entidades pueden utilizarse junto con anticuerpos anti-TIM3 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias tumorales por parte
 20 del hospedador.

Otros anticuerpos que activan la respuesta inmunitaria del hospedador pueden utilizarse junto con anticuerpos anti-TIM3. Éstos incluyen moléculas de la superficie de las células dendríticas que activan la función de las CD y la presentación del antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad de los linfocitos
 25 T auxiliares (Ridge *et al.* (1998) Nature 393: 474-478) y pueden utilizarse junto con anticuerpos anti-TIM3. Los anticuerpos activadores de moléculas coestimuladoras de linfocitos T, tales como CTLA-4, (por ejemplo, Patente de EE.UU. n.º 5.811.097), OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) Immunol 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero *et al.* (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff *et al.* (1999) Nature 397: 262-266) también pueden proporcionar mayores niveles de activación de los linfocitos T. Los inhibidores de PD1 o PD-L1 también pueden utilizarse junto con un anticuerpo anti-TIM3. Otras combinaciones se describen en cualquier otro sitio del presente documento.

El trasplante de médula ósea se utiliza actualmente para tratar una diversidad de tumores de origen hematopoyético. Aunque la enfermedad del injerto contra el hospedador es una consecuencia de este tratamiento, el beneficio
 35 terapéutico puede obtenerse a partir de las respuestas de injerto frente al tumor. La inhibición de la TIM3 puede utilizarse para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor de donante injertados.

También hay varios protocolos de tratamiento experimentales que implican la activación y expansión *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células en receptores para estimular los linfocitos T específicos de antígeno contra el tumor (Greenberg y Riddell (1999) Science 285: 546-51). Estos métodos
 40 también pueden utilizarse para activar las respuestas de los linfocitos T contra agentes infecciosos tales como el CMV. La activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos anti-TIM3 puede aumentar la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos de manera adoptiva.

XVI.B. Enfermedades infecciosas

Los métodos descritos en el presente documento también pueden utilizarse para tratar a pacientes que han estado expuestos a toxinas o patógenos concretos. Por consiguiente, otro aspecto descrito en el presente documento proporciona un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-TIM3, o una porción de unión al antígeno del mismo, de manera que se trate la enfermedad
 50 infecciosa del sujeto. Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado.

De manera similar a su aplicación en tumores, como se ha analizado anteriormente, la inhibición de la TIM3 mediada por anticuerpos puede utilizarse sola o como adyuvante, junto con vacunas, para estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas y auto-antígenos. Algunos ejemplos de patógenos para los que este enfoque terapéutico puede ser particularmente útil incluyen patógenos para los que actualmente no hay una vacuna eficaz, o patógenos para los cuales las vacunas convencionales son menos que completamente eficaces. Éstos incluyen, pero sin limitación, VIH, hepatitis (A, B y C), gripe, herpes, *Giardia*, paludismo, *Leishmania*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. La inhibición de la TIM3 puede ser útil contra infecciones establecidas por agentes tales como el VIH, que presentan antígenos alterados a lo largo de las infecciones. Estos nuevos epítomos se reconocen como extraños en el momento de la administración del anticuerpo anti-TIM3 humana, provocando por tanto una fuerte respuesta de los linfocitos T.

Algunos ejemplos de virus patógenos que causan infecciones que se pueden tratar con los métodos descritos en el presente documento incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), herpesvirus (por ejemplo, VZV, VHS-1, HAV-6, VHS-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus de Cocksackie, coronavirus, virus respiratorio sincicial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus

variolovacunal, virus HTL V, virus del dengue, papilomavirus, virus de molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arbovítica.

Algunos ejemplos de bacterias patógenas causantes de infecciones que se pueden tratar con los métodos de la divulgación incluyen clamidia, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos y gonococos, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionella*, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, carbunco, peste, leptospirosis y bacterias de la enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patógenos que causan infecciones que pueden tratarse con los métodos descritos en el presente documento incluyen *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), genero *Mucorales* (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Algunos ejemplos de parásitos patógenos que causan infecciones que pueden tratarse con los métodos descritos en el presente documento incluyen *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* y *Nippostrongylus brasiliensis*.

En todos los métodos anteriores, la inhibición de la TIM3 puede combinarse con otras formas de inmunoterapia, por ejemplo, las descritas en el presente documento, tales como el tratamiento con citocinas (por ejemplo, interferones, GM-CSF, G-CSF, IL-2) o terapia con un anticuerpo biespecífico, que proporciona una presentación mejorada de los antígenos tumorales (véase, por ejemplo, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak (1994) Structure 2: 1121-1123).

XVI.C. Reacciones autoinmunitarias

Los anticuerpos anti-TIM3 podrían provocar y amplificar respuestas autoinmunitarias. De hecho, la inducción de respuestas antitumorales utilizando células tumorales y vacunas peptídicas revela que muchas respuestas antitumorales implican reactividades antiautorreactivas (van Elsas *et al.* (2001) J. Exp. Med. 194: 481-489; Overwijk, *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000) citado anteriormente; Rosenberg & White (1996) J. Immunother Emphasis Tumor Immunol 19 (1): 81-4). Por consiguiente, es posible considerar el uso de anticuerpos anti-TIM3 junto con diferentes proteínas propias para diseñar protocolos de vacunación para generar eficazmente respuestas inmunitarias contra estas proteínas propias para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer implica una acumulación inapropiada de péptido β A en depósitos amiloides en el cerebro; las respuestas de anticuerpos contra el amiloide son capaces de eliminar estos depósitos amiloides (Schenk *et al.*, (1999) Nature 400: 173-177).

También pueden utilizarse otras proteínas propias como objetivos, tales como la IgE para el tratamiento de la alergia y el asma, y el TNF- α para la artritis reumatoide. Finalmente, pueden inducirse respuestas de los anticuerpos a diferentes hormonas mediante el uso de anticuerpos anti-TIM3. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes contra las hormonas reproductivas pueden utilizarse para la anticoncepción. La respuesta de los anticuerpos neutralizantes contra hormonas y otros factores solubles necesarios para el crecimiento de tumores concretos también pueden considerarse posibles objetivos de vacunación.

Pueden utilizarse métodos análogos a los descritos anteriormente para el uso de anticuerpos anti-TIM3 para la inducción de respuestas autoinmunitarias terapéuticas para tratar a pacientes que tienen una acumulación inapropiada de otros autoantígenos, tales como depósitos amiloides, incluyendo el β A en la enfermedad de Alzheimer, citocinas tales como TNF- α , e IgE.

XVI.D. Vacunas

Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento pueden utilizarse para estimular respuestas inmunitarias específicas de antígeno mediante la coadministración de un anticuerpo anti-TIM3 con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos para mejorar la respuesta inmunitaria frente a un antígeno en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo anti-TIM3, o un porción de unión al antígeno del mismo, de forma que se mejore una respuesta inmunitaria frente al antígeno en el sujeto. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano anti-TIM3 humana (tal como cualquiera de los anticuerpos anti-TIM3 humana descritos en el presente documento). Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano o un antígeno de un patógeno. Algunos ejemplos no limitativos de dichos antígenos incluyen los analizados en las secciones anteriores, tales como los antígenos tumorales (o vacunas tumorales) analizados anteriormente, o antígenos de los virus, bacterias u otros patógenos descritos anteriormente.

En ciertos aspectos de la descripción, un péptido o una proteína de fusión que comprende el epítopo al que se une un anticuerpo anti-TIM3 se utiliza como vacuna en lugar de, o además de, un anticuerpo anti-TIM3.

Las vías de administración adecuadas para las composiciones de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) descritos en el presente documento *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por un experto en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpo pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y de la concentración y/o la formulación de la composición de anticuerpo

Como se ha descrito previamente, los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento pueden coadministrarse con uno o más de otros agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede unirse al agente (en forma de un inmunocomplejo) o puede administrarse por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después de o simultáneamente con el agente, o puede administrarse junto con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia antineoplásica, por ejemplo, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo, dacarbazina y ciclofosfamida hidroxilurea que, por sí solas, son únicamente eficaces a unos niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa en forma de una dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas, y la adriamicina se administra por vía intravenosa en forma de una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de anticuerpos anti-TIM3, o de fragmentos de unión al antígeno de los mismos, descritos en el presente documento, con agentes quimioterápicos, proporciona dos agentes antineoplásicos que actúan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico en las células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las haría no reactivas con el anticuerpo.

También dentro del ámbito descrito en el presente documento están los kits que comprenden las composiciones de anticuerpo descritas en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos humanos anti-TIM3 adicionales descritos en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo humano que tenga una actividad complementaria que se una a un epítipo del antígeno TIM3 distinto del primer anticuerpo humano). Los kits incluyen normalmente una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit.

XVI.E. Combiterapias

Además de las combiterapias descritas anteriormente, los anticuerpos anti-TIM3, por ejemplo, los descritos en el presente documento, puede utilizarse también en combiterapia, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, como se describe a continuación.

En el presente documento se describen métodos de combiterapia en los que un anticuerpo anti-TIM3 se administra junto con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, fármacos de molécula pequeña, anticuerpos o porciones de unión al antígeno de los mismos, que son eficaces en la estimulación de las respuestas inmunitarias para de ese modo aumentar más, estimular o regular por aumento las respuestas inmunitarias en un sujeto.

En general, un anticuerpo anti-TIM3, por ejemplo, descrito en el presente documento, se puede combinar con (i) un agonista de una molécula estimuladora (por ejemplo, coestimuladora) (por ejemplo, receptor o ligando) y/o (ii) un antagonista de una señal o molécula inhibidora (por ejemplo, receptor o ligando) en las células inmunitarias, tales como linfocitos T, dando ambos como resultado la amplificación de las respuestas inmunitarias, tales como las respuestas de los linfocitos T específicos de antígeno. En ciertos aspectos, un agente inmunooncológico es (i) un agonista de una molécula estimuladora (incluyendo una molécula coestimuladora) (por ejemplo, receptor o ligando) o (ii) un antagonista de una molécula inhibidora (incluyendo una molécula coinhibidora) (por ejemplo, receptor o ligando) en las células, por ejemplo, aquellos que inhiben la activación de los linfocitos T o los que intervienen en la inmunidad innata, por ejemplo, linfocitos NK, y en donde el agente inmunooncológico mejora la inmunidad innata. Dichos agentes inmunooncológicos se denominan a menudo reguladores del punto de control inmunitario, por ejemplo, inhibidor del punto de control inmunitario o estimulador del punto de control inmunitario.

En ciertos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 se administra con un agente que se dirige a una molécula estimuladora o inhibidora que es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF). Por ejemplo, los anticuerpos anti-TIM3, por ejemplo, descritos en el presente documento, se pueden administrar a un sujeto con un agente que se dirige a un miembro de la familia de las IgSF para aumentar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TIM3 puede administrarse con un agente que se dirige (o se une específicamente a) un miembro de la familia de B7 de ligandos unidos a la membrana que incluye B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) y B7-H6, o un receptor o ligando coestimulador o coinhibidor que se une específicamente a un miembro de la familia de B7.

Un anticuerpo anti-TIM3 también puede administrarse con un agente que se dirige a un miembro de la familia de moléculas del TNF y el TNFR (ligandos o receptores), tales como CD40 y CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L,

CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn 14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LTpR, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, Linfotóxina α /TNFp, TNFR2, TNFa, LTpR, Linfotóxina α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY y NGFR (véase, e.g., Tansey (2009) Drug Discovery Today 00: 1).

5 Las respuestas de los linfocitos T pueden estimularse mediante una combinación de anticuerpos anti-TIM3 que tienen las regiones variables de, por ejemplo, TIM3.2, TIM3.4, TIM3.5, TIM3.6, 9F6, 8B9, TIM3.9, TIM3.10, TIM3.11, TIM3.12, TIM3.13, TIM3.14, TIM3.15, TIM3.16, TIM3.17, TIM3.18, TIM3.7 y TIM3.8, y uno o más de los siguientes agentes:

- 10 (1) Un antagonista (agente inhibidor o bloqueante) de una proteína que inhibe la activación de los linfocitos T (por ejemplo, inhibidores del punto de control inmunitario), tales como CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, GITR y LAG-3, galectina 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, galectina-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 y TIM-4; y/o
- 15 (2) Un agonista de una proteína que estimula la activación de los linfocitos T, tales como B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 y CD28H.

Algunos agentes ilustrativos que modulan una de las proteínas anteriores y se pueden combinar con anticuerpos anti-TIM3, por ejemplo, los descritos en el presente documento, para el tratamiento del cáncer, incluyen: YERVOY® (ipilimumab) o tremelimumab (contra CTLA-4), galiximab (contra B7.1), BMS-936558 (contra PD-1), MK-3475 (contra PD-1), atezolizumab (TECENTRIQ®), AMP224 (contra B7DC), BMS-936559 (contra B7-H1), MPDL3280A (contra B7-H1), MEDI-570 (contra ICOS), AMG557 (contra B7H2), MGA271 (contra B7H3), IMP321 (contra LAG-3), BMS-663513 (contra CD137), PF-05082566 (contra CD137), CDX-1127 (contra CD27), anti-OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (contra OX40L), atacicept (contra TACI), CP-870893 (contra CD40), lucatumumab (contra CD40), dacetuzumab (contra CD40), muromonab-CD3 (contra CD3); los anticuerpos anti-GITR MK4166, TRX518, Medi1873, INBRX-110, LK2-145, GWN-323, GITRL-Fc, o cualquier combinación de los mismos.

Otras moléculas que pueden combinarse con anticuerpos anti-TIM3 para el tratamiento del cáncer incluyen antagonistas de receptores inhibidores en linfocitos NK o agonistas de receptores activadores en linfocitos NK. Por ejemplo, los anticuerpos anti-TIM3 se pueden combinar con antagonistas de KIR (por ejemplo, lirilumab).

30 La activación de los linfocitos T también está regulada por citocinas solubles, y los anticuerpos anti-TIM3 pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, que tiene cáncer, con antagonistas de citocinas que inhiben la activación de los linfocitos T, o agonistas de citocinas que estimulan la activación de los linfocitos T

35 En ciertos aspectos de la descripción, los anticuerpos anti-TIM3 pueden utilizarse junto con (i) antagonistas (o agentes inhibidores o bloqueantes) de proteínas de la familia de las IgSF o de la familia de B7 o de la familia del TNF que inhiben la activación de los linfocitos T, o antagonistas de citocinas que inhiben la activación de los linfocitos T (por ejemplo, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; "citocinas inmunosupresoras") y/o (ii) agonistas de receptores estimuladores de la familia de las IgSF, la familia de B7 o la familia del TNF, o de citocinas que estimulan la activación de los linfocitos T, para estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, para tratar enfermedades proliferativas, tales como el cáncer.

Otros agentes más para combiterapias incluyen agentes que inhiben o agotan los macrófagos o los monocitos, que incluyen, pero sin limitación, antagonistas del CSF-1R, tales como anticuerpos antagonistas del CSF-1R, que incluyen RG7155 (documentos WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) o FPA-008 (documentos WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

Los anticuerpos anti-TIM3 también se pueden administrar con agentes que inhiben la señalización del TGF- β .

50 Algunos agentes adicionales que se pueden combinar con un anticuerpo anti-TIM3 incluyen agentes que aumentan la presentación del antígeno tumoral, por ejemplo, vacunas de células dendríticas, vacunas celulares secretoras de GM-CSF, oligonucleótidos CpG e imiquimod, o terapias que mejoran la inmunogenicidad de las células tumorales (por ejemplo, antraciclinas).

Otras terapias más que se pueden combinar con un anticuerpo anti-TIM3 incluyen terapias que agotan o bloquean los linfocitos Treg, por ejemplo, un agente que se une específicamente al CD25.

Otra terapia que se puede combinar con un anticuerpo anti-TIM3 es una terapia que inhibe una enzima metabólica tal como la indolamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa u óxido nítrico sintasa.

60 Otra clase de agentes que pueden utilizarse con un anticuerpo anti-TIM3 incluye agentes que inhiben la formación de adenosina, por ejemplo, inhibidores del CD73, o que inhiben el receptor de adenosina A2A.

Otras terapias que se pueden combinar con anticuerpo anti-TIM3 para tratar el cáncer incluyen terapias que revierten/impiden la anergia o el agotamiento de los linfocitos T y terapias que desencadenan una activación inmunitaria innata y/o una inflamación en un sitio tumoral.

Otras terapias que pueden combinarse con un anticuerpo anti-TIM3 para tratar el cáncer incluyen terapias que bloquean la IL-8, por ejemplo, con HuMax-IL8.

Un anticuerpo anti-TIM3 se puede combinar con más de un agente inmunooncológico, y puede ser, por ejemplo, combinado con una estrategia combinatoria que dirige múltiples elementos de la vía inmunitaria, tales como uno o más de los siguientes: una terapia que aumenta la presentación de antígenos tumorales (por ejemplo, vacuna de células dendríticas, vacunas celulares secretoras de GM-CSF, oligonucleótidos CpG, imiquimod); una terapia que inhibe la regulación inmunitaria negativa, por ejemplo, inhibiendo la vía de CTLA-4 y/o de PD1/PD-L1/PD-L2 y/o agotando o bloqueando los linfocitos Treg u otras células supresoras inmunitarias; una terapia que estimula la regulación inmunitaria positiva, por ejemplo, con agonistas que estimulan la vía de CD-137, OX-40 y/o CD40 o GITR y/o que estimulan la función efectora de los linfocitos T; una terapia que aumenta sistémicamente la frecuencia de los linfocitos T antitumorales; una terapia que agota o inhibe los linfocitos Treg, tales como los linfocitos Treg en el tumor, por ejemplo, utilizando un antagonista de CD25 (por ejemplo, daclizumab) o por agotamiento de perlas anti-CD25 *ex vivo*; una terapia que afecta a la función de las células mieloides supresoras en el tumor; una terapia que aumenta la inmunogenicidad de las células tumorales (por ejemplo, antraciclinas); la transferencia adoptiva de linfocitos T o linfocitos NK incluyendo células modificadas genéticamente, por ejemplo, células modificadas con receptores quiméricos para el antígeno (terapia con T-CAR); una terapia que inhibe una enzima metabólica tal como la indolamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa u óxido nítrico sintetasa; una terapia que revierte/impide la anergia o el agotamiento de los linfocitos T; una terapia que desencadena la activación inmunitaria innata y/o la inflamación en un sitio tumoral; la administración de citocinas inmunoestimuladoras; o el bloqueo de citocinas inmunosupresoras.

Los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se pueden usar junto con uno o más agentes agonistas que se unen a receptores coestimuladores positivos, agentes bloqueantes que atenúan la señalización a través de receptores inhibidores, antagonistas y uno o más agentes que aumentan sistémicamente la frecuencia de los linfocitos T antitumorales, agentes que superan distintas vías supresoras inmunitarias dentro del microentorno tumoral (por ejemplo, bloquean la unión al receptor inhibidor (por ejemplo, interacciones PD-L1/PD-1), disminuyen o inhiben los Treg (por ejemplo, usando un anticuerpo monoclonal anti-CD25 (por ejemplo, daclizumab) o mediante agotamiento de perlas anti CD25 *ex vivo*), inhiben enzimas metabólicas tales como la IDO o revierten/impiden la anergia o el agotamiento de los linfocitos T) y agentes que desencadenan una activación inmunitaria innata y/o una inflamación en sitios tumorales.

En ciertos aspectos de la descripción, se administra un anticuerpo anti-TIM3 a un sujeto junto con un inhibidor de BRAF si el sujeto es positivo para la mutación BRAF V600.

Los antagonistas de PD-1 adecuados para su uso en la combiterapia descrita en el presente documento, incluyen, sin limitación, ligandos, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos biespecíficos), y agentes multivalentes. En un aspecto de la descripción, el antagonista de PD-1 es una proteína de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión Fc, tal como AMP-244. En un aspecto de la descripción, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1.

Un anticuerpo anti-PD-1 ilustrativo es nivolumab (BMS-936558) o un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de uno de los anticuerpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 y 4A11 descritos en el documento WO 2006/121168. En ciertos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab) descrito en el documento WO2012/145493; AMP-514 descrito en el documento WO 2012/145493; o PDR001. Otros anticuerpos PD-1 y otros inhibidores de PD-1 conocidos incluyen los descritos en los documentos WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, en las Patentes de EE. UU. n.º 7.635.757 y 8.217.149 y en la Publicación de Patente de EE. UU. n.º 2009/0317368. También puede utilizarse cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 divulgados en el documento WO2013/173223. Un anticuerpo anti-PD-1 que compite por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que, como uno de estos anticuerpos, también se puede usar en combiterapias.

En algunos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-PD-L1 útil en la combiterapia es BMS-936559 (denominado 12A4 en el documento WO 2007/005874 y la Patente de EE. UU. n.º 7.943.743), o un anticuerpo que comprende las CDR o las regiones variables de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4, que se describen en la Publicación PCT WO 07/005874 y en la Patente de EE. UU. n.º 7.943.743. En cierto aspecto de la descripción, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 (también conocido como durvalumab y anti-B7-H1), MPDL3280A (también conocido como atezolizumab y RG7446), MSB0010718C (también conocido como avelumab; documento WO2013/79174) o rHigM12B7. También se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 divulgados en los documentos WO2013/173223, WO2011/066389, WO2012/145493, las Patentes de EE. UU. n.º 7.635.757 y 8.217.149, y Publicación de EE. UU. n.º 2009/145493. También se pueden usar en combiterapias anticuerpos anti-PD-L1 que compiten con y/o se unen al mismo epítipo que cualquiera de estos anticuerpos.

En ciertos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 de la divulgación puede utilizarse con un antagonista de CTLA-4, por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4. En un aspecto de la descripción, un anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo seleccionado del grupo de: YERVOY® (ipilimumab o anticuerpo 10D1, descrito en la Publicación PCT WO 01/14424), tremelimumab (anteriormente ticilimumab, CP-675.206), monoclonal o anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en

cualquiera de las siguientes publicaciones: el documento WO 98/42752; el documento WO 00/37504; Patente de EE. UU. n.º 6.207.156; Hurwitz *et al.* (1998) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 95 (17): 10067-10071; Camacho *et al.* (2004) J. Clin. Oncology 22 (145): Resumen n.º 2505 (anticuerpo CP-675206); y Mokyr *et al.* (1998) Cancer Res. 58: 5301-5304. También puede utilizarse cualquiera de los anticuerpos anti-CTLA-4 divulgados en el documento WO2013/173223.

5 En otros aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 de la divulgación se utiliza junto con un antagonista de LAG3. Algunos ejemplos de anticuerpos anti-LAG3 incluyen anticuerpos que comprenden las CDR o las regiones variables de los anticuerpos 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 o 17E5, que se describen en la Publicación de Patente de EE. UU. n.º US2011/0150892, el documento WO10/19570 y el documento WO2014/008218. En un aspecto de la descripción, un anticuerpo anti-LAG-3 es BMS-986016. Otros anticuerpos anti-LAG-3 reconocidos en la técnica que
10 pueden utilizarse incluyen IMP731 e IMP-321, descritos en los documentos US 2011/007023, WO08/132601 y WO09/44273. También se pueden usar en combiterapias anticuerpos anti-LAG-3 que compiten con y/o se unen al mismo epítipo que cualquiera de estos anticuerpos.

15 En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 de la divulgación puede administrarse junto con un agonista de CD137 (4-1BB), tal como un anticuerpo agonista de CD137. Algunos anticuerpos CD137 adecuados incluyen, por ejemplo, urelumab o PF-05082566 (documento WO12/32433).

20 En otros aspectos de la descripción, puede administrarse un anticuerpo anti-TIM3 junto con un agonista de OX40, tal como un anticuerpo agonista de OX40. Algunos anticuerpos OX40 adecuados incluyen, por ejemplo, MEDI-6383, MEDI-6469 o MOXR0916 (RG7888; documento WO06/029879).

25 En un aspecto de la descripción, se administra un anticuerpo anti-TIM3 junto con un agonista de CD40, tal como un anticuerpo agonista de CD40. En ciertos aspectos de la descripción, el agente inmunooncológico es un antagonista de CD40, tal como un anticuerpo CD40 antagonista. Algunos anticuerpos CD40 adecuados incluyen, por ejemplo, lucatumumab (HCD122), dacetuzumab (SGN-40), CP-870.893 o Chi Lob 7/4.

30 En un aspecto de la descripción, se administra un anticuerpo anti-TIM3 junto con un agonista de CD27, tal como un anticuerpo agonista de CD27. Algunos anticuerpos CD27 adecuados incluyen, por ejemplo, varilumab (CDX-1127).

35 En ciertos aspectos de la descripción, el anticuerpo anti-TIM3 se administra junto con un anticuerpo anti-GITR, por ejemplo, un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de 6C8, por ejemplo, un anticuerpo humanizado que tiene las CDR de 6C8, como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/105021; un anticuerpo que comprende las CDR del anticuerpo anti-GITR descrito en el documento WO2011/028683; un anticuerpo que comprende las CDR del anticuerpo anti-GITR descrito en el documento JP2008278814, un anticuerpo que comprende las CDR del anticuerpo anti-GITR descrito en el documento WO2015/031667, el documento WO2015/187835, el documento WO2015/184099, el documento WO2016/054638, el documento WO2016/057841 o el documento WO2016/057846 u otro anticuerpo anti GITR descrito o mencionado en el presente documento.

40 En otros aspectos de la descripción, se administra un anticuerpo anti-TIM3 junto con MGA271 (contra B7H3) (documento WO11/109400).

45 En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se administra junto con un antagonista de KIR, tal como lirilumab.

50 En otros aspectos de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 se administra junto con un antagonista de IDO. Algunos antagonistas de la IDO adecuados incluyen, por ejemplo, INCB-024360 (documento WO2006/122150, documento WO07/75598, documento WO08/36653, documento WO08/36642), indoximod, NLG-919 (documento WO09/73620, documento WO09/1156652, documento WO11/56652, documento WO12/142237) o F001287.

55 En otros aspectos más de la descripción, se administra un anticuerpo anti-TIM3 junto con un agonista del receptor de tipo Toll, por ejemplo, un agonista de TLR2/4 (por ejemplo, bacilo de Calmette-Guérin); un agonista de TLR7 (por ejemplo, hiltonol o imiquimod); un agonista de TLR7/8 (por ejemplo, resiquimod); o un agonista de TLR9 (por ejemplo, CpG7909).

En un aspecto de la descripción, se administra un anti-TIM3 junto con un inhibidor del TGF-β, por ejemplo, GC1008, LY2157299, TEW7197 o IMC-TR1.

60 Los anticuerpos anti-TIM3 y las combiterapias descritas en el presente documento también se pueden utilizar junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su particular utilidad contra la enfermedad que se está tratando (por ejemplo, cáncer). Las combinaciones de los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento se pueden utilizar secuencialmente con agente(s) farmacéuticamente aceptable(s) conocido(s).

65 Por ejemplo, los anticuerpos anti-TIM3 y las combiterapias descritos en el presente documento se pueden utilizar junto con (por ejemplo, simultáneamente o por separado) un tratamiento adicional, tal como irradiación y/o quimioterapia, por ejemplo, usando camptotecina (CPT-11), 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatino, doxorubicina, irinotecán, paclitaxel,

gemcitabina, cisplatino, paclitaxel, carboplatino-paclitaxel (Taxol), doxorubicina o camptotecina + apo21/TRAIL (un combo 6X)), uno o más inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib o MG132), uno o más inhibidores de Bcl-2 (por ejemplo, BH3I-2' (inhibidor de bcl-xl), inhibidor de la indolamina dioxigenasa-1 (por ejemplo, INCB24360, indoximod, NLG-919 o F001287), AT-101 (derivado de R-(-)-gossipol), ABT-263 (molécula pequeña), GX-15-070 (obatoclax) o antagonistas de MCL-1 (proteína 1 de diferenciación celular de leucemia mieloide), antagonistas del iAP (inhibidor de la proteína de apoptosis) (por ejemplo, smac7, smac4, mimético de smac de molécula pequeña, péptidos smac sintéticos (véase Fulda *et al.*, Nat Med 2002; 8: 808-15), ISIS23722 (LY2181308) o AEG-35156 (GEM-640)), inhibidores de la HDAC (histona desacetilasa), anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, rituximab), inhibidores de la angiogénesis (por ejemplo, bevacizumab), agentes anti-angiogénicos dirigidos al VEGF y al VEGFR (por ejemplo, Avastin), triterpenoides sintéticos (véase Hyer *et al.*, Cancer Research 2005; 65: 4799-808), c-FLIP (proteína inhibidora de FLICE celular) moduladores (por ejemplo, ligandos naturales y sintéticos del PPAR γ (receptor γ de peroxisoma activado por proliferador), 5809354 o 5569100), inhibidores de cinasa (por ejemplo, sorafenib), trastuzumab, cetuximab, temsirlómus, inhibidores de la mTOR tales como rapamicina y temsirlómus, bortezomib, inhibidores de JAK2, inhibidores de HSP90, inhibidores de PI3K-AKT, lenalidomida, inhibidores de GSK3P, inhibidores de IAP y/o fármacos genotóxicos.

Los anticuerpos anti-TIM3 y las combiterapias descritos en el presente documento pueden utilizarse además junto con uno o más agentes citotóxicos antiproliferativos. Algunas clases de compuestos que pueden utilizarse como agentes citotóxicos antiproliferativos incluyen, pero sin limitación, las siguientes:

agentes alquilantes (incluyendo, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de la etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo, clormetina, ciclofosfamida (CYTOXAN®) fosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobromán, trietilenmelamina, trietilenfiofosforamina, busulfano, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina y temozolomida.

Antimetabolitos (incluyendo, sin limitación, antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa): metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

Algunos agentes antiproliferativos adecuados para la combinación con anticuerpos anti-TIM3, sin limitación, taxanos, paclitaxel (el paclitaxel está disponible comercialmente como TAXOL™), docetaxel, discodermolida (DDM), dictiostatina (DCT), pelorusida A, epotilonas, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, epotilona E, epotilona F, furanoepotilona D, desoxiepotilona BI, [17]-deshidrodesoxiepotilona B, [18]-deshidrodesoxiepotilonas B, C12,13-ciclopropil-epotilona A, epotilona A con puente C6-C8, trans-9,10-deshidroepotilona D, cis-9,10-deshidroepotilona D, 16-desmetilepotilona B, epotilona BIO, discodermolida, patupilona (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (discodermolida), TZT-1027 (soblidotina), ILX-651 (clorhidrato de tasidotina), halicondrina B, mesilato de eribulina (E-7389), hemiasterlina (HTI-286), E-7974, criptoficinas, LY-355703, inmunconjugados maitansinoides (DM-1), MKC-1, ABT-751, TI-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleuterobina, 17beta-acetoxi-2-etoxi-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol, ciclostreptina, isolaulimalida, laulimalida, 4-epi-7-deshidroxi-14,16-didesmetil-(+)-discodermolidas y criptotilona 1, además de otros agentes estabilizadores de la microtubulina conocidos en la técnica.

En los casos en que es deseable hacer que las células proliferativas de forma anómala permanezcan quiescentes junto con o antes del tratamiento con los anticuerpos anti-TIM3 descritos en el presente documento, también pueden administrarse al paciente hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos), tales como 17 α -etinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, acetato de megestrol, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida, toremifeno, ZOLADEX®. Cuando se emplean los métodos o las composiciones descritos en el presente documento, también se pueden administrar otros agentes utilizados en la modulación del crecimiento o metástasis tumoral en un entorno clínico, tales como antimiméticos, como se desee

En ciertos aspectos de la descripción, la combinación del anticuerpo anti-TIM3 y un segundo agente analizada en el presente documento puede administrarse simultáneamente como una única composición en un portador farmacéuticamente aceptable, o simultáneamente como composiciones individuales con el anticuerpo anti-TIM3 y el segundo agente en un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto de la descripción, la combinación del anticuerpo anti-TIM3 y el segundo agente puede administrarse secuencialmente. La administración de los dos agentes puede comenzar en momentos con, por ejemplo, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 5 días, 7 días, o una o más semanas de separación, o la administración del segundo agente puede comenzar, por ejemplo, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 5 días, 7 días, o una o más semanas después de que se haya administrado el primer agente

En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo antineoplásico que puede combinarse con un anticuerpo anti-TIM3 y/o un segundo agente incluye RITUXAN® (rituximab), HERCEPTIN® (trastuzumab), BEXXAR® (tositumomab), ZEVALIN® (ibritumomab), CAMPATH® (alemtuzumab), LYMPHOCIDE® (epruzumab), AVASTIN® (bevacizumab) y

TARCEVA® (erlotinib) o cualquier combinación de los mismos. En otros aspectos de la descripción, el segundo anticuerpo útil para la combiterapia con un anticuerpo anti-TIM3 puede ser un conjugado de anticuerpo-fármaco.

5 En otro aspecto de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 solo o junto con otro agente se utiliza al mismo tiempo o secuencialmente con un trasplante de médula ósea para tratar diversos tumores de origen hematopoyético.

10 En el presente documento se describen métodos para alterar un acontecimiento adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer) con un agente inmunoestimulador, que comprende la administración de un anticuerpo anti-TIM3 con o sin un segundo agente, a un sujeto. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un método de reducción de la incidencia de colitis o diarrea inducida por un anticuerpo terapéutico inmunoestimulador mediante la administración de un esteroide no absorbible al paciente. Como se utiliza en el presente documento, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que presenta un extenso metabolismo de primer paso de manera que, después del metabolismo en el hígado, la biodisponibilidad del esteroide es baja, es decir, menos de aproximadamente un 20 %. En un aspecto descrito en el presente documento, el esteroide no absorbible es budesonida. La budesonida es un glucocorticoesteroide de acción local, que se metaboliza ampliamente, principalmente por el hígado, después de la administración oral. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesonida dependiente del tiempo y del pH desarrollada para optimizar la administración de fármacos al íleon y a lo largo del colon. ENTOCORT EC® está aprobado en Estados Unidos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn de leve a moderada que afecta al íleon y/o al colon ascendente. En otros aspectos más de la descripción, un anticuerpo anti-TIM3 junto con un esteroide no absorbible puede combinarse además con un salicilato. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA tales como, por ejemplo: sulfasalazina (AZULFIDINE®, Pharmacia & Up John); olsalazina (DJPENTUM®, Pharmacia & Up John); balsalazida (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); y mesalamina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharma, Inc.; ROWASA®, Solvay).

Tabla 1.

SEQ ID	Descripción	Secuencias
1	Cadena pesada de TIM3.5 (13A3) IgG1.1f	QQLQSGGGLVPSSTLSLCTVSGGSLSSSTYMGWIRQPPQKGLWISIIYVIGFTYIPSL KGRVTISVDTSDNGPSLSSVTAADTAIVYCATGCPVGVYMGFTDPMQCTIATVSSASTGPR VFPLAPSSKSTSGTAAAGCIVKNDYPPRKYVYVWNGALISGVHTTFAVLASGGLYSLSSVTVP SSSLGQCTYICVYHKKQNTKDKVEFKSCDTHCFCPCAPAPAGAPSVTLFPKPKQIMLSKTEVE RTEPVTGVVGVSHEDFVYKFWYDGVYHAKTRPRRQKQNSTYRVVSVLTALHQQWINGKBY KQVSRKALPSSLENTISKAGQPPRQVYTLFPSEEMTKQVSLTCLVKGFTPSDLAVENSH GQPRMYATTPVLDSDGSPFLYSKLTVDNKGQGGVYFSCSYMHEALHNYTKSLSLSPCK*
2	Cadena pesada de 8B9 IgG1.1f	QVQLQSGGGLVPSSTLSLCTVSGGSLSSSTYMGWIRQPPQKGLWISIIYVIGFTYIPSL RVTISVDTSDNGPSLSSVTAADTAIVYCATGCPVGVYMGFTDPMQCTIATVSSASTGPR SSNTSGGTAAAGCIVKNDYPPRKYVYVWNGALISGVHTTFAVLASGGLYSLSSVTVP QTYICQVHKKQNTKDKVEFKSCDTHCFCPCAPAPAGAPSVTLFPKPKQIMLSKTEVE CVVDSHEDFVYKFWYDGVYHAKTRPRRQKQNSTYRVVSVLTALHQQWINGKBY KALPSSLENTISKAGQPPRQVYTLFPSEEMTKQVSLTCLVKGFTPSDLAVENSHQPRMY ATTPVLDSDGSPFLYSKLTVDNKGQGGVYFSCSYMHEALHNYTKSLSLSPCK*
3	Cadena pesada de TIM3.6 (8C4) IgG1.1f	QVQLQSGGGLVPSSTLSLCTVSGGSLSSSTYMGWIRQPPQKGLWISIIYVIGFTYIPSL RVTISVDTSDNGPSLSSVTAADTAIVYCATGCPVGVYMGFTDPMQCTIATVSSASTGPR SSNTSGGTAAAGCIVKNDYPPRKYVYVWNGALISGVHTTFAVLASGGLYSLSSVTVP QTYICQVHKKQNTKDKVEFKSCDTHCFCPCAPAPAGAPSVTLFPKPKQIMLSKTEVE CVVDSHEDFVYKFWYDGVYHAKTRPRRQKQNSTYRVVSVLTALHQQWINGKBY KALPSSLENTISKAGQPPRQVYTLFPSEEMTKQVSLTCLVKGFTPSDLAVENSHQPRMY ATTPVLDSDGSPFLYSKLTVDNKGQGGVYFSCSYMHEALHNYTKSLSLSPCK*
4	Cadena pesada de TIM3.2 (17C3) IgG1.1f	QVQLVSGGGLVPSSTLSLCTVSGGSLSSSTYMGWIRQPPQKGLWISIIYVIGFTYIPSL GRVTISVDTSDNGPSLSSVTAADTAIVYCATGCPVGVYMGFTDPMQCTIATVSSASTGPR VFPLAPSSKSTSGTAAAGCIVKNDYPPRKYVYVWNGALISGVHTTFAVLASGGLYSLSSVTVP SSSLGQCTYICVYHKKQNTKDKVEFKSCDTHCFCPCAPAPAGAPSVTLFPKPKQIMLSKTEVE RTEPVTGVVGVSHEDFVYKFWYDGVYHAKTRPRRQKQNSTYRVVSVLTALHQQWINGKBY KQVSRKALPSSLENTISKAGQPPRQVYTLFPSEEMTKQVSLTCLVKGFTPSDLAVENSH GQPRMYATTPVLDSDGSPFLYSKLTVDNKGQGGVYFSCSYMHEALHNYTKSLSLSPCK*
5	Cadena pesada de 9F6 IgG1.1f	QVQLVSGGGLVPSSTLSLCTVSGGSLSSSTYMGWIRQPPQKGLWISIIYVIGFTYIPSL GRVTISVDTSDNGPSLSSVTAADTAIVYCATGCPVGVYMGFTDPMQCTIATVSSASTGPR VFPLAPSSKSTSGTAAAGCIVKNDYPPRKYVYVWNGALISGVHTTFAVLASGGLYSLSSVTVP SSSLGQCTYICVYHKKQNTKDKVEFKSCDTHCFCPCAPAPAGAPSVTLFPKPKQIMLSKTEVE RTEPVTGVVGVSHEDFVYKFWYDGVYHAKTRPRRQKQNSTYRVVSVLTALHQQWINGKBY KQVSRKALPSSLENTISKAGQPPRQVYTLFPSEEMTKQVSLTCLVKGFTPSDLAVENSH GQPRMYATTPVLDSDGSPFLYSKLTVDNKGQGGVYFSCSYMHEALHNYTKSLSLSPCK*
6	Cadena pesada de TIM3.4 (3G4) IgG1.1f	QVQLVSGGGLVPSSTLSLCTVSGGSLSSSTYMGWIRQPPQKGLWISIIYVIGFTYIPSL GRVTISVDTSDNGPSLSSVTAADTAIVYCATGCPVGVYMGFTDPMQCTIATVSSASTGPR VFPLAPSSKSTSGTAAAGCIVKNDYPPRKYVYVWNGALISGVHTTFAVLASGGLYSLSSVTVP SSSLGQCTYICVYHKKQNTKDKVEFKSCDTHCFCPCAPAPAGAPSVTLFPKPKQIMLSKTEVE RTEPVTGVVGVSHEDFVYKFWYDGVYHAKTRPRRQKQNSTYRVVSVLTALHQQWINGKBY KQVSRKALPSSLENTISKAGQPPRQVYTLFPSEEMTKQVSLTCLVKGFTPSDLAVENSH GQPRMYATTPVLDSDGSPFLYSKLTVDNKGQGGVYFSCSYMHEALHNYTKSLSLSPCK*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
7	Cadena pesada de TIM3.9 (17C8) IgG1.1f	QVQLVSGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSDIYKSWIRKQAPGKGLWVSFTSSSSIIYYADSVK GRFTISRNKAKMSLYIQMNSLRAEQAVTYCARNGISSQREYYGMQVWGQGTIVVSSASTKGP9 VPLAPSSSTSGGTALGCLVKDTEPEPTVSVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVATVP SSSLQGTQYICWNHRSNKKDKNPESKNTHTCPCFAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREBQNSTYRVVSVLTVLDQDLNGKEY KCVSNKALPSSIEKTTISKAGQPREPQVYTLPPSRERMKNQVSECLVKGFPYSDIAVEWESN GQPRNNYKTPPVLDSDGSFFELSKLTVDKSRWQQGNVPSGVMHRALEHNTQNSLSLSPG*
8	Cadena pesada de TIM3.5 (13A3) IgG1.1f (sin K carboxiterminal)	QQLQSSGGLVPESESLSLCTVSGSSLSRSRTYMWLQPPKGLKELIGSLYYGFTYTPSL KSRVTSVDTSRNQPSIKLSSTVTAADTAVTYCARNGFTGGYAHWFDPMGQGTIVVSSASTKGP8 VPLAPSSSTSGGTALGCLVKDTEPEPTVSVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVATVP SSSLQGTQYICWNHRSNKKDKNPESKNTHTCPCFAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREBQNSTYRVVSVLTVLDQDLNGKEY KCVSNKALPSSIEKTTISKAGQPREPQVYTLPPSRERMKNQVSECLVKGFPYSDIAVEWESN GQPRNNYKTPPVLDSDGSFFELSKLTVDKSRWQQGNVPSGVMHRALEHNTQNSLSLSPG*
9	Cadena pesada de 8B9 IgG1.1f (sin K carboxiterminal)	QVQLSGEGLVKESEETLSLTCTVSGSISGRHYKMMIRQFPKGLKELIGYTHYSSITHNSLSK9 RVTISVDTSRNQPSIKLSSTVTAADTAVTYCARNGFTGGYKMDIRGQGTIVVSSASTKGPVFPPLAP SSSLQGTQYICWNHRSNKKDKNPESKNTHTCPCFAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREBQNSTYRVVSVLTVLDQDLNGKEY KCVSNKALPSSIEKTTISKAGQPREPQVYTLPPSRERMKNQVSECLVKGFPYSDIAVEWESN GQPRNNYKTPPVLDSDGSFFELSKLTVDKSRWQQGNVPSGVMHRALEHNTQNSLSLSPG*
10	Cadena pesada de TIM3.6 (8C4) IgG1.1f (sin K carboxiterminal)	QVQLSGEGLVKESEETLSLTCTVSGSISGRHYKMMIRQFPKGLKELIGYTHYSSITHNSLSK9 RVTISVDTSRNQPSIKLSSTVTAADTAVTYCARNGFTGGYKMDIRGQGTIVVSSASTKGPVFPPLAP SSSLQGTQYICWNHRSNKKDKNPESKNTHTCPCFAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREBQNSTYRVVSVLTVLDQDLNGKEY KCVSNKALPSSIEKTTISKAGQPREPQVYTLPPSRERMKNQVSECLVKGFPYSDIAVEWESN GQPRNNYKTPPVLDSDGSFFELSKLTVDKSRWQQGNVPSGVMHRALEHNTQNSLSLSPG*
11	Cadena pesada de TIM3.2 (17C3) IgG1.1f (sin K carboxiterminal)	QVQLVSGGGLVPEGGLSLRLSCAASGFTFSDIYKSWIRKQAPGKGLWVSFTSSSSIIYYADSVK GRFTISRNKAKMSLYIQMNSLRAEQAVTYCARNGISSQREYYGMQVWGQGTIVVSSASTKGP9 VPLAPSSSTSGGTALGCLVKDTEPEPTVSVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVATVP SSSLQGTQYICWNHRSNKKDKNPESKNTHTCPCFAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREBQNSTYRVVSVLTVLDQDLNGKEY KCVSNKALPSSIEKTTISKAGQPREPQVYTLPPSRERMKNQVSECLVKGFPYSDIAVEWESN GQPRNNYKTPPVLDSDGSFFELSKLTVDKSRWQQGNVPSGVMHRALEHNTQNSLSLSPG*
12	Cadena pesada de 9F6 IgG1.1f (sin K carboxiterminal)	QVQLVSGGGLVPEGGLSLRLSCAASGFTFSDIYKSWIRKQAPGKGLWVSFTSSSSIIYYADSVK GRFTISRNKAKMSLYIQMNSLRAEQAVTYCARNGISSQREYYGMQVWGQGTIVVSSASTKGP9 VPLAPSSSTSGGTALGCLVKDTEPEPTVSVNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVATVP SSSLQGTQYICWNHRSNKKDKNPESKNTHTCPCFAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREBQNSTYRVVSVLTVLDQDLNGKEY KCVSNKALPSSIEKTTISKAGQPREPQVYTLPPSRERMKNQVSECLVKGFPYSDIAVEWESN GQPRNNYKTPPVLDSDGSFFELSKLTVDKSRWQQGNVPSGVMHRALEHNTQNSLSLSPG*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
13	Cadena pesada de TIM3.4 (3G4) IgG1.1f (sin K carboxiterminal)	QVQLVSGGGLVPRGGSLRLSCAASGFTPSDYTRMSWIRQAPKGLKHWVSRTISGSIYYADSVK GEFTLSRDNAKSLYLQKNSLRARDAVAVYCARSGISSSWSYAYGMDVWGQFTTVSSASTKGP SVFLAPSSKSTSGGTALAGLVKDYKEEPKVPVSGNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSAVVTP PSSSLGTQYICVNHHSNTAVDVAEVSCEHTHTCPCPAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMI SRTEFTVAVVDSHEDPVEVKNVAVDGVENAKNTFRREQVNSTYRVSVLVTHQDMINGEY YKQVSNKALPAPLRTISAKAGQPRFQVTLTPSRRENTKQVSLICLVKGFYSLEAVENESH GQPNNTTTPVLDSDGSEFTLSKLTVDKSRWQGVFSCSVMHDAHHHTYTKSLSLSPG*
14	Cadena pesada de TIM3.9 (17C8) IgG1.1f (sin K carboxiterminal)	QVQLVSGGGLVPRGGSLRLSCAASGFTPSDYIRKSWIRQAPKGLKHWVSPISSSSGSIYYADSVK GEFTLSRDNAKSLYLQKNSLRARDAVAVYCARSGISSEWRYTGHVWGQFTTVSSASTKGP SVFLAPSSKSTSGGTALAGLVKDYKEEPKVPVSGNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSAVVTP SSSLGTQYICVNHHSNTAVDVAEVSCEHTHTCPCPAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMI SRTEFTVAVVDSHEDPVEVKNVAVDGVENAKNTFRREQVNSTYRVSVLVTHQDMINGEY YKQVSNKALPAPLRTISAKAGQPRFQVTLTPSRRENTKQVSLICLVKGFYSLEAVENESH GQPNNTTTPVLDSDGSEFTLSKLTVDKSRWQGVFSCSVMHDAHHHTYTKSLSLSPG*
15	Cadena pesada de TIM3.5 (13A3) IgG1.3f	QVQLVSGGGLVPRGGSLRLSCAASGFTPSDYIRKSWIRQAPKGLKHWVSPISSGFTYINPSL KSPVTLSDTSKQPSLKLSSVTAADTAVYCARSGISGPGYAHWFDPAGQGLVTVSSASTKGP SVFLAPSSKSTSGGTALAGLVKDYKEEPKVPVSGNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSAVVTP SSSLGTQYICVNHHSNTAVDVAEVSCEHTHTCPCPAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMI SRTEFTVAVVDSHEDPVEVKNVAVDGVENAKNTFRREQVNSTYRVSVLVTHQDMINGEY YKQVSNKALPAPLRTISAKAGQPRFQVTLTPSRRENTKQVSLICLVKGFYSLEAVENESH GQPNNTTTPVLDSDGSEFTLSKLTVDKSRWQGVFSCSVMHDAHHHTYTKSLSLSPG*
16	Cadena pesada de 8B9 IgG1.3f	QVQLVSGGGLVPRGGSLRLSCAASGFTPSDYIRKSWIRQAPKGLKHWVSPISSGFTYINPSL KSPVTLSDTSKQPSLKLSSVTAADTAVYCARSGISGPGYAHWFDPAGQGLVTVSSASTKGP SVFLAPSSKSTSGGTALAGLVKDYKEEPKVPVSGNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSAVVTP SSSLGTQYICVNHHSNTAVDVAEVSCEHTHTCPCPAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMI SRTEFTVAVVDSHEDPVEVKNVAVDGVENAKNTFRREQVNSTYRVSVLVTHQDMINGEY YKQVSNKALPAPLRTISAKAGQPRFQVTLTPSRRENTKQVSLICLVKGFYSLEAVENESH GQPNNTTTPVLDSDGSEFTLSKLTVDKSRWQGVFSCSVMHDAHHHTYTKSLSLSPG*
17	Cadena pesada de TIM3.6 (8C4) IgG1.3f	QVQLVSGGGLVPRGGSLRLSCAASGFTPSDYIRKSWIRQAPKGLKHWVSPISSGFTYINPSL KSPVTLSDTSKQPSLKLSSVTAADTAVYCARSGISGPGYAHWFDPAGQGLVTVSSASTKGP SVFLAPSSKSTSGGTALAGLVKDYKEEPKVPVSGNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSAVVTP SSSLGTQYICVNHHSNTAVDVAEVSCEHTHTCPCPAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMI SRTEFTVAVVDSHEDPVEVKNVAVDGVENAKNTFRREQVNSTYRVSVLVTHQDMINGEY YKQVSNKALPAPLRTISAKAGQPRFQVTLTPSRRENTKQVSLICLVKGFYSLEAVENESH GQPNNTTTPVLDSDGSEFTLSKLTVDKSRWQGVFSCSVMHDAHHHTYTKSLSLSPG*
18	Cadena pesada de TIM3.2 (17C3) IgG1.3f	QVQLVSGGGLVPRGGSLRLSCAASGFTPSDYIRKSWIRQAPKGLKHWVSPISSGFTYINPSL KSPVTLSDTSKQPSLKLSSVTAADTAVYCARSGISGPGYAHWFDPAGQGLVTVSSASTKGP SVFLAPSSKSTSGGTALAGLVKDYKEEPKVPVSGNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSAVVTP SSSLGTQYICVNHHSNTAVDVAEVSCEHTHTCPCPAPAEAGAPSVLPFPKPKDTLMI SRTEFTVAVVDSHEDPVEVKNVAVDGVENAKNTFRREQVNSTYRVSVLVTHQDMINGEY YKQVSNKALPAPLRTISAKAGQPRFQVTLTPSRRENTKQVSLICLVKGFYSLEAVENESH GQPNNTTTPVLDSDGSEFTLSKLTVDKSRWQGVFSCSVMHDAHHHTYTKSLSLSPG*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
19	Cadena pesada de 9F6 IgG1.3f	CQQLVESGGSLVAPGQGLRLSCAASGFTISDIYKSWLRQAPGKGLWVSHFGSGSSIIYYADSVK GRFTISRDNKASLEKNNISLRVEDAVYCARQGISGWTYYGMDVWGQGTAVVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVADYFPEEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTQYICWVNHKPSNTKVDKVPKSCDATHCPCPAPAEAGCAPSVLPFEPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVFNWYDGVVHNATKPRPEQYNSTYRVAVLTVDHQMWLNCHBY KCVSNKALPAPLEKTIISKAKQPPRPVYTLFPSEEMTKHQVSTCLKSGFTISDIAYEWSN GQPENNYKTPPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRMQQGVFSCSVMHALNNHTQKSLSLSPG*
20	Cadena pesada de TIM3.4 (3G4) IgG1.3f	CQQLVESGGSLVAPGQGLRLSCAASGFTISDIYKSWLRQAPGKGLWVSHFGSGSSIIYYADSVK GRFTISRDNKASLEKNNISLRVEDAVYCARQGISGWTYYGMDVWGQGTAVVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVADYFPEEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTQYICWVNHKPSNTKVDKVPKSCDATHCPCPAPAEAGCAPSVLPFEPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVFNWYDGVVHNATKPRPEQYNSTYRVAVLTVDHQMWLNCHBY KCVSNKALPAPLEKTIISKAKQPPRPVYTLFPSEEMTKHQVSTCLKSGFTISDIAYEWSN GQPENNYKTPPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRMQQGVFSCSVMHALNNHTQKSLSLSPG*
21	Cadena pesada de TIM3.9 (17C8) IgG1.3f	CQQLVESGGSLVAPGQGLRLSCAASGFTISDIYKSWLRQAPGKGLWVSHFGSGSSIIYYADSVK GRFTISRDNKASLEKNNISLRVEDAVYCARQGISGWTYYGMDVWGQGTAVVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVADYFPEEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTQYICWVNHKPSNTKVDKVPKSCDATHCPCPAPAEAGCAPSVLPFEPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVFNWYDGVVHNATKPRPEQYNSTYRVAVLTVDHQMWLNCHBY KCVSNKALPAPLEKTIISKAKQPPRPVYTLFPSEEMTKHQVSTCLKSGFTISDIAYEWSN GQPENNYKTPPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRMQQGVFSCSVMHALNNHTQKSLSLSPG*
22	Cadena pesada de TIM3.5 (13A3) IgG1.3f (sin K carboxiterminal)	CQQLVESGGSLVAPGQGLRLSCAASGFTISDIYKSWLRQAPGKGLWVSHFGSGSSIIYYADSVK GRFTISRDNKASLEKNNISLRVEDAVYCARQGISGWTYYGMDVWGQGTAVVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVADYFPEEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTQYICWVNHKPSNTKVDKVPKSCDATHCPCPAPAEAGCAPSVLPFEPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVFNWYDGVVHNATKPRPEQYNSTYRVAVLTVDHQMWLNCHBY KCVSNKALPAPLEKTIISKAKQPPRPVYTLFPSEEMTKHQVSTCLKSGFTISDIAYEWSN GQPENNYKTPPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRMQQGVFSCSVMHALNNHTQKSLSLSPG*
23	Cadena pesada de 8B9 IgG1.3f (sin K carboxiterminal)	CQQLVESGGSLVAPGQGLRLSCAASGFTISDIYKSWLRQAPGKGLWVSHFGSGSSIIYYADSVK GRFTISRDNKASLEKNNISLRVEDAVYCARQGISGWTYYGMDVWGQGTAVVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVADYFPEEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTQYICWVNHKPSNTKVDKVPKSCDATHCPCPAPAEAGCAPSVLPFEPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVFNWYDGVVHNATKPRPEQYNSTYRVAVLTVDHQMWLNCHBY KCVSNKALPAPLEKTIISKAKQPPRPVYTLFPSEEMTKHQVSTCLKSGFTISDIAYEWSN GQPENNYKTPPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRMQQGVFSCSVMHALNNHTQKSLSLSPG*
24	Cadena pesada de TIM3.6 (8C4) IgG1.3f (sin K carboxiterminal)	CQQLVESGGSLVAPGQGLRLSCAASGFTISDIYKSWLRQAPGKGLWVSHFGSGSSIIYYADSVK GRFTISRDNKASLEKNNISLRVEDAVYCARQGISGWTYYGMDVWGQGTAVVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVADYFPEEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTQYICWVNHKPSNTKVDKVPKSCDATHCPCPAPAEAGCAPSVLPFEPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVFNWYDGVVHNATKPRPEQYNSTYRVAVLTVDHQMWLNCHBY KCVSNKALPAPLEKTIISKAKQPPRPVYTLFPSEEMTKHQVSTCLKSGFTISDIAYEWSN GQPENNYKTPPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRMQQGVFSCSVMHALNNHTQKSLSLSPG*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
25	Cadena pesada de TIM3.2 (17C3) IgG1.3f (sin K carboxiterminal)	QVQLVSGGAVKPKGASVKKCKASGTTFTSYIMHWVRKAPGGLEMMGILINPRGDSIIYAQKQ GRVIMRDTSTSTVYVWELSSLESDTAVYCARDFYSGNTFYGMQVWGSGTAVTVSSASTKGPS VPELAPSSKSTSGGTAAGCLVADYFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFPAVALDSGLYSLSVATVP SSLSGTCFTYICNVNHPKSTKPKVDKRVKPKDKTHTCPCPAPAEAGAPSVFLPPPKDTLMIS RPEPTCVVVDVSHEDPEVFNWYGVGVNHAKTTPRECKNQSTYRVSVLTVDLQDMLNGKEY KCKVSKALPSSGIENITISKAKGFERPEQVYTLPPSRERMTKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESK GQPERMTTTPPVLDSDGSEFTLKSLTVDKSRMQGNVPSCSVNHRALRMHTQKSLSPGK*
26	Cadena pesada de 9F6 IgG1.3f (sin K carboxiterminal)	QVQLVSSGGGLVKPGGSLRLSCAASGRTFSYIMSWIRKAGNGLEWVSFISGGSGTYYIADSVK GRFTISPDNAKNSLILQMSLRADDAVYICAREGISGWSYIYGMQVWGSGTAVTVSSASTKGP VPELAPSSKSTSGGTAAGCLVADYFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFPAVALDSGLYSLSVATVP SSLSGTCFTYICNVNHPKSTKPKVDKRVKPKDKTHTCPCPAPAEAGAPSVFLPPPKDTLMIS RPEPTCVVVDVSHEDPEVFNWYGVGVNHAKTTPRECKNQSTYRVSVLTVDLQDMLNGKEY KCKVSKALPSSGIENITISKAKGFERPEQVYTLPPSRERMTKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESK GQPERMTTTPPVLDSDGSEFTLKSLTVDKSRMQGNVPSCSVNHRALRMHTQKSLSPGK*
27	Cadena pesada de TIM3.4 (3G4) IgG1.3f (sin K carboxiterminal)	QVQLVSSGGGLVKPGGSLRLSCAASGRTFSYIMSWIRKAGNGLEWVSFISGGSGTYYIADSVK GRFTISPDNAKNSLILQMSLRADDAVYICAREGISGWSYIYGMQVWGSGTAVTVSSASTKGP VPELAPSSKSTSGGTAAGCLVADYFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFPAVALDSGLYSLSVATVP SSLSGTCFTYICNVNHPKSTKPKVDKRVKPKDKTHTCPCPAPAEAGAPSVFLPPPKDTLMIS RPEPTCVVVDVSHEDPEVFNWYGVGVNHAKTTPRECKNQSTYRVSVLTVDLQDMLNGKEY KCKVSKALPSSGIENITISKAKGFERPEQVYTLPPSRERMTKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESK GQPERMTTTPPVLDSDGSEFTLKSLTVDKSRMQGNVPSCSVNHRALRMHTQKSLSPGK*
28	Cadena pesada de TIM3.9 (17C8) IgG1.3f (sin K carboxiterminal)	QVQLVSSGGGLVKPGGSLRLSCAASGRTFSYIMSWIRKAGNGLEWVSFISGGSGTYYIADSVK GRFTISPDNAKNSLILQMSLRADDAVYICAREGISGWSYIYGMQVWGSGTAVTVSSASTKGP VPELAPSSKSTSGGTAAGCLVADYFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFPAVALDSGLYSLSVATVP SSLSGTCFTYICNVNHPKSTKPKVDKRVKPKDKTHTCPCPAPAEAGAPSVFLPPPKDTLMIS RPEPTCVVVDVSHEDPEVFNWYGVGVNHAKTTPRECKNQSTYRVSVLTVDLQDMLNGKEY KCKVSKALPSSGIENITISKAKGFERPEQVYTLPPSRERMTKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESK GQPERMTTTPPVLDSDGSEFTLKSLTVDKSRMQGNVPSCSVNHRALRMHTQKSLSPGK*
72	Cadena pesada de TIM3.10 (13A3) IgG1.1f (N60Q)	QVQLVSSGGGLVKPGGSLRLSCAASGRTFSYIMSWIRKAGNGLEWVSFISGGSGTYYIADSVK GRFTISPDNAKNSLILQMSLRADDAVYICAREGISGWSYIYGMQVWGSGTAVTVSSASTKGP VPELAPSSKSTSGGTAAGCLVADYFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFPAVALDSGLYSLSVATVP SSLSGTCFTYICNVNHPKSTKPKVDKRVKPKDKTHTCPCPAPAEAGAPSVFLPPPKDTLMIS RPEPTCVVVDVSHEDPEVFNWYGVGVNHAKTTPRECKNQSTYRVSVLTVDLQDMLNGKEY KCKVSKALPSSGIENITISKAKGFERPEQVYTLPPSRERMTKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESK GQPERMTTTPPVLDSDGSEFTLKSLTVDKSRMQGNVPSCSVNHRALRMHTQKSLSPGK*
73	Cadena pesada de TIM3.11 (13A3) IgG1.1f (N60S)	QVQLVSSGGGLVKPGGSLRLSCAASGRTFSYIMSWIRKAGNGLEWVSFISGGSGTYYIADSVK GRFTISPDNAKNSLILQMSLRADDAVYICAREGISGWSYIYGMQVWGSGTAVTVSSASTKGP VPELAPSSKSTSGGTAAGCLVADYFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFPAVALDSGLYSLSVATVP SSLSGTCFTYICNVNHPKSTKPKVDKRVKPKDKTHTCPCPAPAEAGAPSVFLPPPKDTLMIS RPEPTCVVVDVSHEDPEVFNWYGVGVNHAKTTPRECKNQSTYRVSVLTVDLQDMLNGKEY KCKVSKALPSSGIENITISKAKGFERPEQVYTLPPSRERMTKQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESK GQPERMTTTPPVLDSDGSEFTLKSLTVDKSRMQGNVPSCSVNHRALRMHTQKSLSPGK*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
74	Cadena pesada de TIM3.12 (13A3) IgG1.1f (N60A)	QLQLQSGGGLVKPSETELSLCTVSGSSLSRSYTWGMKIQPPKGLKLEWIGSIYSGFTTYNPSL KSRVTISVDTSKQPSLALSSVTAADTAATVYCATGGPFGDYAHMFDPWGGQGLVTVSSASTKGPS VFEIAPSSSTSGCTAALGCLVNDYFPEPVTSWMSGALTSQVHTTFAVLOSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQFTICWYHKEPNTVQKVEPKSCDNTHTCPCPAPFAEGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTEPTCVVVDVSHEDPEVKNTNNTVDGVVHNMTKPREEQNSTIYVSVYLVLEQWLMGRKY KCNVSNKALPSSTEKTIISNKGQPRFQVTLFPSRREMTKNGVSLCLVKGFTFSDIAVERESN GQPRNNTKTPPVLDSDGSEFFLYSLTVDRSRQKGVFSCSWHREALHHHTYQKSLSLSPGK*
75	Cadena pesada de TIM3.13 (13A3) IgG1.1f (D101E)	QLQLQSGGGLVKPSETELSLCTVSGSSLSRSYTWGMKIQPPKGLKLEWIGSIYSGFTTYNPSL KSRVTISVDTSKQPSLALSSVTAADTAATVYCATGGPFGDYAHMFDPWGGQGLVTVSSASTKGPS VFEIAPSSSTSGCTAALGCLVNDYFPEPVTSWMSGALTSQVHTTFAVLOSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQFTICWYHKEPNTVQKVEPKSCDNTHTCPCPAPFAEGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTEPTCVVVDVSHEDPEVKNTNNTVDGVVHNMTKPREEQNSTIYVSVYLVLEQWLMGRKY KCNVSNKALPSSTEKTIISNKGQPRFQVTLFPSRREMTKNGVSLCLVKGFTFSDIAVERESN GQPRNNTKTPPVLDSDGSEFFLYSLTVDRSRQKGVFSCSWHREALHHHTYQKSLSLSPGK*
76	Cadena pesada de TIM3.14 (13A3) IgG1.1f (P102V)	QLQLQSGGGLVKPSETELSLCTVSGSSLSRSYTWGMKIQPPKGLKLEWIGSIYSGFTTYNPSL KSRVTISVDTSKQPSLALSSVTAADTAATVYCATGGPFGDYAHMFDPWGGQGLVTVSSASTKGPS VFEIAPSSSTSGCTAALGCLVNDYFPEPVTSWMSGALTSQVHTTFAVLOSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQFTICWYHKEPNTVQKVEPKSCDNTHTCPCPAPFAEGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTEPTCVVVDVSHEDPEVKNTNNTVDGVVHNMTKPREEQNSTIYVSVYLVLEQWLMGRKY KCNVSNKALPSSTEKTIISNKGQPRFQVTLFPSRREMTKNGVSLCLVKGFTFSDIAVERESN GQPRNNTKTPPVLDSDGSEFFLYSLTVDRSRQKGVFSCSWHREALHHHTYQKSLSLSPGK*
77	Cadena pesada de TIM3.15 (13A3) IgG1.1f (P102Y)	QLQLQSGGGLVKPSETELSLCTVSGSSLSRSYTWGMKIQPPKGLKLEWIGSIYSGFTTYNPSL KSRVTISVDTSKQPSLALSSVTAADTAATVYCATGGPFGDYAHMFDPWGGQGLVTVSSASTKGPS VFEIAPSSSTSGCTAALGCLVNDYFPEPVTSWMSGALTSQVHTTFAVLOSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQFTICWYHKEPNTVQKVEPKSCDNTHTCPCPAPFAEGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTEPTCVVVDVSHEDPEVKNTNNTVDGVVHNMTKPREEQNSTIYVSVYLVLEQWLMGRKY KCNVSNKALPSSTEKTIISNKGQPRFQVTLFPSRREMTKNGVSLCLVKGFTFSDIAVERESN GQPRNNTKTPPVLDSDGSEFFLYSLTVDRSRQKGVFSCSWHREALHHHTYQKSLSLSPGK*
78	Cadena pesada de TIM3.16 (13A3) IgG1.1f (P102L)	QLQLQSGGGLVKPSETELSLCTVSGSSLSRSYTWGMKIQPPKGLKLEWIGSIYSGFTTYNPSL KSRVTISVDTSKQPSLALSSVTAADTAATVYCATGGPFGDYAHMFDPWGGQGLVTVSSASTKGPS VFEIAPSSSTSGCTAALGCLVNDYFPEPVTSWMSGALTSQVHTTFAVLOSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQFTICWYHKEPNTVQKVEPKSCDNTHTCPCPAPFAEGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTEPTCVVVDVSHEDPEVKNTNNTVDGVVHNMTKPREEQNSTIYVSVYLVLEQWLMGRKY KCNVSNKALPSSTEKTIISNKGQPRFQVTLFPSRREMTKNGVSLCLVKGFTFSDIAVERESN GQPRNNTKTPPVLDSDGSEFFLYSLTVDRSRQKGVFSCSWHREALHHHTYQKSLSLSPGK*
79	Cadena pesada de TIM3.17 (13A3) IgG1.1f (N60Q/P102Y)	QLQLQSGGGLVKPSETELSLCTVSGSSLSRSYTWGMKIQPPKGLKLEWIGSIYSGFTTYNPSL KSRVTISVDTSKQPSLALSSVTAADTAATVYCATGGPFGDYAHMFDPWGGQGLVTVSSASTKGPS VFEIAPSSSTSGCTAALGCLVNDYFPEPVTSWMSGALTSQVHTTFAVLOSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQFTICWYHKEPNTVQKVEPKSCDNTHTCPCPAPFAEGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTEPTCVVVDVSHEDPEVKNTNNTVDGVVHNMTKPREEQNSTIYVSVYLVLEQWLMGRKY KCNVSNKALPSSTEKTIISNKGQPRFQVTLFPSRREMTKNGVSLCLVKGFTFSDIAVERESN GQPRNNTKTPPVLDSDGSEFFLYSLTVDRSRQKGVFSCSWHREALHHHTYQKSLSLSPGK*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
349	Cadena pesada de TIM3.18 (13A3) IgG1.1f (N60Q/D101E)	CLOLESQGLVKEPSETLSLCTVSGSSLSRSYWGATKQPFQKLEWISLYSGFTYIQPSL KSRVTISVDTSKQPSLKLSSVTAADTAATVYCAQGGYQGLAHWPDPKQGLVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGTAALGCLVDFPEFVTVSSMSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTITICVNHKPSNTKVKPKVPEKSCDNTHTCPCPAPAEKAPSVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKRWYVDGVVHNATKPRKQVNSTYVAVSVLTVAHQWLNKQKY KCVSNKALPSSIEKTISSAKGQPREPQVTLFPPSRERMKNQVSECLVKGFPYPSDIAVENESN GQPERNYKTPPVLDSDGSPFLVLSKLIVDKSRWQGGVPSCSVNMBALHNHTQKSLSLSPG*
80	Cadena pesada de TIM3.8 (8B9) IgG1.1f (S61P)	CVOLESQGLVKEPSETLSLCTVSGSSLSRHWIACQPFQKLEWISLYSGFTYIQPSL RVTISVDTSKQPSLKLSSVTAADTAATVYCAQGGYQGLAHWPDPKQGLVTVSSASTKQPS SSRTSGGTAALGCLVDFPEFVTVSSMSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVP QTYICVNHKPSNTKVKPKVPEKSCDNTHTCPCPAPAEKAPSVFLFPKPKDTLMISRTPEV CVVDVSHEDPEVKRWYVDGVVHNATKPRKQVNSTYVAVSVLTVAHQWLNKQKY KALPSSIEKTISSAKGQPREPQVTLFPPSRERMKNQVSECLVKGFPYPSDIAVENESN YKTPPVLDSDGSPFLVLSKLIVDKSRWQGGVPSCSVNMBALHNHTQKSLSLSPG*
81	Cadena pesada de TIM3.7 (9F6) IgG1.1f (A108T)	CVOLESQGLVKEPSETLSLCTVSGSSLSRHWIACQPFQKLEWISLYSGFTYIQPSL GRFTISRNMAKPSLFTQWHLRVEDTAATVYCAQGGYQGLAHWPDPKQGLVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGTAALGCLVDFPEFVTVSSMSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTITICVNHKPSNTKVKPKVPEKSCDNTHTCPCPAPAEKAPSVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKRWYVDGVVHNATKPRKQVNSTYVAVSVLTVAHQWLNKQKY KCVSNKALPSSIEKTISSAKGQPREPQVTLFPPSRERMKNQVSECLVKGFPYPSDIAVENESN GQPERNYKTPPVLDSDGSPFLVLSKLIVDKSRWQGGVPSCSVNMBALHNHTQKSLSLSPG*
82	Cadena pesada de TIM3.10 (13A3) IgG1.1f (N60Q) (sin K carboxiterminal)	CLOLESQGLVKEPSETLSLCTVSGSSLSRSYWGATKQPFQKLEWISLYSGFTYIQPSL KSRVTISVDTSKQPSLKLSSVTAADTAATVYCAQGGYQGLAHWPDPKQGLVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGTAALGCLVDFPEFVTVSSMSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTITICVNHKPSNTKVKPKVPEKSCDNTHTCPCPAPAEKAPSVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKRWYVDGVVHNATKPRKQVNSTYVAVSVLTVAHQWLNKQKY KCVSNKALPSSIEKTISSAKGQPREPQVTLFPPSRERMKNQVSECLVKGFPYPSDIAVENESN GQPERNYKTPPVLDSDGSPFLVLSKLIVDKSRWQGGVPSCSVNMBALHNHTQKSLSLSPG*
83	Cadena pesada de TIM3.11 (13A3) IgG1.1f (N60S) (sin K carboxiterminal)	CLOLESQGLVKEPSETLSLCTVSGSSLSRSYWGATKQPFQKLEWISLYSGFTYIQPSL KSRVTISVDTSKQPSLKLSSVTAADTAATVYCAQGGYQGLAHWPDPKQGLVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGTAALGCLVDFPEFVTVSSMSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTITICVNHKPSNTKVKPKVPEKSCDNTHTCPCPAPAEKAPSVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKRWYVDGVVHNATKPRKQVNSTYVAVSVLTVAHQWLNKQKY KCVSNKALPSSIEKTISSAKGQPREPQVTLFPPSRERMKNQVSECLVKGFPYPSDIAVENESN GQPERNYKTPPVLDSDGSPFLVLSKLIVDKSRWQGGVPSCSVNMBALHNHTQKSLSLSPG*
84	Cadena pesada de TIM3.12 (13A3) IgG1.1f (N60A) (sin K carboxiterminal)	CLOLESQGLVKEPSETLSLCTVSGSSLSRSYWGATKQPFQKLEWISLYSGFTYIQPSL KSRVTISVDTSKQPSLKLSSVTAADTAATVYCAQGGYQGLAHWPDPKQGLVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGTAALGCLVDFPEFVTVSSMSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGQTITICVNHKPSNTKVKPKVPEKSCDNTHTCPCPAPAEKAPSVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKRWYVDGVVHNATKPRKQVNSTYVAVSVLTVAHQWLNKQKY KCVSNKALPSSIEKTISSAKGQPREPQVTLFPPSRERMKNQVSECLVKGFPYPSDIAVENESN GQPERNYKTPPVLDSDGSPFLVLSKLIVDKSRWQGGVPSCSVNMBALHNHTQKSLSLSPG*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
85	Cadena pesada de TIM3.13 (13A3) IgG1.1f (D101E) (sin K carboxiterminal)	QLQLQSSGPGGLVKPSETSLTCTVSGSSISRSSTYMGWIRQPPKRGLEWIGSIYISGFTTYTPSL KSRVTISVDTSKMGPSLALSSVTAADTAATVATGCTGCPYEDYAHWFDMGQGGTLATVTSASAKGPS VFFPLAPSSNSTSGTAALGCLVHTVPEPVTVMNSGALTSQVHTFPAYLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGFTQTYTCVNHKPSNKNVDKRVFKSCDKHTCCPCPADABAGAPSVLFPKPKNQIMES PTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNHTVDCGVEVHNKTRPREEQNYSTYRVVSVLTVLHQDMNKEHY KCKVSKKALPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMINKQSITCLVKGFPYPSDIAVENEEN GCPENNYKTTTPVVDSDGSEFFLISKLTVDKSPQGNVPSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG*
86	Cadena pesada de TIM3.14 (13A3) IgG1.1f (P102V) (sin K carboxiterminal)	QLQLQSSGPGGLVKPSETSLTCTVSGSSISRSSTYMGWIRQPPKRGLEWIGSIYISGFTTYTPSL KSRVTISVDTSKMGPSLALSSVTAADTAATVATGCTGCPYEDYAHWFDMGQGGTLATVTSASAKGPS VFFPLAPSSNSTSGTAALGCLVHTVPEPVTVMNSGALTSQVHTFPAYLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGFTQTYTCVNHKPSNKNVDKRVFKSCDKHTCCPCPADABAGAPSVLFPKPKNQIMES PTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNHTVDCGVEVHNKTRPREEQNYSTYRVVSVLTVLHQDMNKEHY KCKVSKKALPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMINKQSITCLVKGFPYPSDIAVENEEN GCPENNYKTTTPVVDSDGSEFFLISKLTVDKSPQGNVPSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG*
87	Cadena pesada de TIM3.15 (13A3) IgG1.1f (P102Y) (sin K carboxiterminal)	QLQLQSSGPGGLVKPSETSLTCTVSGSSISRSSTYMGWIRQPPKRGLEWIGSIYISGFTTYTPSL KSRVTISVDTSKMGPSLALSSVTAADTAATVATGCTGCPYEDYAHWFDMGQGGTLATVTSASAKGPS VFFPLAPSSNSTSGTAALGCLVHTVPEPVTVMNSGALTSQVHTFPAYLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGFTQTYTCVNHKPSNKNVDKRVFKSCDKHTCCPCPADABAGAPSVLFPKPKNQIMES PTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNHTVDCGVEVHNKTRPREEQNYSTYRVVSVLTVLHQDMNKEHY KCKVSKKALPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMINKQSITCLVKGFPYPSDIAVENEEN GCPENNYKTTTPVVDSDGSEFFLISKLTVDKSPQGNVPSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG*
88	Cadena pesada de TIM3.16 (13A3) IgG1.1f (P102L) (sin K carboxiterminal)	QLQLQSSGPGGLVKPSETSLTCTVSGSSISRSSTYMGWIRQPPKRGLEWIGSIYISGFTTYTPSL KSRVTISVDTSKMGPSLALSSVTAADTAATVATGCTGCPYEDYAHWFDMGQGGTLATVTSASAKGPS VFFPLAPSSNSTSGTAALGCLVHTVPEPVTVMNSGALTSQVHTFPAYLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGFTQTYTCVNHKPSNKNVDKRVFKSCDKHTCCPCPADABAGAPSVLFPKPKNQIMES PTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNHTVDCGVEVHNKTRPREEQNYSTYRVVSVLTVLHQDMNKEHY KCKVSKKALPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMINKQSITCLVKGFPYPSDIAVENEEN GCPENNYKTTTPVVDSDGSEFFLISKLTVDKSPQGNVPSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG*
89	Cadena pesada de TIM3.17 (13A3) IgG1.1f (N60Q/P102Y)(sin K carboxiterminal)	QLQLQSSGPGGLVKPSETSLTCTVSGSSISRSSTYMGWIRQPPKRGLEWIGSIYISGFTTYTPSL KSRVTISVDTSKMGPSLALSSVTAADTAATVATGCTGCPYEDYAHWFDMGQGGTLATVTSASAKGPS VFFPLAPSSNSTSGTAALGCLVHTVPEPVTVMNSGALTSQVHTFPAYLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGFTQTYTCVNHKPSNKNVDKRVFKSCDKHTCCPCPADABAGAPSVLFPKPKNQIMES PTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNHTVDCGVEVHNKTRPREEQNYSTYRVVSVLTVLHQDMNKEHY KCKVSKKALPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMINKQSITCLVKGFPYPSDIAVENEEN GCPENNYKTTTPVVDSDGSEFFLISKLTVDKSPQGNVPSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG*
350	Cadena pesada de TIM3.18 (13A3) IgG1.1f (N60Q/D101E)(sin K carboxiterminal)	QLQLQSSGPGGLVKPSETSLTCTVSGSSISRSSTYMGWIRQPPKRGLEWIGSIYISGFTTYTPSL KSRVTISVDTSKMGPSLALSSVTAADTAATVATGCTGCPYEDYAHWFDMGQGGTLATVTSASAKGPS VFFPLAPSSNSTSGTAALGCLVHTVPEPVTVMNSGALTSQVHTFPAYLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGFTQTYTCVNHKPSNKNVDKRVFKSCDKHTCCPCPADABAGAPSVLFPKPKNQIMES PTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNHTVDCGVEVHNKTRPREEQNYSTYRVVSVLTVLHQDMNKEHY KCKVSKKALPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMINKQSITCLVKGFPYPSDIAVENEEN GCPENNYKTTTPVVDSDGSEFFLISKLTVDKSPQGNVPSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
90	Cadena pesada de TIM3.8 (8B9) IgG1.1f (S61P) (sin K carboxiterminal)	QVQLQSGPGGLVKRPSETLSLTCTVSGSSISSESYTWGMIRQPPKGGLEWIGSIYISGFTTYNPSL RVTIISVDTSKNGPSLKLSVTAADIAVYCAQPGYAHKSPGQGLVATVSSASTGHS SSKSTSGGTAALGCLVREYFEFVTVSNRSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP QPYICWVNHKPSNTKPKRVEKSDNTHTCCPCAPAEAGAPSVLPFPKPNTLMIS CYVAVDSHEDEPVKTHWYDGVVEHNAKTPREEQYNSTIRVSVLTVLHQMINKKEY KALPSSIEKTIENAGQPREPQVYILEPPEHEMKNQVSLTCLVKGFPSPDIAYWESN YATTPVLDSDSGSFTLSKLTVDKSRMQGNVFCSCVDEALHNHTYTKSLSPGK*
91	Cadena pesada de TIM3.7 (9F6) IgG1.1f (A108T) (sin K carboxiterminal)	QVQLVSGGGLVKRPSETLSLTCTVSGSSISSESYTWGMIRQPPKGGLEWIGSIYISGFTTYNPSL GPTIISVDTSKNGPSLKLSVTAADIAVYCAQPGYAHKSPGQGLVATVSSASTGHS VFIAPSSKSTSGGTAALGCLVREYFEFVTVSNRSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGCTQYICWVNHKPSNTKPKRVEKSDNTHTCCPCAPAEAGAPSVLPFPKPNTLMIS RFEVTCVAVDVSHEDEPVKTHWYDGVVEHNAKTPREEQYNSTIRVSVLTVLHQMINKKEY KCVSKHALPAEILEXTISKAGQPREPQVYILEPPEHEMKNQVSLTCLVKGFPSPDIAYWESN GQPENNKNTTPVLDSDSGSFTLSKLTVDKSRMQGNVFCSCVDEALHNHTYTKSLSPGK*
92	Cadena pesada de TIM3.10 (13A3) IgG1.3f (N60Q)	QVQLQSGPGGLVKRPSETLSLTCTVSGSSISSESYTWGMIRQPPKGGLEWIGSIYISGFTTYNPSL KRPVTIISVDTSKNGPSLKLSVTAADIAVYCAQPGYAHKSPGQGLVATVSSASTGHS VFIAPSSKSTSGGTAALGCLVREYFEFVTVSNRSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGCTQYICWVNHKPSNTKPKRVEKSDNTHTCCPCAPAEAGAPSVLPFPKPNTLMIS RFEVTCVAVDVSHEDEPVKTHWYDGVVEHNAKTPREEQYNSTIRVSVLTVLHQMINKKEY KCVSKHALPAEILEXTISKAGQPREPQVYILEPPEHEMKNQVSLTCLVKGFPSPDIAYWESN GQPENNKNTTPVLDSDSGSFTLSKLTVDKSRMQGNVFCSCVDEALHNHTYTKSLSPGK*
93	Cadena pesada de TIM3.11 (13A3) IgG1.3f (N60S)	QVQLQSGPGGLVKRPSETLSLTCTVSGSSISSESYTWGMIRQPPKGGLEWIGSIYISGFTTYNPSL KRPVTIISVDTSKNGPSLKLSVTAADIAVYCAQPGYAHKSPGQGLVATVSSASTGHS VFIAPSSKSTSGGTAALGCLVREYFEFVTVSNRSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGCTQYICWVNHKPSNTKPKRVEKSDNTHTCCPCAPAEAGAPSVLPFPKPNTLMIS RFEVTCVAVDVSHEDEPVKTHWYDGVVEHNAKTPREEQYNSTIRVSVLTVLHQMINKKEY KCVSKHALPAEILEXTISKAGQPREPQVYILEPPEHEMKNQVSLTCLVKGFPSPDIAYWESN GQPENNKNTTPVLDSDSGSFTLSKLTVDKSRMQGNVFCSCVDEALHNHTYTKSLSPGK*
94	Cadena pesada de TIM3.12 (13A3) IgG1.3f (N60A)	QVQLQSGPGGLVKRPSETLSLTCTVSGSSISSESYTWGMIRQPPKGGLEWIGSIYISGFTTYNPSL KRPVTIISVDTSKNGPSLKLSVTAADIAVYCAQPGYAHKSPGQGLVATVSSASTGHS VFIAPSSKSTSGGTAALGCLVREYFEFVTVSNRSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGCTQYICWVNHKPSNTKPKRVEKSDNTHTCCPCAPAEAGAPSVLPFPKPNTLMIS RFEVTCVAVDVSHEDEPVKTHWYDGVVEHNAKTPREEQYNSTIRVSVLTVLHQMINKKEY KCVSKHALPAEILEXTISKAGQPREPQVYILEPPEHEMKNQVSLTCLVKGFPSPDIAYWESN GQPENNKNTTPVLDSDSGSFTLSKLTVDKSRMQGNVFCSCVDEALHNHTYTKSLSPGK*
95	Cadena pesada de TIM3.13 (13A3) IgG1.3f (D101E)	QVQLQSGPGGLVKRPSETLSLTCTVSGSSISSESYTWGMIRQPPKGGLEWIGSIYISGFTTYNPSL KRPVTIISVDTSKNGPSLKLSVTAADIAVYCAQPGYAHKSPGQGLVATVSSASTGHS VFIAPSSKSTSGGTAALGCLVREYFEFVTVSNRSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGCTQYICWVNHKPSNTKPKRVEKSDNTHTCCPCAPAEAGAPSVLPFPKPNTLMIS RFEVTCVAVDVSHEDEPVKTHWYDGVVEHNAKTPREEQYNSTIRVSVLTVLHQMINKKEY KCVSKHALPAEILEXTISKAGQPREPQVYILEPPEHEMKNQVSLTCLVKGFPSPDIAYWESN GQPENNKNTTPVLDSDSGSFTLSKLTVDKSRMQGNVFCSCVDEALHNHTYTKSLSPGK*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
96	Cadena pesada de TIM3.14 (13A3) IgG1.3f (P102V)	QLQLSGGPGGLVAPSEETLSLTCTVSGGSISSRSIYWGMIQCPFGKGLKEMISLYSGFTYINPSL KSRVTISVDTSINQPSLKLSSVTAADATATVCATGSPGIGDYAHWFYVWGQGLTVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVNDYEPFVTVSSSGALTSGVHTFPVAVLOSGLYSLSSVVTVP SSSLSGTCITICWVNHKPNENTYDKVVEPKSCDNTHCCPCPAPAGAGAPSVFLFPKPKDILMIS RTPETCVVVDVSHEDPVRKTHSVDPVEVHRATKPREEQINSTYRVSVLTVLQDMINGEY KGVSNKALPAEIKETISKAGQPRPEQVTLFESREEMTKQVSEFLVAGFTPSDIAYEWSN GQPERNYKTPPVLDSDGSEFFLISKLTVDKSPWAGGVFSCSYNHZALHNTQKSLSLSPGK*
97	Cadena pesada de TIM3.15 (13A3) IgG1.3f (P102Y)	QLQLSGGPGGLVAPSEETLSLTCTVSGGSISSRSIYWGMIQCPFGKGLKEMISLYSGFTYINPSL KSRVTISVDTSINQPSLKLSSVTAADATATVCATGSPGIGDYAHWFYVWGQGLTVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVNDYEPFVTVSSSGALTSGVHTFPVAVLOSGLYSLSSVVTVP SSSLSGTCITICWVNHKPNENTYDKVVEPKSCDNTHCCPCPAPAGAGAPSVFLFPKPKDILMIS RTPETCVVVDVSHEDPVRKTHSVDPVEVHRATKPREEQINSTYRVSVLTVLQDMINGEY KGVSNKALPAEIKETISKAGQPRPEQVTLFESREEMTKQVSEFLVAGFTPSDIAYEWSN GQPERNYKTPPVLDSDGSEFFLISKLTVDKSPWAGGVFSCSYNHZALHNTQKSLSLSPGK*
98	Cadena pesada de TIM3.16 (13A3) IgG1.3f (P102L)	QLQLSGGPGGLVAPSEETLSLTCTVSGGSISSRSIYWGMIQCPFGKGLKEMISLYSGFTYINPSL KSRVTISVDTSINQPSLKLSSVTAADATATVCATGSPGIGDYAHWFYVWGQGLTVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVNDYEPFVTVSSSGALTSGVHTFPVAVLOSGLYSLSSVVTVP SSSLSGTCITICWVNHKPNENTYDKVVEPKSCDNTHCCPCPAPAGAGAPSVFLFPKPKDILMIS RTPETCVVVDVSHEDPVRKTHSVDPVEVHRATKPREEQINSTYRVSVLTVLQDMINGEY KGVSNKALPAEIKETISKAGQPRPEQVTLFESREEMTKQVSEFLVAGFTPSDIAYEWSN GQPERNYKTPPVLDSDGSEFFLISKLTVDKSPWAGGVFSCSYNHZALHNTQKSLSLSPGK*
99	Cadena pesada de TIM3.17 (13A3) IgG1.3f (N60Q/P102Y)	QLQLSGGPGGLVAPSEETLSLTCTVSGGSISSRSIYWGMIQCPFGKGLKEMISLYSGFTYINPSL KSRVTISVDTSINQPSLKLSSVTAADATATVCATGSPGIGDYAHWFYVWGQGLTVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVNDYEPFVTVSSSGALTSGVHTFPVAVLOSGLYSLSSVVTVP SSSLSGTCITICWVNHKPNENTYDKVVEPKSCDNTHCCPCPAPAGAGAPSVFLFPKPKDILMIS RTPETCVVVDVSHEDPVRKTHSVDPVEVHRATKPREEQINSTYRVSVLTVLQDMINGEY KGVSNKALPAEIKETISKAGQPRPEQVTLFESREEMTKQVSEFLVAGFTPSDIAYEWSN GQPERNYKTPPVLDSDGSEFFLISKLTVDKSPWAGGVFSCSYNHZALHNTQKSLSLSPGK*
351	Cadena pesada de TIM3.18 (13A3) IgG1.3f (N60Q/D101E)	QLQLSGGPGGLVAPSEETLSLTCTVSGGSISSRSIYWGMIQCPFGKGLKEMISLYSGFTYINPSL KSRVTISVDTSINQPSLKLSSVTAADATATVCATGSPGIGDYAHWFYVWGQGLTVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVNDYEPFVTVSSSGALTSGVHTFPVAVLOSGLYSLSSVVTVP SSSLSGTCITICWVNHKPNENTYDKVVEPKSCDNTHCCPCPAPAGAGAPSVFLFPKPKDILMIS RTPETCVVVDVSHEDPVRKTHSVDPVEVHRATKPREEQINSTYRVSVLTVLQDMINGEY KGVSNKALPAEIKETISKAGQPRPEQVTLFESREEMTKQVSEFLVAGFTPSDIAYEWSN GQPERNYKTPPVLDSDGSEFFLISKLTVDKSPWAGGVFSCSYNHZALHNTQKSLSLSPGK*
100	Cadena pesada de TIM3.8 (8B9) IgG1.3f (S61P)	QVQLDSGGPGGLVAPSEETLSLTCTVSGGSISSRSIYWGMIQCPFGKGLKEMISLYSGFTYINPSL KSRVTISVDTSINQPSLKLSSVTAADATATVCATGSPGIGDYAHWFYVWGQGLTVTVSSASTKQPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVNDYEPFVTVSSSGALTSGVHTFPVAVLOSGLYSLSSVVTVP SSSLSGTCITICWVNHKPNENTYDKVVEPKSCDNTHCCPCPAPAGAGAPSVFLFPKPKDILMIS RTPETCVVVDVSHEDPVRKTHSVDPVEVHRATKPREEQINSTYRVSVLTVLQDMINGEY KGVSNKALPAEIKETISKAGQPRPEQVTLFESREEMTKQVSEFLVAGFTPSDIAYEWSN GQPERNYKTPPVLDSDGSEFFLISKLTVDKSPWAGGVFSCSYNHZALHNTQKSLSLSPGK*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
101	Cadena pesada de TIM3.7 (13A3) IgG1.3f (A108T) (9F6)	CQVLVESGGLVKKPESGLFLSCAASGFTSDYIMSWLQAPPKGLDWAVERLSGGSSFTYVALSVK GPFITLSDHNAKSLFLQMHSLIPVEDIAVYCARAGYISGWYTYGDMWGGQTLVTVSSASITGPS VFPLAPSSSTSGCTAALGCLVNTFFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFAVAGSGSLYSLSVTVTP SSSLTQTYICVNHKSGENTVDKVEPNSCDKTHFCPCPAPAEAGAPSVFLPPKPNITLMIS RPEVTCVYVDSHEDDEVKTNWYDQVEVHMAKTHREKQYNSTTRAVSVLVTHQDWLNGEY KCVSNKALPAPTEKTLISNAGQPRFQVTLPPSRREMTKQVSLTCLVNGFPSPDAVERESN GCPERNYKTPPVLDSDGSEFLYSHLTVKSRAGCGNVFSCSNMDEALHMHITQKSLSLSPG*
102	Cadena pesada de TIM3.10 (13A3) IgG1.3f (N60Q) (sin K carboxiterminal)	QLQLGSGPLVKKPESGLFLSCAASGFTSDYIMSWLQAPPKGLDWAVERLSGGSSFTYVALSVK KSRVTLSVDTSKQCFSLKLSVTAADIAVYCATGPGYGDYAHWFPMGGQTLVTVSSASITGPS VFPLAPSSSTSGCTAALGCLVNTFFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFAVAGSGSLYSLSVTVTP SSSLTQTYICVNHKSGENTVDKVEPNSCDKTHFCPCPAPAEAGAPSVFLPPKPNITLMIS RPEVTCVYVDSHEDDEVKTNWYDQVEVHMAKTHREKQYNSTTRAVSVLVTHQDWLNGEY KCVSNKALPAPTEKTLISNAGQPRFQVTLPPSRREMTKQVSLTCLVNGFPSPDAVERESN GCPERNYKTPPVLDSDGSEFLYSHLTVKSRAGCGNVFSCSNMDEALHMHITQKSLSLSPG*
103	Cadena pesada de TIM3.11 (13A3) IgG1.3f (N60S) (sin K carboxiterminal)	QLQLGSGPLVKKPESGLFLSCAASGFTSDYIMSWLQAPPKGLDWAVERLSGGSSFTYVALSVK KSRVTLSVDTSKQCFSLKLSVTAADIAVYCATGPGYGDYAHWFPMGGQTLVTVSSASITGPS VFPLAPSSSTSGCTAALGCLVNTFFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFAVAGSGSLYSLSVTVTP SSSLTQTYICVNHKSGENTVDKVEPNSCDKTHFCPCPAPAEAGAPSVFLPPKPNITLMIS RPEVTCVYVDSHEDDEVKTNWYDQVEVHMAKTHREKQYNSTTRAVSVLVTHQDWLNGEY KCVSNKALPAPTEKTLISNAGQPRFQVTLPPSRREMTKQVSLTCLVNGFPSPDAVERESN GCPERNYKTPPVLDSDGSEFLYSHLTVKSRAGCGNVFSCSNMDEALHMHITQKSLSLSPG*
104	Cadena pesada de TIM3.12 (13A3) IgG1.3f (N60A) (sin K carboxiterminal)	QLQLGSGPLVKKPESGLFLSCAASGFTSDYIMSWLQAPPKGLDWAVERLSGGSSFTYVALSVK KSRVTLSVDTSKQCFSLKLSVTAADIAVYCATGPGYGDYAHWFPMGGQTLVTVSSASITGPS VFPLAPSSSTSGCTAALGCLVNTFFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFAVAGSGSLYSLSVTVTP SSSLTQTYICVNHKSGENTVDKVEPNSCDKTHFCPCPAPAEAGAPSVFLPPKPNITLMIS RPEVTCVYVDSHEDDEVKTNWYDQVEVHMAKTHREKQYNSTTRAVSVLVTHQDWLNGEY KCVSNKALPAPTEKTLISNAGQPRFQVTLPPSRREMTKQVSLTCLVNGFPSPDAVERESN GCPERNYKTPPVLDSDGSEFLYSHLTVKSRAGCGNVFSCSNMDEALHMHITQKSLSLSPG*
105	Cadena pesada de TIM3.13 (13A3) IgG1.3f (D101E) (sin K carboxiterminal)	QLQLGSGPLVKKPESGLFLSCAASGFTSDYIMSWLQAPPKGLDWAVERLSGGSSFTYVALSVK KSRVTLSVDTSKQCFSLKLSVTAADIAVYCATGPGYGDYAHWFPMGGQTLVTVSSASITGPS VFPLAPSSSTSGCTAALGCLVNTFFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFAVAGSGSLYSLSVTVTP SSSLTQTYICVNHKSGENTVDKVEPNSCDKTHFCPCPAPAEAGAPSVFLPPKPNITLMIS RPEVTCVYVDSHEDDEVKTNWYDQVEVHMAKTHREKQYNSTTRAVSVLVTHQDWLNGEY KCVSNKALPAPTEKTLISNAGQPRFQVTLPPSRREMTKQVSLTCLVNGFPSPDAVERESN GCPERNYKTPPVLDSDGSEFLYSHLTVKSRAGCGNVFSCSNMDEALHMHITQKSLSLSPG*
106	Cadena pesada de TIM3.14 (13A3) IgG1.3f (P102V) (sin K carboxiterminal)	QLQLGSGPLVKKPESGLFLSCAASGFTSDYIMSWLQAPPKGLDWAVERLSGGSSFTYVALSVK KSRVTLSVDTSKQCFSLKLSVTAADIAVYCATGPGYGDYAHWFPMGGQTLVTVSSASITGPS VFPLAPSSSTSGCTAALGCLVNTFFPEPVTVSRNSGALTSGVHTFAVAGSGSLYSLSVTVTP SSSLTQTYICVNHKSGENTVDKVEPNSCDKTHFCPCPAPAEAGAPSVFLPPKPNITLMIS RPEVTCVYVDSHEDDEVKTNWYDQVEVHMAKTHREKQYNSTTRAVSVLVTHQDWLNGEY KCVSNKALPAPTEKTLISNAGQPRFQVTLPPSRREMTKQVSLTCLVNGFPSPDAVERESN GCPERNYKTPPVLDSDGSEFLYSHLTVKSRAGCGNVFSCSNMDEALHMHITQKSLSLSPG*

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
107	Cadena pesada de TIM3.15 (13A3) IgG1.3f (P102Y) (sin K carboxiterminal)	QLQLDSGGGLVKKPSETLSLTCTVSGSSLSRSYTWGWIQQPPGKGLKEMIGSYISGFTTYQPSL KSRVTISVDTSKMGFSLSSVTAADAVYCATGSGPYGDAYAHEDTWGQGLVTVSSASTKGPS VHFLAPSSNSTSGGTAAAGCLVKKYFPPVTVSSNGALTSQVHTTFAVILSSGLYSSSVTVTP SSSLGQCYTICVNHKPSNVDKRPKSDKTHPCPCAPAPAGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTFEVTCVAVVDSHEDPEVKNPWTGCVFVHNATKPREEQINSTYRVSVLTVLHQDMLNGKPY RCVKSNAALPAPIENTISKANGQREPVQVTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVENESN GQPERNYKTTFFVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGNVPSCSVMHREALNHTYQKSLSLSPG*
108	Cadena pesada de TIM3.16 (13A3) IgG1.3f (P102L) (sin K carboxiterminal)	QLQLDSGGGLVKKPSETLSLTCTVSGSSLSRSYTWGWIQQPPGKGLKEMIGSYISGFTTYQPSL KSRVTISVDTSKMGFSLSSVTAADAVYCATGSGPYGDAYAHEDTWGQGLVTVSSASTKGPS VHFLAPSSNSTSGGTAAAGCLVKKYFPPVTVSSNGALTSQVHTTFAVILSSGLYSSSVTVTP SSSLGQCYTICVNHKPSNVDKRPKSDKTHPCPCAPAPAGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTFEVTCVAVVDSHEDPEVKNPWTGCVFVHNATKPREEQINSTYRVSVLTVLHQDMLNGKPY RCVKSNAALPAPIENTISKANGQREPVQVTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVENESN GQPERNYKTTFFVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGNVPSCSVMHREALNHTYQKSLSLSPG*
109	Cadena pesada de TIM3.17 (13A3) IgG1.3f (N60Q/P102Y)(sin K carboxiterminal)	QLQLDSGGGLVKKPSETLSLTCTVSGSSLSRSYTWGWIQQPPGKGLKEMIGSYISGFTTYQPSL KSRVTISVDTSKMGFSLSSVTAADAVYCATGSGPYGDAYAHEDTWGQGLVTVSSASTKGPS VHFLAPSSNSTSGGTAAAGCLVKKYFPPVTVSSNGALTSQVHTTFAVILSSGLYSSSVTVTP SSSLGQCYTICVNHKPSNVDKRPKSDKTHPCPCAPAPAGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTFEVTCVAVVDSHEDPEVKNPWTGCVFVHNATKPREEQINSTYRVSVLTVLHQDMLNGKPY RCVKSNAALPAPIENTISKANGQREPVQVTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVENESN GQPERNYKTTFFVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGNVPSCSVMHREALNHTYQKSLSLSPG*
352	Cadena pesada de TIM3.18 (13A3) IgG1.3f (N60Q/D101E)(sin K carboxiterminal)	QLQLDSGGGLVKKPSETLSLTCTVSGSSLSRSYTWGWIQQPPGKGLKEMIGSYISGFTTYQPSL KSRVTISVDTSKMGFSLSSVTAADAVYCATGSGPYGDAYAHEDTWGQGLVTVSSASTKGPS VHFLAPSSNSTSGGTAAAGCLVKKYFPPVTVSSNGALTSQVHTTFAVILSSGLYSSSVTVTP SSSLGQCYTICVNHKPSNVDKRPKSDKTHPCPCAPAPAGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTFEVTCVAVVDSHEDPEVKNPWTGCVFVHNATKPREEQINSTYRVSVLTVLHQDMLNGKPY RCVKSNAALPAPIENTISKANGQREPVQVTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVENESN GQPERNYKTTFFVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGNVPSCSVMHREALNHTYQKSLSLSPG*
110	Cadena pesada de TIM3.8 (8B9) IgG1.3f (S61P) (sin K carboxiterminal)	QVQLDSGGGLVKNSETLSLTCTVSGSSLSRHATRWIQQPPGKGLKEMIGYLRVGSSTHDFSLKSE PVTIISVDTSKMGFSLSSVTAADAVYCATDTCYKMDINQGGTVTVSSASTKGPSVFFLPAP SSSLGQCYTICVNHKPSNVDKRPKSDKTHPCPCAPAPAGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTFEVTCVAVVDSHEDPEVKNPWTGCVFVHNATKPREEQINSTYRVSVLTVLHQDMLNGKPY RCVKSNAALPAPIENTISKANGQREPVQVTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVENESN GQPERNYKTTFFVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGNVPSCSVMHREALNHTYQKSLSLSPG*
111	Cadena pesada de TIM3.7 (9F6) IgG1.3f (A108T) (sin K carboxiterminal)	QVQLDSGGGLVKKPESLPSCAASGTFSTNITKSWIPKQAGKLEWPSFTSGGKSTIYVADSVN GRTTISPDNAKMSLTIGMSLAVLDVAVYICARDCTSSGWYYGMDTWGQGLVTVSSASTKGPS VHFLAPSSNSTSGGTAAAGCLVKKYFPPVTVSSNGALTSQVHTTFAVILSSGLYSSSVTVTP SSSLGQCYTICVNHKPSNVDKRPKSDKTHPCPCAPAPAGAPSVFLFPKPKDTLMIS RTFEVTCVAVVDSHEDPEVKNPWTGCVFVHNATKPREEQINSTYRVSVLTVLHQDMLNGKPY RCVKSNAALPAPIENTISKANGQREPVQVTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVENESN GQPERNYKTTFFVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQGNVPSCSVMHREALNHTYQKSLSLSPG*

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
151	Cadena pesada de TIM3.2 (17c3) IgG1.3f	CAGGTCAGTTGGTGCATCTCTGGGGTGGAGTGAAGAGCCCTGGGGCTCAGTGAAGGTTCTCTG CAGAGCATCTGGATACACTTTACACCGTACTATATGGACTTGGGTTCGACAGGCCCCGTGGAAAG GGCTTCAGTGGATGGGATATCAACCTAGGGGTGATAGCATATATCTAGCCACAGAGTCTCAG GGCAGGTCCACATACACAGGAGACAGCTCCACAGGACAGCTTACATGAGCTGAGGACCTCTGAG ATCTCAGGACACCCCTGGTATTAATCTCTGACAGCATTTCTATGCTTGGCAAACTACTACTAG GTATGGAAGCTCTGGGGCAGAGGACAGGTTACCGTCTCTCAGATAGACACAGAGGCCCCATGG GTCTTCCCTTGGCAGCCCTCTCAGAGACCTCTGGGGACAGAGGCTTGGACTGCTGCTGCTGCT CAGAGCTACTTCCCGAACCCGTGGGCTCTGGGACTAGGCGGCTGAGCCCTGACCAAGGCGCTGC ACAGCTTCAGGGGCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTG TCCAGAGCTTGGCAGCCAGAGCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTG GGATAGAGAGTTGAGCTCAATCTTCTGACAGACTTAAATAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTG AAGCTTAAGGGGCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTG CGGACCTCTGAGTCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTG CTGCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAG GGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG AAGTGAAGCTCTGACAGAGGCTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG GAGGCTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG TCAGCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG GGCAGCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG CTATGCAAGCTCACTGCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG TGCATGAGGCTCTGACAGAGCTTACAGAGAGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGA
152	Cadena pesada de 9F6 IgG1.3f	CAGGTCAGTTGGTGCATCTCTGGGGTGGAGTGAAGAGCCCTGGGGCTCAGTGAAGGTTCTCTG TCCAGGCTCTGGATACACTTTACACCGTACTATATGGACTTGGGTTCGACAGGCCCCGTGGAAAG GGCTTCAGTGGATGGGATATCAACCTAGGGGTGATAGCATATATCTAGCCACAGAGTCTCAG GGCAGGTCCACATACACAGGAGACAGCTCCACAGGACAGCTTACATGAGCTGAGGACCTCTGAG ATCTCAGGACACCCCTGGTATTAATCTCTGACAGCATTTCTATGCTTGGCAAACTACTACTAG GTATGGAAGCTCTGGGGCAGAGGACAGGTTACCGTCTCTCAGATAGACACAGAGGCCCCATGG GTCTTCCCTTGGCAGCCCTCTCAGAGACCTCTGGGGACAGAGGCTTGGACTGCTGCTGCTGCT CAGAGCTACTTCCCGAACCCGTGGGCTCTGGGACTAGGCGGCTGAGCCCTGACCAAGGCGCTGC ACAGCTTCAGGGGCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTG TCCAGAGCTTGGCAGCCAGAGCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTG GGATAGAGAGTTGAGCTCAATCTTCTGACAGACTTAAATAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTG AAGCTTAAGGGGCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTGAGTCTGCTG CGGACCTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAG CTGCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAG GGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG AAGTGAAGCTCTGACAGAGGCTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG GAGGCTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG TCAGCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG GGCAGCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG CTATGCAAGCTCACTGCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG TGCATGAGGCTCTGACAGAGCTTACAGAGAGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
206	Cadena pesada de TIM3. 11 (13A3) IgG1.1f (N60S)	CAGTGGAGTGGAGAGTGGAGCCAGAGCTGGTGAAGCTTGGGAGACCTGTGCTCAGCCG CACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGAGATTACTTGGGCTGGATCCGGAGCCCCAG GGAGGGCTGGAGTGGATGGAGATCTATTATAGTGGTTCACCTACTACTACCTCCTCCCTC AAGATCGAGTACCAATATCCGTTGACACCTCCAGAACAGTCTCTCTGAGTGGACTTCGT GACCCGCGACACAGCGGTGTATTATTGTGACAGGGGGGCTAGGTGTACTACATCCACT GATTGGACCCCTGGGGGAGAGCCCTGGTACAGCTCTCCTAGCTAGACAGGGGCTATCG GTCTTCCTCCCTGGGACCTCTCTCCAGAGACCTCTGGGGGGACAGGGGCTGGGCTGGCTGG CAGAGTACTCTCCCTGACCGGTGAGGTCTGTGGAACTCTAGGGGCTCTGACGAGCGCTGG AAGCTTCCCTGGGCTCTCTAGCTCTCTAGAGCTCTACTCTCTAGAGACCTGGTACCTCTGCC TCAGAGCTTGGGACCCAGACTCTAGCTCTGACAGGATGACAGAGCTCCAGACACCAAGT GGACAGAGATTGGAGCCCAATCTGTGACAAATCTACAGATGCCAGCTGCTCCAGAGCTG AAGCGAAGAGCCCTCTCAZTCTTCTCTCTCCAAAGCTCAGAGACACCTTATGATCTTCC CCGAACCTGAGCTACAGCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CTGCTAGCTGACGGCTGGAGTGCATATGCTCAAGAGAGAGCTGGGGGAGAGAGTACAA GGAGCTACCTGTGCTCAGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG AAGTGAAGTCTCCAGAGAGCTCTCCAGAGAGCTCTCCAGAGAGCTCTCCAGAGAGCTCTCC GGAGCCGGAGTACAGAGTGTACCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG TCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG GGAGCCGGAGAGACTACAGAGAGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CTATAGAGCTTACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG TCTATGGGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
207	Cadena pesada de TIM3. 12 (13A3) IgG1.1f (N60A)	CAGTGGAGTGGAGAGTGGAGCCAGAGCTGGTGAAGCTTGGGAGACCTGTGCTCAGCCG CACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGAGATTACTTGGGCTGGATCCGGAGCCCCAG GGAGGGCTGGAGTGGATGGAGATCTATTATAGTGGTTCACCTACTACTACCTCCTCCCTC AAGATCGAGTACCAATATCCGTTGACACCTCCAGAACAGTCTCTCTGAGTGGACTTCGT GACCCGCGACACAGCGGTGTATTATTGTGACAGGGGGGCTAGGTGTACTACATCCACT GATTGGACCCCTGGGGGAGAGCCCTGGTACAGCTCTCCTAGCTAGACAGGGGCTATCG GTCTTCCTCCCTGGGACCTCTCTCCAGAGACCTCTGGGGGACAGGGGCTGGGCTGGCTGG CAGAGTACTCTCCCTGACCGGTGAGGTGTGTGGAACTCTAGGGGCTCTGACAGCGCTGG AAGCTTCCCTGGGCTCTCTAGCTCTCTAGAGCTCTACTCTCTAGAGAGCTGGTGGAGCTGG TCAGAGAGTGGAGACCCAGACTCTAGCTCTGACAGGATGACAGAGCTCCAGACACCAAGT GGACAGAGATTGGAGCCCAATCTGTGACAAATCTACAGATGCCAGCTGCTCCAGAGCTG AAGCGAAGAGCCCTCTCAZTCTTCTCTCTCCAAAGCTCAGAGACACCTTATGATCTTCC CCGAACCTGAGCTACAGCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CTGCTAGCTGACGGCTGGAGTGCATATGCTCAAGAGAGAGCTGGGGGAGAGTACAA GGAGCTACCTGTGCTCAGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG AAGTGAAGTCTCCAGAGAGCTCTCCAGAGAGCTCTCCAGAGAGCTCTCCAGAGAGCTCTCC GGAGCCGGAGTACAGAGTGTACCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG TCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG GGAGCCGGAGAGACTACAGAGAGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CTATAGAGCTTACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG TCTATGGGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG

[illegible]

[illegible]

SEQ ID	Descripción	Secuencias
212	Cadena pesada de TIM3.17 (13A3) IgG1.1f (N60Q/P102Y)	CAGCTGCAAGCTGCAAGAGTGGGGCCAGAGATGATGAATCTTGGAGAGCCCTGTCCTCAAGTCG CACTGTCTCTGGTGGCTCCATCGACAGTAGAGGTACTACTTGGGGTGGATCCGGCCAGCCCCAG GGAGAGGGCTGAGTGGATGGAGATCTATATAGTGGTTCAGCTTACTAGCAAGCCCTGCTC AAGAGTCAGATCAGCAATAGCGTTGACAGCTCCAGAGACAGATCTGCTGAGTGGATGAGCTCTG GAACGCCAGACACAGGCTGTGTATTTGTGGACAGGGGGCCCTTACGGTACTACAGCCCACT GGTGGACTACTGGGGCCAGGGGAACCTGGTACCGCTGCTTCTACAGACACAGCCCACTGG GTCTTCCCTGGGACCTCTCTCCAGAGAGACCTCTGGGGGACAGCGGGCCCTGGGCTGCTGGT CAAGAGTACTCTCTGACAGCGTGTGAGGTCTGAGAGATTAAGGCTCTCTGACAGAGGGGTG ACAGCTTCCCGGCTGCTACAGTCTTACAGCTCTTACCTTACAGAGCTGGTGGTGGAGCTGGCC TCCAGAGAGCTGGGACCGACCTTACCTTCTGACAGCTGTAATACAGAGCCAGAGACAGAGCT GGACAGAGAGCTGGGACCGACCTTCTGACAGCTTACAGCTTACAGAGCTGGTGGTGGAGCTGG AAGCGAGAGGGCCCGGCTCACTTCTCTTCCGCGGAGAACCCAGAGAGACCTTCAATGATCTCC CCGACCTCTAGGTACATGGGGGTGCTGAGAGCTGAGAGACAGAGACCTTCTAGGTCTAGCTTCAA CTGTAGCTTGGACAGCTGGAGTGTATATGAGAGACAGAGCTTGGAGAGAGAGTACAGACA GCAGTACCTTGGCTTCAAGCTCTCTGAGCTTCTGACAGAGCTTCTGATGGCTAGAGAGCTAC AAGTGAAGGTCTGACAGAGCTCTGAGAGCTTCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AAGTGGAG TCCAGCTTCACTTGGTGGTCAAGAGTCTTCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG GGAG CTATAGAGAGTCAAGCTGAG TGTATGAGAGCTTGGTCAAGCTTACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
355	Cadena pesada de TIM3.18 (13A3) IgG1.1f (N60Q/D101E)	CAGCTGCAAGCTGCAAGAGTGGGGCCAGAGATGATGAATCTTGGAGAGCCCTGTCCTCAAGTCG CACTGTCTCTGGTGGCTCCATCGACAGTAGAGGTACTACTTGGGGTGGATCCGGCCAGCCCCAG GGAGAGGGCTGAGTGGATGGAGATCTATATAGTGGTTCAGCTTACTAGCAAGCCCTGCTC AAGAGTCAGATCAGCAATAGCGTTGACAGCTCCAGAGACAGATCTGCTGAGTGGATGAGCTCTG GAACGCCAGACACAGGCTGTGTATTTGTGGACAGGGGGCCCTTACGGTACTACAGCCCACT GGTGGACTACTGGGGCCAGGGGAACCTGGTACCGCTGCTTCTACAGACACAGCCCACTGG GTCTTCCCTGGGACCTCTCTCCAGAGAGACCTCTGGGGGACAGCGGGCCCTGGGCTGCTGGT CAAGAGTACTCTCTGACAGCGTGTGAGGTCTGAGAGATTAAGGCTCTCTGACAGAGGGGTG ACAGCTTCCCGGCTGCTACAGTCTTACAGCTCTTACCTTACAGAGCTGGTGGTGGAGCTGGCC TCCAGAGAGCTGGGACCGACCTTACCTTCTGACAGCTGTAATACAGAGCTGGTGGTGGAGCTGG GGACAGAGAGCTGGGACCGACCTTCTGACAGCTTACAGCTTACAGAGCTGGTGGTGGAGCTGG AAGCGAGAGGGCCCGGCTCACTTCTCTTCCGCGGAGAACCCAGAGAGACCTTCAATGATCTCC CCGACCTCTAGGTACATGGGGGTGCTGAGAGCTGAGAGACAGAGACCTTCTAGGTCTAGCTTCAA CTGTAGCTTGGACAGCTGGAGTGTATATGAGAGACAGAGCTTGGAGAGAGAGTACAGACA GCAGTACCTTGGCTTCAAGCTCTCTGAGCTTCTGACAGAGCTTCTGATGGCTAGAGAGCTAC AAGTGAAGGTCTGACAGAGCTCTGAGAGCTTCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AAGTGGAG TCCAGCTTCACTTGGTGGTCAAGAGTCTTCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG GGAG CTATAGAGAGTCAAGCTGAG TGTATGAGAGCTTGGTCAAGCTTACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG

SEQ ID	Descripción	(continuación)
213	Cadena pesada de TIM3.8 (8B9) IgG1.1f (S61P)	Seuencias
214	Cadena pesada de TIM3.7 (9F6) IgG1.1f (A108T)	Seuencias

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
226	Cadena pesada de TIM3.11 (13A3) IgG1.3f (N60S)	CAGTGTGAGTGTGAGAGTGGGCGCAGAGACTGGGAAAGCTTCGGAGACCGCTGTCCCTCACCTG CAGTGTCTGTGGTGGCTCCATCAGACAGTAGAGTACTAGTGGGGCTGGATTCGGCCAGGCCCCGAG GGAAGGGCTGGAGTGGATGGGAGCTATCTATTAGTGGGTTCACCTACTACTACTACTACTACTCTC AAGAGTTCAGTTCAGCAATATCGGTGACACGTCACAGAACTAGTTCCTCTGAGGCTGAGTCTGT GATGGTCGAGACAGAGCTGTGTATTATTGGGAGACAGAGGGGACCTACAGTGTAGTACTACGCTCAT GGTCGGACCGCTGGGAGCGCAGAGGAGCGTGGTACCGCTCTCCAGTTCAGTACACCAAGAGGCTCAGG GTTTTCCCGCTGGAGACGCTCTCCAGAGAGAGCTCTGGGGGACAGAGGAGCTTGGGCTGGCTGGT CAGAGTACTCTCTCGAAGAGGAGGCTGTGGGAATTCAGAGGCGCTCTAGCTACGCGGGTGG AAGCTTCCCGCTGTCACAGTCTCTAGAGCTCTACTCTCTAGAGAGGCTGTGAGAGGCTGTGAGAGGCT TCCAGAGCTTGGGACAGAGCTTACATCTGAGAGCTGTGATACAGAGCCAGAGACAGAGCAAGAGT GGACAGAGAGTTTGAAGCCAAATCTTGTGAAAGCTCAGATATCCCATCTGAGAGTGGTGGCAGAGCTG AAGTCGAGAGAGGCTCTGTGAGTCT CGAGCTCTGAGGTCGATGAGCTGT CTGGTACGGGAGGCGGTGGAGGCTGT GCAGTACCGGTGGTACGCT AAGTCGAGGTCCTCAAGAGCGCT CGAGCTCGGAGAGCAGAGGCTGT TCGGCTGAGCT GGCTAGGCGGAGAACTAAGTACAGAGAGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CTATAGCAAGCTCAGCT TGCATGAGGCTCTGCAAGAGCTACTACAGAGAGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
227	Cadena pesada de TIM3.12 (13A3) IgG1.3f (N60A)	CAGTGTGAGTGTGAGAGTGGGCGCAGAGACTGGGAAAGCTTCGGAGACCGCTGTCCCTCACCTG CAGTGTCTGTGGTGGCTCCATCAGACAGTAGAGTACTAGTGGGGCTGGATTCGGCCAGGCCCCGAG GGAAGGGCTGGAGTGGATGGGAGCTATCTATTAGTGGGTTCACCTACTACTACTACTACTACTCTC AAGAGTTCAGTTCAGCAATATCGGTGACACGTCACAGAACTAGTTCCTCTGAGGCTGAGTCTGT GATGGTCGAGACAGAGCTGTGTATTATTGGGAGACAGAGGGGACCTACAGTGTAGTACTACGCTCAT GGTCGGACCGCTGGGAGCGCAGAGGAGCGTGGTACCGCTCTCCAGTTCAGTACACCAAGAGGCTCAGG GTTTTCCCGCTGGAGACGCTCTCCAGAGAGAGCTCTGGGGGACAGAGGAGCTTGGGCTGGCTGGT CAGAGTACTCTCTCGAAGAGGAGGCTGTGGGAATTCAGAGGCGCTCTAGCTACGCGGGTGG AAGCTTCCCGCTGTCACAGTCTCTAGAGCTCTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT TCCAGAGCTTGGGACAGAGCTTACATCTGAGAGCTGTGATACAGAGCCAGAGACAGAGCAAGAGT GGACAGAGAGTTTGAAGCCAAATCTTGTGAAAGCTCAGATATCCCATCTGAGAGTGGTGGCAGAGCTG AAGTCGAGAGAGGCTCTGTGAGTCT CGAGCTCTGAGGTCGATGAGCTGT CTGGTACGGGAGGCGGTGGAGGCTGT GCAGTACCGGTGGTACGCT AAGTCGAGGTCCTCAAGAGCGCT CGAGCTCGGAGAGCAGAGGCTGT TCGGCTGAGCT GGCTAGGCGGAGAACTAAGTACAGAGAGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CTATAGCAAGCTCAGCT TGCATGAGGCTCTGCAAGAGCTACTACAGAGAGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

[illegible]

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
230	Cadena pesada de TIM3.15 (13A3) IgG1.3f (P102Y)	CACTGCACTGTCAGAGATCGGCGCCAGAGATGGTGAAGCTTCGAGAGACCTGCTCCACCTG CACCTGCTCTGGTGGCTCCATCAGCGCTAGAGATTACTGCTGGGCTGGATCGGACAGCGCCAG CGAGAGCGCTGGAGTGGATTCGAGGTATCTATTAGTGGGTTCACCTACTACTACAAATCCGTGCTTC AAGAGTCAGATCAGCATATCGGTGGACAGGTCAGAAATCAGTCTCTCTGGAAGCTCAGGTCTGT GACCGCGGAAACAGCGCTGTATTATTGTGCGACAGGGGGGCTTACGCTGTATAGGCCCAT GGTTTGACTACTGGGTCACAGGAACCTGGTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT GGTTCTCCCTGGACCTCTCTCCAGAGAGACCTCTGGGGGACAGAGCGGCTGGGCTGGCTGGT CAAGGACTATTTCTCTGAACTGGTGGAGTGTGTGGAACTTAAAGGCGCTTACAGTACGCGGTGC ACACCTTCCCGCTGTCTCTACAGTCTCTCAGACTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT TCAGAGGCTTGGGACACAGACCTCAATCTGCAAGCTGTAATCAGAGCCAGGACAGAAACAGAGST GGACAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAATCTACATGCTCCACATGCTCCGCTGCTCCAGACCTG AAGCCGAGAGGCGCTGCTCAGTCTTCT CGGACCTCTGAGGTCACAGGGGTGGTGGACGTGAGTCAACAGATCTCTGAGTCAAGTTCAA CTGGATCTGGAGCGGTGGAGTGTGATAATGTCAGAGACAAAGCTCTGGAGGAGGAGTACAA GCAGCTACCGGTCTGCTACCGGTCT AAGTGAAGATCTCCAGAGGCT GCAGCCCGAGAACACAGGTTGACACCT TCAGCTGAGCTGCT GGCCAGCCGAGAACAAATACAGAGCAAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CTATAGCACTCTCAGCTTGCAAGAGCAAGTGTGAGAGAGAGGAGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCT TGCTATGAGGCTCTGCAACACCTACTACCGCTAGAGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
231	Cadena pesada de TIM3.16 (13A3) IgG1.3f (P102L)	CAGCTGAGCTGTCAGAGATCGGCGCCAGAGATGGTGAAGCTTCGAGAGACCTGCTCCACCTG CACCTGCTCTGGTGGCTCCATCAGCGCTAGAGATTACTGCTGGGCTGGATCGGACAGCGCCAG CGAGAGCGCTGGAGTGGATTCGAGGTATCTATTAGTGGGTTCACCTACTACTACAAATCCGTGCTTC AAGAGTCAGATCAGCATATCGGTGGACAGGTCAGAAATCAGTCTCTCTGGAAGCTCAGGTCTGT GACCGCGGAAACAGCGCTGTATTATTGTGCGACAGGGGGGCTTACGCTGTATAGGCCCAT GGTTTGACTACTGGGTCACAGGAACCTGGTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT GGTTCTCCCTGGACCTCTCTCCAGAGAGACCTCTGGGGGACAGAGCGGCTGGGCTGGCTGGT CAAGGACTATTTCTCTGAACTGGTGGAGTGTGTGGAACTTAAAGGCGCTTACAGTACGCGGTGC ACACCTTCCCGCTGTCTCTACAGTCTCTCAGACTCTTACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT TCAGAGGCTTGGGACACAGACCTCAATCTTGTGACAAATCTACATGCTCCACATGCTCCGCTGCT GGACAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAATCTACATGCTCCACATGCTCCGCTGCTCCAGACCTG AAGCCGAGAGGCGCTGCTCAGTCTTCT CGGACCTCTGAGGTCACAGGGGTGGTGGACGTGAGTCAACAGATCTCTGAGTCAAGTTCAA CTGGATCTGGAGCGGTGGAGTGTGATAATGTCAGAGACAAAGCTCTGGAGGAGGAGTACAA GCAGCTACCGGTCTGCTACCGGTCT AAGTGAAGATCTCCAGAGGCT GCAGCCCGAGAACACAGGTTGACACCT TCAGCTGAGCTGCT GGCCAGCCGAGAACAAATACAGAGCAAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CTATAGCACTCTCAGCTTGCAAGAGCAAGTGTGAGAGAGAGGAGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCT TGCTATGAGGCTCTGCAACACCTACTACCGCTAGAGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

(continuación)

[illegible]

[illegible]

SEQ ID	Descripción	Secuencias
162	TIM3.5 (13A3), TIM3.2 (17C3), Cadena ligera de TIM3.4 (3G4) IgG1	GAATATGTTGAGCGAGTCTCCAGGCAACCTGTCCTTTGCTCTCCAGGGGAAAGAGGCGCACTCTCTC CTCGAGGGCCAGCTCAGAGCTGTACGAGGAGCTACTTTAGCTCTGCTATCCAGACAGAAACCTGCCCCAGG CTCCAGGCTCTCTATATGCTGATCCAGAGAGGCTACTGCTCATCTCCAGACAGCTTCACTGAGTGC AGTGGCTCTGGGACAGACTTCACTCTCAACATAGGCAACACTGGAAGCTCTGACACTTTTGGAGTCTGA TTACTGTGACAGATAAGTATGACTCAAGATCACTTTGGCAAGGAGACAGCACTTGGAGATTAAC CTACCGTCTGCTGACAGCTCTCTCTATCTCTCCCTCCATCTGATGAGAGTGTGAATCTGGAACT GCTCTGTGTTGTGCTCTGTGATTACTCTTATCCGAGAGGCTCAAGTACAGTGTGAGAGTGGAG TAAGCCCTCCAAATCCGCTACTCCAGGAGAGTCTCAGAGACAGGACACACAGACAGACACT ACAGCTTCAGTAGACCTGACCTGAGCAAAAGAGATACGCGCAACACAAAGTCTTAGGCTTGC GAGATCACCATCAGGGCTGAGAGCTGCGCTGATACAGAGCTTCACACAGGSGAGAGTCTTAG
163	889, TIM3.6 (8C4), Cadena ligera de TIM3.9 (17C8) IgG1	GAATATGTTGAGCGAGTCTCCAGGCAACCTGTCCTTTGCTCTCCAGGGGAAAGAGGCGCACTCTCTC CTCGAGGGCCAGCTCAGAGCTGTACGAGGAGCTACTTTAGCTCTGCTATCCAGACAGAAACCTGCCCCAGG CTCCAGGCTCTCTATATGCTGATCCAGAGAGGCTACTGCTCATCTCCAGACAGCTTCACTGAGTGC AGTGGCTCTGGGACAGACTTCACTCTCAACATAGGCAACACTGGAAGCTCTGACACTTTTGGAGTCTGA TTACTGTGACAGATAAGTATGACTCAAGATCACTTTGGCAAGGAGACAGCACTTGGAGATTAAC CTACCGTCTGCTGACAGCTCTCTCTATCTCTCCCTCCATCTGATGAGAGTGTGAATCTGGAACT GCTCTGTGTTGTGCTCTGTGATTACTCTTATCCGAGAGGCTCAAGTACAGTGTGAGAGTGGAG TAAGCCCTCCAAATCCGCTACTCCAGGAGAGTCTCAGAGACAGGACACACAGACAGACACT ACAGCTTCAGTAGACCTGACCTGAGCAAAAGAGATACGCGCAACACAAAGTCTTAGGCTTGC GAGATCACCATCAGGGCTGAGAGCTGCGCTGATACAGAGCTTCACACAGGSGAGAGTCTTAG
165	Cadena ligera de 9F6 VK1 IgG1	GGCATCCAGTTGACCCAGCTCCATCTGCTGCTGGAATCTGTAGGAGAGAGTCTCACTATCAG TTGCTGGGCAAGTTCAGGCAATTAGCAGTGTCTTAGCTGTGATAGAGAGAAACAGGGAAGTCTC CTAAGCTCTGATCTGTGATGACCTCCAGTTTGGAGAGTGGGTCTCATAGAGTTCAGGCGGAGT GGATCTGGGACAGACTTCACTCTCAACATAGGCAACACTGGAAGCTCTGACACTTTTGGAGTCTGA CTGTGACAGATTAATATTTACTCTGGAGAGTGTGATCAGGCGCAACAGTGGCAATCTGAAGCTTA CGGCGGTGACCACTCTGCTCTCACTTCCGCGCACTGTGATGAGAGTGTGAATCTGGAGTCTGCTC TCTGTTGTGCTGCTGCTGATGATCTCTATCCAGACAGAGGCAAAAGTACAGTGTGCAAGCTGTGATA CGCTCTCAATCGGAGTACTCCAGAGAGAGTGTACAGAGAGAGCACTAAGGACAGCACTTCTGA GCTGTGAGTACAGCTGTGATCTGAGCAAAAGAGATCTAGAGAAATCAAAATCTACGCTGTGCAAA GGCACATATCAGGCTGTGAGTCTGCGCTGATACAGAGCTTCACACAGGSGAGAGTCTTAG
166	Cadena ligera de 9F6 VK2 IgG1	GAATATGTTGAGCGAGTCTCCAGGCAACCTGTCCTTTGCTCTCCAGGGGAAAGAGGCGCACTCTCTC CTCGAGGGCCAGCTCAGAGCTGTACGAGGAGCTACTTTAGCTCTGCTATCCAGACAGAAACCTGCCCCAGG CTCCAGGCTCTCTATATGCTGATCCAGAGAGGCTACTGCTCATCTCCAGACAGCTTCACTGAGTGC AGTGGCTCTGGGACAGACTTCACTCTCAACATAGGCAACACTGGAAGCTCTGACACTTTTGGAGTCTGA TTACTGTGACAGATAAGTATGACTCAAGATCACTTTGGCAAGGAGACAGCACTTGGAGATTAAC CTACCGTCTGCTGACAGCTCTCTCTATCTCTCCCTCCATCTGATGAGAGTGTGAATCTGGAGTCTGCTC TCTGTTGTGCTGCTGCTGTGATTACTCTTATCCGAGAGGCTCAAGTACAGTGTGAGAGTGGAGTGA CGGCTCCAAATCCGCTACTCCAGGAGAGTCTCAGAGACAGGACACACAGACAGACACT GCTCTGAGTACAGCTGTGATCTGAGCAAAAGAGATCTAGAGAAATCAAAATCTACGCTGTGCAAA GGCACATATCAGGCTGTGAGTCTGCGCTGATACAGAGCTTCACACAGGSGAGAGTCTTAG

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencias
164	Cadena ligera de 9F6 VK3 IgG1	GAAATTTGTTGACGAGAGTCTCCAGGACCGGTCCTTTCTCTTCAGGAGAAAGAGCCACCCCTTTC CTGACAGGCGCAGTCTCAGAGTGTTTAGCAGCAGCTACTTAGCTTGTCTACAGGACGAAACCTGGGDDAGG CTCCAGCGCTCTCTCATCTATGGTGGCATGCAACAGCGCCGCACTTGGCATCTCCCAACACAGCTTCATTTGGC ACGCGGCTGCGACAGACTTAACTCTTAACTACAGAGAGCTCGGAGCTCTGAGATTTTCCAGTCTGA TTACTGTACAGAGATAGGTAGCTCAGCGCTCACTTTGGGCGAGGAGATCAGGCTGGAGATCAAC CTACGGTGGCCGACACATCTGTTTAACTCTTCTCCCATCTGTGATGAGCAGTTGCAATCTCGACT GGCTCTGTTGTGTGCTTGTGATGAATCTGTATGCTAGAGAGCCCAAAATTCAGTGAAGAGTGA TAGCCCTCTCAATCCGGTACTCCGAGCAGCTCTCAGACAGAGCAGACACACAGACAGACCTT ACACCTCAGACAGACACCTGATGCTGAACAGAGAGAGCTACGAGAAACACAAATCTACCCCTGC GAAGTCACCCATCAGGCGCTGAGCTGGCCGCTCCAAAGAGCTTCACACAGGAGAGAGTTAG

La práctica de la presente divulgación empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la pericia de la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* Patente de EE. UU. n.º 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; el tratado, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, vols. 154 y 155; Mayer y Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Weir y Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooks, *Antisense drug Technology: Principles, strategies and applications*, 2ª ed., CRC Press (2007) y en Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore Md.).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de anticuerpos anti-TIM3 humana

Se inmunizaron ratones transgénicos para la IgG humana (KM) con la fracción de membrana plasmática de células HEK-293 humanas transfectadas con la TIM-3 humana. Las células de los ganglios linfáticos de todos los ratones inmunizados se fusionaron con el compañero de fusión SP2/0. En primer lugar, se cribaron los sobrenadantes de hibridoma para detectar la presencia de anticuerpos IgG humanos mediante un ensayo de alto rendimiento. A continuación, se determinó la especificidad del antígeno mediante la unión FACS en células humanas transfectadas con la TIM-3. En resumen, se realizaron 47 fusiones, se identificaron 3935 clones positivos para la IgG, de los cuales 448 se identificaron como positivos para la hTIM3 mediante un ELISA, y de éstos 126 resultaron ser positivos mediante FACS de la hTIM3. De éstos, 117 clones (o anticuerpos) se analizaron adicionalmente mediante diversos métodos que incluyen: (1) categorización de epítomos realizada mediante un Biacore; (2) unión de la TIM3 a una estirpe celular transfectada con la TIM-3 (293-TIM3) para determinar la CE₅₀; (3) ensayos con Th1 (como se describe con más detalle a continuación); y (4) ensayos con TIL (como se describe con más detalle a continuación). De los 117, se seleccionaron siete hibridomas que expresaban anticuerpos anti-TIM3 totalmente humanos por tener las características deseables: 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8. El aminoácido de, y las secuencias de nucleótidos que codifican, los dominios variables de los anticuerpos producidos por estos hibridomas se proporcionan en las FIGS. 1-7, y las SEQ ID NOs de las CDR, las regiones variables y las cadenas pesadas y ligeras, así como su isotipo, se proporcionan en la FIG. 13 (véanse las filas con los nombres de los hibridomas). Un hibridoma y el anticuerpo que secreta tienen el mismo nombre (por ejemplo, 13A3).

Los anticuerpos que comprenden las CDR y/o los dominios variables de los anticuerpos 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8 también se expresaron de forma recombinante en células hospedadoras. Los anticuerpos recombinantes se denominan en el presente documento con los nombres "TIM3.2" a "TIM3.18". Cuando se hace referencia a cualquiera de estos anticuerpos recombinantes por sus nombres "TIM3.2" a "TIM3.18", no se hace referencia a ninguna región constante específica, es decir, los anticuerpos TIM3.2 a TIM3.18 pueden tener cualquier región constante deseada, por ejemplo, las mostradas en la FIG. 13.

Las CDR y los dominios variables se expresaron en el contexto de una región constante IgG1 sin efector (alotipo "f"), que comprende las sustituciones L234A, L235E, G237A, A330S y P331S ("IgG1.1f") e IgG1.3f, una región constante IgG1 sin efector (alotipo "f"), que comprende las sustituciones L234A, L235E, G237A, es decir, únicamente difiere de IgG1.1f en que no tiene las sustituciones A330S y P331S. Las CDR y las regiones variables también pueden utilizarse en el contexto de la IgG4, por ejemplo, la IgG4P (es decir, una IgG4 con la sustitución "S228P"). También se han mutado ciertas CDR y regiones estructurales de estos anticuerpos. Específicamente, se han mutado la VHCDR2 de 13A3 y 8B9, la VHCDR3 de 13A3 y VHFR4. En la FIG. 13, la Tabla 1 y la lista de secuencias se proporciona una lista de los anticuerpos IgG1.1f e IgG1.3f que se han producido y de otros anticuerpos que pueden prepararse. Los anticuerpos expresados de forma recombinante incluyen los descritos en los Ejemplos siguientes, así como los anticuerpos 3G4, 8C4, 9F6, 8B9, 17C8, SD6 que se han expresado como anticuerpos IgG1.1f

En las FIGS. 8A y 9A se proporciona una alineación de secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos 13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6, 3G4 y 17C8, respectivamente. La designación de la secuencia de las regiones VH y VL se proporciona en las FIGS. 8B y 9B, respectivamente. En la FIG. 10 se proporciona una alineación de secuencias de las cadenas VH natural y mutada de 13A3. En la FIG. 11 se proporciona una alineación de secuencias de la cadena VH natural y mutada de 9F6. En la FIG. 12 se proporciona una alineación de secuencias de las cadenas VH natural y mutada de 8B9.

Ejemplo 2: caracterización de los anticuerpos anti-TIM3 humana

Se ensayó la unión de los anticuerpos anti-TIM3 seleccionados a las células que expresan la TIM3. En la FIG. 14A se muestra la unión de diferentes anticuerpos anti-TIM3 a células transfectadas con la TIM3 humana (FIG. 14A), y a linfocitos T humanos activados con anti-CD3/anti-CD28 (FIG. 14B), como se determina mediante citometría de flujo. También se ensayó la unión de los anticuerpos a la TIM3 de macaco utilizando células transfectadas con TIM3 de macaco (FIG. 15A) y linfocitos T de macaco activados con anti-CD3/anti-CD28 (FIG. 15B). En la FIG. 15A se muestra que 13A3 tiene la mejor CE₅₀ de unión para la estirpe celular transfectada de TIM3 de macaco, y es el único anticuerpo anti-TIM3 que es reactivo con los linfocitos T de macaco activados.

Ejemplo 3: afinidad de unión de los anticuerpos TIM3 a la TIM3 humana y TIM3 de macaco determinada por resonancia de plasmón superficial

La cinética y la afinidad de los fragmentos Fab de 13A3 anti-TIM3 hacia la TIM3 humana y de macaco se determinaron en un instrumento Biacore T200 a 37 °C en PBS a pH 7,4 suplementado con Tween-20 al 0,05 % (v/v), como se describe con detalle más adelante. La proteína TIM3 humana utilizada consistía en el dominio extracelular (ECD) de la TIM3 humana unido a un Fc de ratón, formando de este modo una proteína hTIM3 ECD-Fc dimérica ("hTIM3-mFc"). Esta proteína de fusión se expresó en células CHO transfectadas de forma estable, y se purificó del medio utilizando proteína A de afinidad, seguido de una cromatografía de exclusión por tamaño molecular. La proteína TIM3 recombinante de macaco cangrejero utilizada consistía en el dominio extracelular de la TIM3 de macaco cangrejero seguido de un conector y etiquetas de afinidad, formando de este modo una proteína cynoTIM3 ECD monomérica ("cynoTIM3-MycHisAvi"). Esta proteína de fusión se expresó en células Expi293 transfectadas temporalmente (Life Tech,) y la proteína se aisló a partir del medio y se purificó utilizando una etiqueta de afinidad (6x His), seguido de una cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

La secuencia de aminoácidos de hTIM3-mFc era la siguiente:

```
SEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECCGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNQDFRKGDVSLT
IENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKENLKLVIKPAKVTPAPTRQRDETAAPRMLTTRGHGPAETQTGLSLPDI
NLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGASVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIPEPKPKDVLITITLTPKVTCV
VVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAPPAPIEKTIS
KTKGRPKAPQVYTIPPEKEQMAKDKVSLTCMITDEFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVN
QKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 375)
```

La secuencia de aminoácidos de cynoTIM3-MycHisAvi era la siguiente:

```
SEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECCGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNQDFRKGDVSLT
IENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKENLKLVIKPAKSPGGGGGGSEQKLISEEDLGHHHHHGLNDIFEAQKI
EWHE (SEQ ID NO: 376)
```

Se usaron los Fab de 13A3 y TIM3.18.IgG1.3 unidos a una cola de histidina. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (HC) del Fab de 13A3 6xHis era la siguiente:

```
QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIQPPGKGLEWIGSIYYSGFTYYNPSLKSRTISVDT
SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDYAHWFEPWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CGGHHHHHHH (SEQ ID NO: 365)
```

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (HC) del Fab 13A3 de N60Q de D101E 6xHis era la siguiente:

```
QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIQPPGKGLEWIGSIYYSGFTYYQPSLKSRTISVDT
SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDYAHWFEPWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CGGHHHHHHH (SEQ ID NO: 366)
```

Los Fab recombinantes de 13A3 y TIM3.18.IgG1.3 se prepararon mediante una transfección temporal en Expi293 (Life Tech). El Fab expresado comprendía la región variable de la cadena pesada seguida del CH1 de hIgG1, y la región variable de la cadena ligera seguida del dominio CL de hKappa. El Fab expresado se secretó en el medio y se purificó utilizando la etiqueta de afinidad (6x His).

Se preparó un chip de captura de anticuerpos anti-ratón en un chip Biacore CM4 serie S (GE Healthcare Life Sciences,

n.º de catálogo BR-1005-34) utilizando el kit de captura Biacore para anticuerpos de ratón (n.º de catálogo BR-1008-38). La proteína de fusión TIM3 humana-Fc de ratón se capturó en las celdas de flujo 2 y 3 en dos densidades de superficie diferentes. La proteína de fusión TIM3 de macaco-Fc de ratón se capturó en la celda de flujo 4. La celda de flujo 1 (superficie de captura en blanco) sirvió como referencia. Los fragmentos Fab de los anticuerpos expresados recombinantemente y marcados con His se hicieron fluir como analitos sobre todas las superficies en una serie de diluciones triples de 6 miembros con una concentración máxima de 1,0 µM y mínima de 4,1 nM. Los sensogramas resultantes fueron doblemente referenciados (utilizando la celda de flujo 1 y un blanco de tampón) y ajustados a un modelo de unión Langmuir 1:1 con transporte de masa. Los datos de las celdas de flujo 2 y 3 se ajustaron globalmente.

- 10 La velocidad de formación (K_a) y de disociación (K_D) del complejo, así como la constante de disociación global (K_D) se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2: cinética y afinidad de unión de los anticuerpos anti-TIM3 13A3 y TIM3.18.IgG1.3 a las proteínas TIM3 humana y de macaco

Ligando	Analitos	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
TIM3 humana	Fc de hTIM3/Fab de 13A3	$3,2 \times 10^6$	$6,9 \times 10^{-3}$	2,2
TIM3 de macaco cangrejero	Fc de TIM3 de macaco/Fab de 13A3	$2,4 \times 10^6$	$5,3 \times 10^{-2}$	22
TIM3 humana	Fc de hTIM3/Fab de TIM3.18	$3,2 \times 10^6$	5×10^{-3}	1,6
TIM3 de macaco cangrejero	Fc de TIM3 de macaco/Fab de TIM3.18	$3,4 \times 10^6$	$5,9 \times 10^{-2}$	17

Los experimentos con 13A3 no se realizaron el mismo día que los de TIM3.18.

Ejemplo 4: afinidad de unión de los anticuerpos TIM3 a la TIM3 humana y de macaco determinada mediante un análisis de Scatchard

Se marcó el TIM3.18.IgG1.3 con radioyodo con ^{125}I -Na (1 mCi; PerkinElmer, catálogo NEZ033H001 MC) utilizando el reactivo de yodación en fase sólida IODO-GEN® (1,3,4,6-tetracloro-3a-6a-difenilglicourilo; catálogo de Pierce 28601). El exceso de yoduro se eliminó con una columna de desalinización (catálogo de Pierce 43243). Se recogieron fracciones de anticuerpo marcado y se analizó su radiactividad con un contador gamma Wizard 1470 (PerkinElmer). La concentración de anticuerpo ^{125}I -TIM3.18.IgG1.3 en cada fracción se calculó con el fluorómetro Qubit de Invitrogen. La radiopureza se estableció mediante una cromatografía en capa fina de los picos de proteínas y las fracciones radiactivas (Catálogo de Pinestar Technology 151-005).

La unión del anticuerpo radioyodado TIM3.18.IgG1.3 a las células CHO que expresan la TIM3 humana o de macaco se demostró incubando las células CHO que expresan la TIM3 humana o de macaco con una valoración del anticuerpo ^{125}I -TIM3.18.IgG1.3. La unión no específica se determinó a través de la unión en presencia de una valoración de un exceso molar de 100 veces de anticuerpo sin marcar y se restó de los CPM totales para calcular la unión específica. Se utilizó una curva patrón lineal de concentración del anticuerpo ^{125}I -TIM3.18.IgG1.3 frente a los CPM para extrapolar la actividad específica, nM máximos unidos al anticuerpo ^{125}I -TIM3.18.IgG1.3, y de este modo calcular el número de receptores por célula.

Los resultados se muestran en las FIGS. 27A y 27B. La curva patrón de anticuerpo ^{125}I -TIM3.18.IgG1.3 (FIG. 27A) muestra que 1 nM del anticuerpo marcado con ^{125}I equivale a 81119,3 cpm. El número de receptores por célula se calcula mediante la siguiente ecuación: $(B_{\text{max}}) \times (\text{Número de Avogadro}) \times (\text{Volumen del ensayo}) / n.º \text{ de células por pocillo}$. Los resultados muestran que el anticuerpo TIM3.18.IgG1.3 tiene una afinidad de 0,26-0,48 nM por la TIM3 humana sobreexpresada en células CHO (que tienen 414 720 receptores por célula) y una afinidad de 0,36-0,48 nM por la TIM3 de macaco sobreexpresada (que tiene 235 944 receptores por célula).

Un análisis similar realizado con el anticuerpo ^{125}I -TIM3.18.IgG1.3 en linfocitos Th1 humanos activados de 2 donantes (50 000 células/pocillo) proporcionó una afinidad de 0,125-0,164 nM, a pesar de una diferencia de casi cuatro veces en el número de receptores por célula entre los donantes (FIG. 28). La unión del TIM3.18.IgG1.3 radioyodado a la TIM3 humana se demostró incubando linfocitos Th1 humanos primarios activados (preparados como se describe en otros Ejemplos del presente documento) con una valoración de ^{125}I -TIM3.18.IgG1.3. La unión no específica se determinó a través de la unión en presencia de una valoración de un exceso molar de 100 veces de anticuerpo sin marcar y se restó de los CPM totales para calcular la unión específica. Para extrapolar el máximo de nM de ^{125}I -TIM3.18.IgG1.3 unidos y calcular de este modo el número de receptores por célula, se utilizó una curva patrón lineal de la concentración de ^{125}I -TIM3.18.IgG1.3 frente a los CPM.

Ejemplo 5: ausencia de reactividad cruzada de TIM3.18.IgG1.3 con la TIM1 humana, la TIM4 humana y la TIM3 de ratón

Tras una búsqueda en BLAST del dominio IgV de la TIM-3 en todo el banco génico, las moléculas más homólogas

fueron la TIM1 y la TIM4 (45 % de identidad). El perfil de selectividad del TIM3.18.IgG1.3 utilizando estirpes celulares humanas transfectadas con la TIM1 o la TIM4 mediante citometría de flujo no mostró reactividad cruzada con la TIM1 ni la TIM4. También se demostró mediante citometría de flujo en células de ratón transfectadas con la TIM3, que el TIM3.18.IgG1.3 no presenta reactividad cruzada con las células transfectadas con la TIM-3 de ratón.

Ejemplo 6: la producción de IFN- γ por parte de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) es aumentada por los anticuerpos anti-TIM3

Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos anti-TIM3 e identificar los que tienen más probabilidades de tener una actividad estimuladora de los linfocitos T significativa *in vivo*, se desarrolló un ensayo específico de linfocitos T. El ensayo mide la cantidad de IFN- γ secretada por los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), aislados a partir de tejido tumoral reciente e incubados en presencia de células CHO irradiadas, que expresan CD3 ("células CHO-OKT3"), en presencia o ausencia de un anticuerpo TIM3 (o de control). Sin querer estar limitados por un mecanismo de acción específico, la secreción de IFN- γ en presencia de un anticuerpo anti-TIM3 dado indica que el anticuerpo inhibe la señalización negativa que normalmente proporciona la TIM3 a los TIL, y estimula la activación (es decir, la producción de IFN- γ) de los TIL.

El tejido tumoral reciente (incluidos los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL)) de un paciente con carcinoma de células renales se preparó en una suspensión unicelular mediante digestión enzimática (Miltenyi, n.º de catálogo 130-095-929). La viabilidad celular era superior al 80 %, como se determina mediante FACS. Se cocultivaron $1,5 \times 10^5$ células durante 5 días con $2,5 \times 10^4$ irradiadas (67 000 RAD durante 1 h 20 min; Rad Source Irradiator, RS-2000 Biological System) células CHO-OKT3 en un medio que contenía IL-2 (IL-2 (Peprotech, n.º de catálogo 200-02) a 20 UI/ml) en presencia de un anticuerpo de control del isotipo o de un anticuerpo anti-TIM3 a diferentes concentraciones. El día 5 del cultivo se recogió el sobrenadante celular y se evaluó el nivel de IFN- γ mediante un ELISA (kit de ELISA BD Opteia hIFN γ , BD, n.º de catálogo 555152). Los resultados, que se muestran en la FIG. 16, indican que los anticuerpos anti-TIM3 13A3, 3G4, 17C3, 17C8 y 9F6 estimulan la producción de IFN- γ por parte de los TIL de carcinoma de células renales.

Se digirió tejido tumoral reciente de un paciente con cáncer de pulmón con un kit de digestión enzimática de Miltenyi (Miltenyi, n.º de catálogo 130-095-929). La suspensión unicelular se cocultivó con células CHO-OKT3 irradiadas (67 000 RAD) durante 1 h 20 min; Rad Source Irradiator, RS-2000 Biological System) en medio que contenía IL-2 (IL-2 (Peprotech, n.º de catálogo 200-02) a 20 UI/ml) en presencia de un anticuerpo de control del isotipo o de un anticuerpo anti-TIM3 a diferentes concentraciones. El día 5 del cultivo se recogió el sobrenadante celular para el ELISA del IFN- γ (kit de ELISA BD Opteia hIFN γ , BD, n.º de catálogo 555152). Los resultados, que se muestran en la FIG. 17A, indican que los anticuerpos anti-TIM3 ensayados (es decir, 13A3 y 3G4) estimulan la producción de IFN- γ por parte de los TIL de cáncer de pulmón.

Además, el día 3,5 de un cocultivo de la suspensión de células de tejido tumoral de cáncer de pulmón con CHO-OKT3 irradiadas (67 000 RAD durante 1 h 20 min; Rad Source Irradiator, RS-2000 Biological System) tratadas con un anticuerpo de control del isotipo o con un anticuerpo anti-TIM3 en presencia de IL-2, las células se incubaron con BD GolgiStop durante la noche. Posteriormente, las células se tñieron en primer lugar con marcadores de superficie celular, CD45, CD4, CD8, TIM3 y PD1, y a continuación se fijaron y permeabilizaron con el kit BD Cytotfix/Cytoperm seguido de la tinción intracelular del IFN- γ . Los resultados, que se muestran en la FIG. 17B, muestran que el porcentaje de células que expresan IFN- γ intracelular aumenta en los linfocitos CD8 $^{+}$ (panel inferior) después del tratamiento con anticuerpos anti-TIM3.

En la FIG. 18 se muestran los datos agrupados de múltiples experimentos con TIL tumorales (realizados como se ha descrito anteriormente en este Ejemplo) en respuesta a clones de anticuerpos anti-TIM-3 13A3 o 3G4 (es decir, cada punto de la figura representa los TIL de una muestra tumoral de un paciente tratado con 13A3 o 3G4). Varios TIL de carcinoma de células renales (RCC) y de cáncer de pulmón respondieron al anticuerpo anti-TIM-3 promocionando la producción de IFN- γ , mientras que una única preparación de TIL de un tumor de tiroides no lo consiguió.

Ejemplo 7: bloqueo cruzado basado en FACS de anticuerpos anti-TIM3

Se aislaron linfocitos T humanos totales a partir de PBMC utilizando un kit de purificación de linfocitos T de Miltenyi, y se activaron con anti-CD3 unido a placa (1 μ g/ml; anti-CD3, clon OKT3, eBioscience, n.º de catálogo 16-0037-85) y anti-CD28 soluble (1 μ g/ml; anti-CD28, clon CD28.2, BD Biosciences, n.º de catálogo 555725) durante 4 días. La TIM3 se expresó en >80 % de los linfocitos T, como se determina mediante FACS. Los linfocitos T se incubaron con diferentes anticuerpos anti-TIM3 durante 30 minutos, seguido de una incubación con anticuerpos anti-TIM3 seleccionados marcados con biotina durante 30 minutos, y se detectaron con estreptavidina conjugada con PE. Los resultados, que se muestran en la FIG. 19, indican que los anticuerpos 13A3, 3G4, 17C3, 17C8 y 9F6 se encuentran en el mismo grupo de categorización (Grupo I), es decir, compiten de forma cruzada entre sí, mientras que los anticuerpos 8B9 y 8C4 se encuentran en un grupo de categorización separado (Grupo II), es decir, no compiten de forma cruzada con los anticuerpos del Grupo I, sino que compiten de forma cruzada entre sí. Se ha demostrado que los anticuerpos del grupo de categorización I tienen actividad biológica (véanse los Ejemplos), mientras que los del grupo de categorización II tenían una actividad más débil. Dos anticuerpos anti-TIM3 que no competían de forma

crucada ni con el Grupo I ni con el Grupo II, no parecían tener ninguna actividad biológica. Los anticuerpos del grupo de categorización I eran también los que interferían con la unión de la TIM3 a PS (como se describe en más detalle en el presente documento).

5 Ejemplo 8: cartografiado de epítopos mediante el método de expresión en superficie de levadura

La secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de la TIM3 humana (NM_032782), es decir, SEVEYRAEVLGQNNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWL

10 NGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIPAKVTPAPTRQRDFTAAAFPRM
LTTTRGHGAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIG, (SEQ ID NO: 290) se clonó en el plásmido de expresión en levadura PDV0023 mediante ligación en los sitios de las enzimas de restricción XhoI y NotI. Se realizó una mutagénesis aleatoria de baja tasa en la secuencia para generar mutaciones puntuales únicas en toda la región codificante de la TIM3 utilizando el kit GeneMorph II Random Mutagenesis de Agilent Technologies. Se generó una biblioteca de $9,8 \times 10^6$ clones en células VWK18gal de *S. cerevisiae*. Se pasaron 2×10^8 células de la biblioteca y se
15 indujeron para el marcaje con anticuerpos y la clasificación celular. Aproximadamente 2×10^7 células inducidas se incubaron con 100 nM de un anticuerpo primario objetivo anti TIM3 humana y 100 nM de anticuerpo anti cMyc (9E10) durante 1 h a 25 °C. Las células se lavaron y a continuación se detectaron con anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG humana-PE y de cabra anti-IgG-A633 de ratón marcados con fluorescencia durante 45 minutos a 4 °C para detectar los anticuerpos primarios unidos en la superficie celular. Las células marcadas se clasificaron con un
20 instrumento BD FACSARIA II en medios de cultivo de levadura. Se recogieron las células marcadas positivamente con el anticuerpo anti-Myc, y las marcadas negativamente con el anticuerpo anti-TIM3 humana. La población de células APC+ / PE- se expandió, se pasó y se indujo para una segunda ronda de marcaje y clasificación idénticos para enriquecer las poblaciones deseadas. Se purificó ADN plasmídico de levadura de aproximadamente 2×10^7 células de la biblioteca no seleccionada y de ambas rondas de células seleccionadas y clasificadas. Para cada población
25 celular se rescató la secuencia objetivo de la TIM3 y se purificó del ADN a partir del plásmido de levadura mediante una PCR utilizando cebadores específicos del vector que flanquean la secuencia de la TIM3 humana. Los productos de la PCR de la secuencia objetivo se sometieron a la preparación de bibliotecas NGS utilizando el kit Nextera XT DNA Library for Illumina Sequencing de Illumina. Las bibliotecas preparadas se enviaron a EAVQ2 Solutions para su secuenciación de alto rendimiento en la plataforma MiSeq de Illumina con 300 ciclos / celda de flujo. Se compararon
30 entre 0,5 y 1,0 millones de lecturas de secuencia de cada biblioteca con la secuencia de la TIM3 natural, y se tabularon las mutaciones en cada posición a lo largo de la secuencia. Se calculó la diferencia en la frecuencia de mutaciones en cada posición de resto entre las rondas seleccionadas y la biblioteca no seleccionada, y se utilizó para determinar los restos críticos para la unión del anticuerpo. Se analizaron las posiciones con alta frecuencia de mutación para ver si estaban expuestas en la superficie utilizando un modelo estructural de la TIM3 humana basado en estructuras
35 cristalinas conocidas de la TIM3 de ratón (PDB: 2OYP y PDB: 3BIB). Alta frecuencia de mutación, los restos expuestos en la superficie se consideran parte de epítopos, mientras que en la frecuencia de mutación alta, los restos enterrados se consideran falsos positivos. Los restos falsos positivos suelen ser los que alteran el plegamiento local o central de la proteína, y alteran indirectamente la unión del Ac a su epítipo de la superficie.

40 En la FIG. 20 se muestran los restos que se determinó que formaban parte del epítipo de la TIM3 humana para cada uno de los anticuerpos utilizados. Además, D104 muestra una puntuación mutacional positiva, en todos los cartografiados, y puede ser un puente salino estructural al R81. Para el epítipo 8B9, L84 muestra una alta frecuencia de mutación, aunque aparece enterrado en la estructura que soporta los restos del epítipo. Q113 muestra una puntuación baja pero positiva para 13A3. Es probable que desempeñe una función de apoyo estructural de la región
45 del epítipo, pero tiene alguna exposición en la superficie.

Ejemplo 9: bloqueo de la interacción TIM3-PtdSer mediante anticuerpos TIM3

El "ensayo de bloqueo en tándem" mostrado en la FIG. 21A se utilizó para determinar si los anticuerpos anti-TIM3
50 inhiben la interacción entre la TIM3 humana y la fosfatidilserina ("PtSer" o "PS"). Dado que la PS no es soluble en agua, para el ensayo se prepararon liposomas de PS. En resumen, se mezclaron lípidos con metanol/cloroformo y, a continuación, se evaporó el cloroformo bajo una corriente de nitrógeno y a vacío durante la noche. Posteriormente, los lípidos se sonicaron con una micropunta para dispersar totalmente el lípido y crear el liposoma. Además, se pasaron por una extrusora >10 veces para garantizar un tamaño homogéneo.

55 Los liposomas de PS se generan con PS (L- α -fosfatidilserina (cerebro, porcino) Avanti Polar Lipids n.º de cat. 840032C) suspendida en cloroformo. La reserva de PS se diluye en primer lugar en cloroformo hasta la cantidad necesaria, y el cloroformo se evapora bajo una corriente de nitrógeno hasta que no quede líquido visible. Para eliminar las cantidades ínfimas de cloroformo, la PS seca se coloca a vacío durante toda la noche. A continuación, la PS seca se suspende
60 en PBS con vórtex y una breve sonicación hasta que la solución se enturbia. Para crear liposomas de PS de un tamaño definido, se utiliza una extrusora con un filtro de 100 nm. La PS en suspensión se carga en la extrusora y se hace pasar por el filtro al menos 10 veces. En este punto, el liposoma de PS se diluye en PBS hasta alcanzar la concentración necesaria.

65 En el "ensayo de bloqueo en tándem", el TIM3 (ECD)-Fc se capturó en el biosensor Octet, y se permitió que el anticuerpo anti-TIM3 y los liposomas de PS se unieran a la proteína TIM3. Cuando el anti-TIM3 se une a una región

que está bloqueando la unión de la PS, el liposoma de PS no muestra ninguna unión.

Los resultados, que se muestran en la FIG. 21B, indican que los anticuerpos 3G4, 13A3, 17C3 y 17C8 inhiben la unión de la PtSer a la TIM3 humana, mientras que otros 2 anticuerpos anti-TIM3, es decir, AbA y AbB, no inhiben la unión de la PtSer a la TIM3 humana. Como se describe adicionalmente en los Ejemplos, los anticuerpos que inhiben la unión de la PtSer son también los que tiene la actividad funcional más fuerte (como se determina en los ensayos con Th1 y TIL).

Ejemplo 10: cartografiado de los epítomos por HDX-EM de los anticuerpos TIM3

Se utilizó una espectrometría de masas por intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-EM) para sondear los epítomos de unión de la hTIM-3 con los anticuerpos 13A3 y 3G4.

La HDX-EM sondea la conformación y la dinámica conformacional de las proteínas en solución mediante la monitorización de la velocidad y la magnitud del intercambio de deuterio de los átomos de hidrógeno de la amida de la cadena principal [1, 2]. El nivel de HDX depende de la accesibilidad al disolvente de los átomos de hidrógeno de la amida de la cadena principal y de los puentes de hidrógeno de la proteína. El aumento de masa de la proteína después de la HDX puede medirse con precisión mediante EM. Cuando esta técnica se empareja con una digestión enzimática, se pueden resolver las características estructurales a nivel de péptido, permitiendo la diferenciación de los péptidos expuestos en la superficie de aquellos plegados en el interior o de los secuestrados en la interfaz de un complejo proteína-proteína. Normalmente, se realizan experimentos de marcaje con deuterio y la posterior inactivación, seguidos de digestión enzimática, separación del péptido y análisis por EM.

Antes de los experimentos de cartografiado de epítomos, se realizaron experimentos no deuterados para generar una lista de péptidos comunes para la TIM-3 humana recombinante (hTIM3-ECD (22-200) marcada con His (véase la FIG. 25); 10 μ M, Sino Biological Inc.) y complejos proteicos de la hTIM-3 con el Fab de los anticuerpos 13A3 y 3G4 (relación molar de 1:1). Las muestras se inyectaron en la columna enzimática de pepsina Waters Enzymate BEH (2,1 $\times$ 30 mm), y se digirieron durante 3 min a 200 $^{\circ}$ C. La cámara de refrigeración del sistema de UPLC, que albergaba todos los elementos cromatográficos, se mantuvo a $0,0 \pm 0,1$ $^{\circ}$ C durante todo el tiempo de las mediciones. Los péptidos inyectados se atraparon y desalinizaron durante 3 min a 100 μ l/min y, a continuación, se separaron en 6 min mediante un gradiente de acetonitrilo-agua al 5-40 % a 65 μ l/min. La columna de separación era una columna ACQUITY UPLC BEH C18 de 1,0 mm $\times$ 50,0 mm (Waters). La identificación de los péptidos pépticos se realizó mediante una combinación de análisis de masa exacta y MSE utilizando ProteinLynx Global SERVER 2.5 (Waters) en el sistema HDX-EM de Waters.

En el experimento de HDX-EM, se diluyeron 5 μ l de cada muestra (hTIM-3 o hTIM-3 con el Fab del anticuerpo 13A3 o 3G4) en 55 μ l de tampón D₂O (tampón de fosfato 10 mM, D₂O, a pH 7,0) para iniciar las reacciones de marcaje. Las reacciones se llevaron a cabo durante diferentes periodos: 1 min, 10 min y 240 min. Al final de cada periodo de reacción de marcaje, la reacción se inactivó añadiendo tampón de inactivación (tampón de fosfato 100 mM con GdnCl 4 M y TCEP 0,4 M, pH 2,5, 1:1, v/v). Se digirieron 50 μ l de la muestra inactivada utilizando las mismas condiciones que en los experimentos no deuterados. Todos los experimentos de comparación se realizaron en unas condiciones experimentales idénticas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los niveles relativos de deuterio resultantes se representaron gráficamente frente al tiempo de intercambio con el uso del programa informático DynamX 3.0™ (Waters).

Como se muestra en la FIG. 25, en los experimentos de HDX-EM se obtuvo una cobertura de secuencia del 97,3 % de la hTIM-3. Como se muestra en la FIG. 26, el análisis de datos de HDX-EM de la hTIM-3 después de la unión con el Fab de los anticuerpos 13A3 y 3G4 identificó los siguientes epítomos discontinuos:

AcM 13A3: ⁴⁹VPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 367), ¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 368), y fragmento ¹¹⁹NDEKFNKL¹²⁷ del mismo; y
AcM 3G4: ⁴⁰YTPAAGNLVPVCWGKGACPVFE⁶² (SEQ ID NO: 369), ⁶⁶VVLRTDERDVNY⁷⁷ (SEQ ID NO: 370), ⁷⁸WTSRYWLNQDFRKGDVSL⁹⁵ (SEQ ID NO: 371) y ¹¹⁰CRIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷ (SEQ ID NO: 372).

En la FIG. 26 se muestran los péptidos de HDX-EM a los que se unen los anticuerpos 13A3 y 3G4, como se determina utilizando el protocolo de HDX-EM descrito en este Ejemplo.

Por lo tanto, el anticuerpo 13A3 interactúa con regiones de los restos de aminoácidos 49-62 y 111-127 de la hTIM3, pero no interactúa significativamente con otras regiones, tal como la región que es aminoterminal al resto de aminoácido Y40 o V49, la región que está situada entre los restos de aminoácidos E62 y R111 y la región que es carboxiterminal al resto de aminoácido L127. El 13A3 se une al bucle de unión de la fosfatidilserina del dominio IgV de la TIM-3.

Ejemplo 11: tinción IHQ en el objetivo por reactividad cruzada de TIM3.18 en tejido humano

Se realizó una inmunohistoquímica (IHQ) con 13A3 en secciones congeladas de bazo humano y de macaco

cangrejero. En ambas especies, el 13A3 (0,5 µg/ml) tiñó el endotelio de los sinusoides venosos. Como era de esperar, el anticuerpo 3G4, que no presenta reacción cruzada con la TIM-3 de macaco cangrejero, tiñó el bazo humano pero no el bazo de macaco cangrejero.

- 5 En análisis preliminares de reactividad cruzada tisular, se aplicó TIM3.18.IgG 13 conjugado con FITC a secciones o frotis congelados de 20 tipos de tejidos humanos normales, que incluyen cerebro, cerebelo, corazón, hígado, pulmón, riñón, frotis de PBMC, bazo, amígdala, timo, piel, colon, intestino delgado, estómago, páncreas, nervio periférico, hipófisis, tiroides, próstata y placenta (1 donante cada una). Se observó tinción específica en un subconjunto de células mononucleares (MNC) en los PBMC, bazo y amígdala, así como en las células reticulares epiteliales o los macrófagos del timo. La tinción más profunda fue en células similares a macrófagos/CD, que se observaron en todos los tejidos examinados, incluidos los macrófagos específicos tisulares (es decir, las células de Kupffer en el hígado, los macrófagos dérmicos/CD en la piel y las células de Hofbauer en la placenta). A nivel de órganos, la tinción más intensa se encontró en el bazo. Además de pequeños subconjuntos de MNC, con mucha frecuencia se observó una fuerte tinción en las células endoteliales esplénicas en la pulpa roja. Además, se observó tinción positiva en un pequeño subconjunto de células epiteliales tubulares corticales de la corteza renal.

Ejemplo 12: actividad antitumoral de anticuerpos combinados anti-TIM3 y PD-1 en ratones

- 20 Se evaluaron los anticuerpos comerciales de rata anti-TIM-3 de ratón (RMT3 23) y PD-1 (RMP1-14) (Bio-X-Cell) en un modelo de tumor colorrectal CT26. El diseño experimental fue similar al de un estudio *in vivo* descrito previamente, Ngiow *et al.* (2011) Cancer Res. 71: 3540). Dado que la TIM-3 se expresa relativamente tarde (día 15) en este modelo tumoral, se implantó un pequeño volumen de células tumorales (2×10^5) en el costado de cada ratón para que el crecimiento del tumor fuera mínimo, dando tiempo para la expresión de la TIM-3. Cuando los tumores se hicieron palpables el día 8, los ratones fueron distribuidos al azar en 4 grupos de tratamiento de 10 ratones cada uno, con un volumen tumoral medio de 40 mm³. El RMT3-23 (anticuerpo anti-TIM-3) y el RMP1-14 (anticuerpo anti-PD-1) se administraron mediante inyección intraperitoneal, como agentes únicos o combinados (250 µg/por inyección de cada anticuerpo); el control del isotipo se administró a 500 µg/inyección. Cada animal del estudio recibió 250 µg de un anticuerpo o 500 µg de 2 anticuerpos combinados por cada inyección y por un total de 3 dosis. El tamaño del tumor se evaluó quincenalmente. Los ratones de cada grupo que recibieron los productos investigados individuales o combinados mostraron actividad antitumoral, permaneciendo 2/10 ratones del grupo de monoterapia con anti-PD-1 y 6/10 ratones del grupo con anti-PD-1 y anti-TIM-3 combinados, libres de tumor al finalizar el estudio (FIG. 24A). Un estudio con CT26 anterior con el mismo diseño produjo unos resultados similares, con 3/10 ratones del grupo con monoterapia anti-PD-1 y 7/10 ratones del grupo combinado con anti-PD-1 y anti-TIM-3, libres de tumor. La actividad antitumoral del anti-TIM-3 administrado como agente único fue escasa o nula.

- 35 Cabe destacar que el valor de la CE₅₀ de la unión de RMT3-23 a linfocitos T de ratón activados es de 1,7 nM, que es 17 veces más débil que la CE₅₀ de TIM3.18 para la unión a la TIM-3 humana. Otro anticuerpo de rata anti-TIM-3 de ratón, (Ac M), que bloquea de forma cruzada el RMT3-23, tiene una CE₅₀ de 0,1 nM en la unión a linfocitos T de ratón activados, que es equivalente a la CE₅₀ de TIM3.18. Al igual que RMT3-23, el Ac M cartografía los bucles de unión de la PS de la TIM-3 de ratón. El uso de este anticuerpo con una región constante de la cadena pesada de mIgG1-D265A (isotipo inerte para el Fc) en el modelo tumoral CT26 demostró que potenciaba la respuesta antitumoral al anti-PD-1 (FIG. 24B).

Ejemplo 13: ensayo de proliferación de linfocitos Th1 con bloqueo del anticuerpo TIM3 (completo o Fab)

- 45 Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos anti-TIM3, se desarrolló un ensayo específico de proliferación de linfocitos T utilizando linfocitos Th1 polarizados *in vitro*. Los linfocitos Th1 polarizados se obtuvieron mediante la reestimulación repetida de linfocitos T CD4+ indiferenciados. A continuación, estas células se incubaron con células CHO-OKT3 irradiadas (de crecimiento detenido) en presencia de los anticuerpos anti-TIM3 (o de control) y se midió la proliferación de los linfocitos Th1.

- Los linfocitos T CD4 indiferenciados se polarizaron en linfocitos T Th1 similares a los de memoria de la siguiente manera. Los linfocitos T CD4 indiferenciados se purificaron a partir de PBMC utilizando un kit de aislamiento de linfocitos T CD4 indiferenciados de Miltenyi. Las células se cultivaron durante 3-4 días en IMDM/10 % de FBS a $3,6 \times 10^5$ células/ml en presencia de: perlas recubiertas de CD3/CD28 (80 %/20 %, respectivamente) a razón de 1 perla por 1 célula; 10 ng/ml de IL-2 humana; 1 ng/ml de IL-12 humana y 10 000 ng/ml de anticuerpo anti-IL-4 humana. Después de la incubación, las células se recogieron en un tubo, las perlas se retiraron con un imán y las células se volvieron a cultivar en un nuevo matraz. Se añadió IL-2 humana recombinante a una concentración final de 4 ng/ml, y las células se incubaron durante 3 días más. A continuación, se recogieron las células y se lavaron con 1X IMDM/10 % de FBS. Las células se contaron, se resuspendieron en IMDM/10 % de FBS a $4,1 \times 10^5$ células/ml y se cultivaron durante 3-4 días en presencia de: perlas recubiertas de CD3/CD28 (80 %/20 %, respectivamente) a razón de 1 perla por 1 célula; 10 ng/ml de IL-2 humana; 1 ng/ml de IL-12 humana y 10 000 ng/ml de anticuerpo anti-IL-4 humana. Después de la incubación, las células se recogieron en un tubo, las perlas se retiraron con un imán y las células se volvieron a cultivar en un nuevo matraz. Se añadió IL-2 humana recombinante a una concentración final de 4 ng/ml, y las células se incubaron durante 2-3 días más. A continuación, se recogieron los linfocitos Th1 polarizados y se lavaron 3 veces. El día de la preparación del ensayo, los linfocitos Th1 polarizados se resuspendieron en medio completo.

Se usaron los siguientes reactivos:

Dynabeads M-450 Epoxy	Dynal Biotech ASA	140,11
Tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 8,5	Teknova	0214-250
anti-hCD3, Clon UCHT-1, de calidad funcional	eBioscience	16-0038-85
anti-hCD28, Clon CD28.2, de calidad funcional	eBioscience	16-0289-85
IL-2 recombinante humana	PeproTech, Inc.	200-02
IL-12 recombinante humana	PeproTech, Inc.	200-12
anti-IL-4 humana	eBioscience	16-7048-85
DMEM de Iscove	Mediatech, Inc.	10-016-CM
Suero bovino fetal (termoinactivado)	Hyclone	SH30071.03

- 5 La estirpe celular CHO-OKT3 se cultivó en matraces agitadores y se irradió (67 000 RAD) durante 1 h 20 min; Rad Source Irradiator, RS-2000 Biological System) el día de la preparación del ensayo. Las células CHO-OKT3 irradiadas estimularon los linfocitos T y expusieron la fosfatidilserina (PS), como confirmó la tinción con Annexin V.

- 10 El TIM3.18.IgG1.3 o el control de isotipo se valoró a partir de 20 µg/ml mediante diluciones seriadas cuádruples, con cada condición establecida por triplicado. El Fab de TIM3.18.IgG1.3 se valoró a partir de 53 µg/ml también mediante dilución seriada cuádruple. El fragmento Fab de TIM3.18.IgG1.3 fue el mismo que el utilizado en el experimento de cristalografía (véanse los Ejemplos).

- 15 Los cultivos se establecieron en placas de 96 pocillos de fondo plano tratadas con TC (Costar) con 1×10^5 linfocitos Th1 polarizados y $2,5 \times 10^4$ células CHO-OKT3 irradiadas (relación CHO:linfocitos T de 1:4) en 200 µl de medio completo por pocillo en presencia de 0,1 µg/ml de anti-CD28 (clon CD28.2, BD Biosciences, n.º de catálogo 555725), y se incubaron durante 3 días a 37 °C y con un 5 % de CO₂. A continuación, las placas se sometieron a un pulso de 1 µCi de timidina tritiada (Perkin Elmer, n.º de catálogo NET027001MC) por pocillo durante 16 horas y, a continuación, las células se recogieron en placas de filtro (Perkin Elmer) para analizar la incorporación de la timidina tritiada con el fin de evaluar la proliferación.

- 20 Los resultados, que se muestran en las FIGS. 29A y 29B, indican que el anticuerpo anti-TIM3 TIM3.18.IgG1.3 aumentó la proliferación de los linfocitos Th1 de una manera dependiente de la dosis en el ensayo de cocultivo de células CHO-OKT3/Th1. La actividad global del TIM3.18.IgG1.3 es equivalente a la de su anticuerpo precursor, el 13A3 (isotipo IgG4) (FIG. 29A). El fragmento Fab de TIM3.18.IgG1.3 también mostró una inducción de la proliferación dependiente de la dosis (FIG. 29B) en el ensayo con células CHO-OKT3/Th1.

- 30 Por lo tanto, el TIM3.18.IgG1.3 (tanto completo como el Fab) potenció la actividad de los linfocitos Th1 de una manera dependiente de la dosis en cocultivo con células CHO-OKT3 irradiadas. La presencia de actividad con el fragmento Fab indicó que el TIM3.18.IgG1.3 funciona como un anticuerpo antagonista, y que la TIM-3 es un receptor inhibidor de la función de los linfocitos T. No se requirió reticulación del Fc para la actividad biológica del TIM3.18.IgG1.3.

Ejemplo 14: ensayo de proliferación de linfocitos Th1 con bloqueo conjunto de TIM 3 y PD 1

- 35 Este ensayo fue un cocultivo entre células irradiadas (crecimiento detenido; 67 000 RAD durante 1 h 20 min; Rad Source Irradiator, RS-2000 Biological System) CHO-OKT3 transfectadas con PD-L1 humano (CHO-OKT3-PD-L1), y linfocitos Th1 en una proporción CHO:linfocitos T de 1:4 en presencia de anti-CD28. La estirpe celular CHO-OKT3-PD-L1 se cultivó en matraces agitadores y se irradió el día de la preparación del ensayo. Los linfocitos Th1 polarizados se prepararon como se describe en los otros Ejemplos descritos en el presente documento. El día de la preparación del ensayo, los linfocitos Th1 polarizados se resuspendieron en medio completo.

- 40 El anticuerpo anti-PD-1 nivolumab se valoró a partir de 10 µg/ml mediante diluciones seriadas de 10 veces, con cada condición establecida por triplicado. El anticuerpo TIM-3 TIM3.18.IgG1.3 o el control del isotipo se añadieron a 20 µg/ml.

- 45 Los cultivos se establecieron en placas de 96 pocillos de fondo plano tratadas con TC (Costar) con 1×10^5 linfocitos Th1 y $2,5 \times 10^4$ células CHO-OKT3-PD-L1 en 200 µl de medio completo por pocillo [en presencia de 0,1 µg/ml de anti-CD28 (clon CD28.2, BD Biosciences, n.º de catálogo 555725), y se incubaron durante 3 días a 37 °C y con un 5 % de CO₂. A continuación, las placas se sometieron a un pulso de 1 µCi de timidina tritiada (Perkin Elmer, n.º de catálogo NET027001MC) por pocillo durante 16 horas y, a continuación, las células se recogieron en placas de filtro (Perkin Elmer) para analizar la incorporación de la timidina tritiada con el fin de evaluar la proliferación.

- 50 Los resultados, que se muestran en la FIG. 30, indican que el anticuerpo anti-PD-1 nivolumab aumentó la proliferación de los linfocitos T Th1 estimulados con células CHO-OKT3-PD-L1 de una manera dependiente de la dosis, y que la proliferación aumentó considerablemente junto con TIM3.18.IgG1.3. El bloqueo conjunto de las vías de TIM-3 y PD-1 mostró un efecto aditivo en este ensayo.

Ejemplo 15: ensayo de liberación de IFN- γ por parte de linfocitos infiltrantes de tumores con bloqueo de TIM3.18.IgG1.3

Para este ensayo se obtuvieron tejidos tumorales recientes de una muestra de carcinoma de células renales o de cáncer de mama humanos extirpados quirúrgicamente. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) se aislaron utilizando un kit de disociación enzimática (Miltenyi, catálogo 130-095-929). Los TIL se complementaron con 20 UI/ml de IL-2 (IL-2 humana recombinante, Peprotech, catálogo 200-02) y se cocultivaron con células irradiadas (crecimiento detenido; 67 000 RAD durante 1 h 20 min; Rad Source Irradiator, RS-2000 Biological System) CHO-OKT3 en una relación CHO:T de 1:6. La estirpe celular CHO-OKT3 se cultivó en matraces agitadores y se irradió el día de la preparación del ensayo.

El anticuerpo TIM-3 TIM3.18.IgG1.3 o el control del isotipo se valoró a partir de 20 μ g/ml mediante diluciones seriadas cuádruples, con cada condición establecida por triplicado. Los cultivos se establecieron en placas de 96 pocillos de fondo plano tratadas con TC (Costar) con $1,5 \times 10^5$ linfocitos T y $2,5 \times 10^4$ células CHO-OKT3 irradiadas en 200 μ l por pocillo en IMDM + 5 % de FBS y un 5 % de suero AB humano (Gemini, n.º de catálogo 100-512), y se incubaron durante 5 días a 37 °C y con un 5 % de CO₂. Se recogió el sobrenadante de cada muestra para la medición del IFN- γ mediante un ELISA (kit de ELISA BD Opteia hIFN- γ , BD, n.º de catálogo 555152).

Los resultados, que se muestran en la FIG. 31, para los TIL de carcinoma de células renales, y en la FIG. 32, para los TIL de cáncer de mama, indican que el TIM3.18.IgG1.3 aumentó la producción de IFN- γ de una manera dependiente de la dosis en el ensayo de cocultivo CHO-OKT3/TIL, con un aumento de hasta 4 veces con respecto a los controles negativos a las concentraciones más altas de TIM3.18.IgG1.3 en el ensayo de TIL de carcinoma de células renales.

Ejemplo 16: el TIM3.18.IgG1.3 promueve la secreción de IFN- γ en el ensayo de MLR alogénico M0:T

Los monocitos CD14+ aislados a partir de donantes sanos se diferenciaron al estadio M0 en un medio de cultivo que contenía M-CSF. Después del día 6 en el cultivo, una población significativa de macrófagos expresaba CD163+ y CD206+ en la superficie celular mediante tinción FACS, coherente con la firma de macrófagos supresores. Mediante una citometría de flujo con un anticuerpo anti-TIM-3, se demostró que la TIM-3 se expresaba en los macrófagos M0 (FIG. 33). A continuación, estos macrófagos M0 se irradiaron (5 000 RAD durante 7 min; Rad Source Irradiator, RS-2000 Biological System) y se cocultivaron con linfocitos T totales de un donante alogénico, y el día 6 después del cocultivo, las células mezcladas se pulsaron con ³H-timidina durante la noche para evaluar la proliferación de linfocitos T.

Los resultados, que se muestran en la FIG. 34, indican que el TIM3.18.IgG1.3 aumentó la proliferación de los linfocitos T en comparación con el control del isotipo.

Ejemplo 17: estructura cristalina del Fab de TIM3.18.IgG1.3 interactuando con la hTIM3

La región IgV de la hTIM3 se cocrystalizó con un fragmento Fab de TIM3.18 de la siguiente manera. Las secuencias utilizadas fueron las siguientes:

hTrm3_IgV:

NRNRHNSAALVLEFGPGSEVEYRAEVGQNAVLEPCFYTEAFGNLVPVCGKGGACPVFEQGNVVLRTDDEADVNYF
TSRYWLNGBERKGEVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLRKLVKPA (SEQ ID NO: 377; la
 secuencia de TIM3 está subrayada)

Tim3.18_Fab:

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIROPKGLWIGSIYYSGFTYYQPSLSRVTVISVDI
 SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDYAHWFEPWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRVEPKS
 CGGHHHHHHH (SEQ ID NO: 366)

Tim3.18_kappa:

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT
 ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
 ID NO: 29)

Expresión y purificación. Se expresó un dominio IgV de la hTim3 marcado con histidina en *E. coli* (BL21 DE3) con un

vector pET47b. La purificación y el repliegado se realizaron siguiendo el protocolo publicado para la mTim3 (DeKruyff *et al.* J. Immunology 2010). El Fab de Tim3.18 se expresó temporalmente en células HEK293 y se purificó mediante la etiqueta de His carboxiterminal de la cadena pesada.

- 5 Cristalización del complejo y determinación de la estructura. La estructura cristalina del dominio IgV de la hTim3 con el Fab de Tim3.18 se resolvió a 1,5 Å. En primer lugar, se cribó el complejo Fab:antígeno para determinar las condiciones de cristalización con varios tamices de Hampton Research, y se observaron agrupamientos de cristales en unas condiciones con PEG 3350 con un pH que variaba de 6,5 a 5,5. La condición del crecimiento cristalino se optimizó aún más para permitir el crecimiento de cristales individuales. Los cristales individuales se recolectaron con glicerol como crioprotector y se ultracongelaron en nitrógeno líquido. La recogida de datos se llevó a cabo en el IMCA-CAT en APS utilizando el detector Pilatus-6M. Las imágenes de difracción se procesaron con el programa informático Global Phasing, y se pusieron en fase utilizando un modelo del Fab de Tim3.18. Se realizaron múltiples rondas de refinamiento utilizando el paquete de programas informáticos CCP4, Coot, Phenix y Global Phasing.
- 10
- 15 El dominio IgV de la hTim3 resuelto coincide bien con el de la estructura publicada de la hTim3 (PDB: 5F71; worldwideweb.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=5F71), así como con la estructura de la mTim3 (PDB: 3KAA; worldwideweb.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3kaa; Rosemarie *et al.* (2010) J Immunol 184: 1918), que se resolvió en un complejo con PS. El bolsillo de unión de la PS en la hTim3 se dedujo a partir de estas alineaciones estructurales. Adicionalmente, la ubicación del bolsillo de unión a la PS está conservada entre los miembros de TIM en seres humanos y ratones (Freeman *et al.* (2010) Immunol Rev. 235: 172).
- 20

Los restos de contacto para TIM3.18 en la proteína hTim3 se identificaron calculando la diferencia en la superficie accesible entre la estructura cristalina del Fab de hTIM3:TIM3.18 y la estructura de la hTIM3 sola ("método de enterramiento en superficie"). Los restos de la hTIM3 que muestran una superficie enterrada después de la formación del complejo con el Fab de TIM3.18 se definieron como parte de los restos de contacto. La superficie accesible por el disolvente de una proteína se definió como el lugar del centro de una esfera de sonda (que representa una molécula de disolvente de 1,4 Å de radio) cuando rueda sobre la superficie de Van der Waals de la proteína. La superficie accesible por el disolvente se calculó generando puntos de superficie en una esfera extendida alrededor de cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma de los radios del átomo y de la sonda), y eliminando aquellos que se encontraban dentro de esferas equivalentes asociadas con átomos vecinos, tal y como se implementó en el programa AREAIMOL (http://www.ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter38/03_surfarea.html).

25

30

Los resultados, que se muestran en las FIGS. 35 y 36, establecen que los siguientes aminoácidos son restos de contacto, como se identificó mediante el método de enterramiento en la superficie descrito anteriormente: P29, V30, C31, P38, V39, F40, E41, C42, G43, N44, V45, V46, L47, R48, T49, D50, E51, D53, R90, Q92, G95, I96, M97, D99 (numeración según la SEQ ID NO: 290, que es el dominio extracelular maduro de la hTIM3) o P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, T70, D71, E72, D74, R111, Q113, G116, I117, M118, D120 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20), que es la hTIM3 con un péptido de señalización). Estos resultados indican que los restos de contacto de TIM3.18.IgG1.3 en la TIM3 humana se solapan con el bolsillo de unión de la PS de la TIM3 humana. Específicamente, la CDR2 de la cadena pesada de TIM3.18 ocupa el bolsillo de unión de la PS. La CDR1 y la CDR3 de la cadena pesada establecen contactos adicionales con los bucles de unión de la PS. Los datos estructurales aquí generados confirman los resultados obtenidos en el ensayo de bloqueo de la PS (véanse los Ejemplos).

35

40

Los resultados de la cristalografía muestran también que los siguientes restos de aminoácidos de la hTIM3 tienen un átomo que está situado dentro de 5 Å de un átomo de un resto de aminoácido (el "método de la distancia de 5 Å") del Fab de TIM3.18: P29, V30, C31, P38, V39, F40, E41, C42, G43, N44, V45, V46, L47, R48, D50, E51, D53, R90, I91, Q92, G95, I96, M97, D99 (numeración según la SEQ ID NO: 290, que es el dominio extracelular maduro de la hTIM3) o P50, V51, C52, P59, V60, F61, E62, C63, G64, N65, V66, V67, L68, R69, D71, E72, D74, R111, I112, Q113, G116, I117, M118, D120 (numeración según la SEQ ID NO: 286 (FIG. 20), que es la hTIM3 con un péptido de señalización). Los restos de interacción específicos entre el Fab y la proteína hTIM3 se exponen en la Tabla 3.

45

50

Tabla 3. Listado de restos de la TIM3 humana que interactúan con restos Fab

<u>Tim3</u>	<u>Anticuerpo Tim3.18</u>			
<u>resto</u>	<u>cadena ligera/pesada</u>	<u>n.º de resto</u>	<u>tipo de resto</u>	
29(PRO)	H/	56	(SER)	
	H/	57	(GLY)	
	H/	58	(PHE)	

ES 3 005 961 T3

(continuación)

<u>Tim3</u>		<u>Anticuerpo Tim3.18</u>		
<u>resto</u>		<u>cadena ligera/pesada</u>	<u>n.º de resto</u>	<u>tipo de resto</u>
30(VAL)		H/	56	(SER)
		H/	58	(PHE)
31(CYS)		H/	58	(PHE)
		H/	55	(TYR)
38(PRO)		H/	106	(TYR)
39(VAL)		H/	60	(TYR)
		H/	106	(TYR)
		L/	92	(TYR)
		L/	93	(GLY)
		L/	94	(SER)
		L/	95	(SER)
40(PHE)		H/	49	(TRP)
		H/	54	(TYR)
		H/	60	(TYR)
		H/	106	(TYR)
		H/	108	(HIS)
		L/	95	(SER)
		L/	97	(ILE)
41(GLU)		H/	54	(TYR)
		H/	55	(TYR)
		H/	56	(SER)
		H/	58	(PHE)
		H/	60	(TYR)
		H/	103	(TYR)
42(CYS)		H/	103	(TYR)
		H/	104	(GLY)
43(GLY)		H/	103	(TYR)
		H/	104	(GLY)

ES 3 005 961 T3

(continuación)

<u>Tim3</u>		<u>Anticuerpo Tim3.18</u>		
<u>resto</u>		<u>cadena ligera/pesada</u>	<u>n.º de resto</u>	<u>tipo de resto</u>
		H/	105	(ASP)
		H/	106	(TYR)
44(ASN)		H/	103	(TYR)
		H/	104	(GLY)
		H/	105	(ASP)
45(VAL)		H/	32	(ARG)
		H/	33	(SER)
		H/	55	(TYR)
		H/	103	(TYR)
		H/	104	(GLY)
46(VAL)		H/	32	(ARG)
47(LEU)		H/	32	(ARG)
		H/	55	(TYR)
48(ARG)		H/	30	(SER)
		H/	31	(SER)
		H/	32	(ARG)
		H/	55	(TYR)
50(ASP)		H/	55	(TYR)
		H/	56	(SER)
51(GLU)		H/	30	(SER)
53(ASP)		H/	32	(ARG)
90(ARG)		H/	58	(PHE)
		H/	60	(TYR)
91(ILE)		H/	58	(PHE)
92(GLN)		H/	57	(GLY)

(continuación)

<u>Tim3</u>		<u>Anticuerpo Tim3.18</u>		
<u>resto</u>		<u>cadena ligera/pesada</u>	<u>n.º de resto</u>	<u>tipo de resto</u>
		H/	58	(PHE)
		H/	59	(THR)
		H/	60	(TYR)
95(GLY)		H/	66	(LYS)
96(ILE)		H/	66	(LYS)
97(MET)		H/	66	(LYS)
99(ASP)		H/	58	(PHE)
		H/	60	(TYR)

Una comparación de los restos de aminoácidos identificados por ambos métodos muestra que los restos son esencialmente los mismos, excepto por el resto T49, que se identifica únicamente mediante el método de enterramiento en superficie, y el resto I91, que se identifica únicamente por el "método de la distancia de 5 Å".

5

Ejemplo 18: características adicionales del TIM3.18.IgG1.3

Las características biofísicas del TIM3.18.IgG1.3 expresado en células CHO se proporcionan en la Tabla 4.

10

Tabla 4: características biofísicas del TIM3.18.IgG1.3

Propiedad	Método	Resultados
Identidad	Mapa peptídico mediante CL-EM/EM	PM desglucosilado = 145 619 Da (como se predijo) HC desglucosilada, reducida y alquilada = 50 068 Da LC aglicosilada, reducida y alquilada = 23 683 Da
Pureza/Homogeneidad	CE-SDS	>99 % de la secuencia y la estructura de disulfuro confirmada por cartografiado peptídico y espectrometría de masas 95,1 % monómero, las impurezas incluyen un 2,9 % de HHL, 0,9 % de HL, 0,5 % de HH, 0,6 % de LC; Cadena pesada no glicosilada 2,1 %
	SEC	98,5 % de monómero
	SE-MALS	99,94 % (150 kDa), 0,06 % (322 kDa)
	HIC-HPLC	92 % de pico principal, 1 % antes del pico principal, 7 % después del pico principal
	CE (glicanos)	G0F (79,3 %), G1F (12,2 %), G2F (0,7 %), Man5 (6,8 %), G0 (0,9 %).
	cIEF	pI del pico principal = 8,6, intervalo de pI 8,17-8,66
Modificaciones químicas	Mapa peptídico mediante CL-EM/EM	Muy baja
Estabilidad térmica y reversibilidad	DSC (diluido en tampón de conservación)	Tm1 = 68,1 °C, Tm2 = 80,3 °C, Tm3 = 82,6 °C Reversibilidad a 74 °C = 96 %, a 80 °C = 26 %

Se confirmó un único sitio de N-glicosilación en la N297 de la cadena pesada, con un perfil de glicanos que es coherente con el perfil de glicanos de los anticuerpos monoclonales de IgG1 expresados en CHO. TIM3. EI 18.IgG1.3

no se une a CD16, CD32 o CD64, lo que sugiere que es inerte a cualquier función efectora mediada por Fc-FcR. El TIM3.18.IgG1.3 tiene una buena estabilidad térmica ($T_{m1} = 68,1^{\circ}\text{C}$, $T_{m2} = 80,3^{\circ}\text{C}$, $T_{m3} = 82,6^{\circ}\text{C}$) y reversibilidad térmica (95,6 % a 74°C , 25,5 % a 80°C), lo que sugiere que la molécula conserva su integridad estructural bajo estrés térmico y tiene unas propiedades de repliegamiento robustas cuando se libera el estrés.

Las características de estabilidad del TIM3.18.IgG1.3 se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5: estabilidad del TIM3.18.IG1.3

Propiedad	Métodos(s)	Resultados
Congelación/descongelación (1 h a -80°C , 1 h a la t.a. $\times 6$)	UV, SEC	No se revela ningún riesgo de estabilidad frente a la congelación/descongelación
Perfil de solubilidad/concentración	UV, SEC	Al menos 60 mg/ml
estabilidad en condiciones de envejecimiento acelerado 50 mg/ml 12 sem a 4°C , 25°C y 40°C en la formulación del planteamiento	SEC, DLS, HIC, cIEF, cartografiado peptídico mediante CL-EM/EM	12 sem a $40^{\circ}\text{C} = 2\%$ /mes de aumento de las LMW 12 sem a $40^{\circ}\text{C} < 1\%$ de aumento de las HMW 12 sem a $40^{\circ}\text{C} = 18\%$ /mes de aumento en las variantes ácidas

No se observaron problemas de estabilidad física durante el estrés de congelación-descongelación (6 ciclos) a 50 mg/ml. Se establecieron estudios de degradación forzada con 50 mg/ml a 4, 25 y 40°C . No se observaron modificaciones químicas en la región CDR durante 12 semanas en ninguna de las condiciones ensayadas.

El riesgo potencial de inmunogenicidad del TIM3.18.IgG1.3 se evaluó mediante métodos *in silico*. El análisis iDAB *in silico* del TIM3.18.IgG1.3 mostró pocas secuencias potenciales de unión al HLA en las CDR de este AcM, lo que indica un bajo riesgo de inducir una respuesta inmunitaria humana.

Ejemplo 19: FC/FD del TIM3.18.IgG1.3 en monos

En un estudio de FC/FD de dosis única y tolerabilidad, todos los monos fueron inmunizados por vía intramuscular con 2,5 mg de hemocianina lapa californiana (KLH) y vectores recombinantes no proliferativos de adenovirus-5 (Ad5) que expresaban las proteínas Nef y Gag del virus de la inmunodeficiencia simica (VIS) (3×10^9 de cada vector). Después de la inmunización, a los monos se les administró el TIM3.18.IgG1.3 por vía intravenosa a unas dosis de 0 (vehículo), 0,5, 10 o 25 mg/kg ($N = 3$ /grupo; de sexo mixto). Se recogieron muestras de suero durante un máximo de 42 días para evaluar la farmacocinética (FC) y los anticuerpos antifármaco (ADA), y muestras de sangre durante un máximo de 42 días para evaluar la ocupación de los receptores. Se reservaron muestras de suero adicionales para otros criterios de valoración exploratorios, incluidos los niveles de TIM-3 soluble.

El $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ fue proporcional a la dosis de 0,5 a 25 mg/kg. El TIM3.18.IgG1.3 mostró un $T_{1/2}$ de aproximadamente 2 semanas y un aclaramiento sérico total de 0,18 ml/h/kg. El volumen de distribución en el estado estacionario variaba entre 68 y 84 ml/kg, lo que sugiere que el TIM3.18.IgG1.3 reside predominantemente en el espacio extracelular (Tabla 6).

Tabla 6: parámetros farmacocinéticos del TIM3.18.IgG1.3 después de la administración i.v. en macacos cangrejeros

Estudio	Número de mono	Dosis (mg/kg)	AUC (0-INF) ($\mu\text{M} \times \text{h}$)	$T_{1/2}$ (h)	CLT (ml/h/kg)	V_{ee} (ml/kg)
	3	0,5	NC	NC	NC	NC
DT16095	3	10	$358 \pm 90^*$	337 ± 91	$0,19 \pm 0,047$	$84 \pm 3,8$
	3	25	1076 ± 324	321 ± 104	$0,17 \pm 0,053$	$68 \pm 7,4$

* El AUC extrapolada superó el valor de corte del 20 % y variaba entre el 21 % y el 55 %.

Tomando como base la FC en macacos cangrejeros y con un escalado alométrico, el aclaramiento sérico total humano previsto es de 0,10 ml/h/kg y el V_{ee} de 88 ml/kg. Como resultado, la semivida humana prevista es de aproximadamente 26 días.

Ejemplo 20: ensayo preliminar de liberación de citocinas

Para determinar si el tratamiento con TIM3.18.IgG1.3 supone un riesgo de síndrome de liberación de citocinas, se incubó sangre completa de 16 donantes humanos con 20 $\mu\text{g/ml}$ del TIM3.18.IgG1.3 o controles positivos en solución.

Se analizó un panel de 75 citocinas y quimiocinas séricas de cada donante. No se observaron indicios de una mayor liberación de citocinas o quimiocinas derivadas de los linfocitos T, lo que sugiere un bajo riesgo de síndrome de liberación de citocinas. En el análisis de la sangre completa de algunos donantes, se produjo una elevación de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α y G-CSF, coherente con las pruebas presentadas anteriormente de que el bloqueo de la TIM-3
5 aumenta la producción de citocinas derivadas de monocitos o macrófagos.

Ejemplo 21: el TIM3.18.IgG 1.3 no provoca la regulación por disminución ni la internalización del receptor

10 Para determinar si 13A3 regula por disminución o internaliza la TIM3 humana en la membrana celular cuando se une a la misma, se realizó el estudio de inactivación de la fluorescencia mostrado en la FIG. 37. Los resultados después de un tratamiento de 3 horas, que se muestran en la FIG. 38, indican que ni el anticuerpo 13A3 ni las variantes D101E o N60Q provocaron una acumulación dependiente de la dosis del anticuerpo TIM3 intracelular en linfocitos T CD8+ activados de donantes, lo que sugiere que el anticuerpo no es internalizado.

15 Para determinar la posible regulación por disminución, se incubaron linfocitos T CD8+ activados de donantes durante 2 horas en presencia de diferentes cantidades de 13A3, 13A3.D101.Ig1.1f, 13A3.D101E/N60Q.IgG1.1f o un anticuerpo de control o sin anticuerpo, y se determinó la cantidad de TIM3 en la superficie celular. Los resultados indicaron que la incubación con los anticuerpos anti-TIM3 no reguló por disminución la TIM3 en la superficie celular.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, que se une a la TIM3 humana, que comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 41, una CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 122, y una CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 126, y una CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 64, una CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 66 y una CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 68.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL), en donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 364 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 60.
3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en una IgG1, una IgG2, una IgG3, una IgG4, y una variante de las mismas.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende el Fc de una IgG1 sin efector.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 349 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 351 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 353 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.
8. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 350 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.
9. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 352 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.
10. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 354 y/o la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29.
11. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11.
13. Una célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 12.
14. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.
15. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 14, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino/cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de células germinativas, cáncer óseo, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de piel, neoplasia del sistema nervioso central, linfoma, leucemia, mieloma, sarcoma y cáncer relacionado con virus.
16. El anticuerpo para el uso de las reivindicaciones 14 o 15, en donde el anticuerpo es adecuado para su administración con uno o más fármacos adicionales.
17. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 16, en donde el uno o más fármacos adicionales son un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-LAG-3, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-GITR o un anticuerpo anti-PD-L1.

FIG. 1A

Anti-TIM-3 13A3 VH1

Segmento V: 4-39

Segmento D: 4-17

Segmento J: JH5b

1	Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T	
	CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC	
		CDR1
52	L S L T C T V S G G S I S S R S Y	
	CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC AGT AGA AGT TAC	
103	Y W G W I R Q P P G K G L E W I G	
	TAC TGG GGC TGG ATC CCG CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG	
		CDR2
154	S I Y Y S G F T Y Y N P S L K S R	
	AGT ATC TAT TAT AGT GGG TTC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA	
205	V T I S V D T S K N Q F S L K L S	
	GTC ACC ATA TCC GTT GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC	
		CDR3
256	S V T A A D T A V Y Y C A T G G P	
	TCT GTG ACC GCC GCA GAC ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG ACA GGG GGG CCC	
307	Y G D Y A H W F D P W G Q G T L V	
	TAC GGT GAC TAC GCC CAC TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC	
358	T V S S	
	ACC GTC TCC TCA	

FIG. 1B

Anti-TIM-3 13A3 VK1

Segmento V: A27

Segmento J: JK5

1	E I V L T Q S P G T L S L S P G E
	GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA
	CDR1
52	R A T L S C R A S Q S V S S S Y L
	AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA
	CDR2
103	A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G
	GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCF GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT
	CDR2
154	A S S R A T G I P D R F S G S G S
	GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT
205	G T D F T L T I S R L E P E D F A
	GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA
	CDR3
256	V Y Y C Q Q Y G S S P I T F G Q G
	GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG
307	T R L E I K
	ACA CGA CTG GAG ATT AAA

FIG. 1C

13A3 _NT_VH1

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAG
TCGGGCCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGT
AGAAGTTACTACTGCGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGT
GGGTTCACTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCC
CTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGACAGGGGGGCCCTACGGTGACTAC
CCCCACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGTCTCCTCA

13A3 _AA_VH1

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS
GFTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDYAHWFDPWGQGTLLTVSS

13A3 _NT_VK1

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGAGAAATTGTGTTGACG
CAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTCTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTETTAGC
AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTG
GAGATTAAA

13A3 _AA_VK1

METPAQLLFLLLLWLPTDTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIFDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTPFGQGTREIK

FIG. 2A

Anti-TIM-3 8B9 VH1

Segmento V: 4-59

Segmento D: 4-17

Segmento J: JH6b

1	Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T
	CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC
	CDR1
52	L S L T C T V S G G S I S R H Y W
	CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGT CGT CAC TAC TGG
	CDR2
103	N W I R Q P P G K G L E W I G Y I
	AAC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG TAT ATC
154	H Y S G S T N Y N S S L K S R V T
	CAT TAC AGT GGA AGC ACC AAC TAC AAT TCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC
205	I S V D T S K N Q F S L K L S S V
	ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG
	CDR3
256	T A A D T A V Y Y C A R D T G Y Y
	ACC GCT GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACT GGG TAC TAC
307	G M D I W G Q G T T V T V S S
	GGT ATG GAC ATC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 2B

Anti-TIM-3 8B9 VK1 (hKappa)

Segmento V: A27

Segmento J: JK4

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      CDR1
      R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L
52     AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GPT AGC AGC AGC TAC TTA

      A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103    GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

      CDR2
      A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
154    GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

      G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205    GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

      CDR3
      V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   L   T   F   G   G   G
256    GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG

      T   K   V   E   I   K
307    ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

FIG. 2C

8B9 _NT_VH1

ATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG
TCCGGCCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCSSAGACCCCTSTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTCGT
CACTACTGGAACTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCCATTACAGTGGAAGC
ACCAACTACAAATTCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAG
CTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACSSCCGTGTATTAAGTGTGCGAGAGATACTGGGTACTACGGTATGGACATC
TGGGGCCCAAGGGACCAUGGTCACCGTCTCCTCA

8B9 _AA_VH1

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPESETLSLTCTVSGGSI SRHYWNWIRQPPGKLEWIGYIHYSGS
TNYNSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDTGYYGMDIWGQGTITVTVSS

8B9 _NT_VK1

ATGGAAACCCCGAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACG
CAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGC
AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATGGTAGCTCACCTCTCACTTTTCGG
CGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

8B9 _AA_VK1

METPAQLLLFLLLLLWLPDFTTGEIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGFDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK

FIG. 3A

Anti-TIM-3 8C4 VH1

Segmento V: 4-59

Segmento D: 4-17

Segmento J: JH6b

1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	
	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	
52	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	<u>CDR1</u>				
	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGT	CGT	TAC	TAC	TGG	
103	S	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	<u>CDR2</u>		
	AGC	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	TAT	ATC	
154	H	Y	T	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	
	CAT	TAC	ACT	GGG	AGC	ACC	AAC	TAC	AAC	CCC	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	
205	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	
	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	
256	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	<u>CDR3</u>					
	ACC	GCA	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	ACA	GAT	ACG	GGC	TAC		
307	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S		
	TAC	GGT	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA		

FIG. 3B

Anti-TIM-3 8C4 VK1

Segmento V: A27

Segmento J: JK4

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      CDR1
      R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L
52   AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA

      A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103  GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

      CDR2
      A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
154  GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

      G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205  GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

      CDR3
      V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   L   T   F   G   G   G
256  GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG

      T   K   V   E   I   K
307  ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

FIG. 3C

8C4_NT_VH1

ATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG
TCGGGCCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTCGT
TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGSTATATCCATTACACTGGGAGC
ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAG
CTGAGCTCTGTGACCGCAGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGACAGATACGGGCTACTACGGTATGGACGTC
TGGGCGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

8C4_AA_VH1

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISRYYSWIRQPPGKLEWIGYIHYTGS
TNYNPSLKSRVTISVPTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCATDTGYYGMDVWGQGTFVTVSS

8C4_NT_VK1

ATGGAAACCCCAAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACG
CAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGC
AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTG
GAGATCAAA

8C4_AA_VK1

METPAQLLFLLLLWLDPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAFRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK

FIG. 4A

Anti-TIM-3 17C3 VH1

Segmento V: 1-46

Segmento D: 3-10

Segmento J: JH6b

1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
	CAG GTG CAG TTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA
	V K V S C K A S G Y T F T <u>CDR1</u>
52	GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACT TTC ACC AGC TAC TAT ATG
	<u>H W V R Q A P G Q G L E W M G</u> <u>CDR2</u>
103	CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA ATA ATC
	N P R G D S I I Y A Q K F Q G R V
154	AAC CCT AGG GGT GAT AGC ATA ATC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC
	T M T R D T S T S T V Y M E L S S
205	ACC ATG ACC AGG GAC ACG TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGC AGC
	L R S E D T A V Y Y C A R <u>CDR3</u>
256	CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TTC TAT GGT
	S G N Y Y Y G M D V W G Q G T T V
307	TCG GGA AAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC
	T V S S
358	ACC GTC TCC TCA

FIG. 4B

Anti-TIM-3 17C3 VK1

Segmento V: A27

Segmento J: JK5

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      CDR1
      R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L
52   AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA

      A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103  GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

      CDR2
      A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
154  GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

      G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205  GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

      CDR3
      V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   I   T   F   G   Q   G
256  GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG

      T   R   L   E   I   K
307  ACA CGA CTG GAG ATT AAA

```

FIG. 4C

17C3__NT__VH1

ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCTCCAGGTGCTCACTCCCAGGTGCAGTTGGTGCAG
TCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCATCTGGATACACTTTACCAGC
TACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGGGGTGAT
AGCATAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATG
GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTTCTATGGTTCGGGAAACTAC
TACTACGGTATGGACCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

17C3__AA__VH1

MDWTWRVFCLLAVAPGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPRGD
SIIYAQKFKQGRVTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDFAVYYCARDYFGSGNYYYGMDVWGQGTITVTVSS

17C3__NT__VK1

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACG
CAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGC
AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGAATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCAGTACACCTTCGGCCAAGGGACACGACTG
GAGATTAAA

17C3__AA__VK1

METPAQLLFLLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPKGQAFRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTREIK

FIG. 5A

Anti-TIM-3 9F6 VH1

Segmento V: 3-11

Segmento D: 6-19

Segmento J: JH6b

1	Q V Q L V E S G G G L V K P G G S	
	CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC AAG CCT GGA GGG TCC	
		CDR1
52	L R L S C A A S G F T F S D Y Y M	
	CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAC TAC ATG	
		CDR2
103	S W I R Q A P G K G L E W V S F I	
	AGC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TTC ATT	
154	S G G G S T I Y Y A D S V K G R F	
	AGT GGT GGT GGT AGT ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC	
205	T I S R D N A K N S L F L Q M N S	
	ACC ATC TCC AGG GAC AAC GCC AAG AAC TCG CTG TTT CTG CAA ATG AAC AGC	
		CDR3
256	L R V E D T A V Y Y C A R D G Y S	
	CTG AGA GTC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGC TAT AGC	
307	S G W Y Y Y G M D V W G Q G T A V	
	AGT GGC TGG TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC GCG GTC	
358	T V S S	
	ACC GTC TCC TCA	

FIG. 5B

Anti-TIM-3 9F6 VK1

Segmento V: L18

Segmento J: JK1

1	A I Q L T Q S P S S L S A S V G D
	GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC
	_____CDR1_____
52	R V T I T C R A S Q G I S S A L A
	AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC
	_____CDR2_____
103	W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A
	TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

154	S S L E S G V P S R F S G S G S G
	TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG
205	T D F T L T I S S L Q P E D F A T
	ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT
	_____CDR3_____
256	Y Y C Q Q F N S Y P R T F G Q G T
	TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC
307	K V E I K
	AAG GTG GAA ATC AAA

FIG. 5C

Anti-TIM-3 9F6 VK2

Segmento V: A27

Segmento J: JK4

1	E I V L T Q S P G T L S L S P G E
	GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA
	CDR1
52	R A T L S C R A S Q S V S S S Y L
	AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA
103	A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G
	GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT
	CDR2
154	A S S R A T G I P D R F S G S G S
	GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT
205	G T D F T L T I S R L E P E D F A
	GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA
	CDR3
256	V Y Y C Q Q Y G S S L T F G G G T
	GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC
307	K V E I K
	AAG GTG GAG ATC AAA

FIG. 5D

Anti-TIM-3 9F6 VK3

Segmento V: A27

Segmento J: JK4

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      CDR1
      R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L
52   AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA

      A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103  GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

      CDR2
      A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
154  GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

      G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205  GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

      CDR3
      V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   L   T   F   G   G   G
256  GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG

      T   K   V   E   I   K
307  ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

FIG. 5E

9F6_NT_VH1

TGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTATAAAAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGT
 CTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACT
 ACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTTCATTAGTGGTGGTGGTAGTA
 CCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCGCTGTTTCTGC
 AAATGAACAGCCTGAGASTCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGATGGCTATAGCAGTGGCTGGTACT
 ACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCGCGGTACCCGTCTCCTCA

9F6_AA_VH1

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYMSWIRQAPGKGLEWVSFISGGGS
 TIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRVEDTAVYYCARDGYSSGWYYYGMDVWGQGTAVTVSS

9F6_NT_VK1

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAG
 TTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGASTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGC
 ATTAGCAGTGCCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGT
 TTGGAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG
 CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCTTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAG
 GTGGAAATCAAA

9F6_AA_VK1

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAFKLLIYDASS
 LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPRTFGQGTKVEIK

9F6_NT_VK2

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACG
 CAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGC
 AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
 GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCCTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGATTTTGCACTGTATTACTGTGACAGATATGGTAGCTCACTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG
 ATCAAA

9F6_AA_VK2

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
 ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTLTFGGGTKVEIK

9F6_NT_VK3

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACG
 CAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGC
 AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
 GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCCTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGATTTTGCACTGTATTACTGTGACAGATATGGTAGCTCACCGCTCACTTTTCGG
 CGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

9F6_AA_VK3

METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
 ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTLTFGGGTKVEIK

FIG. 6A

Anti-TIM-3 3G4 VH1

Segmento V: 3-11

Segmento D: 6-13

Segmento J: JH6b

1	Q V Q L V E S G G G L V K P G G S	
	CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC AAG CCT GGA GGG TCC	
		CDR1
52	L R L S C A A S G F T F S D Y Y M	
	CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAC TAC ATG	
		CDR2
103	S W I R Q A P G K G L E W V S F I	
	AGC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TTC ATT	
154	S T S G S I I Y Y A D S V K G R F	
	AGT ACT AGT GGT AGT ATC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC	
205	T I S R D N A K N S L Y L Q M N S	
	ACC ATC TCC AGG GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC	
		CDR3
256	L R A E D T A V Y Y C A R E G Y S	
	CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA GGG TAT AGC	
307	S S W S Y Y Y G M D V W G Q G T T	
	AGC AGC TGG TCC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG	
358	V T V S S	
	GTC ACC GTC TCC TCA	

FIG. 6B

Anti-TIM-3 3G4 VK1

Segmento V: A27

Segmento J: JK5

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   F   G   E
1      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      CDR1
      R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L
52     AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA

      -----
      A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103    GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

      CDR2
      A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
154    GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

      G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205    GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

      CDR3
      V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   I   T   F   G   Q   G
256    GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG

      T   R   L   E   I   K
307    ACA CGA CTG GAG ATT AAA

```

FIG. 6C

3G4__NT__VH1

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTTGCTATTATAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAG
TCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGAC
TACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGTACTAGTGGTAGT
ATCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGGGTATAGCAGCAGCTGGTCC
TACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

3G4_AA_VH1

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYMSWIRQAPGKGLEWVSFLSTSGS
IIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGYSSWSYYYGMDVWGQGTTFVTVSS

3G4_NT_VK1

ATGGAAACCCACAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACG
CAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGC
AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGAFTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCAGTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTG
GAGATTAAA

3G4_AA_VK1

METPAQLLFLLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAFRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSPTTFGQGTREIK

FIG. 7A

Anti-TIM-3 17C8 VH1

Segmento V: 3-11

Segmento D: 6-19

Segmento J: JH6b

```

1      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  L  V  K  P  G  G  S
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC AAG CCT GGA GGG TCC

52      L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  CDR1
      CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAC TAC ATG

103     S  W  I  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  F  I
      AGC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TTC ATT

154     S  S  S  G  S  I  I  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F
      AGT AGT AGT GGT AGT ATC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

205     T  I  S  R  D  N  A  K  N  S  L  Y  L  Q  M  N  S
      ACC ATC TCC AGG GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256     L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  CDR3
      CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGG TAT AGC

307     S  G  W  E  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V
      AGT GGC TGG GAG TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC

358     T  V  S  S
      ACC GTC TCC TCA

```

FIG. 7B

Anti-TIM-3 17C8 VK1

Segmento V: A27

Segmento J: JK4

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      CDR1
      R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L
52   AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA

      A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103  GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

      CDR2
      A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
154  GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

      G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205  GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

      CDR3
      V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   L   T   F   G   G   G
256  GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG

      T   K   V   E   I   K
307  ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

FIG. 7C

17C8__NT__VH1

ATGGAGCTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTATAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAG
TCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGAC
TACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGTAGTAGTGGTAGT
ATCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGTATAGCACTGGCTGGGAG
TACTACGGTATGGACCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

17C8__AA__VH1

MEFGLSWVFLVAILKGVQCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSFLSSSGS
IIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYSSGWEYYGMDVWGQGTITVTVSS

17C8__NT__VK1

ATGGAAACCCACAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACG
CAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGC
AGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGAATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTG
GAGATCAAA

17C8__AA__VK1

METPAQLLFLLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAFRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK

FIG. 8A

Alineación de secuencias de las regiones variables de la cadena pesada

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
13A3	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS	SPSYWGNIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFT--			59
8B9	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS	--RHYWNIHQPPGKGLEWIGNIHYSGST--			57
8C4	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS	--RYYWNIHQPPGKGLEWIGNIHYTGST--			57
17C3	QVQLVQSCAEVKKPGASVKVSKASGYTFT	--SYMHNVHQAPGQGLEWMGLINPRGDSI			58
9F6	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSQAASGFTFS	--DYMSWIRQAPGKGLEWVSFISSGGSTI			58
3G4	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSQAASGFTFS	--DYMSWIRQAPGKGLEWVSFISSGSI			58
17C8	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSQAASGFTFS	--DYMSWIRQAPGKGLEWVSFISSGSI			58
	*: ** : ** : ** : : : * . ** : : :	: * : * : ** : ** : ** : : *			

	CDR2	FR3	CDR3	
13A3	YYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAT	-----GG-----PYGDIYAHWFDP		112
8B9	NYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARD	-----TC-----YYG-----MDI		106
8C4	NYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCATD	-----TG-----YYG-----MDV		106
17C3	IYAQKFQGRVTMTDRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARD	DFYGGSGNY-YYG-----MDV		112
9F6	YYADSVKGRFTISRDNAKNSFLQMNSLRVEDTAVYYCARD	DGYSSGWY-YYG-----MDV		112
3G4	YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPAEDTAVYYCA	REGYSSSWSYYYG-----MDV		113
17C8	YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPAEDTAVYYCA	DGYSSGWE-YYG-----MDV		112
	* * . * : : * : : : . * : *	*****	. ** : *	

	FR4	
13A3	WGQGT LTVVSS	123
8B9	WGQGT LTVVSS	117
8C4	WGQGT LTVVSS	117
17C3	WGQGT LTVVSS	123
9F6	WGQGT LTVVSS	123
3G4	WGQGT LTVVSS	124
17C8	WGQGT LTVVSS	123
	*****	*****

FIG. 8B

Designación de la secuencia de la región VH

SEQ ID NO:									
	VH	CDR1	CDR2	CDR3	Variantes de la VH				
13A3.	34	41	46	53	112 (N60Q)	113 (N60S)	114 (N60A)	115 (D101E)	116 (P102V)
					117 (P102Y)	118 (P102L)	119 (N60Q, P102Y)	364 (N60Q, D101E)	
8B9.	35	42	47	54	120 (S61P)				
8C4.	36	43	48	55					
17C3.	37	44	49	56					
9F6.	38	45	50	57	121 (A108T)				
3G4.	39	45	51	58					
17C8.	40	45	52	59					

FIG. 9A

Alineación de secuencias de las regiones variables de la cadena ligera

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
13A3	EIVLTQSPGTLSSLSPGEPATLS	CRASQSVSSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
17C3	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLS	CRASQSVSSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
3G4	EIVLTQSPGTLSSLSPGEPATLS	CRASQSVSSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
8B9	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLS	CRASQSVSSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
8C4	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLS	CRASQSVSSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
9F6_VK3	EIVLTQSPGTLSSLSPGEPATLS	CRASQSVSSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
17C8	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLS	CRASQSVSSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
9F6_VK2	EIVLTQSPGTLSSLSPGEPATLS	CRASQSVSSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP	60
9F6_VK1	AIQLTQSPSSLSASVGDRTIT	CRASQGISSA-	LA	WYQKPGKAPKLLIYDASSLES	59
	* *****,** * *;*,*:*:*****:**; *****;***;****,*** ;*;* *				
	FR3	CDR3	FR4		
13A3	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPITFGQ	GTRLEIK	108	
17C3	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPITFGQ	GTRLEIK	108	
3G4	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPITFGQ	GTRLEIK	108	
8B9	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPITFGG	GTKVEIK	108	
8C4	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPITFGG	GTKVEIK	108	
9F6_VK3	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPITFGG	GTKVEIK	108	
17C8	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPITFGG	GTKVEIK	108	
9F6_VK2	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSS-LTFGG	GTKVEIK	107	
9F6_VK1	SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDEATYYC	QQFNSYPPTFGQ	GTKVEIK	107	
	***** *;*****,*** .* *** **:***				

FIG. 9B

Designación de la secuencia de la cadena ligera

	SEQ ID NO:			
	VL	CDR1	CDR2	CDR3
13A3	60	64	66	68
8B9	61	64	66	69
8C4	61	64	66	69
17C3	60	64	66	68
9F6 (VK1)	62	65	67	70
9F6 (VK2)	63	64	66	71
9F6 (VK3)	61	64	66	69
3G4	60	64	66	68
17C8	61	64	66	69

FIG. 10

Alineación de secuencias de la cadena pesada de 13A3.IgG1.3f y sus variantes

TIM3.5	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>
TIM3.11	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>
TIM3.12	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>
TIM3.13	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>
TIM3.10	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>
TIM3.18	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>
TIM3.14	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>
TIM3.16	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>
TIM3.15	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>
TIM3.17	<u>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGFTY</u>

TIM3.5	<u>YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>
TIM3.11	<u>YSPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>
TIM3.12	<u>YAPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>
TIM3.13	<u>YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>
TIM3.10	<u>YQPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>
TIM3.18	<u>YQPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>
TIM3.14	<u>YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>
TIM3.16	<u>YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>
TIM3.15	<u>YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>
TIM3.17	<u>YQPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGGPYGDIYAHWFDPWGQGLT</u>

TIM3.5	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>
TIM3.11	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>
TIM3.12	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>
TIM3.13	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>
TIM3.10	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>
TIM3.18	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>
TIM3.14	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>
TIM3.16	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>
TIM3.15	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>
TIM3.17	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u>

TIM3.5	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>
TIM3.11	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>
TIM3.12	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>
TIM3.13	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>
TIM3.10	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>
TIM3.18	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>
TIM3.14	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>
TIM3.16	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>
TIM3.15	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>
TIM3.17	<u>QSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u>

TIM3.5	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>
TIM3.11	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>
TIM3.12	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>
TIM3.13	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>
TIM3.10	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>
TIM3.18	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>
TIM3.14	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>
TIM3.16	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>
TIM3.15	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>
TIM3.17	<u>EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u>

FIG. 10 (Cont.)

TIM3.5	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.11	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.12	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.13	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.10	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.18	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.14	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.16	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.15	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.17	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

TIM3.5	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.11	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.12	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.13	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.10	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.18	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.14	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.16	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.15	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.17	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

TIM3.5	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.11	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.12	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.13	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.10	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.18	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.14	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.16	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.15	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.17	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 11

Alineación de secuencias de la cadena pesada de 9F6.IgG1.3f y sus variantes (A108T)

9F6	<u>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS</u> CAASGFTFSDIYMSWIRQAPGKGLEWVSFISGGGSTIYY
TIM3.7	<u>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS</u> CAASGFTFSDIYMSWIRQAPGKGLEWVSFISGGGSTIYY

9F6	<u>ADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQ</u> MNSLRVEDTAVYYCARDGYSSGWYYYGMDVWGQGTAVT
TIM3.7	<u>ADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQ</u> MNSLRVEDTAVYYCARDGYSSGWYYYGMDVWGQGTAVT
	*****;
9F6	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
TIM3.7	<u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

9F6	<u>QSSGLYSLS</u> SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
TIM3.7	<u>QSSGLYSLS</u> SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA

9F6	<u>EGAPSVFELFPPKPKDTLMI</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREE
TIM3.7	<u>EGAPSVFELFPPKPKDTLMI</u> SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREE

9F6	<u>QYNSTYRPVVS</u> VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS
TIM3.7	<u>QYNSTYRPVVS</u> VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS

9F6	<u>REEMTKNQVSLTCLVKGF</u> YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
TIM3.7	<u>REEMTKNQVSLTCLVKGF</u> YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

9F6	<u>SRWQQGNVFSC</u> SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.7	<u>SRWQQGNVFSC</u> SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 12

Alineación de secuencias de la cadena pesada de 8B9.IgG1.3f y sus variantes (S61P)

8B9	<u>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSI SRHYWNWIRQPPGKGLEWIGYIHYSGSTNYN</u>
TIM3.8	<u>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSI SRHYWNWIRQPPGKGLEWIGYIHYSGSTNYN</u>

8B9	<u>SSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDTGYYGMDIWGQGTITVTVSSAST</u>
TIM3.8	<u>PSLKSFVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDTGYYGMDIWGQGTITVTVSSAST</u>
	.*****
8B9	KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
TIM3.8	KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

8B9	SLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSV
TIM3.8	SLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSV

8B9	FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTY
TIM3.8	FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTY

8B9	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
TIM3.8	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK

8B9	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
TIM3.8	NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG

8B9	NVFSCSVMHAEALHNHYTQKSLSLSPGK
TIM3.8	NVFSCSVMHAEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 13

N. del H. *	Nombre del Ac recomb.	Cadena pesada					Cadena ligera					Isotipo de la LC	
		HC	VH	CDR1	CDR2	CDR3	Isotipo de la HC	LC	VL	CDR1	CDR2		CDR3
13A3	-	301, 302	34	41	46	53	hIgG4	29	VK1	60	64	68	hKappa
-	TIM3.5-IgG1.1f	1, 8*					hIgG1.1f						
	13A3-IgG1.1f												
	13A3-IgG1.3f	15, 22					hIgG1.3f						
	13A3-IgG4P	303, 304					hIgG4						
	TIM3.10-IgG1.1f	72, 82	112		122		hIgG1.1f						
	(13A3 VH-N60Q)												
	TIM3.10-IgG1.3f	92, 102					hIgG1.3f						
	TIM3.10-IgG4P	305, 306					hIgG4P						
	TIM3.11-IgG1.1f	73, 83	113		123		hIgG1.1f						
	(13A3 VH-N60S)												
	TIM3.11-IgG1.3f	93, 103					hIgG1.3f						
	TIM3.11-IgG4P	307, 308					hIgG4P						
	TIM3.12-IgG1.1f	74, 84	114		124		hIgG1.1f						
	(13A3 VH-N60A)												
	TIM3.12-IgG1.3f	94, 104					hIgG1.3f						
	TIM3.12-IgG4P	309, 310					hIgG4P						
	TIM3.13-IgG1.1f	75, 85	115		46	126	hIgG1.1f						
	(13A3 VH-D101E)												
	TIM3.13-IgG1.3f	95, 105					hIgG1.3f						
	TIM3.13-IgG4P	311, 312					hIgG4P						
	TIM3.14-IgG1.1	76, 86	116			127	hIgG1.1f						
	(13A3 VH-P102V)												
	TIM3.14-IgG1.3f	96, 106					hIgG1.3f						
	TIM3.14-IgG4P	313, 314					hIgG4P						
	TIM3.15-IgG1.1f	77, 87	117			128	hIgG1.1f						
	(13A3 VH-P102Y)												
	TIM3.15-IgG1.3f	97, 107					hIgG1.3f						
	TIM3.15-IgG4P	315, 316					hIgG4P						
	TIM3.16-IgG1.1f	78, 88	118			129	hIgG1.1f						
	(13A3 VH-P102L)												
	TIM3.16-IgG1.3f	98, 108					hIgG1.3f						

FIG. 13 (Cont.)

N. del H. *	Nombre del Ac recomb.	Cadena pesada						Cadena ligera						
		VH			Isotipo de la HC			LC	VL			Isotipo de la LC		
		HC	VH	CDR1	CDR2	CDR3	VL		CDR1	CDR2	CDR3			
	TIM3.16-IgG4P	317, 318												
	TIM3.17-IgG1.1f (13A3 VH-N60Q, P102Y)	79, 89	119		122	128								
	TIM3.17-IgG1.3f	99, 109												
	TIM3.17-IgG4P	319, 320												
	TIM3.18-IgG1.1f (13A3-VH-N60Q, D101E)	349, 350	364			126								
	TIM3.18-IgG1.3f (13A3-VH-N60Q, D101E)	351, 352												
	TIM3.18-IgG4P (13A3-VH-N60Q, D101E)	353, 354												
8B9	-	321, 322	35	42	47	54		30	VK1	61			69	
	889-IgG1.1f	2, 9												
	889-IgG1.3f	16, 23												
	889-IgG4P	323, 324												
	TIM3.8-IgG1.1f (8B9 VH S61P)	80, 90	120		125									
	TIM3.8-IgG1.3f	100, 110												
	TIM3.8-IgG4P	325, 326												
	-	327, 328	36	43	48	55								
8C4	TIM3.6-IgG1.1f (8C4)	3, 10												
	TIM3.6-IgG1.3f	17, 24												
	TIM3.6-IgG4P	329, 330												
17C3	-	331, 332	37	44	49	56		29	VK1	60			68	

FIG. 13 (Cont.)

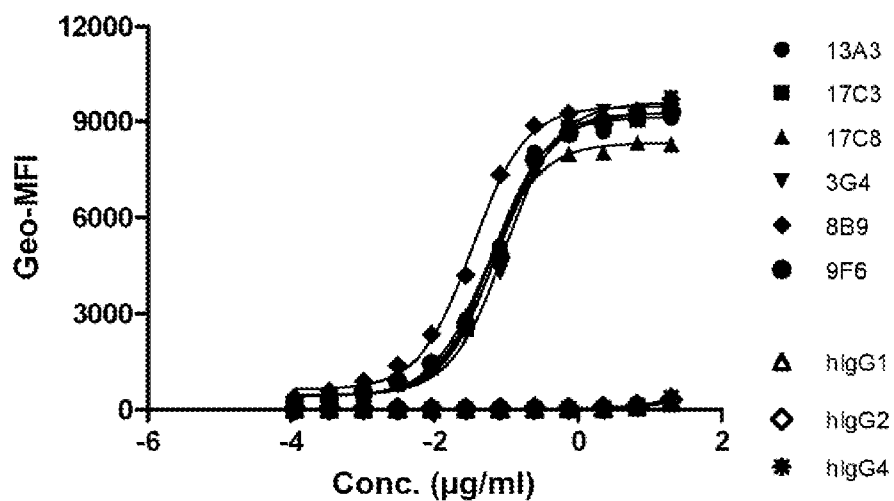
N. del H. *	Nombre del Ac recomb.	Cadena pesada					Cadena ligera					Isotipo de la LC	
		HC	VH			Isotipo de la HC	LC	VL					
			VH	CDR1	CDR2			CDR3	VL	CDR1	CDR2		CDR3
9F6	TIM3.2-IgG1.1f (17C3-IgG1.1f)	4,11					IgG1.1f						
	TIM3.2-IgG1.3f	18,25					IgG1.3f						
	TIM3.2-IgG4P	333, 334					IgG4P						
	-	335, 336	38	45	50	57	IgG1za	32	VK1	62	65	67	70
-	9F6-IgG1.1f	5,12					IgG1.1f						
	9F6-IgG1.3f	19,26					IgG1.3f	33	VK2	63	64	66	71
	9F6-Ig4P	337, 338					IgG4P	31	VK3	61		69	
	TIM3.7-IgG1.1f (9F6 VK2 VH-A108T)	81,91	121				IgG1.1f	33	VK2	63		71	
3G4	TIM3.7-IgG1.3f	101,111					IgG1.3f						
	TIM3.7-IgG4P	339, 340					IgG4P						
	-	341, 342	39		51	58	IgG1za	29	VK1	60		68	
	TIM3.4-IgG1.1f	6,13					IgG1.1f						
-	3G4-IgG1.1f						IgG1.1f						
	TIM3.4-IgG1.3f	20,27					IgG1.3f						
	TIM3.4-IgG4P	343, 344					IgG4P						

FIG. 13 (Cont.)

N. del H. *	Nombre del Ac recomb.	Cadena pesada						Cadena ligera					
		HC	VH	CDR1	CDR2	CDR3	Isotipo de la HC	LC	VL	CDR1	CDR2	CDR3	Isotipo de la LC
17C8	-	345, 346	40		52	59	IgG4	30	VK1			69	
-	TIM3.9-IgG1.1f (17C8)	7,14					IgG1.1f						
	TIM3.9-IgG1.3f	21,28					IgG1.3f						
	TIM3.9-IgG4P	347, 348					IgG4P						

FIG. 14A

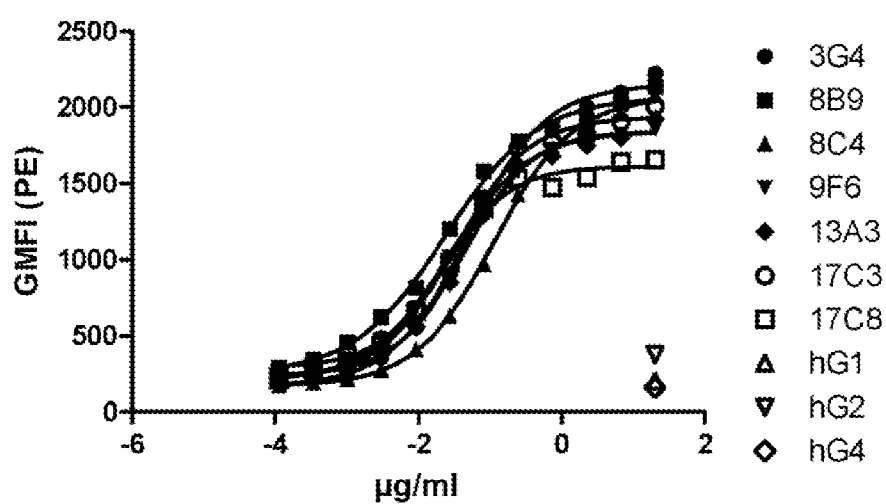
Unión de los anticuerpos anti-TIM-3 a un transfectante CHO-huTIM3



	CE ₅₀
13A3	0,06358
17C3	0,07208
17C8	0,05160
3G4	0,09602
8B9	0,03371
9F6	0,07401
hIgG1	39740
hIgG2	42256
hIgG4	29319

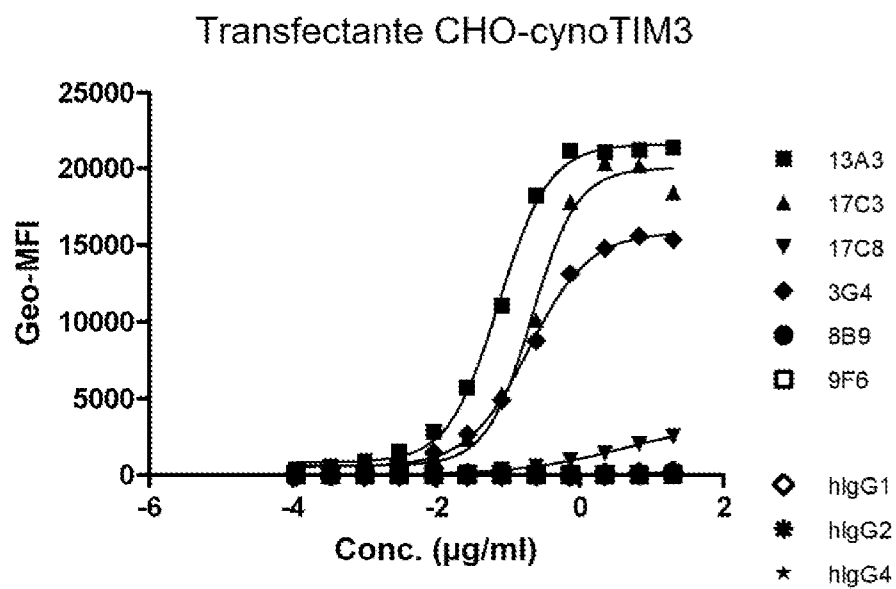
FIG. 14B

Unión de los anti-TIM-3 a linfocitos T humanos activados



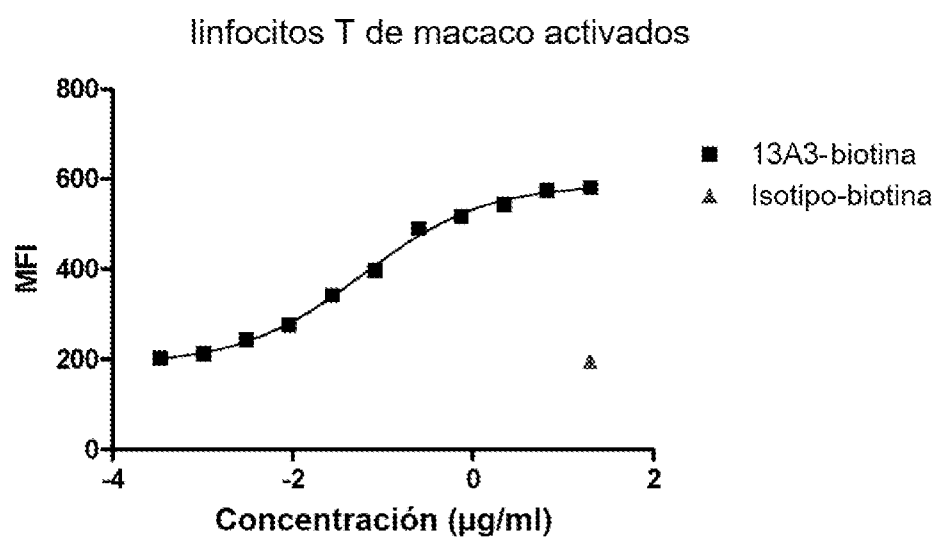
	CE ₅₀
3G4	0,05043
8B9	0,02392
8C4	0,1149
9F6	0,02660
13A3	0,04274
17C3	0,03621
17C8	0,02083

FIG. 15A



	CE ₅₀
13A3	0,07486
17C3	0,2159
17C8	4,709
3G4	0,1952
8B9	~ 2,532
9F6	~ 7,465
hlgG1	75731
hlgG2	44504
hlgG4	54134

FIG. 15B



	13A3-biotina
CE ₆₀	0,06018

FIG. 16

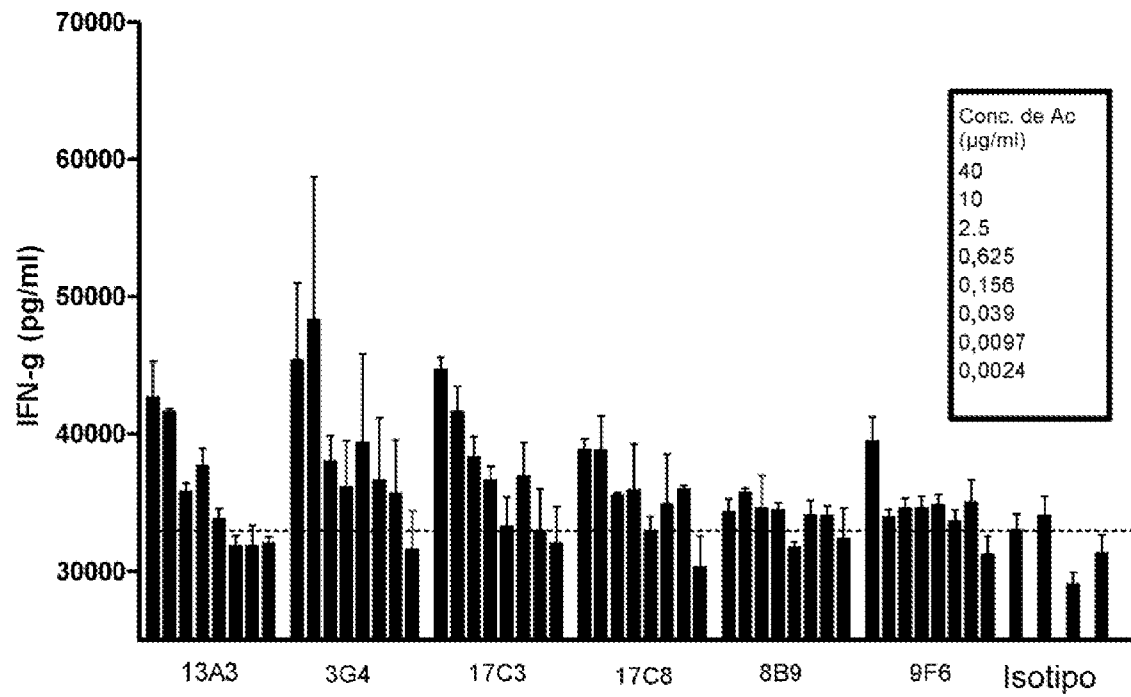


FIG. 17A

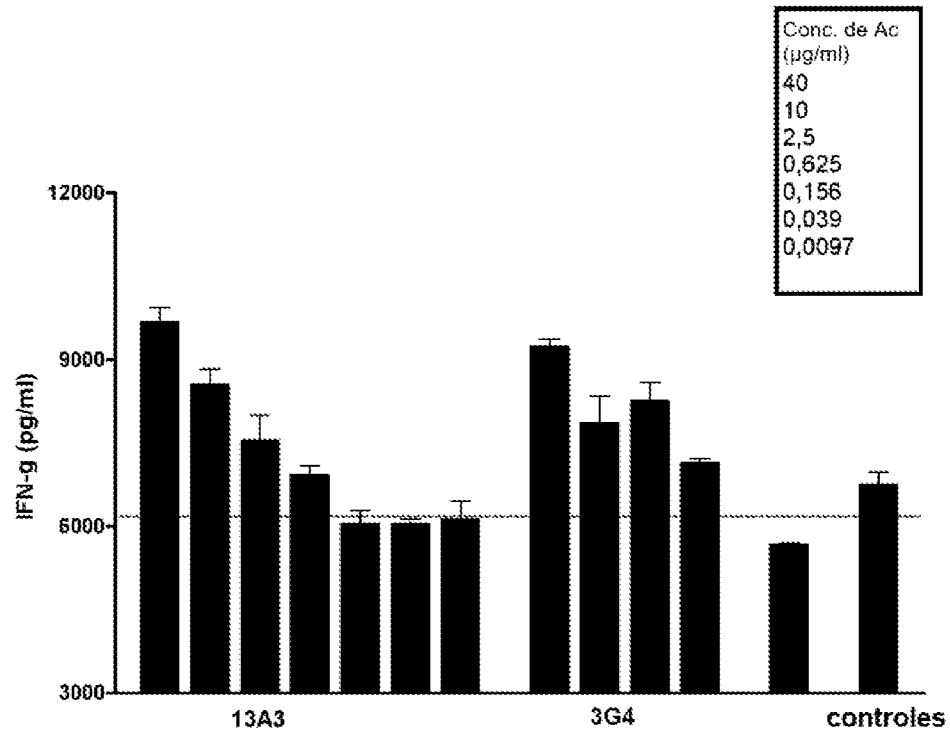


FIG. 17B

Tratamiento con Ac

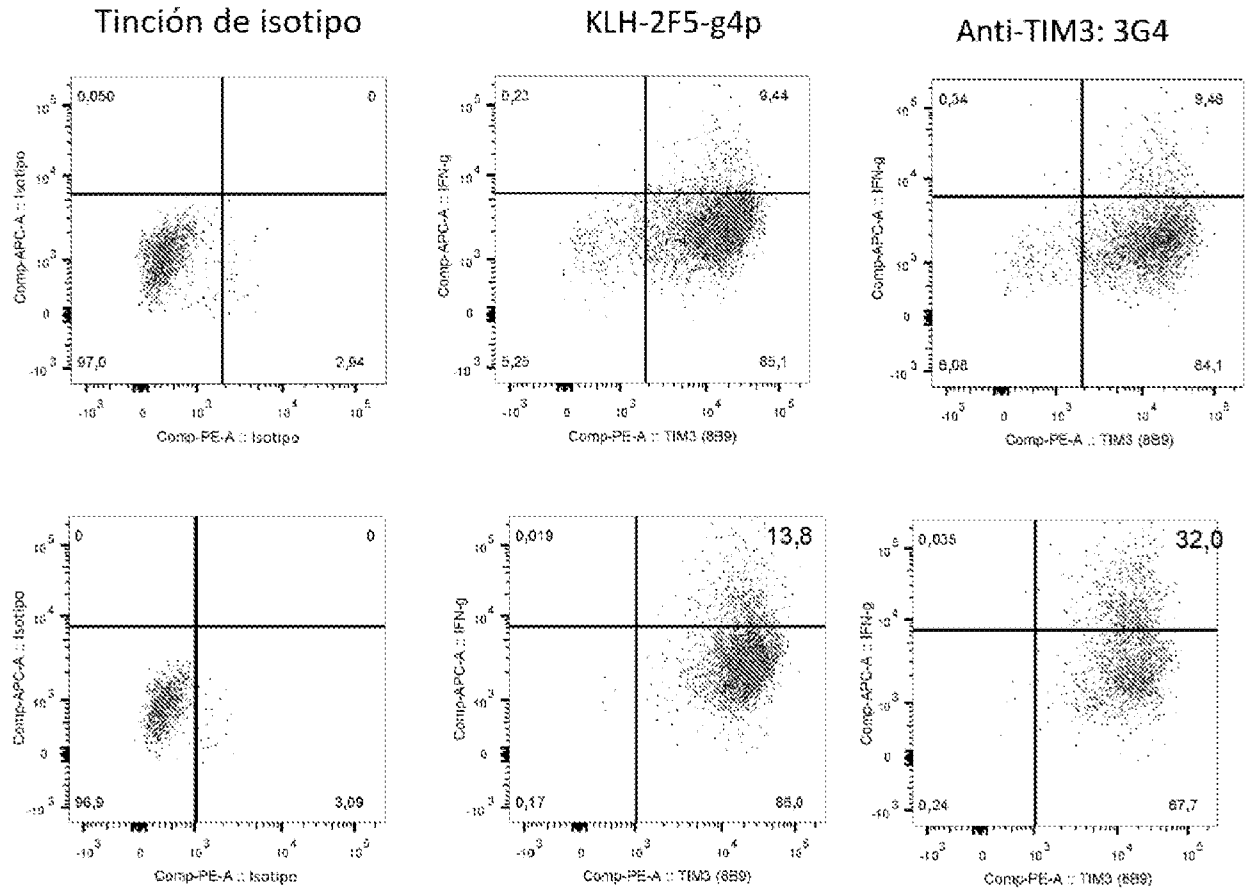


FIG. 18

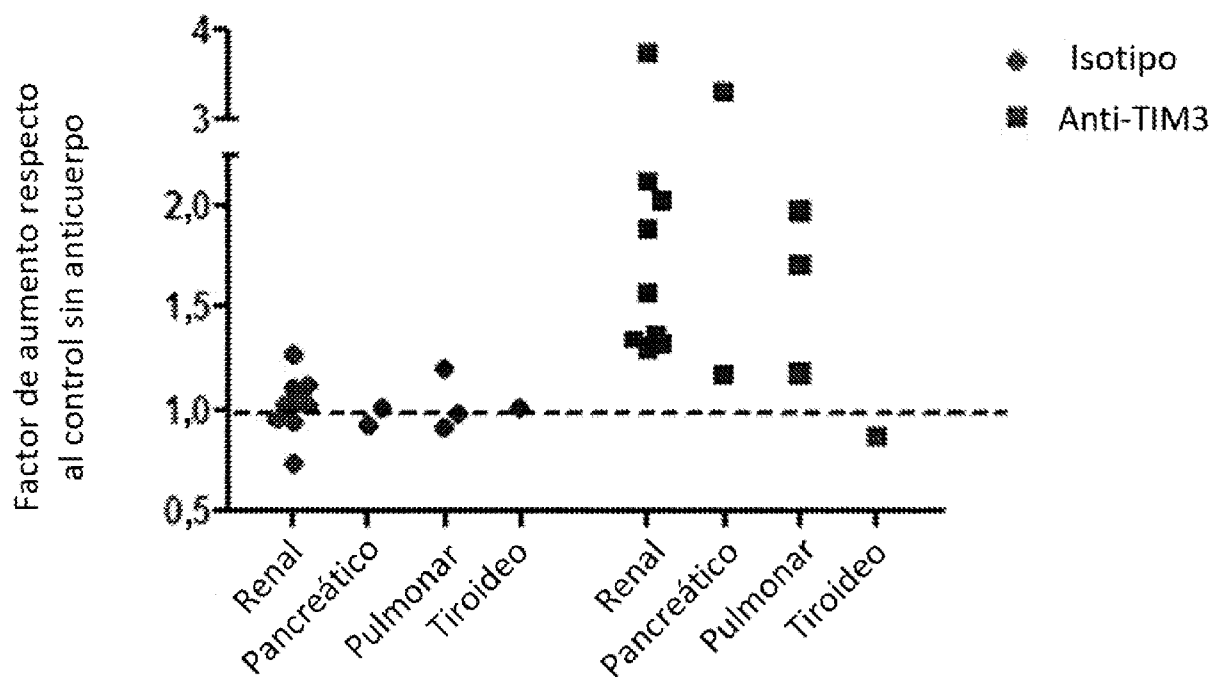


FIG. 19

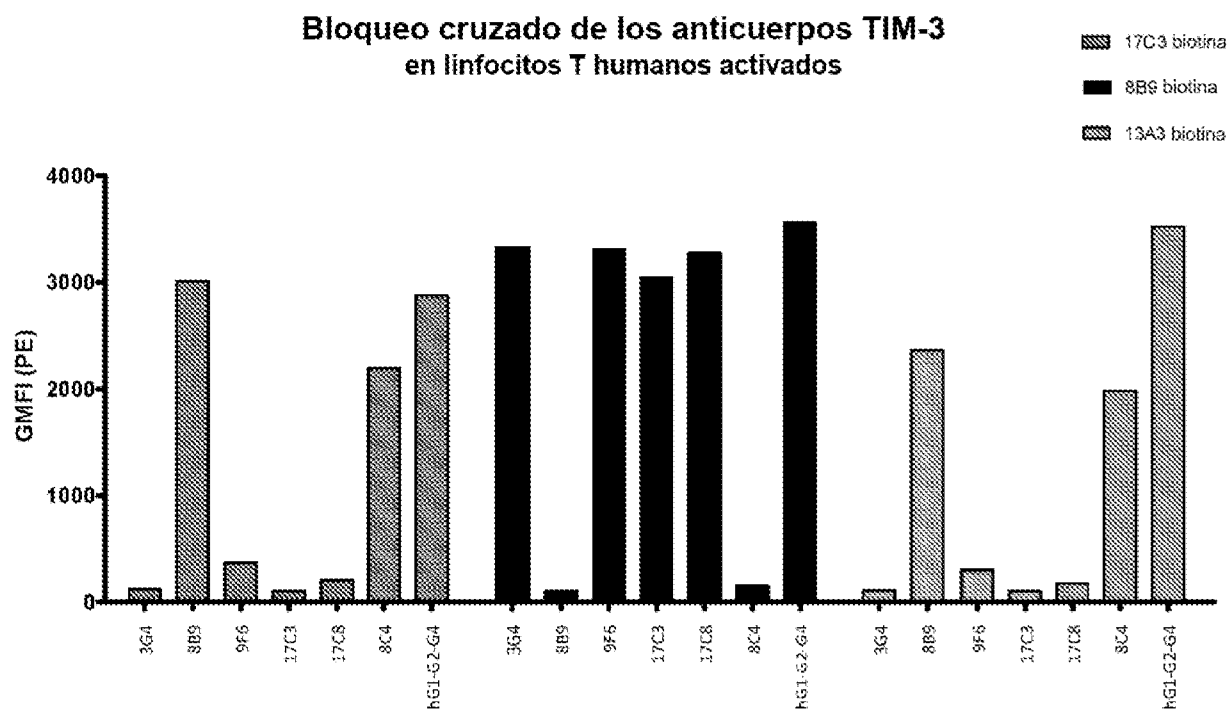


FIG. 20

Restos de epítipo en la proteína TIM3

TIM3	10	20	30	40	50	60
13A3	MESHLPEDCV	LLLLLLLLL	SSEVEYRAEV	GQNAVLP	CFY	VCWGKGACPV
3G4						CP
17C3						CPV
8B9					L	CPV
TIM3	70	80	90	100	110	120
13A3	FECGNVLR	DERDVNYWTS	RYWLN	GDVSLTIENV	TLADSGIYCC	RIQIPGIMND
3G4	FEC			D	R	Q
17C3	FEC			D		G
8B9	FECG			D		G
		W S R	WL GD R			
TIM3	130	140	150	160	170	180
13A3	EKFNLKLVK	PAKVTPAPTR	QRDETA	AEFR MLTTRGHGPA	ETQTLGSLPD	INLTQISTLA
3G4						
17C3						
8B9						
TIM3	190	200	210	220	230	240
	NELRDSRLAN	DLRDSGATIR	IGIYIGAGIC	AGLALALIFG	ALIEFKWYSHS	KEKIQNLSLI
TIM3	250	260	270	280	290	300
	SLANLPPSGL	ANAVAEGIRS	EENIYTIEEN	VYEVEEPNEY	YCYVSSRQQP	SQFLGCRFAMP

FIG. 21A

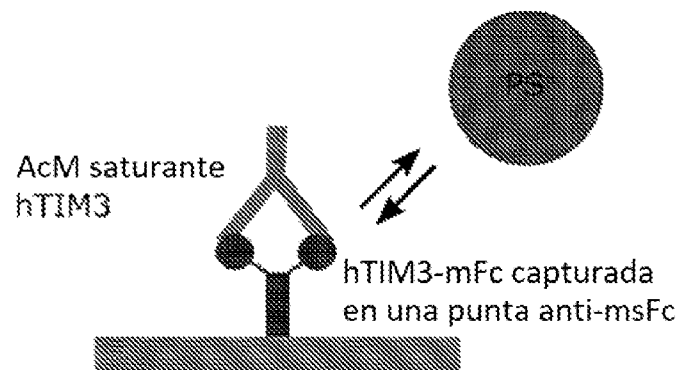
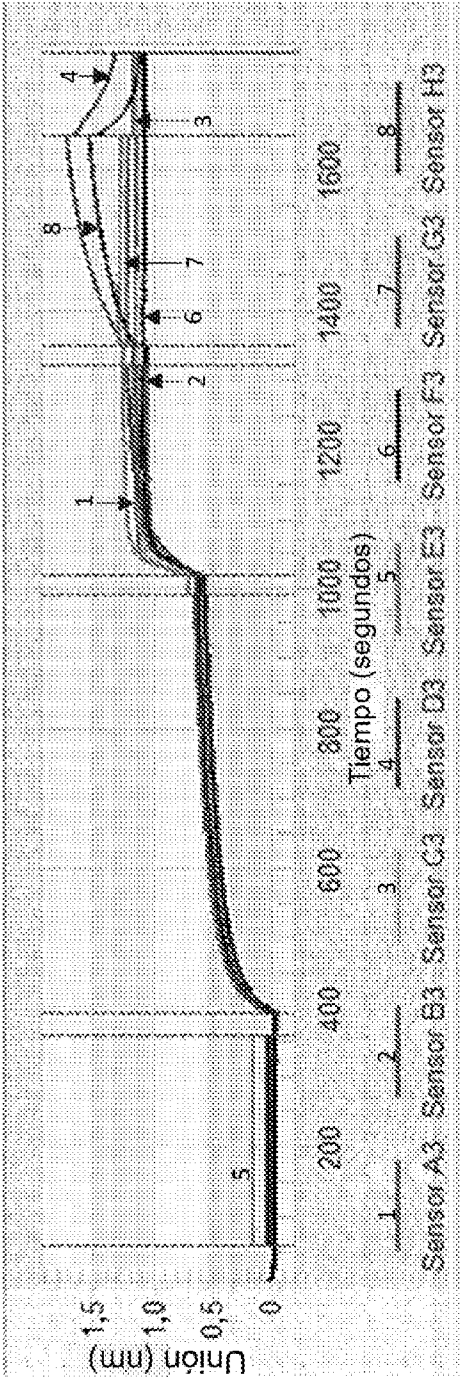


FIG. 21B

puntas	Ensayo de reacción cruzada	carga	anticuerpos	unión
a-mFc	PS extruida	síntos de unión ~50 nM de hTIM3-mFc	isaturantes	PS extruida



Octete HTX, a 25 °C en PBS a pH 7,4 con 1 mg/ml de BSA, hTIM3-ECD-mFc capturada, y panel de Ac anti-TIM3 unidos, unión de la PS extruida analizada a una dilución de %.

FIG. 21B (Cont.)

Unión de la PS		Respuesta de la PS (nm)	
AcM	t=1630 s	Unión de la PS	
3G4	0,0061	No	
Ac A	0,4725	Sí	
13A3	0,0003	No	
17C3	0,0077	No	
17C8	-0,0039	No	
Ac B	0,3803	Sí	

Unión de la PS		Respuesta de la PS (nm)	
AcM	t=1310 s	Unión de la PS	
Ac A	0,084	Sí	
8B9	-0,0103	No	
8C4	-0,0158	No	
9F6	-0,0302	No	
blanco 1	0,1841	Sí	
blanco 2	0,1193	Sí	

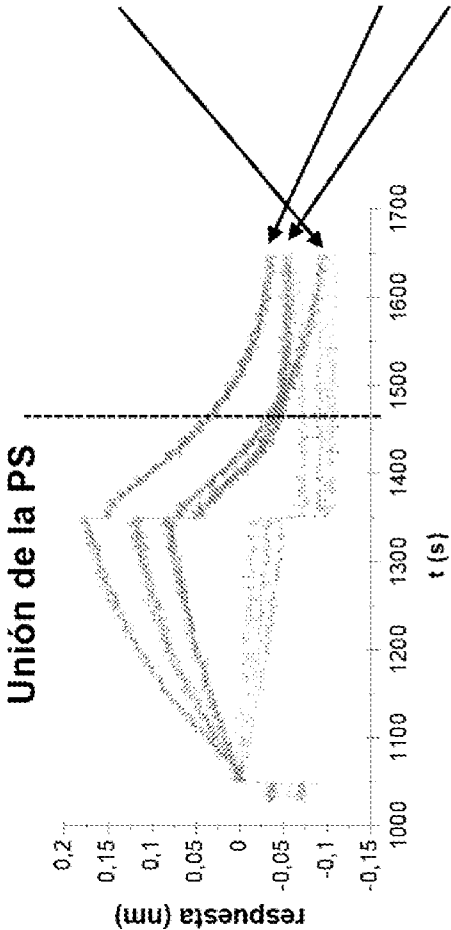
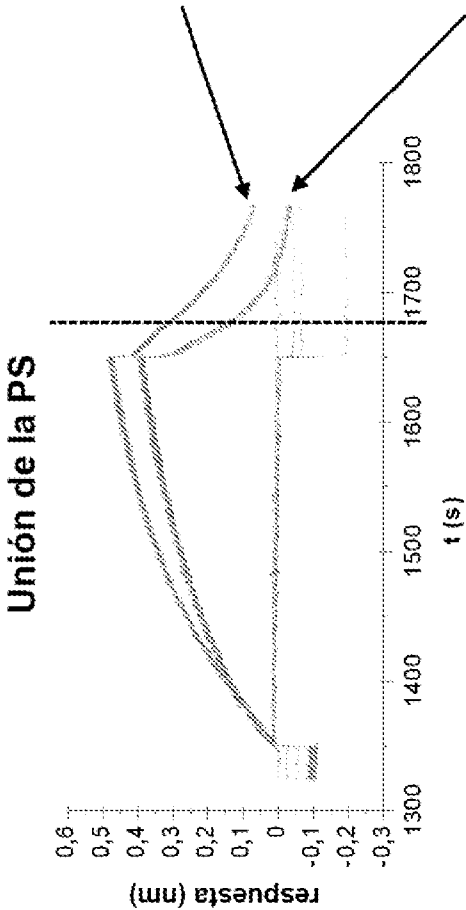


FIG. 22

Sumario de la actividad funcional de los anticuerpos anti-TIM3

Clon	Ensayo de unión (CE ₅₀ nM)				Ensayo de linfocitos T	Ensayo de TiL	Bloqueo de PS-TIM3
	Linfocitos T humanos (nM)	Linfocitos T de macaco cangrejero (nM)	CHO-huTIM (nM)	CHO-cynoTIM3 (nM)			
13A3 (IgG4)	0,27	0,4	0,4	0,47	N/A	Dep. de la dosis	Sí
3G4 (IgG2)	0,3	No de MC	0,67	1,3	Dep. de la dosis	Dep. de la dosis	Sí
17C3 (IgG1)	0,24	No de MC	0,47	1,4	Dep. de la dosis	Dep. de la dosis	Sí
17C8 (IgG1)	0,13	No de MC	0,33	No de MC	Dep. de la dosis	Dep. de la dosis	Sí
9F6 (IgG1)	0,13	No de MC	0,47	No de MC	Débil	Sin actividad	Sí
8B9 (IgG4)	0,13	No de MC	0,2	No de MC	Débil	Sin actividad	Sí
8C4 (IgG1)	0,73	No de MC	N/A	No de MC	Débil	Sin actividad	Sí

FIG. 23

Descripción de las secuencias representadas por los números de SEQ ID

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
1	13A3	IgG1.1f HC	Aminoácido
2	889	IgG1.1f HC	Aminoácido
3	8C4	IgG1.1f HC	Aminoácido
4	17C3	IgG1.1f HC	Aminoácido
5	9F6	IgG1.1f HC	Aminoácido
6	3G4	IgG1.1f HC	Aminoácido
7	17C8	IgG1.1f HC	Aminoácido
8	13A3	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
9	889	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
10	8C4	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
11	17C3	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
12	9F6	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
13	3G4	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
14	17C8	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
15	13A3	IgG1.3f HC	Aminoácido
16	889	IgG1.3f HC	Aminoácido
17	8C4	IgG1.3f HC	Aminoácido
18	17C3	IgG1.3f HC	Aminoácido
19	9F6	IgG1.3f HC	Aminoácido
20	3G4	IgG1.3f HC	Aminoácido
21	17C8	IgG1.3f HC	Aminoácido
22	13A3	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
23	889	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
24	8C4	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
25	17C3	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
26	9F6	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
27	3G4	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
28	17C8	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
29	13A3, 17C3, 3G4	LC	Aminoácido
30	889, 8C4, 17C8	LC	Aminoácido
31	9F6 (VK3)	LC	Aminoácido
32	9F6 (VK1)	LC	Aminoácido
33	9F6 (VK2)	LC	Aminoácido
34	13A3	VH	Aminoácido
35	889	VH	Aminoácido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
36	8C4	VH	Aminoácido
37	17C3	VH	Aminoácido
38	9F6	VH	Aminoácido
39	3G4	VH	Aminoácido
40	17C8	VH	Aminoácido
41	13A3, incluyendo las siguientes variantes 13A3: N60Q; N60S; N60A; D101E; P102V; P102Y; P102L; N60Q y P102Y; N60Q y D101E	CDR1 (VH)	Aminoácido
42	8B9, incluyendo la variante 8B9 (S61P)	CDR1 (VH)	Aminoácido
43	8C4	CDR1 (VH)	Aminoácido
44	17C3	CDR1 (VH)	Aminoácido
45	9F6, incluyendo la variante 9F6 (A108T); 3G4; 17C8	CDR1 (VH)	Aminoácido
46	13A3, incluyendo las siguientes variantes 13A3: D101E, P102V, P102Y, y P102L	CDR2 (VH)	Aminoácido
47	8B9	CDR2 (VH)	Aminoácido
48	8C4	CDR2 (VH)	Aminoácido
49	17C3	CDR2 (VH)	Aminoácido
50	9F6, incluyendo la variante 9F6 (A108T)	CDR2 (VH)	Aminoácido
51	3G4	CDR2 (VH)	Aminoácido
52	17C8	CDR2 (VH)	Aminoácido
53	13A3, incluyendo las siguientes variantes 13A3: N60Q; N60S; N60A	CDR3 (VH)	Aminoácido
54	8B9, incluyendo la variante 8B9 (S61P)	CDR3 (VH)	Aminoácido
55	8C4	CDR3 (VH)	Aminoácido
56	17C3	CDR3 (VH)	Aminoácido
57	9F6, incluyendo la variante 9F6 (A108T)	CDR3 (VH)	Aminoácido
58	3G4	CDR3 (VH)	Aminoácido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
59	17C8	CDR3 (VH)	Aminoácido
60	13A3, 17C3, 3G4	VL	Aminoácido
61	8B9, 8C4, 17C8, 9F6 (VK3)	VL	Aminoácido
62	9F6 (VK1)	VL	Aminoácido
63	9F6 (VK2)	VL	Aminoácido
64	13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6 (VK2, VK3), 3G4, 17C8	CDR1 (VL)	Aminoácido
65	9F6 (VK1)	CDR1 (VL)	Aminoácido
66	13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6 (VK2, VK3), 3G4, 17C8	CDR2 (VL)	Aminoácido
67	9F6 (VK1)	CDR2 (VL)	Aminoácido
68	13A3, 17C3, 3G4	CDR3 (VL)	Aminoácido
69	8B9, 8C4, 9F6 (VK3), 17C8	CDR3 (VL)	Aminoácido
70	9F6 (VK1)	CDR3 (VL)	Aminoácido
71	9F6 (VK2)	CDR3 (VL)	Aminoácido
72	13A3 (N60Q)	IgG1.1f HC	Aminoácido
73	13A3 (N60S)	IgG1.1f HC	Aminoácido
74	13A3 (N60A)	IgG1.1f HC	Aminoácido
75	13A3 (D101E)	IgG1.1f HC	Aminoácido
76	13A3 (P102V)	IgG1.1f HC	Aminoácido
77	13A3 (P102Y)	IgG1.1f HC	Aminoácido
78	13A3 (P102L)	IgG1.1f HC	Aminoácido
79	13A3 (N60Q, P102Y)	IgG1.1f HC	Aminoácido
349	13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.1f HC	Aminoácido
80	8B9 (S61P)	IgG1.1f HC	Aminoácido
81	9F6 (A108T)	IgG1.1f HC	Aminoácido
82	13A3 (N60Q)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
83	13A3 (N60S)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
84	13A3 (N60A)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
85	13A3 (D101E)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
86	13A3 (P102V)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
87	13A3 (P102Y)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
88	13A3 (P102L)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
89	13A3 (N60Q, P102Y)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
350	13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
90	8B9 (S61P)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
91	9F6 (A108T)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
92	13A3 (N60Q)	IgG1.3f HC	Aminoácido
93	13A3 (N60S)	IgG1.3f HC	Aminoácido
94	13A3 (N60A)	IgG1.3f HC	Aminoácido
95	13A3 (D101E)	IgG1.3f HC	Aminoácido
96	13A3 (P102V)	IgG1.3f HC	Aminoácido
97	13A3 (P102Y)	IgG1.3f HC	Aminoácido
98	13A3 (P102L)	IgG1.3f HC	Aminoácido
99	13A3 (N60Q, P102Y)	IgG1.3f HC	Aminoácido
351	13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC	Aminoácido
100	8B9 (S61P)	IgG1.3f HC	Aminoácido
101	9F6 (A108T)	IgG1.3f HC	Aminoácido
102	13A3 (N60Q)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
103	13A3 (N60S)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
104	13A3 (N60A)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
105	13A3 (D101E)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
106	13A3 (P102V)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
107	13A3 (P102Y)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
108	13A3 (P102L)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
109	13A3 (N60Q, P102Y)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
352	13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
110	8B9 (S61P)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
111	9F6 (A108T)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
112	13A3 (N60Q)	VH	Aminoácido
113	13A3 (N60S)	VH	Aminoácido
114	13A3 (N60A)	VH	Aminoácido
115	13A3 (D101E)	VH	Aminoácido
116	13A3 (P102V)	VH	Aminoácido
117	13A3 (P102Y)	VH	Aminoácido
118	13A3 (P102L)	VH	Aminoácido
119	13A3 (N60Q, P102Y)	VH	Aminoácido
364	13A3 (N60Q, D101E)	VH	Aminoácido
120	8B9 (S61P)	VH	Aminoácido
121	9F6 (A108T)	VH	Aminoácido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
122	13A3 (N60Q); 13A3 (N60Q, P102Y); 13A3 (N60Q, D101E)	CDR2 (VH)	Aminoácido
123	13A3 (N60S)	CDR2 (VH)	Aminoácido
124	13A3 (N60A)	CDR2 (VH)	Aminoácido
125	8B9 (S61P)	CDR2 (VH)	Aminoácido
126	13A3 (D101E); 13A3 (N60Q, D101E)	CDR3 (VH)	Aminoácido
127	13A3 (P102V)	CDR3 (VH)	Aminoácido
128	13A3 (P102Y); 13A3 (N60Q, P102Y)	CDR3 (VH)	Aminoácido
129	13A3 (P102L)	CDR3 (VH)	Aminoácido
130	Todos los anticuerpos	Dominio constante de la HC (IgG1.1f)	Aminoácido
131	Todos los anticuerpos	Dominio constante de la HC (IgG1.1f) (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
132	Todos los anticuerpos	Dominio constante de la HC (IgG1.3f)	Aminoácido
133	Todos los anticuerpos	Dominio constante de la HC (IgG1.3f) (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
134	13A3	IgG1.1f HC	Nucleótido
135	8B9	IgG1.1f HC	Nucleótido
136	8C4	IgG1.1f HC	Nucleótido
137	17C3	IgG1.1f HC	Nucleótido
138	9F6	IgG1.1f HC	Nucleótido
139	3G4	IgG1.1f HC	Nucleótido
140	17C8	IgG1.1f HC	Nucleótido
141	13A3	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
142	8B9	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
143	8C4	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
144	17C3	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
145	9F6	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
146	3G4	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
147	17C8	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
148	13A3	IgG1.3f HC	Nucleótido
149	8B9	IgG1.3f HC	Nucleótido
150	8C4	IgG1.3f HC	Nucleótido
151	17C3	IgG1.3f HC	Nucleótido
152	9F6	IgG1.3f HC	Nucleótido
153	3G4	IgG1.3f HC	Nucleótido
154	17C8	IgG1.3f HC	Nucleótido
155	13A3	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
156	8B9	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
157	8C4	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
158	17C3	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
159	9F6	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
160	3G4	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
161	17C8	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
162	13A3, 17C3, 3G4	LC	Nucleótido
163	8B9, 8C4, 17C8	LC	Nucleótido
164	9F6 (VK3)	LC	Nucleótido
165	9F6 (VK1)	LC	Nucleótido
166	9F6 (VK2)	LC	Nucleótido
167	13A3	VH	Nucleótido
168	8B9	VH	Nucleótido
169	8C4	VH	Nucleótido
170	17C3	VH	Nucleótido
171	9F6	VH	Nucleótido
172	3G4	VH	Nucleótido
173	17C8	VH	Nucleótido
174	13A3, incluyendo las siguientes variantes 13A3: N60Q; N60S; N60A; D101E; P102V; P102Y; P102L; N60Q y P102Y; 13A3 (N60Q, D101E)	CDR1 (VH)	Nucleótido
175	8B9, incluyendo la variante 8B9 (S61P)	CDR1 (VH)	Nucleótido
176	8C4	CDR1 (VH)	Nucleótido
177	17C3	CDR1 (VH)	Nucleótido
178	9F6, incluyendo la variante 9F6 (A108T); 3G4; 17C8	CDR1 (VH)	Nucleótido
179	13A3, incluyendo las siguientes variantes 13A3: D101E, P102V, P102Y, y P102L	CDR2 (VH)	Nucleótido
180	8B9	CDR2 (VH)	Nucleótido
181	8C4	CDR2 (VH)	Nucleótido
182	17C3	CDR2 (VH)	Nucleótido
183	9F6, incluyendo la variante 9F6 (A108T)	CDR2 (VH)	Nucleótido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
184	3G4	CDR2 (VH)	Nucleótido
185	17C8	CDR2 (VH)	Nucleótido
186	13A3, incluyendo las siguientes variantes 13A3: N60Q, N60S, N60A	CDR3 (VH)	Nucleótido
187	8B9, incluyendo la variante 8B9 (S61P)	CDR3 (VH)	Nucleótido
188	8C4	CDR3 (VH)	Nucleótido
189	17C3	CDR3 (VH)	Nucleótido
190	9F6, incluyendo la variante 9F6 (A108T)	CDR3 (VH)	Nucleótido
191	3G4	CDR3 (VH)	Nucleótido
192	17C8	CDR3 (VH)	Nucleótido
193	13A3, 17C3, 3G4	VL	Nucleótido
194	8B9, 8C4, 17C8, 9F6 (VK3)	VL	Nucleótido
195	9F6 (VK1)	VL	Nucleótido
196	9F6 (VK2)	VL	Nucleótido
197	13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6 (VK2, VK3), 3G4, 17C8	CDR1 (VL)	Nucleótido
198	9F6 (VK1)	CDR1 (VL)	Nucleótido
199	13A3, 8B9, 8C4, 17C3, 9F6 (VK2, VK3), 3G4, 17C8	CDR2 (VL)	Nucleótido
200	9F6 (VK1)	CDR2 (VL)	Nucleótido
201	13A3, 17C3, 3G4	CDR3 (VL)	Nucleótido
202	8B9, 8C4, 9F6 (VK3), 17C8	CDR3 (VL)	Nucleótido
203	9F6 (VK1)	CDR3 (VL)	Nucleótido
204	9F6 (VK2)	CDR3 (VL)	Nucleótido
205	13A3 (N60Q)	IgG1.1f HC	Nucleótido
206	13A3 (N60S)	IgG1.1f HC	Nucleótido
207	13A3 (N60A)	IgG1.1f HC	Nucleótido
208	13A3 (D101E)	IgG1.1f HC	Nucleótido
209	13A3 (P102V)	IgG1.1f HC	Nucleótido
210	13A3 (P102Y)	IgG1.1f HC	Nucleótido
211	13A3 (P102L)	IgG1.1f HC	Nucleótido
212	13A3 (N60Q, P102Y)	IgG1.1f HC	Nucleótido
355	13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.1f HC	Nucleótido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
213	8B9 (S61P)	IgG1.1f HC	Nucleótido
214	9F6 (A108T)	IgG1.1f HC	Nucleótido
215	13A3 (N60Q)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
216	13A3 (N60S)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
217	13A3 (N60A)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
218	13A3 (D101E)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
219	13A3 (P102V)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
220	13A3 (P102Y)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
221	13A3 (P102L)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
222	13A3 (N60Q, P102Y)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
356	13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
223	8B9 (S61P)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
224	9F6 (A108T)	IgG1.1f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
225	13A3 (N60Q)	IgG1.3f HC	Nucleótido
226	13A3 (N60S)	IgG1.3f HC	Nucleótido
227	13A3 (N60A)	IgG1.3f HC	Nucleótido
228	13A3 (D101E)	IgG1.3f HC	Nucleótido
229	13A3 (P102V)	IgG1.3f HC	Nucleótido
230	13A3 (P102Y)	IgG1.3f HC	Nucleótido
231	13A3 (P102L)	IgG1.3f HC	Nucleótido
232	13A3 (N60Q, P102Y)	IgG1.3f HC	Nucleótido
357	13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC	Nucleótido
233	8B9 (S61P)	IgG1.3f HC	Nucleótido
234	9F6 (A108T)	IgG1.3f HC	Nucleótido
235	13A3 (N60Q)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
236	13A3 (N60S)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
237	13A3 (N60A)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
238	13A3 (D101E)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
239	13A3 (P102V)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
240	13A3 (P102Y)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
241	13A3 (P102L)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
242	13A3 (N60Q, P102Y)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
358	13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
374	13A3 (N60Q, D101E) (TIM3.18) (T168C)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
243	8B9 (S61P)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
244	9F6 (A108T)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal)	Nucleótido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
245	13A3 (N60Q)	VH	Nucleótido
246	13A3 (N60S)	VH	Nucleótido
247	13A3 (N60A)	VH	Nucleótido
248	13A3 (D101E)	VH	Nucleótido
249	13A3 (P102V)	VH	Nucleótido
250	13A3 (P102Y)	VH	Nucleótido
251	13A3 (P102L)	VH	Nucleótido
252	13A3 (N60Q, P102Y)	VH	Nucleótido
359	13A3 (N60Q, D101E)	VH	Nucleótido
253	8B9 (S61P)	VH	Nucleótido
254	9F6 (A108T)	VH	Nucleótido
255	13A3 (N60Q); 13A3 (N60Q, P102Y); 13A3 (N60Q, D101E)	CDR2 (VH)	Nucleótido
256	13A3 (N60S)	CDR2 (VH)	Nucleótido
257	13A3 (N60A)	CDR2 (VH)	Nucleótido
258	8B9 (S61P)	CDR2 (VH)	Nucleótido
259	13A3 (D101E)	CDR3 (VH)	Nucleótido
260	13A3 (P102V)	CDR3 (VH)	Nucleótido
261	13A3 (P102Y); 13A3 (N60Q, P102Y); 13A3 (N60Q, D101E)	CDR3 (VH)	Nucleótido
262	13A3 (P102L)	CDR3 (VH)	Nucleótido
263	Todos los anticuerpos	Domínio constante de la HC (IgG1.1f)	Nucleótido
264	Todos los anticuerpos	Domínio constante de la HC (IgG1.1f) (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
265	Todos los anticuerpos	Domínio constante de la HC (IgG1.3f)	Nucleótido
266	Todos los anticuerpos	Domínio constante de la HC (IgG1.3f) (sin K carboxiterminal)	Nucleótido
267		Péptido de señalización	aminoácido
268		Péptido de señalización	aminoácido
269		Péptido de señalización	aminoácido
270		Péptido de señalización	aminoácido
271		Péptido de señalización	aminoácido
361		Péptido de señalización (TIM3.2-TIM3.18)	aminoácido
272		Péptido de señalización	Nucleótido
273		Péptido de señalización	Nucleótido
274		Péptido de señalización	Nucleótido
275		Péptido de señalización	Nucleótido
276		Péptido de señalización	Nucleótido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
362		Péptido de señalización (TIM3.2-TIM3.18 HC)	Nucleótido
363		Péptido de señalización (TIM3.2-TIM3.18 LC)	Nucleótido
277		IgG1 humana (variante alotípica)	Aminoácido
278		Cadena ligera kappa de la IgG1 humana	Aminoácido
279		LSPGK (Extremo carboxiterminal de la cadena pesada)	Aminoácido
280		LSPG (Extremo carboxiterminal de la cadena pesada)	Aminoácido
281		LSP (Extremo carboxiterminal de la cadena pesada)	Aminoácido
282		X1X2X3X4YX5X6 (CDR1 de la VH degenerada)	Aminoácido
283		X1IX2X3X4GX5X6X7X8YX9X10X11X12X13X14 (CDR2 de la VH degenerada)	Aminoácido
284		X1X2X3X4X5X6YX7X8X9X10YX11X12DX13X14X15X16 X17X18 (CDR3 de la VH degenerada)	Aminoácido
285		QQX1X2SX3X4X5T (CDR1 de la VL degenerada)	Aminoácido
286		Isoforma 1 de la TIM3 (aa)	Aminoácido
287		Isoforma 2 de la TIM3 (aa)	Aminoácido
288		Isoforma 1 de la TIM3 (nt)	Nucleótido
289		Isoforma 2 de la TIM3 (nt)	Nucleótido
290		Dominio extracelular de la TIM3	Aminoácido
291		Dominio constante de la IgG1 humana natural (igual que la IgG1za)	Aminoácido
292		dominio constante de la IgG4 humana	Aminoácido
293		cadena ligera 9F6 VK2 de la IgG1	Aminoácido
294		Dominio constante de la IgG1.1 (utilizado en anticuerpos anti-TIM3)	Aminoácido
295		Dominio constante de la IgG1.3 (utilizado en anticuerpos anti-TIM3)	Aminoácido
296		restos 37-43 del ECD de la TIM3 madura	Aminoácido
297		restos 57-83 del ECD de la TIM3 madura	Aminoácido
298		restos 90-99 del ECD de la TIM3 madura	Aminoácido
299		restos 1-99 del ECD de la TIM3 madura	Aminoácido
300		Conector	Aminoácido
360		Proteína TIM3 de macaco	Aminoácido
301	13A3	hIgG4 HC	Aminoácido
302	13A3	hIgG4 HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
303	TIM3.5 – 13A3	IgG4P HC	Aminoácido
304	TIM3.5 – 13A3	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
305	TIM3.10 – 13A3 (N60Q)	IgG4P HC	Aminoácido
306	TIM3.10 – 13A3 (N60Q)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
307	TIM3.11 – 13A3 (N60S)	IgG4P HC	Aminoácido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
308	TIM3.11 – 13A3 (N60S)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
309	TIM3.12 – 13A3 (N60A)	IgG4P HC	Aminoácido
310	TIM3.12 – 13A3 (N60A)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
311	TIM3.13 – 13A3 (D101E)	IgG4P HC	Aminoácido
312	TIM3.13 – 13A3 (D101E)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
313	TIM 3.14 – 13A3 (P102V)	IgG4P HC	Aminoácido
314	TIM 3.14 – 13A3 (P102V)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
315	TIM3.15 – 13A3 (P102Y)	IgG4P HC	Aminoácido
316	TIM3.15 – 13A3 (P102Y)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
317	TIM3.16 – 13A3 (P102L)	IgG4P HC	Aminoácido
318	TIM3.16 – 13A3 (P102L)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
319	TIM3.17 – 13A3 (N60Q, P102Y)	IgG4P HC	Aminoácido
320	TIM3.17 – 13A3 (N60Q, P102Y)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
353	TIM3.18 – 13A3 (N60Q, D101E)	IgG4P HC	Aminoácido
354	TIM3.18 – 13A3 (N60Q, D101E)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
321	8B9	IgG1za HC	Aminoácido
322	8B9	IgG1za HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
323	8B9	IgG4P HC	Aminoácido
324	8B9	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
325	TIM3.8 – 8B9 (S61P)	IgG4P HC	Aminoácido
326	TIM3.8 – 8B9 (S61P)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
327	8C4	IgG1za HC	Aminoácido
328	8C4	IgG1za HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
329	TIM3.6 – 8C4	IgG4P HC	Aminoácido
330	TIM3.6 – 8C4	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
331	17C3	IgG1za HC	Aminoácido
332	17C3	IgG1za HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
333	TIM3.2 – 17C3	IgG4P HC	Aminoácido
334	TIM3.2 – 17C3	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
335	9F6	IgG1za HC	Aminoácido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
336	9F6	IgG1za HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
337	9F6	IgG4P HC	Aminoácido
338	9F6	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
339	TIM3.7 – 9F6 (A108T)	IgG4P HC	Aminoácido
340	TIM3.7 – 9F6 (A108T)	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
341	3G4	IgG1za HC	Aminoácido
342	3G4	IgG1za HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
343	TIM3.4 – 3G4	IgG4P HC	Aminoácido
344	TIM3.4 – 3G4	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
345	17C8	IgG4 HC	Aminoácido
346	17C8	IgG4 HC	Aminoácido
347	TIM3.9 – 17C8	IgG4P HC	Aminoácido
348	TIM3.9 – 17C8	IgG4P HC (sin K carboxiterminal)	Aminoácido
365	13A3	Fab de la cadena pesada con 6x His	Aminoácido
366	TIM3.18 – 13A3 (N60Q, D101E)	ab de la cadena pesada con 6x His	Aminoácido
367		Restos 49-62 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura	Aminoácido
368		Restos 111-127 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura	Aminoácido
369		Restos 40-62 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura	Aminoácido
370		Restos 66-77 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura	Aminoácido
371		Restos 78-95 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura	Aminoácido
372		Restos 110-127 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura	Aminoácido
373		Restos 119-127 del dominio extracelular de la TIM3 humana madura	Aminoácido
375		hTIM3-mFc	Aminoácido
376		TIM3-MycHisAvi de macaco	Aminoácido
377		hTIM3_IgV	Aminoácido
378	TIM3.18 – 13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC con péptido de señalización	Aminoácido
379	TIM3.18 – 13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal) con péptido de señalización	Aminoácido
380	TIM3.18 – 13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC con secuencia de señalización	Nucleótido
381	TIM3.18 – 13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC (sin K carboxiterminal) con péptido de señalización	Nucleótido
382	TIM3.18 – 13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC (T168C) con secuencia de señalización	Nucleótido

FIG. 23 (Cont).

SEQ ID NO.	Anticuerpo	Descripción	AA/NT
383	TIM3.18 ~ 13A3 (N60Q, D101E)	IgG1.3f HC (T168C) (sin K carboxiterminal) con péptido de señalización	Nucleótido
384	TIM3.18 ~ 13A3 (N60Q, D101E)	LC con péptido de señalización	Aminoácido
385	TIM3.18 ~ 13A3 (N60Q, D101E)	LC con secuencia de señalización	Nucleótido

FIG. 24A

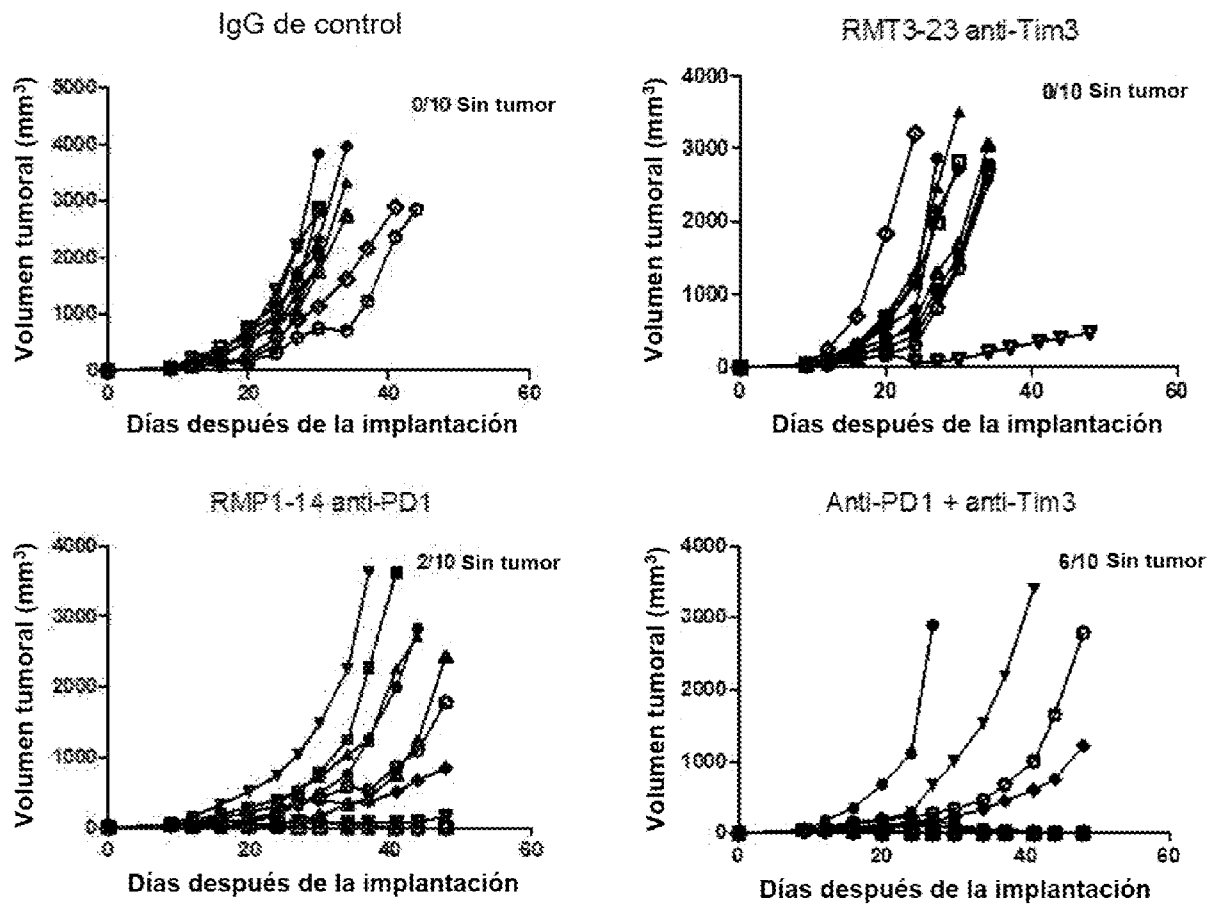


FIG. 24B

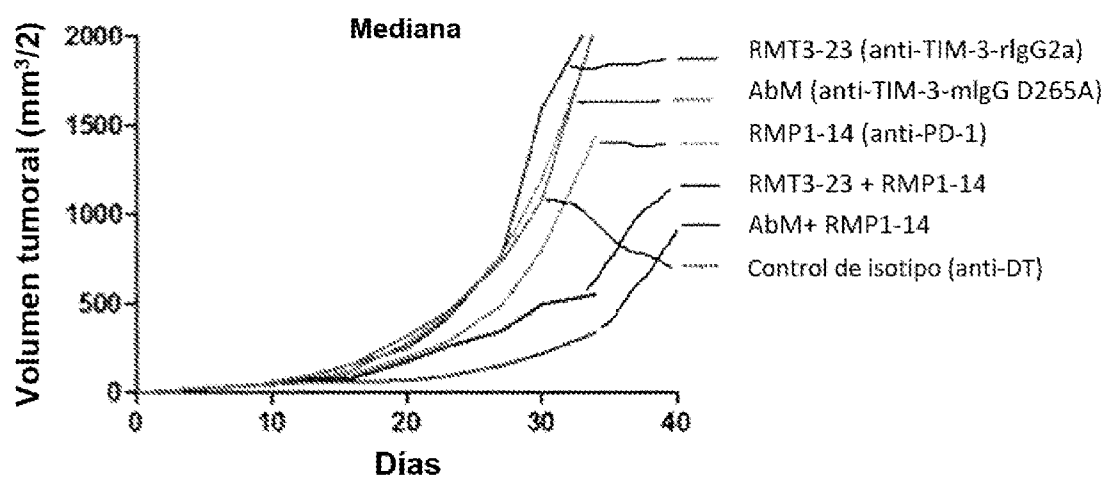
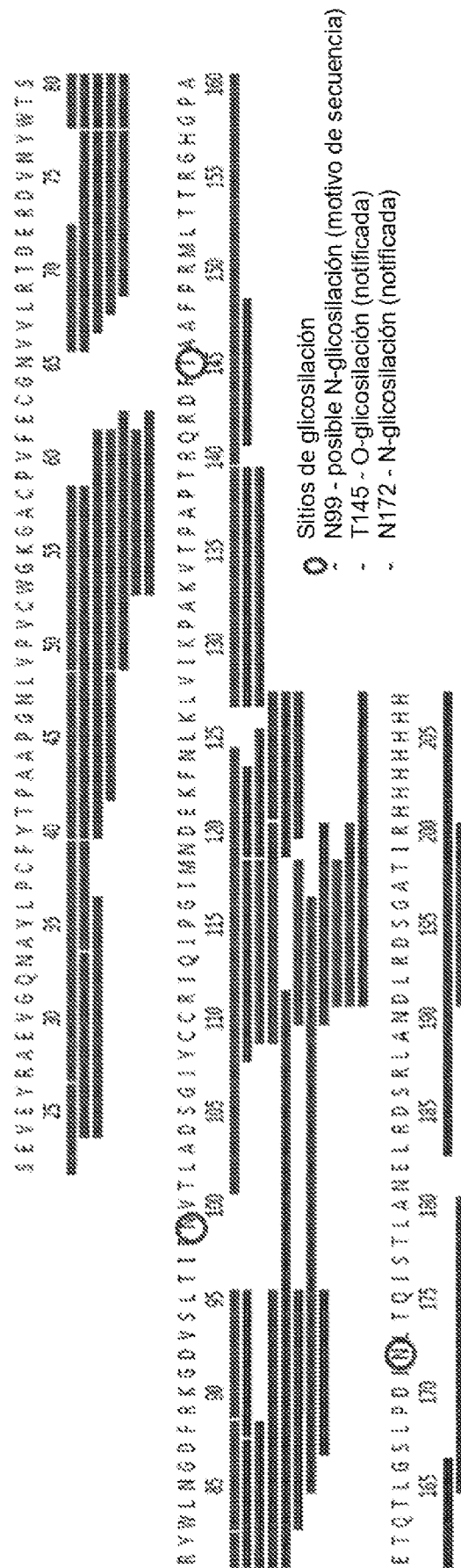


FIG. 25



Total: 52 Peptidos, 97.3 % Cobertura, 3.51 Redundancia

FIG. 26

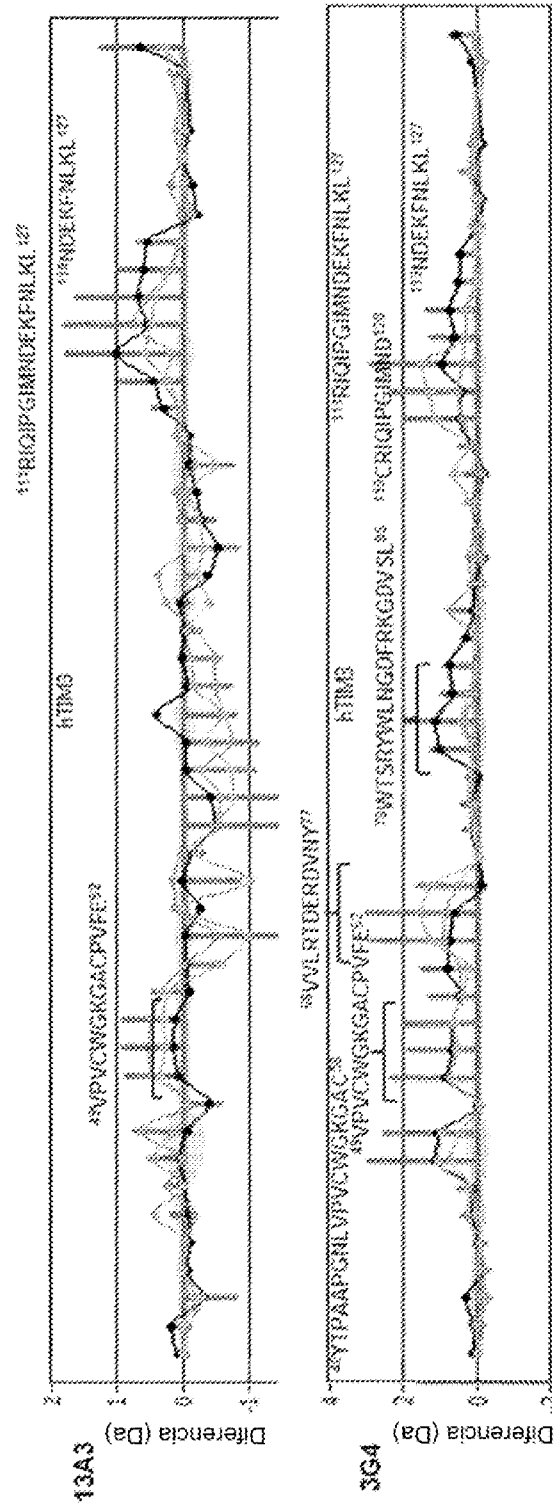
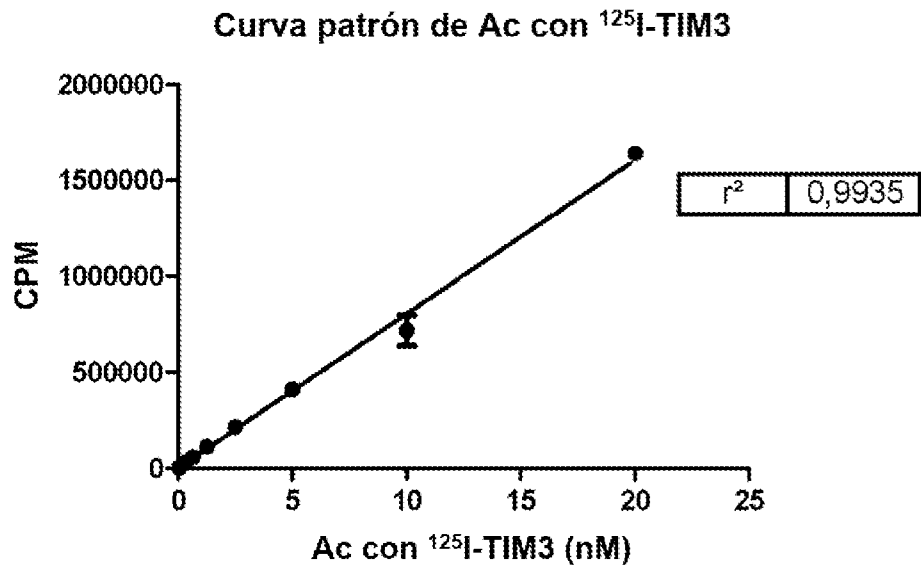


FIG. 27A



$$Y = mX + b$$

$$Y = 80220(1\text{nM}) + 899,3$$

$$Y = 81119,3$$

$$^{125}\text{I}\text{-Ac } 1 \text{ nM} = 81119,3 \text{ cpm}$$

Pendiente	80220 ± 1526
Ordenada en el origen cuando $X=0,0$	$899,3 \pm 11140$

FIG. 27B

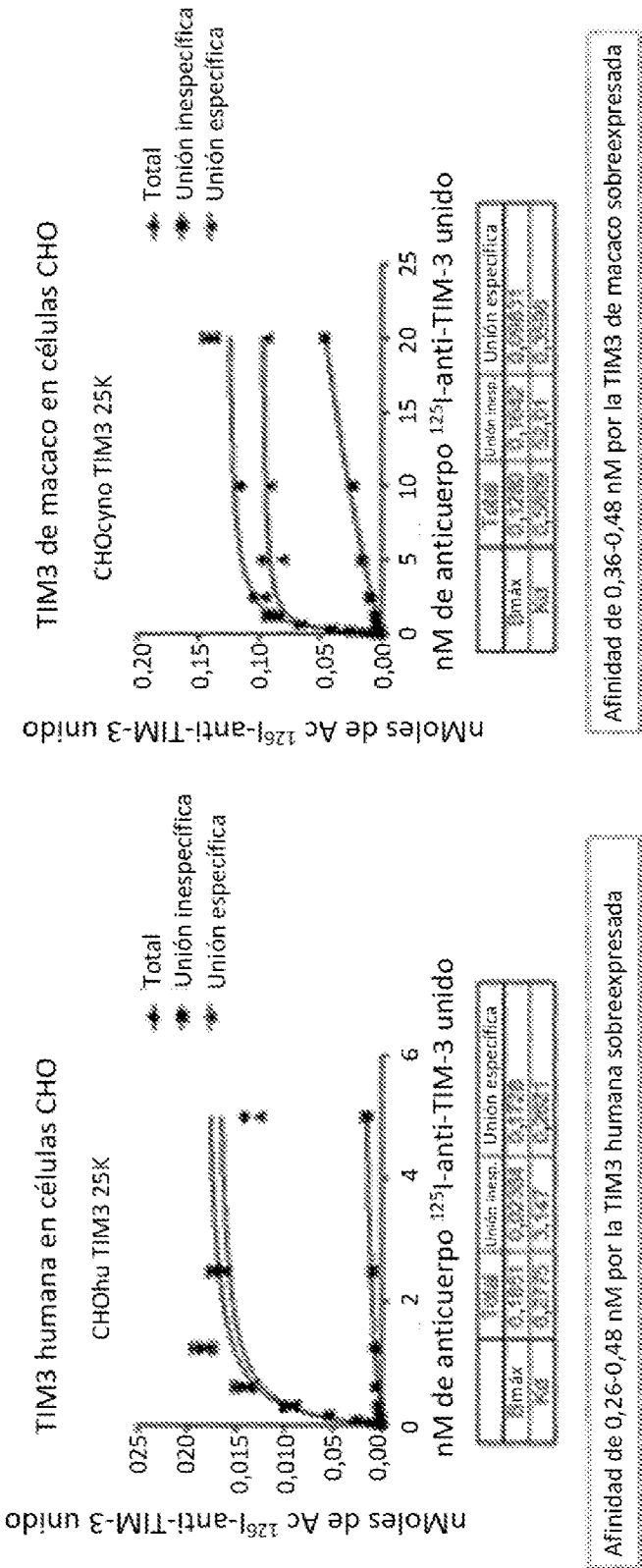


FIG. 28

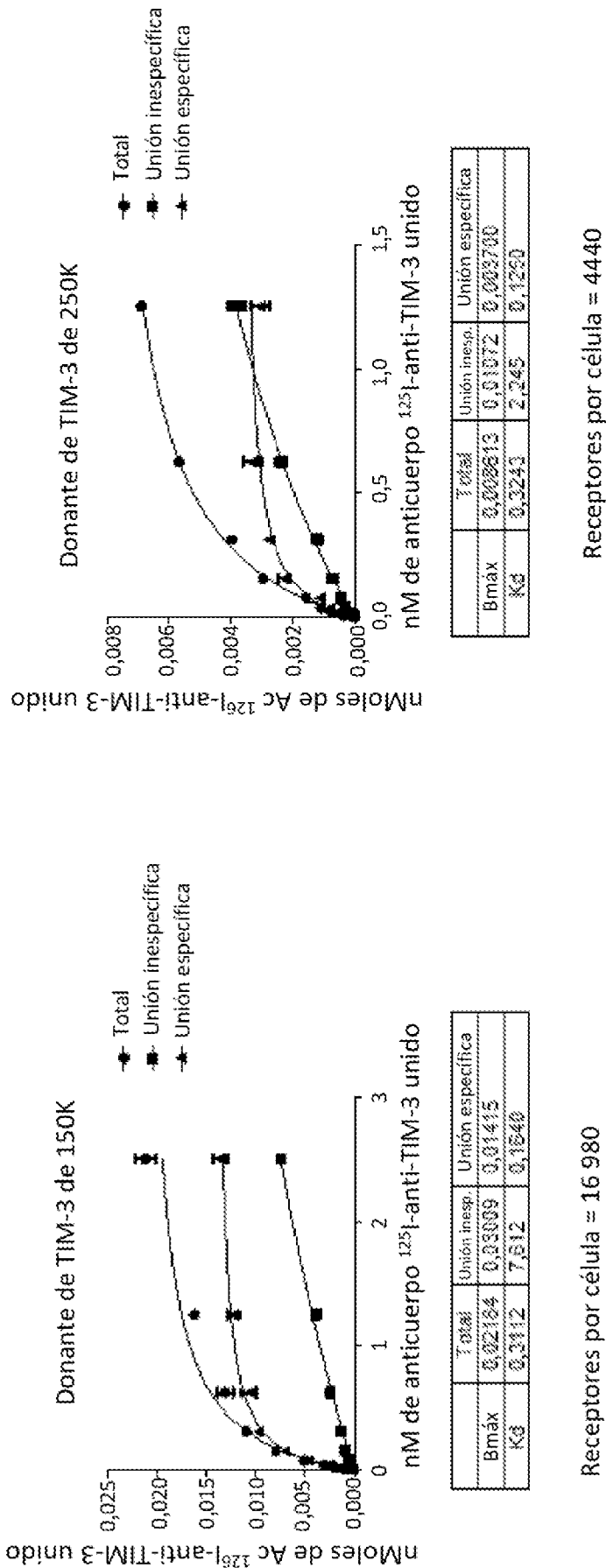


FIG. 29A

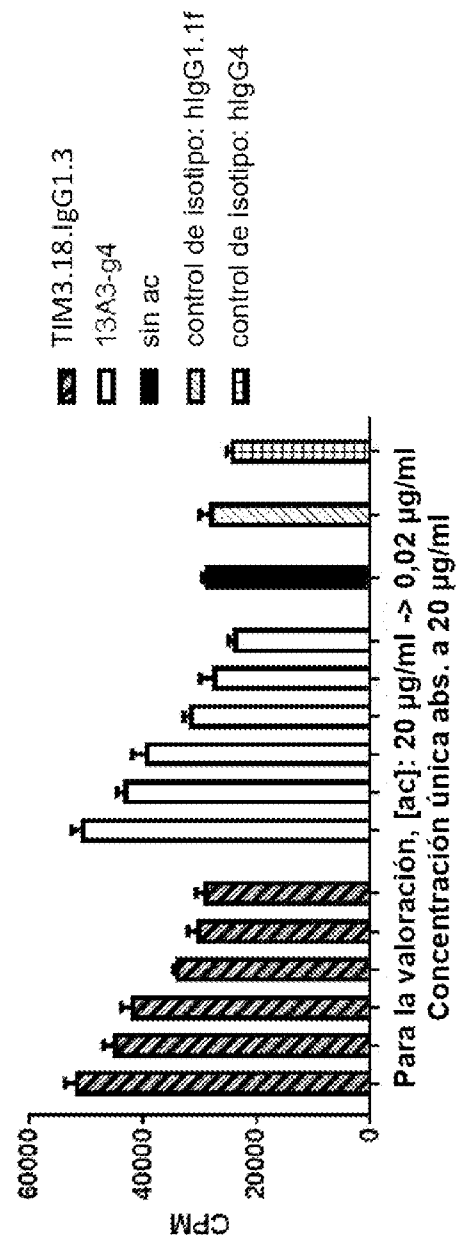


FIG. 29B

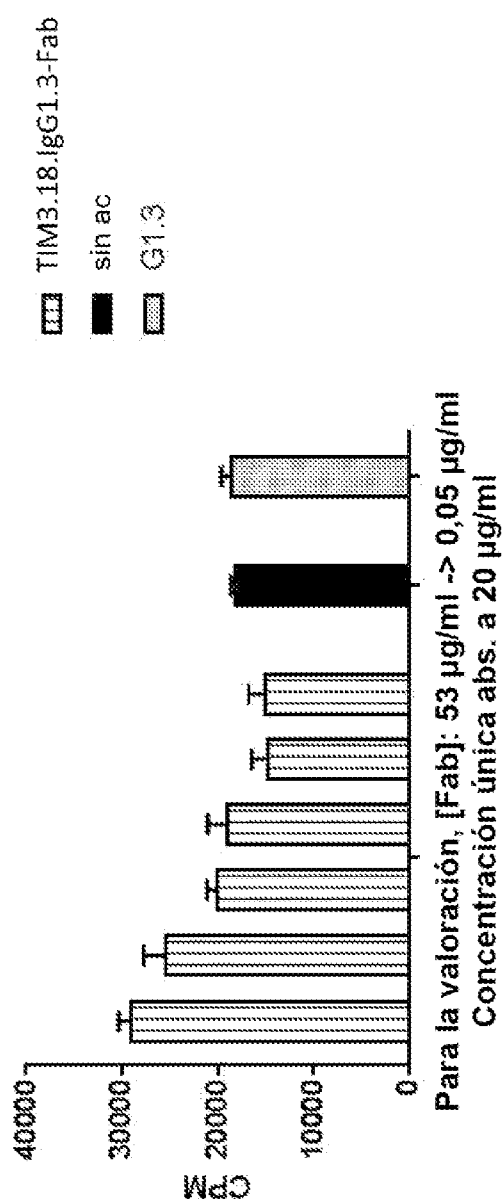


FIG. 30

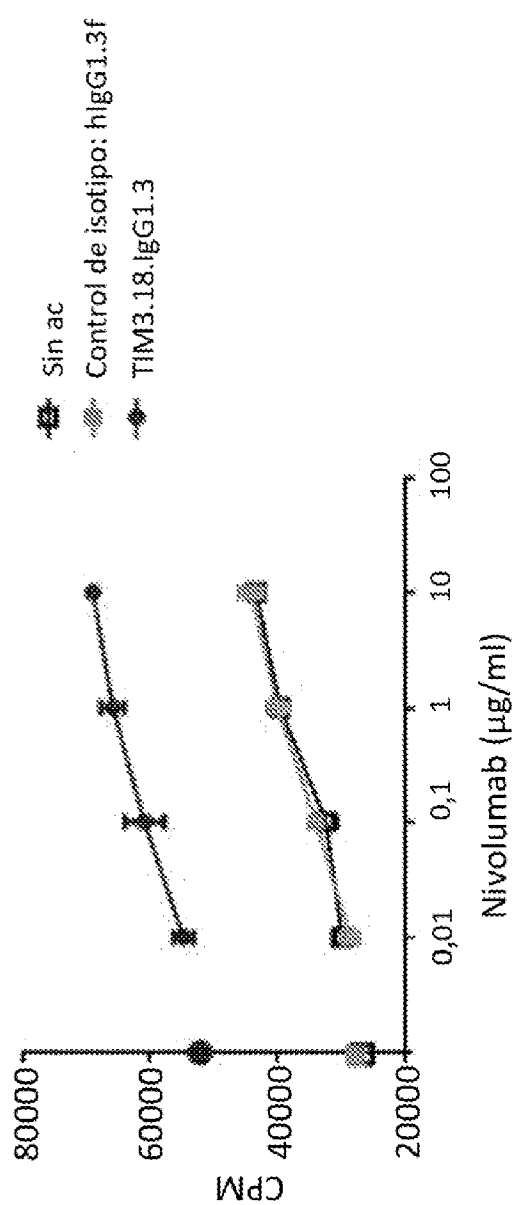


FIG. 31

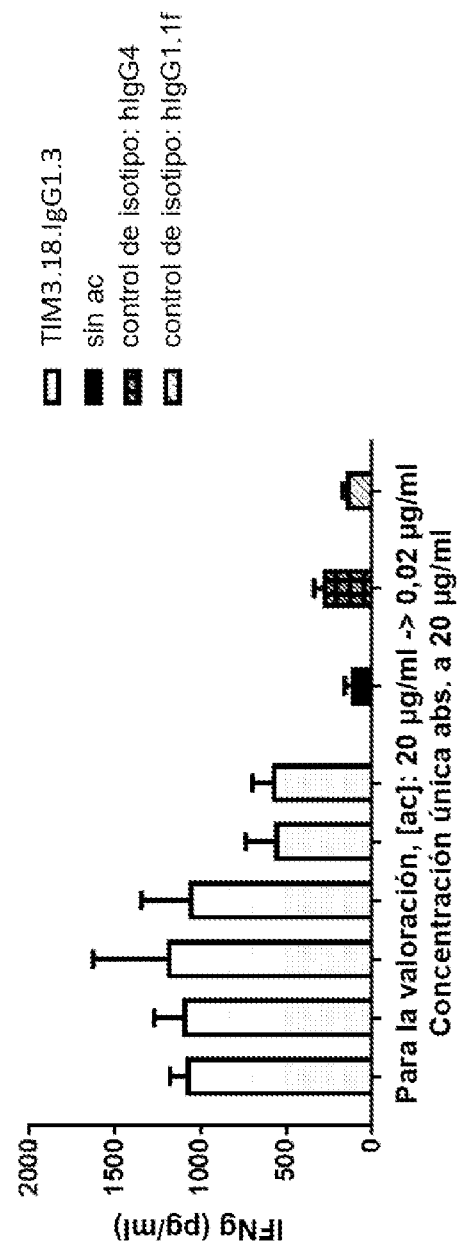


FIG. 32

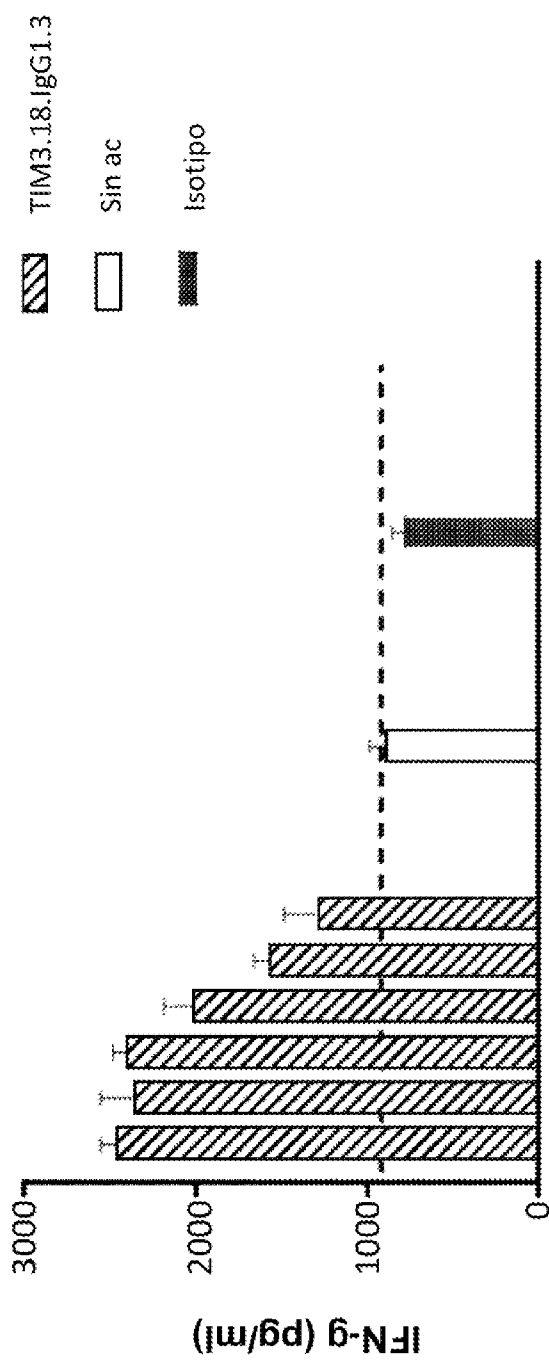


FIG. 33

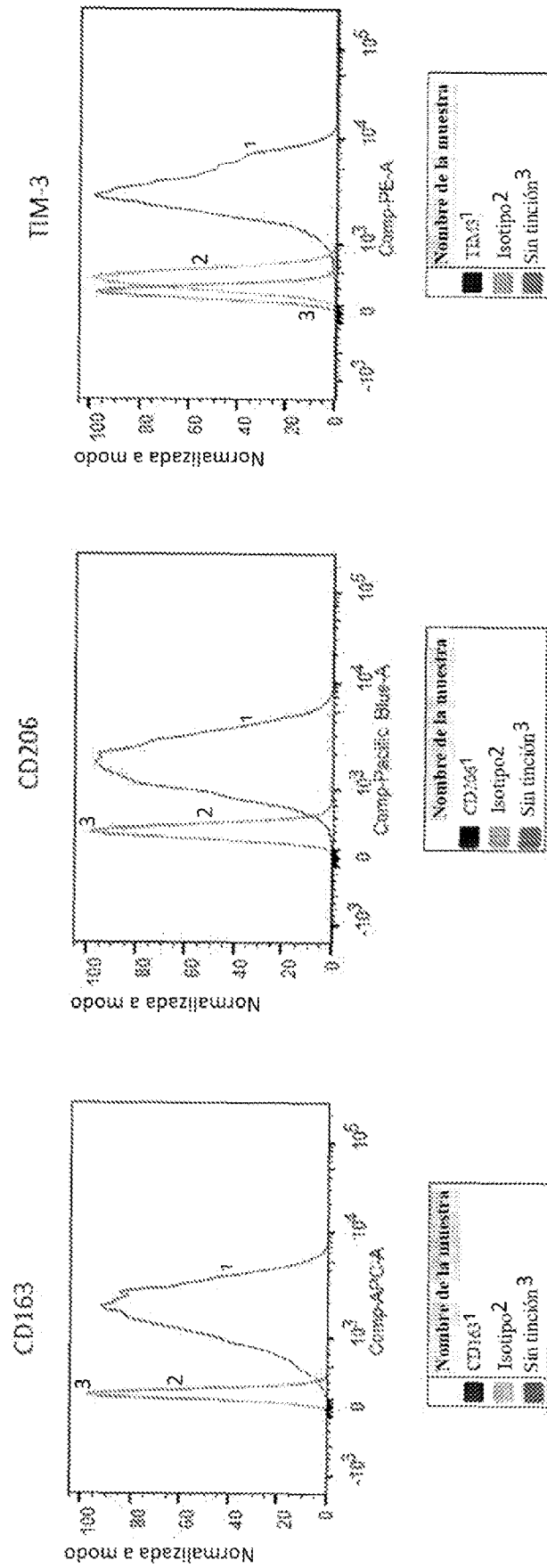


FIG. 34

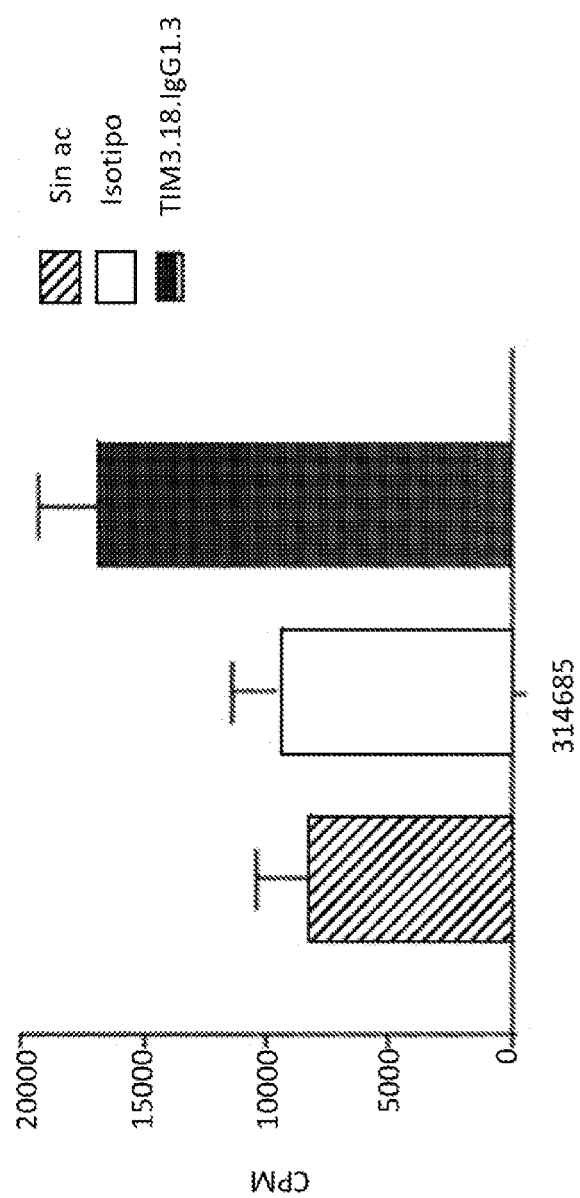


FIG. 35

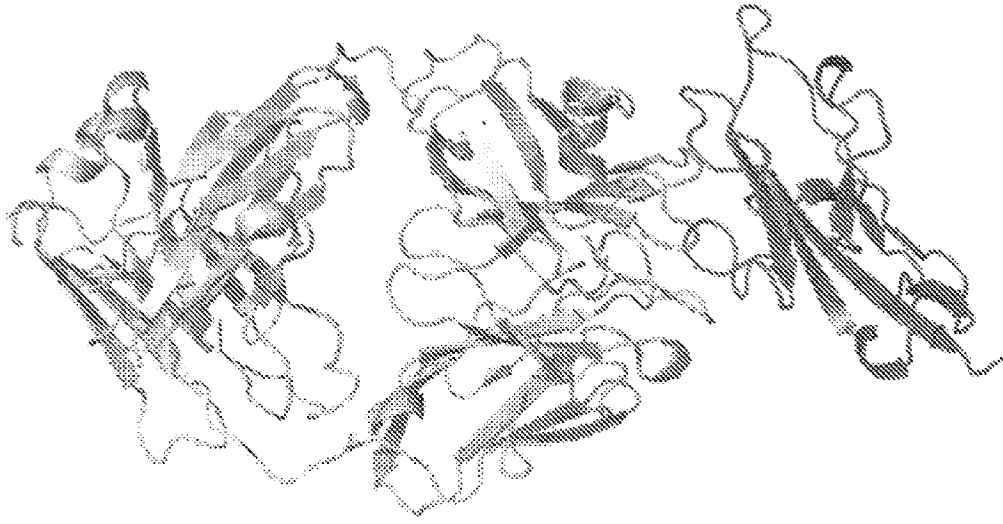


FIG. 36

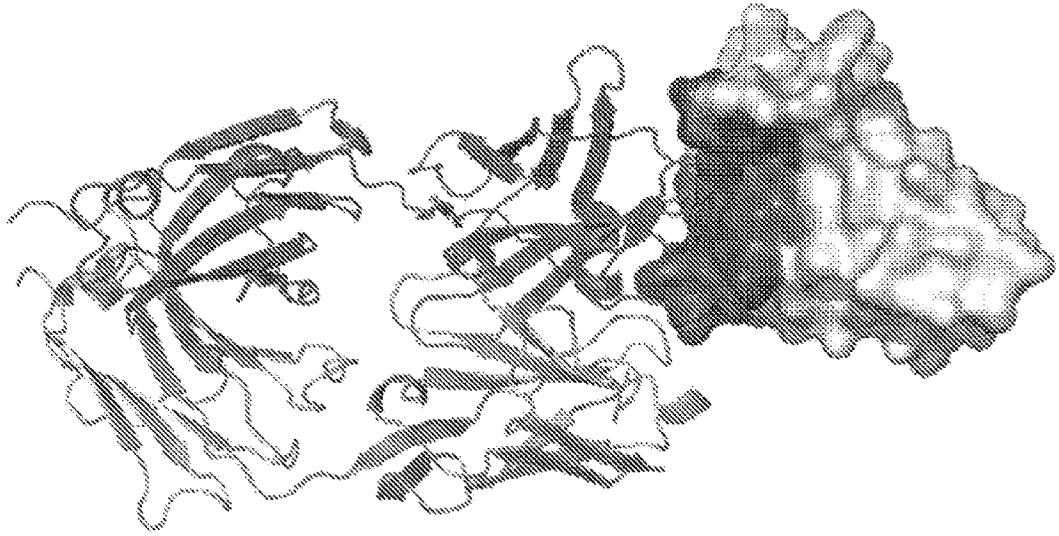
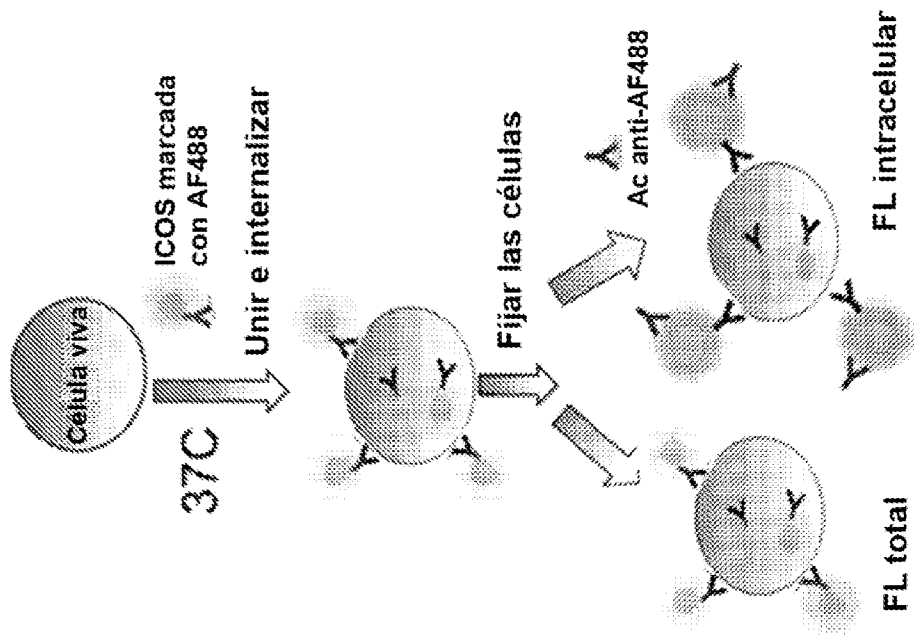
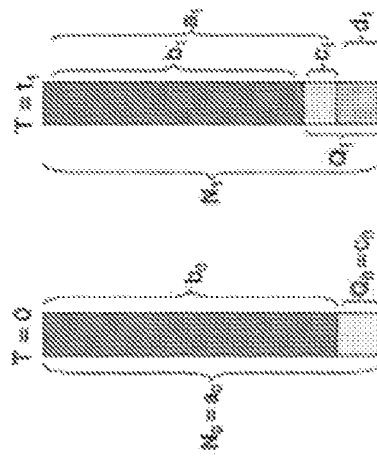


FIG. 37



Calcular la internalización



- = superficie inactivable (b)
- = superficie residual (c)
- = Internalizada (d)

$$\text{fracción internalizada} = \frac{Q_1 - Q_0}{N - Q_0} = \frac{Q_1 - Q_0}{N - Q_0}$$

FIG. 38

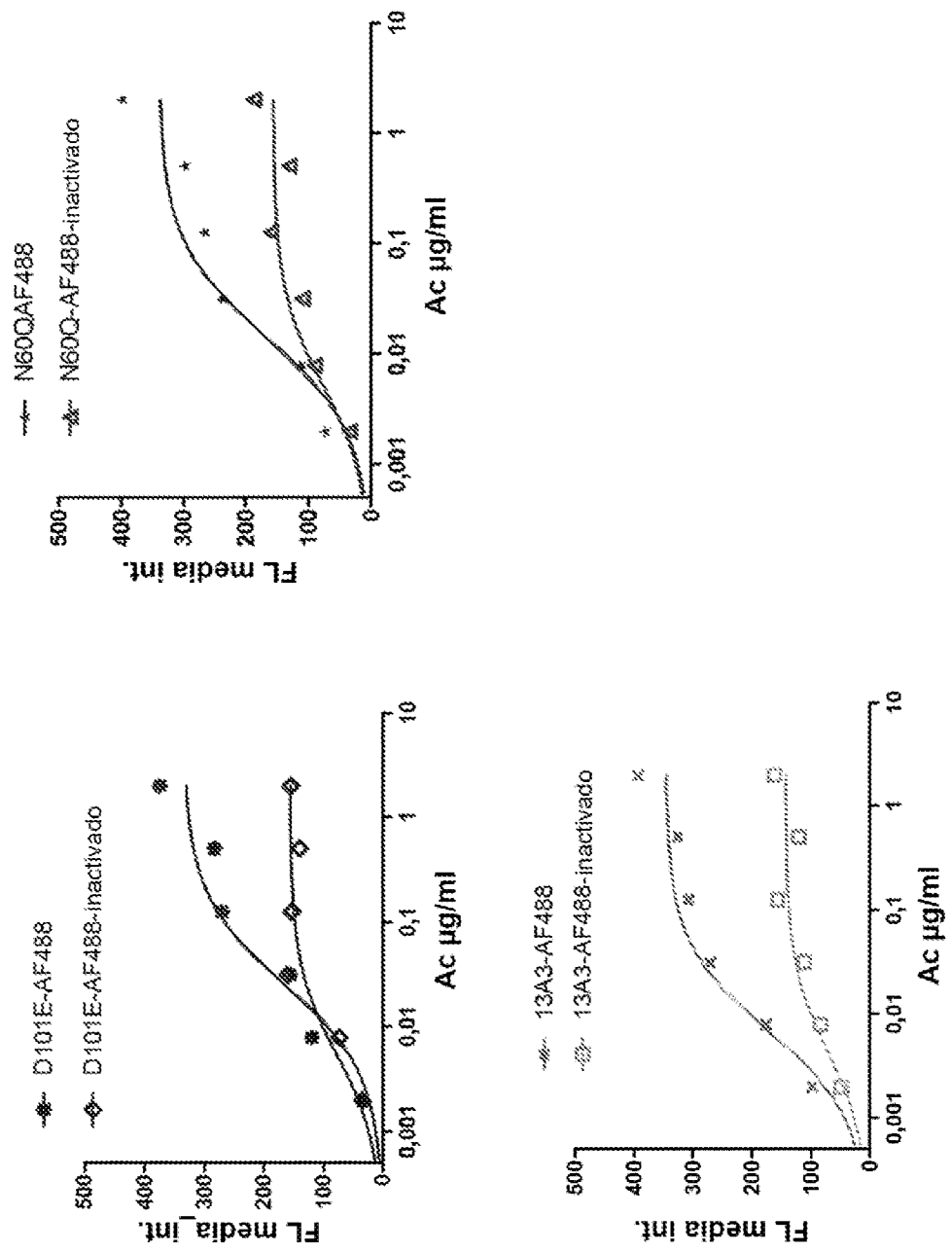


FIG. 39A

13A3

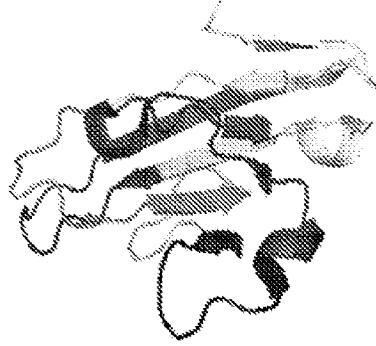


⁶⁸VPVCGWKGACPVFE⁹²

¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷

FIG. 39B

3G4



⁶⁸YTMAFGNGLVPVCGWKGAC⁹²

⁶⁸VPVCGWKGACPVFE⁹²

⁶⁸WLRDTERDINY⁷⁷

⁷⁰WTSRYWLNGDFFRKGDVSL⁹⁵

¹¹¹RIQIPGIMNDEKFNKL¹²⁷