



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111201030 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 01

(21) 申请号 201880061694.6  
(22) 申请日 2018.07.24  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 111201030 A  
(43) 申请公布日 2020.05.26  
(30) 优先权数据  
    62/536,886 2017.07.25 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
    2020.03.23  
(86) PCT国际申请的申请数据  
    PCT/US2018/043513 2018.07.24  
(87) PCT国际申请的公布数据  
    W02019/023247 EN 2019.01.31  
(73) 专利权人 真和制药有限公司  
    地址 美国加利福尼亚州  
(72) 发明人 D·孙 Y·王  
(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所  
    11313  
    专利代理师 刘文娜 郝名悦  
(51) Int.Cl.  
    A61K 38/17 (2006.01)  
    A61K 39/00 (2006.01)  
    A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
G01N 33/574 (2006.01)  
(56) 对比文件  
    US 2004223971 A1,2004.11.11  
    US 2010143954 A1,2010.06.10  
    US 2014086932 A1,2014.03.27  
    US 2015218274 A1,2015.08.06  
    徐跃 等.半乳糖凝集素 及其相关抑制剂的  
    研究进展.中国生化药物杂志.2011,第32卷(第5  
    期),第420页第3.4节.  
    徐跃 等.半乳糖凝集素 及其相关抑制剂的  
    研究进展.中国生化药物杂志.2011,第32卷(第5  
    期),第420页第3.4节.  
    Olga V. Glinskii et al..Mechanical  
    Entrapment Is Insufficient and  
    Intercellular Adhesion Is Essential for  
    Metastatic Cell Arrest in Distant  
    Organs.Neoplasia.2005,第7卷(第5期),第522  
    页摘要第18-22行、第523页左栏材料方法部分第  
    1-4行. (续)

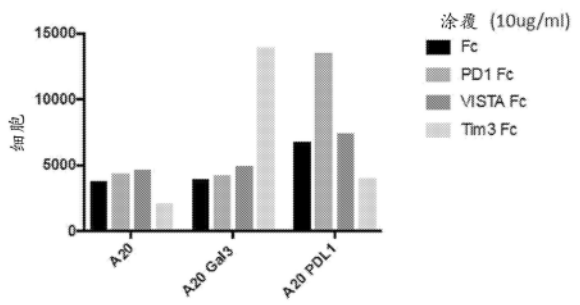
审查员 王李娜

权利要求书4页 说明书35页 附图19页

(54) 发明名称  
    通过阻断TIM-3和其配体的相互作用治疗癌  
    症

(57) 摘要  
    本文提供激活患者的免疫应答和/或治疗癌  
    症的方法,所述方法包括向患者施用干扰Gal3和  
    TIM-3之间的相互作用的Gal3:TIM-3抑制剂,其  
    中所述抑制剂以足以激活免疫应答的量施用。还  
    提供可以阻断Gal3和TIM3之间的相互作用的人  
    源化抗Gal3抗体和使用抗Gal3抗体治疗癌症的  
    方法。还提供用于确定患者的癌症是否适于用  
    Gal3:TIM-3抑制剂治疗的方法以及选择可以阻

断Gal3和TIM-3之间的相互作用、激活免疫应答  
和/或治疗癌症的化合物的方法。



[接上页]

**(56) 对比文件**

Olga V. Glinskii et al..Mechanical Entrapment Is Insufficient and Intercellular Adhesion Is Essential for Metastatic Cell Arrest in Distant Organs.Neoplasia.2005,第7卷(第5期),第522

页摘要第18-22行、第523页左栏材料方法部分第1-4行.

Shin Foong Ngiow et al..Anti-TIM3 Antibody Promotes T Cell IFN-g-Mediated Antitumor Immunity and Suppresses Established Tumors.Microenvironment and Immunology.2011,第71卷(第10期),全文.

1. 干扰Gal3和TIM-3之间的相互作用的抗体在制造用于治疗患者的黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌的药物中的用途，

其中抗体包含

(1) 包含互补决定区 (CDR) L1、CDR L2和CDR L3的轻链可变区，和

(2) 包含CDR H1、CDR H2和CDR H3的重链可变区，其中：

CDR L1由是SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成，

CDR L2由是SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成，

CDR L3由是SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成，

CDR H1由是SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成，

CDR H2由是SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成，

CDR H3由是SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

2. 根据权利要求1所述的用途，其中所述TIM-3在免疫细胞上表达。

3. 根据权利要求1或2所述的用途，其中所述患者患有癌症，其中所述Gal3和TIM-3之间的相互作用发生在肿瘤微环境中，并且其中免疫应答的激活减轻所述患者的癌症负担。

4. 根据权利要求3所述的用途，其中所述黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌包括在肿瘤微环境中的细胞，其中所述细胞在细胞表面上过度表达Gal3。

5. 抗体在制造用于减少黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌患者的肿瘤负荷的药物中的用途，其中将所述药物施用至患有包括在肿瘤微环境中的细胞的癌症的患者，所述细胞在它们的表面上过度表达Gal3，其中所述抗体干扰在所述肿瘤微环境中在免疫细胞上的Gal3和TIM-3之间的相互作用，并且其中所述抗体以足以减轻所述患者的肿瘤负荷的量施用，

其中抗体包含

(1) 包含互补决定区 (CDR) L1、CDR L2和CDR L3的轻链可变区，和

(2) 包含CDR H1、CDR H2和CDR H3的重链可变区，其中：

CDR L1由是SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成，

CDR L2由是SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成，

CDR L3由是SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成，

CDR H1由是SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成，

CDR H2由是SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成，

CDR H3由是SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求2所述的用途，其中免疫细胞是T细胞并且激活免疫应答通过激活T细胞。

7. 根据权利要求3所述的用途，其中所述癌症是转移癌或原发性癌。

8. 根据权利要求5所述的用途，其中所述抗体是单链抗体或Fab。

9. 根据权利要求5所述的用途，其中所述抗体是人源化抗体或人抗体。

10. 根据权利要求1、2和4-9中任一项所述的用途，其中所述抗体的施用是通过静脉输注。

11. 根据权利要求1、2和4-9中任一项所述的用途，其中所述抗体与一种或多种其他疗法组合施用。

12. 根据权利要求11所述的用途，其中所述一种或多种其他疗法选自由化学疗法、放射

疗法、检查点抑制剂疗法组成的组。

13. 根据权利要求11所述的用途,其中所述检查点抑制剂疗法选自由抗PD-1疗法和抗CTLA4疗法组成的组。

14. 根据权利要求1、2、4-9、12和13中任一项所述的用途,其中所述抗体是每隔一周施用10 $\mu$ g/kg体重至100mg/kg体重之间的剂量。

15. 抗Ga13抗体在制造用于确定患者的黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌是否适于用抗Ga13抗体治疗的药物中的用途,所述确定包括:

将从患者的黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌的肿瘤微环境中获得的细胞与抗Ga13抗体结合;

确定所述细胞上Ga13的水平;

比较所述细胞的表面上Ga13的水平与Ga13的第一阈值活性值;以及

如果所述细胞的表面上Ga13的水平高于所述第一阈值活性值,则确定所述患者的黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌适于用抗Ga13抗体治疗,

其中抗Ga13抗体包含

(1) 包含互补决定区(CDR)L1、CDR L2和CDR L3的轻链可变区,和

(2) 包含CDR H1、CDR H2和CDR H3的重链可变区,其中:

CDR L1由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成,

CDR L2由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成,

CDR L3由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成,

CDR H1由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成,

CDR H2由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成,

CDR H3由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述Ga13的第一阈值活性值源自至少100名与所述患者具有相同类型癌症的测试个体的队组。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中确定所述患者的黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌适于治疗的步骤进一步包括确定与Ga13的第二阈值活性值相比从所述肿瘤微环境中获得的细胞表面上Ga13的水平是否是25%或更高,其中所述第二阈值活性值源自包含来自健康患者的相应细胞的样本。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的用途,其中从所述肿瘤微环境获得的细胞至少包括癌细胞和/或肿瘤相关的巨噬细胞。

19. 根据权利要求17所述的用途,其中确定所述患者的黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌适于治疗的步骤进一步包括确定与所述第二阈值活性值相比从肿瘤微环境获得的细胞表面上Ga13的水平是否是75%或更多。

20. 一种用于治疗黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌的无菌溶液,所述无菌溶液包含能够干扰癌症患者的T细胞上Ga13和TIM-3之间的相互作用的抗Ga13抗体,其中所述无菌溶液包含在适于1-4小时时段内静脉内递送的100ml无菌溶液中的每公斤患者体重在10 $\mu$ g和100mg之间的抗Ga13抗体,

其中抗Ga13抗体包含

(1) 包含互补决定区(CDR)L1、CDR L2和CDR L3的轻链可变区,和

(2) 包含CDR H1、CDR H2和CDR H3的重链可变区,其中:

CDR L1由是SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成,

CDR L2由是SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成,

CDR L3由是SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成,

CDR H1由是SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成,

CDR H2由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成,

CDR H3由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

21. 根据权利要求20所述的无菌溶液,其中所述无菌溶液进一步包含一种或多种其他检查点抑制剂抗体。

22. 根据权利要求21所述的无菌溶液,其中一种或多种其他检查点抑制剂抗体选自由抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体组成的组。

23. 根据权利要求20-22中任一项所述的无菌溶液,其中所述无菌溶液进一步包含一种或多种直径在10nm和100nm之间的纳米颗粒。

24. 一种人源化抗Ga13抗体,其中所述抗体包含:

(1) 包含互补决定区 (CDR) L1、CDR L2和CDR L3的轻链可变区和 (2) 包含CDR H1、CDR H2和CDR H3的重链可变区,其中:

所述CDR L1由是SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成,

所述CDR L2由是SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成,

所述CDR L3由是SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成,

所述CDR H1由是SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成,

所述CDR H2由是SEQ ID NO:10的氨基酸组成,以及所述CDR H3由是SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

25. 根据权利要求24所述的人源化抗Ga13抗体,其中所述重链可变区具有与SEQ ID NO:25的氨基酸序列具有至少90%同一性的序列。

26. 根据权利要求24或25所述的人源化抗Ga13抗体,其中所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少90%同一性的序列。

27. 权利要求24-26中任一项所述的人源化抗Ga13抗体在制造用于治疗患者的黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌的药物中的用途,其中所述抗Ga13抗体以足以激活患者免疫应答的量施用。

28. 抗体在制造用于治疗患者的黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌的药物中的用途,其中所述抗体的施用激活患者的免疫应答,其中抗体包含

(1) 包含互补决定区 (CDR) L1、CDR L2和CDR L3的轻链可变区,和

(2) 包含CDR H1、CDR H2和CDR H3的重链可变区,其中:

CDR L1由是SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成,

CDR L2由是SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成,

CDR L3由是SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成,

CDR H1由是SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成,

CDR H2由是SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成,

CDR H3由是SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

29. 权利要求24-26中任一项所述的人源化抗Ga13抗体在制造用于减少黑素瘤、乳腺癌、肾癌和/或结肠癌患者的肿瘤负荷的药物中的用途,其中将所述药物施用至患有包括在肿瘤微环境中的细胞的癌症的患者,所述细胞在它们的表面上过度表达Ga13,其中所述抗体干扰在肿瘤微环境中在免疫细胞上的Ga13和TIM-3之间的相互作用,并且其中所述抗体以足以减轻所述患者的肿瘤负荷的量施用。

## 通过阻断TIM-3和其配体的相互作用治疗癌症

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2017年7月25日提交的美国临时申请No.62/536,886的权益。为了所有目的,所述临时申请通过引用将其全部纳入本文。

### 背景技术

[0003] 人类癌症具有许多遗传的和表观遗传的改变,产生潜在地能够被免疫系统识别的新抗原。尽管在临床前的模型和患者中观察到对癌症的内源性免疫应答,但该应答是无效的,并且经常将建立的癌症视为“自身的”并被免疫系统耐受。另外,肿瘤可能利用数种不同的机制来主动地抑制宿主免疫应答。在这些机制中,肿瘤可以用免疫检查点来逃避免疫破坏,免疫检查点涉及通常终止免疫应答以减轻附带组织损害的免疫系统的各种负调节剂。

[0004] T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3 (TIM-3) 被称为T细胞激活的这种负调节剂之一,然而T细胞激活的TIM-3抑制的机制大部分是未知的。早期一直努力鉴定该调节中的TIM-3的配体,但是数据不一致且不可靠。例如,在2005年报道半乳糖凝集素9 (Ga19) 可结合至TIM-3 (Zhu等, Nature Immunology 6, 1245); 然而,后来的报道示出TIM-3和Ga19的相互作用在本质上是非特异性的 (Leitner等, PLoS Pathog 9(3): e1003253)。CEACAM1也被报道作为TIM-3配体来调节T细胞耐受性和耗竭 (Huang等, Nature 517, 386)。但是, Huang的结果与发明人自己的数据不一致,该数据示出TIM-3不结合至CEACAM1 (参见以下)。

### 发明内容

[0005] 本发明基于TIM-3与新型的配体半乳糖凝集素-3 (Ga13) 的相互作用并且该相互作用导致免疫应答例如T细胞激活的抑制的令人惊讶的发现。本发明提供阻断相互作用、激活免疫应答以及因此治愈癌症的新的组合物和方法。

[0006] 在一些实施方式中,本公开提供在患者中激活免疫应答的方法,其包括向患者施用干扰患者中Ga13和TIM-3之间的相互作用的Ga13:TIM-3抑制剂,其中以足以激活免疫应答的量施用所述抑制剂。在一些实施方式中,患者患有(host) 癌症并且Ga13和TIM-3之间的相互作用发生在肿瘤微环境中。在一些实施方式中,免疫应答的激活减轻患者的癌症负担(cancer load)。在一些实施方式中,TIM-3存在于免疫细胞上。在一些实施方式中,患者患有癌症并且Ga13在肿瘤微环境中过度表达以及以足以减轻患者的癌症负担的量施用Ga13:TIM-3抑制剂。在一些实施方式中,癌症包括在它们的表面上过度表达Ga13的癌细胞。在一些实施方式中,在其上表达TIM-3的免疫细胞是T细胞和/或NK细胞。

[0007] 在一些实施方式中,本公开提供激活患有包含肿瘤微环境中细胞的癌症的患者中的T细胞的方法,其中该细胞过度表达Ga13,该方法包括向患者施用干扰T细胞上Ga13和TIM-3之间的相互作用的Ga13:TIM-3抑制剂,其中以足以通过T细胞的激活来减轻患者的癌症负担的量施用所述抑制剂。

[0008] 任选地,肿瘤微环境中的细胞包含癌细胞。任选地,肿瘤微环境中的细胞包含肿瘤相关的巨噬细胞(TAM),例如,M2 TAM。

[0009] 在一些实施方式中,Ga13:TIM-3抑制剂结合至TIM-3。在一些实施方式中,Ga13:TIM-3抑制剂结合至Ga13。

[0010] 在一些实施方式中,本公开提供用于确定患者的癌症是否适于用Ga13:TIM-3抑制剂治疗的方法,所述方法包括:将从患者的已知类型的肿瘤微环境获得的细胞与对Ga13特异性的抗体结合;测定样本中原发性癌细胞表面上的Ga13的水平;将细胞表面上Ga13的水平与Ga13的第一阈值活性值比较;以及如果原发性癌细胞表面上Ga13的水平高于第一阈值活性值,则确定患者的癌症为适于用Ga13:TIM-3抑制剂治疗。

[0011] 在一些实施方式中,Ga13的第一阈值活性值来源于至少100名与患者样本具有相同类型癌症的测试个体的队组(cohort)。在一些实施方式中,Ga13的第一阈值活性值基于来自健康个体的相似组织类型的细胞表面上Ga13的平均值(average)水平、均值(mean)水平或中值(median)水平。

[0012] 在一些实施方式中,本公开提供能够干扰癌症患者中T细胞上Ga13和TIM-3之间的相互作用的无菌溶液,其中该溶液包含在适于在1-4小时时段内静脉内递送的100ml溶液中每公斤患者体重在10 $\mu$ g和100mg之间的抗体,其中抗体可以干扰T细胞上Ga13和TIM-3之间的相互作用。在一些实施方式中,无菌溶液进一步包含一种或多种其他的检查点抑制剂抗体。在一些实施方式中,多种其他的检查点抑制剂抗体之一选自由抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体组成的组。

[0013] 在一些实施方式中,本公开提供生产能够干扰Ga13和TIM-3之间的相互作用的抗Ga13抗体的方法,该方法包括:将包含如SEQ ID NO:5-8规定的序列中的任一序列的肽引入到动物中,其中该动物生产抗Ga13抗体。

[0014] 在一些实施方式中,本公开提供人源化抗Ga13抗体,其中抗体包括:(1)包含互补决定区(CDR)L1、CDR L2和CDR L3的轻链可变区;和(2)包含CDR H1、CDR H2和CDR H3的重链可变区,其中CDR L1包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,CDR L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,CDR H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,以及CDR H3包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方式中,人源化抗体的重链可变区具有与SEQ ID NO:25的氨基酸序列具有至少90%同一性的序列。在一些实施方式中,人源化抗体的轻链可变区具有与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少90%同一性的序列。

[0016] 在一些实施方式中,人源化抗体能够阻断Ga13和TIM-3之间的相互作用,从而激活免疫应答。

[0017] 在一些实施方式中,本公开提供选择能够阻断患者中Ga13和TIM-3之间的相互作用、激活免疫应答和/或治疗癌症的化合物的方法,所述方法包括:(a)将化合物文库(library)与Ga13和TIM-3接触,以及(b)从文库中选择一种或多种能够阻断Ga13和TIM-3之间的相互作用的候选化合物。在一些实施方式中,所述方法进一步包括:(c)将选自步骤(b)的一种或多种候选化合物与包含T细胞和同种异体抗原呈递细胞的混合物接触,并且鉴定一种或多种能够刺激T细胞的化合物,和/或(d)向患有肿瘤的哺乳动物施用选自步骤(b)的一种或多种候选化合物,并且鉴定一种或多种能够降低哺乳动物的肿瘤负担的化合物,以及任选地(e)向患者施用有效量的能够刺激T细胞和/或能够降低哺乳动物的肿瘤负担的化合物,从而激活免疫应答和/或治疗患者的癌症。在一些实施方式中,化合物为抗体。



[0018] 在一些实施方式中,本公开提供如以上任一实施方式中公开的Gal3:TIM-3抑制剂用于激活患者的免疫应答的方法,所述方法包括向患者施用干扰Gal3和TIM-3之间的相互作用的Gal3:TIM-3抑制剂,其中以足以激活免疫应答的量施用所述抑制剂。任选地,Gal3:TIM抑制剂为以上所述的人源化抗Gal3抗体。

[0019] 在一些实施方式中,本公开提供如以上任一实施方式中公开的Gal3:TIM-3抑制剂在制造用于激活免疫应答和/或治疗癌症的药剂(即药物组合物)中的用途。任选地,Gal3:TIM抑制剂为以上所述的人源化抗Gal3抗体。

## 附图说明

[0020] 图1示出表明人Gal3 (hGal3) 特异性拉下 (pull down) 人TIM-3 (hTIM-3) 的免疫共沉淀实验的结果。图1A示出在用编码HA标记的hTIM-3的质粒和编码hGal3、hGal9或hCEACAM1的质粒共转染的293T细胞中TIM-3的表达。图1B示出hGal9、hGal3或hCEACAM1的表达。图1C示出hGal3而不是CEACAM1拉下共转染的293T细胞中的HA标记的hTIM-3。结果还示出人Gal9 (hGal9) 拉下hTIM-3,但是拉下伴随着蛋白质聚集 (图1B),这表明hGal9和hTIM-3之间的结合可能是非特异性的。

[0021] 图2示出使用包括与hIgG的Fc部分融合的hTIM-3胞外结构域的融合蛋白 (hTIM-3Fc) 的拉下实验的结果。结果示出Gal3和TIM-3之间的结合是特异性的。如在该图中示出, hTIM-3Fc而不是hFc或hPD1 Fc,从293T细胞拉下过度表达的Flag-标记的hGal3蛋白。

[0022] 图3示出表明hGal3和hTim3之间的特异性相互作用的细胞粘附实验的结果。如在该图中示出,与涂覆hVISTA Fc或hPD1 Fc的板相比,显著更高数量的表达hGal3的A20细胞 (A20 Gal3细胞) 能够粘附至涂覆hTIM-3Fc的板。结果还表明,与涂覆人VISTA Fc (hVISTA Fc) 的板或涂覆hTIM-3Fc的板相比,更高数量的A20 PDL1细胞能够粘附至涂覆hPD1 Fc的板。

[0023] 图4A示出通过流式细胞术分析的活的A20细胞 (峰值在左边) 和死亡A20细胞 (峰值在右边)。图4B和图4C示出用抗hFc APC抗体染色的活的细胞 (图4B) 和死亡细胞 (图4C) 的流式细胞术分析的结果。在组1中,在mTIM-3Fc蛋白不存在的情况下,孵育A20 Gal3细胞作为对照;在组2中,用mTIM-3Fc蛋白孵育A20 Gal3细胞;在组3、组4和组5中,除了mTIM-3Fc蛋白之外,还添加抗小鼠TIM-3多克隆抗体 (R&D System, Minneapolis, MN) (组3)、单克隆抗体 RMT3-23 (Bio X cell, West Lebanon, NH) (组4)、单克隆抗体215015 (R&D Systems) (组5) 以测试这些抗体是否能够阻断Gal3和Tim3结合。

[0024] 图5A-图5C示出表明在TIM-3上Gal3的特异性结合的ELISA结果。在图5A中,以10ug/ml的mGal3涂覆板,示出mGal3多克隆抗体 (mGal3pAb) 和单克隆抗体IMT001而不是单克隆抗体M3/38阻断Gal3和Tim3之间的相互作用。图5B示出乳糖阻断Gal9与TIM-3而不是Gal3与TIM-3的结合,这表明Gal3和Tim3之间的结合是不依赖糖的结合。图5C示出抗体 RMT3-23阻断磷脂酰丝氨酸 (PS) 与TIM-3而不是Gal3与Tim3的结合,这表明TIM-3上的结合至Gal3的表位与结合至PS的那些不同。

[0025] 图6A和图6B示出过度表达的Gal3抑制T细胞激活。图6A示出小鼠A20细胞克隆#41、#31和#15过度表达Gal3。图6B示出当这些细胞与小鼠D011.10 T细胞混合时,与亲本的A20细胞相比,产生更少的IL-2 (图6B)。

[0026] 图7A-图7E示出在肺转移(lung metastasis)模型中Ga13抗体具有抗肿瘤活性。图7A示出在B16F10肿瘤细胞上Ga13的高表达。图7B示出来自三个治疗组的整个肺的代表性图像。图7C示出左肺叶表面上转移集落的数目(均值 $\pm$ SEM)。图7D和图7E示出不同治疗组的肺重量和体重(均值 $\pm$ SEM)。与用同种型(isotype)对照治疗的动物相比,用单克隆抗人Ga13抗体治疗的动物示出肿瘤数量的显著减少( $p<0.01$ ) (图7B) 并且如通过肺重量表示的更少的肿瘤负担( $p<0.05$ ) (图7D)。然而,在这个肺转移模型中,用PD1抗体治疗的动物没有示出肿瘤数量或负担的显著减少( $p>0.05$ )。图7E示出用PD1抗体或Ga13抗体治疗的动物具有与对照组相似的体重,表明不存在与任何一种抗体的施用相关的不良影响。

[0027] 图8A-图8C示出Ga13抗体在4T1原位肿瘤(orthotopic tumor)诱导的肺转移中的抗肿瘤活性。图8A示出已经被植入4T1细胞然后用对照抗体(“同种型”)或IMT001治疗的小鼠肺上转移的肿瘤集落(tumor colonies)的图像。在30天的时期内,在第0天、第3天、第7天、第10天和第14天腹腔内施用抗体。在第30天处死小鼠时拍摄图像。图8B示出在相同时期内这些小鼠的体重测量值。图8C示出在第30天这些小鼠的左叶的表面上转移的肿瘤集落的数目。

[0028] 图9示出植入Renca肿瘤细胞和用Ga13抗体治疗的小鼠中的肿瘤生长。与植入Renca肿瘤细胞和用同种型对照抗体(“iso”)治疗的小鼠相比,用Ga13抗体(“IMT001”)治疗的小鼠示出肿瘤尺寸的大幅减小( $p<0.05$ ),而抗小鼠PD-1抗体29F没有作用( $p>0.05$ )。

[0029] 图10示出在植入MC38结肠癌细胞并用抗Ga13抗体治疗的小鼠中的肿瘤生长。与植入MC38肿瘤细胞且用同种型对照抗体(“iso”)治疗的小鼠相比,用Ga13抗体(“IMT001”)治疗的小鼠示出肿瘤尺寸的大幅减小( $p<0.05$ )。

[0030] 图11A-图11D示出表位定位的结果。合成了来源于hGa13蛋白序列的肽阵列(图11A),并用抗Ga13抗体IMT001进行斑点印迹(图11B)。肽5和肽6示出良好信号,表明抗Ga13单克隆抗体IMT001可以结合至这些肽。为了进一步定位这些肽上IMT001的结合表位,合成来源于这些肽序列的一些较短的肽(图11C),并且通过ELISA检测它们与IMT001的结合(图11D)。具有序列GQAPPGAYPG(SEQ ID NO:8)的肽产生最高的信号。

[0031] 图12概述了来自植入B16F10细胞的小鼠的表达各种淋巴细胞标记物:CD3、CD4、CD8、CD19或DX5的免疫细胞数量。这些小鼠已经用同种型对照抗体或IMT001治疗。

[0032] 图13A和图13B示出在免疫组织化学(IHC)测定中人肺癌的肿瘤相关的巨噬细胞上的Ga13表达。使用IMT001染色人肺癌冷冻切片以检测肿瘤相关的巨噬细胞上的Ga13表达。图13A示出来自染色鳞状细胞癌的结果,且图13B示出来自腺癌染色的结果。

[0033] 图14A-图14C示出在人M2巨噬细胞上(图14C)而不是在树突状细胞(DC)上(图14A)或M1巨噬细胞上(图14B)检测到Ga13的表达。

[0034] 图15示出在小鼠巨噬细胞/T细胞反应中Ga13抗体(“IMT001”)的免疫活性。图15B示出与对照组(图15A)相比,通过IHC在小鼠巨噬细胞系RAW264.7上检测的Ga13的表达。图15C示出使用IMT001染色的细胞通过流式细胞术在小鼠巨噬细胞系上Ga13的表达。抗Ga13抗体IMT001而不是小鼠PD-1抗体29F,提高了在RAW巨噬细胞/D011.10 T细胞混合反应中IL-2的产生(图15D)。

## 具体实施方式

### [0035] 定义

[0036] 如本文所使用的术语“一个/一种” (“a”)、“一个/一种” (“an”)或“该”不仅包括具有一个/一种成员的方面,而且还包括具有一个/一种以上的成员的方面。例如,单数形式的“一个/一种” (“a”)、“一个/一种” (“an”)或“该”包括复数对象,除非上下文另外明确指出。因此,例如提到“一种细胞”包括多种这样的细胞,以及提到“该药剂”包括提及本领域技术人员已知的一种或多种药剂,等等。

[0037] 术语“包含/包括”是指组成包括所列举的要素,但不排除其他要素。因此,包含也可以指组成仅包括所列举的要素。例如,轻链包含SEQ ID NO:24,包括该轻链具有如SEQ ID NO:24所示的序列的情况。

[0038] 术语“受试者”、“患者”或“个体”在本文中可互换使用以指人或动物。例如,动物受试者可以为哺乳动物、灵长类动物(例如猴子)、牲畜动物(例如马、奶牛(cow)、绵羊、猪或山羊)、陪伴动物(例如狗、猫)、实验室测试动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、鸟)、具有兽医学意义的动物或具有经济学意义的动物。

[0039] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以包括氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基为相应地天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,也适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。如本文使用的,术语涵盖任何长度的氨基酸链,包括全长度蛋白质(即抗原),其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0040] 术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物(mimetic)。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及之后被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物包括具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团结合的 $\alpha$ 碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这种类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但是保留了与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”包括具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化学化合物。

[0041] 本文氨基酸可以用众所周知的三个字母符号或由IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的一个字母的符号表示。同样,核苷酸可以用它们普遍接受的单字母代码表示。

[0042] 术语“治疗有效量”或“有效量”包括达到所期望的治疗效果或预防效果所需的剂量和时段的有效量(amount)或量(quantity)。

[0043] 术语“施用”包括口服施用、局部接触、作为栓剂施用、静脉内施用、腹膜内施用、肌肉内施用、病灶内施用、鞘内施用、鼻内施用或皮下施用或向受试者植入缓释装置例如微型渗透泵。通过任何途径施用,包括肠胃外和透粘膜(例如颊、舌下、腭、牙龈、鼻、阴道、直肠或经皮)。肠胃外施用包括例如静脉内、肌肉内、小动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内施用。其他递送方式包括但不限于使用脂质体制剂、静脉输注、透皮贴剂等。本领域技术人员将知晓施用本文所述的治疗有效量的Gal3:TIM-3抑制剂来干扰T细胞上Gal3和TIM-3之间的相互作用以减轻患者的癌症负担的其他方法。“共同施用”是指在施用本文所述的第二化合物的同时、刚好之前或刚好之后施用本文所述的第一化合物。

[0044] 术语“肿瘤”和术语“癌症”在本文中可互换使用且两者都指是过度的细胞分裂导致的组织异常生长。

[0045] 术语“肿瘤微环境”指其中存在肿瘤的细胞环境,包括肿瘤细胞和周围的血管、免疫细胞、纤维母细胞、骨髓源性炎症细胞、淋巴细胞、信号分子和胞外基质。

[0046] 术语“免疫细胞”指涉及抗原的特异性识别的造血起源的细胞。免疫细胞包括抗原呈递细胞(APC)如树突状细胞或巨噬细胞;B细胞;T细胞;自然杀伤细胞;和髓样细胞(myeloid cell)如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0047] 术语“免疫应答”指T细胞介导的和/或B细胞介导的免疫应答。示例性的免疫应答包括B细胞应答(例如抗体产生)、T细胞应答(例如细胞因子产生和细胞的细胞毒性)和细胞因子应答细胞例如巨噬细胞的激活。术语“激活免疫应答”指使用本领域技术人员已知的方法提高T细胞介导的和/或B细胞介导的免疫应答的水平。在一个实施方式中,提高的水平为至少20-50%,可替代地至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少120%、至少150%或至少200%。

[0048] 术语“识别”指分子能够特异性地和选择性地结合至第二分子的现象。通常地,特异性结合或选择性结合将为背景信号或噪音的至少两倍,且更通常地是大于背景的10至100倍。

[0049] 术语“Gal3:TIM-3抑制剂”指抑制Gal3和TIM-3之间相互作用的分子并且该抑制导致T细胞激活。

[0050] 术语“TIM-3:Gal3”或“Gal3:TIM-3”途径指其中TIM-3结合至Gal3的信号途径,并且相互作用抑制T细胞激活。

[0051] 术语“激活T细胞”指的是T细胞被激活并参与促进免疫应答的信号途径的现象。通常,T细胞的激活通常伴有T细胞增殖和/或细胞因子的释放,细胞因子例如干扰素 $\gamma$ 、IL-2、IL-5、IL-10、IL-12或转化生长因子(TGF)- $\beta$ 。

[0052] 术语“过度表达Gal3的癌症”指的是相对于对照细胞,其中在细胞表面上表达更高水平的Gal3的癌症。在一些情况下,对照细胞为来自健康个体的相似组织的细胞。在一些情况下,对照细胞为来自患有癌症的相同个体的非癌细胞。

[0053] 术语“癌症负担(cancer load)”、“肿瘤负担(tumor load)”或“癌症负荷(cancer burden)”通常指在任何给定的时间在受试者体内癌细胞的数量、肿瘤的尺寸或癌症的量。肿瘤负担可以通过例如通过本文在下面公开的许多众所周知的生化或成像方法测量肿瘤特异性遗传标记物的表达和测量肿瘤尺寸来检测。

[0054] 术语“阈值活性值”指表达水平或活性水平,与其比较可以帮助确定是否可以进行治疗或是否可以规定治疗。在一些实施方式中,阈值活性值是在来自具有与所治疗的患者相同类型癌症的异质群体(heterogeneous population)的癌细胞上Gal3的中值表达水平。在一些实施方式中,阈值活性值是患有癌症的患者的非癌组织上Gal3的水平。在一些实施方式中,阈值活性值是健康个体上相似组织类型的细胞上Gal3的表达水平或活性水平。

[0055] 术语“抗体”在广义上使用且特别地涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体例如双特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全合成抗体和抗体片段,只要它们展现出所需的生物活性,即结合特异性。抗体是包含一条或多条多肽链的单体或多聚体蛋白质。抗体特异性地结合至抗原并且能够调节抗原的生物活性。术语“抗体”还包括抗体片段。特异性抗

体片段包括但不限于(i)由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段;(ii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由单抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段;(iv)由单可变区组成的dAb片段(Ward等,1989,Nature341:544-546);(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')<sub>2</sub>片段,包括两个连接的Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH结构域和VL结构域通过肽接头连接,该肽接头允许两个结构域缔合以形成抗原结合位点(Bird等,1988,Science 242:423-426;Huston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:5879-5883);(viii)双特异性单链Fv二聚物(PCT/US92/09965)和(ix)“双抗体”或“三抗体”,通过基因融合构建的多价片段或多特异性片段(Tomlinson等,2000,Methods Enzymol,326:461-479;W094/13804;Holliger等,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448)。在某些实施方式中,通过重组DNA技术产生抗体。抗体形式和结构的其他实例在Holliger&Hudson,2006,Nature Biotechnology 23(9):1126-1136和Carter,2006,Nature Reviews Immunology 6:343-357以及其中引用的参考文献中描述,全部这些文献通过引用特别地被纳入。在另外的实施方式中,通过天然存在的抗体的酶裂解或化学裂解产生抗体。

[0056] 术语“人源化抗体”指其中源自另一哺乳动物物种的种系诸如小鼠的CDR序列已经被嫁接至人框架序列的抗体。框架区修饰可以在人框架序列内进行。

[0057] 术语“框架”指除了高变区残基外的可变结构域残基。不同的轻链或重链的“框架区”或“FR”在一个物种内相对地保守。可变结构域的框架通常由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。框架区修饰可在人框架区序列内进行。抗体的框架区,其为构成轻链和重链的结合的框架区,用于在三维空间中定位和排列CDR。框架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或已发表的参考文献中获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可在人和小鼠序列的“VBASE2”种系可变基因序列数据库中找到。

[0058] 如本文使用的术语“可变区”和“可变结构域”指包括互补决定区(CDR,例如CDR H1、CDR H2、CDR H3、CDR L1、CDR L2和CDR L3)和框架区(FR)的氨基酸序列的抗体的轻链和重链的部分。可以根据Chothia,Kabat(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))或国际ImMunoGeneTics数据库(IMGt)定义分配给CDR和FR的氨基酸位置。抗体重链或轻链中的可变区源自种系可变(V)基因、多样性(D)基因或连接(J)基因(并且不源自恒定(C $\mu$ 和C $\delta$ )基因片段),并赋予抗体结合至抗原的特异性。通常,抗体可变区包括穿插有三个高变“互补决定区”的四个保守的“框架”区。

[0059] 如本文使用的术语“互补决定区”和“CDR”指抗体可变区的在序列上高变的和/或形成结构上定义的环的区。CDR也称为高变区。轻链和重链可变区都具有三个CDR。轻链可变区包含CDR L1、CDR L2和CDR L3。重链可变区包含CDR H1、CDR H2和CDR H3。每个CDR可包括来自如通过Chothia,Kabat(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))或国际ImMunoGeneTics数据库(IMGt)定义的互补决定区的氨基酸残基。

[0060] 术语“人抗体”指拥有这样的氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体或来源于利用人抗体谱(repertoire)或其他人抗体编码序列的非人源的抗体的氨基酸序列。人抗体的该定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0061] 术语“嵌合抗体”指可变区序列来源于一个物种并且恒定区序列来源于另一个物

种的抗体,诸如可变区序列来源于小鼠抗体并且恒定区序列来源于人抗体的抗体。

[0062] 术语“检查点抑制剂疗法”指抑制检查点途径的疗法。检查点抑制剂疗法的非限制性实例包括抑制PD1信号途径的疗法和抑制CTLA4信号途径的疗法。检查点抑制剂疗法可以为肽、抗体、核苷类似物(例如适配体)、小分子化合物或其组合。

[0063] 术语“原发性癌”指在特定癌症开始的身体的位置或组织处的癌症。原发性癌通常被称为第一癌或原始癌。原发性癌与转移癌(metastasis)相反,转移癌指的是指癌细胞从原始肿瘤位点迁移而在其他组织中产生癌症。

[0064] 术语“转移癌”指从原始位点(开始的地方)扩散到身体不同区域的癌症。

[0065] 术语“原发性癌细胞”指从癌症患者分离的例如癌症活检并且没有在体外培养的癌细胞。

[0066] 术语癌症“适于Ga13:TIM-3抑制剂的治疗”指可能对Ga13:TIM-3抑制剂治疗有应答的癌症,例如接受Ga13:TIM-3抑制剂的患者可能具有有益的临床结果,例如总存活率、进展时间、无病存活、无进展存活、肿瘤负担减少或如下所公开的任何其他有益的临床结果或根据RECIST标准的那些。

[0067] 概述

[0068] 本发明基于TIM-3特异性结合至Ga13蛋白并且相互作用导致T细胞激活的抑制的令人惊讶的发现。本公开提供通过施用干扰Ga13和TIM-3之间相互作用的抑制剂恢复T细胞激活来治疗患有癌症特别是过度表达Ga13的癌症类型的患者的方法。本公开另外提供如下方法:通过测定肿瘤微环境中的细胞例如癌细胞和肿瘤相关的巨噬细胞的表面上Ga13的水平并且将Ga13的水平与阈值活性值比较来确定癌症是否适于使用Ga13:TIM-3疗法治疗。

[0069] 1.选择患者群体

[0070] Ga13,也称为半乳糖凝集素-3,在数种细胞类型中表达并且参与广泛范围的生理和病理过程,其包括细胞粘附、细胞激活和趋化作用、细胞周期、细胞凋亡、细胞生长和分化以及肿瘤的进展和转移。Ga13在肿瘤细胞以及肿瘤微环境中的细胞例如下文描述的肿瘤相关的巨噬细胞尤其是M2巨噬细胞上表达。

[0071] TIM-3是在免疫细胞尤其是T细胞上表达的分子,并且可以通过与Ga13相互作用抑制免疫应答,例如T细胞信号传导。本文公开的Ga13:TIM-3抑制剂可以干扰Ga13和TIM-3之间的相互作用且激活免疫应答。本文公开的Ga13:TIM-3抑制剂可用于治疗可从免疫应答激活中受益的癌症或其他疾病。

[0072] 实体瘤中的癌细胞能够在它们的周围形成肿瘤微环境以支持癌细胞的生长和转移。肿瘤微环境是其中存在肿瘤的细胞环境,包括周围血管、免疫细胞、纤维母细胞、其他细胞、可溶性因子、信号分子、胞外基质和力学诱因(mechanical cues),其可以促进瘤的转化、支持肿瘤生长和侵袭、保护肿瘤免受宿主免疫、助长治疗抵抗力以及为潜伏的转移(dormant metastases)提供用于茁壮成长的合适位置(niches)。肿瘤和其周围微环境是密切相关的并且不断地相互作用。肿瘤可以通过释放胞外信号、促进肿瘤血管生成并且诱导外围的免疫耐受性而影响它们的微环境,而在微环境中的免疫细胞可以影响癌细胞的生长和演化。参见Swartz等“Tumor Microenvironment Complexity:Emerging Roles in Cancer Therapy”Cancer Res,第72卷,第2473-2480页,2012。

[0073] 肿瘤经常与作为富集巨噬细胞的反应性基质的部分的免疫浸润相关。肿瘤相关的

巨噬细胞 (TAM) 在通过促进新血管形成和基质降解而促进肿瘤生长中起重要作用。当与肿瘤相关时,巨噬细胞展示朝向巨噬细胞的两个表型不同的亚单位之一:M1巨噬细胞(也称为TH1)或M2巨噬细胞(也称为TH2)的功能性极化。已知M1巨噬细胞产生促炎性细胞因子并且在细胞破坏中起积极作用,而M2巨噬细胞主要清除碎片并且促进血管生成并修复。因此,许多具有高数量的TAM的肿瘤具有增加的肿瘤生长率、局部增殖和远处转移。M2巨噬细胞群体在表型上类似于促进肿瘤生长和发育的TAM群体。除了表达Ga13外,M2巨噬细胞也可以表达一种或多种细胞表面标记物,其选自由以下组成的组:CD206、IL-4r、IL-1ra、诱饵(decyoy) IL-1r11、IL-10r、CD23、巨噬细胞清除受体A和B、Ym-1、Ym-2、低密度受体相关的蛋白1(LRP1)、IL-6r、CXCR1/2、CD136、CD14、CD1a、CD1b、CD93、CD226、(FcγR) 和PD-L1。

[0074] 可以使用本文公开的Ga13:TIM-3抑制剂来治疗在肿瘤微环境中过度表达Ga13的癌症。在一些情况下,癌症包括在它们表面上过度表达Ga13的癌细胞。在一些情况下,癌症包含在表面上过度表达Ga13的在肿瘤微环境中包括的其他类型的细胞,例如肿瘤相关的巨噬细胞、血管、基质细胞、纤维母细胞。在一些情况下,癌症过度表达Ga13并且Ga13作为肿瘤微环境的可溶性蛋白存在。除非另有说明,否则术语“过度表达”指比对照例如来自健康个体的相似细胞、组织或身体的区域的表达水平高至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。

[0075] 在一些实施方式中,本文公开的Ga13:TIM-3抑制剂用于治疗与对照细胞相比,在肿瘤微环境中的细胞例如癌细胞或肿瘤相关的巨噬细胞的表面上具有较高水平的Ga13的各种类型的癌症。在细胞表面上Ga13的表达水平可以通过本领域众所周知的方法测量,该方法包括但不限于流式细胞术与免疫组织化学。通常,检测肿瘤微环境中Ga13的表达水平包括将包含来自肿瘤微环境的细胞的样本与抗Ga13抗体结合,所述细胞包括癌细胞和/或肿瘤相关的巨噬细胞(例如M2 TAM),并且通过能够结合细胞表面的Ga13抗体的数量来指示细胞表面上Ga13的水平。在一些实施方式中,Ga13的水平通过测量与Ga13抗体缀合的可检测标记(label)来确定。在一些实施方式中,使用结合至Ga13抗体的标记的第二抗体,并且通过测量来自第二抗体上标记的信号来确定Ga13表达水平。可替代地,抗体可与生物素缀合,并且可以使用可检测标记的亲合素(结合至生物素的多肽)来检测生物素化抗体的存在。可被使用的适当的可检测的标记包括但不限于放射性核素(例如<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H或<sup>32</sup>P)、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、萤光素酶或β-半乳糖苷酶)、荧光部分或荧光蛋白(例如荧光素、若丹明、藻红蛋白、GFP或BFP)或发冷光部分(例如,Quantum Dot Corporation, Palo Alto, Calif. 供应的Qdot™纳米颗粒)。

[0076] 在一些实施方式中,将已经测定的癌症的Ga13表达水平与阈值活性水平比较来确定癌症是否适于用本文公开的Ga13:TIM-3抑制剂治疗。在一些实施方式中,阈值活性水平是患有癌症的患者的非癌组织的细胞中Ga13的表达水平或活性水平。在一些实例中,阈值活性水平是健康个体的相似组织类型的细胞上Ga13的表达水平或活性水平。在一些实施方式中,阈值活性水平来自具有相同类型癌症的患者队组中Ga13的个体中值表达水平,并且该患者队组是关于Ga13的表达水平的异质群体。测试队组优选地包括至少25个个体、50个个体、100个个体、200个个体、1000个个体或更多,其包括所有值和其范围。在一些实施方式中,在比较之前标准化患者中Ga13的表达水平和阈值活性水平。

[0077] 因此,在一些实施方式中,本公开提供确定患者的癌症是否适于用Ga13:TIM-3抑

制剂治疗的方法;并且该方法包括:从患者获得包含癌细胞的样本,测定样本中细胞表面上Gal3的水平,比较细胞上Gal3的水平与阈值活性水平,以及如果患者的癌细胞上Gal3表面表达比阈值活性值高至少15%、至少25%、至少50%、至少75%、至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少100倍、至少1000倍或至少10000倍,则确定患者的癌症适于用Gal3:TIM-3抑制剂治疗。在一些实施方式中,用于比较的阈值活性水平可以基于来自至少100个、200个、300个、500个癌症患者的相同癌症类型的癌细胞表面上Gal3的平均值、均值或中值水平。在一些实施方式中,阈值活性水平基于来自健康个体的相似组织类型的细胞表面上Gal3的平均值、均值或中值水平。在一些实施方式中,用于确定癌症是否适于用Gal3:TIM-3治疗的样本中的癌细胞是原发性癌细胞。

[0078] 许多癌症类型将在表面上过度表达Gal3,包括转移性的那些癌症,且因此适合使用本文公开的方法进行治疗。这些癌症类型包括但不限于肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌、头/颈癌、黑色素瘤、肉瘤、肾细胞肿瘤、肝细胞肿瘤、胶质母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、膀胱癌、胰腺癌、胆囊癌、胃癌、前列腺癌、子宫内膜癌、甲状腺癌和间皮瘤。因此,在一些情况下,适于使用本文公开的方法进行治疗的癌症是源自如上所述的肿瘤的转移性癌症,例如转移性肺癌。

#### [0079] 2. Gal3:TIM-3抑制剂

[0080] 本公开提供通过向患者施用治疗有效量的至少一种Gal3:TIM-3抑制剂治疗癌症的方法。Gal3:TIM-3抑制剂可以为抑制Gal3和TIM-3之间相互作用的任何分子并且所述抑制导致T细胞的激活。在一些实施方式中, Gal3:TIM-3抑制剂结合至TIM-3蛋白质并且在本公开中这种抑制剂被称为TIM-3抑制剂。在一些实施方式中, Gal3:TIM-3抑制剂结合至Gal3蛋白质并且这种抑制剂被称为Gal3抑制剂。Gal3:TIM-3抑制剂可以为蛋白质(例如抗体)或小分子。在本公开中,作为Gal3:TIM-3抑制剂的抗体被称为GIA。

#### [0081] i. Gal3:TIM-3抑制剂抗体(“GIA”)

[0082] 在一个实施方式中,用于治疗癌症的方法包括施用Gal3:TIM-3抑制剂抗体。这种抗体可以阻断Gal3和TIM-3之间的相互作用并且激活T细胞。在一些实施方式中, Gal3:TIM-3抑制剂抗体为Gal3抑制剂抗体。在一些实施方式中, Gal3:TIM-3抑制剂抗体为TIM-3抑制剂抗体。

#### [0083] 生成GIA

[0084] 使用本领域众所周知的方法可以研发GIA。参见,例如Kohler和Milstein, Nature 256:495(1975)和Coligan等(eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 第1卷, 第2.5.1-2.6.7页(John Wiley&Sons 1991)。单克隆抗体可以通过以下获得:向小鼠注射包含抗原(例如Gal3)或其表位的组合物,去除脾脏以获得B淋巴细胞,将B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤、克隆杂交瘤,选择产生针对抗原的抗体的阳性克隆,培养产生针对抗原的抗体的克隆以及从杂交瘤培养物中分离抗体。在一些实施方式中,用于产生Gal3抑制剂抗体的Gal3的表位为:SEQ ID NO:5 (PGAYPGQAPPGAYPGQAPPG)、SEQ ID NO 6 (GAYPGQAPPGAYPGAPGAYP)、SEQ ID NO:7: (PGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYP)、SEQ ID NO:8 (GQAPPGAYPG)。

[0085] 可以通过多种成熟的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化产生的单克隆抗体。这种分离技术包括用蛋白A-琼脂糖的亲和色谱、尺寸排阻色谱和离子交换色谱。参见,例如在第



2.7.1页-第2.7.12页和第2.9.1页-第2.9.3页的Coligan。还参见Baines等,“Purification of Immunoglobulin G(IgG)”在METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY中,第10卷,第79页-第104页(The Humana Press, Inc.1992)。在最初提出针对靶蛋白的抗体后,抗体可以被测序并随后通过重组技术进行制备。鼠抗体和抗体片段的人源化和嵌合是本领域技术人员众所周知的。参见,例如Leung等,Hybridoma 13:469(1994);US20140099254A1。

[0086] 人抗体可以使用转基因小鼠来生产,所述转基因小鼠已被基因工程化以产生响应使用靶蛋白的抗原挑战的特异性人抗体。参见Green等,Nature Genet.7:13(1994); Lonberg等,Nature 368:856(1994)。还可以通过遗传或染色体转染方法、噬菌体展示技术或通过体外激活的B细胞构建针对靶蛋白的人抗体。参见,例如McCafferty等,1990,Nature 348:552-553;美国专利号5,567,610和美国专利号5,229,275。

[0087] 在一些实施方式中,GIA为抗Gal3抗体。在一些实施方式中,GIA结合至具有序列SEQ ID NO:5、6、7或8的肽。在一些实施方式中,GIA为能够结合至Gal3并且干扰TIM-3和Gal3之间的相互作用的抗体。在一些实施方式中,GIA为能够结合至包括选自SEQ ID NO:5-8中的任何一个序列的肽并且干扰TIM-3和Gal3之间的相互作用的抗体。在一些实施方式中,GIA为能够阻断已知的GIA结合至Gal3并且干扰TIM-3和Gal3之间的相互作用的抗体。在一些情况下,在治疗时期、例如三至十二周的时期内的小鼠模型中,如本文公开的Gal3:TIM-3抑制剂例如Gal3抑制剂抗体的施用可以减少至少20%,例如至少30%、至少40%或至少46%的肿瘤负荷。

[0088] 在一些实施方式中,GIA为抗Gal3抗体。在一些实施方式中,抗Gal3抗体为IgG4同种型。在一些实施方式中,抗Gal3抗体包括重链可变区互补决定区CDR1、CDR2和CDR3(CDR H1、CDR H2和CDR H3),其中CDR H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列和/或CDR H3包含SEQ ID NO:11。在一些实施方式中,抗Gal3抗体的重链可变区包含框架区1-4(FR H1、FR H2、FR H3和FR H4),其中FR H1包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,FR H2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,FR H3包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列和/或FR H4包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗Gal3抗体的重链包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0089] 在一些实施方式中,抗Gal3抗体包括轻链可变区互补决定区CDR1、CDR2和CDR3(CDR L1、CDR L2和CDR L3),其中CDR L1包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列和/或CDR L3包含SEQ ID NO:19。在一些实施方式中,抗Gal3抗体的重链可变区包含框架区1-4(FR L1、FR L2、FR L3和FR L4),其中FR L1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,FR L2包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,FR L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列和/或FR L4包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗Gal3抗体的轻链包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0090] 在一些实施方式中,抗Gal3抗体包括重链可变区,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗Gal3抗体包括轻链可变区,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0091] 修饰GIA

[0092] GIA也可以通过引入相对于现有GIA的保守修饰而产生。例如,修饰的GIA可包含重链可变区和轻链可变区和/或Fc区,其与以上产生的抗体的对应物同源。可以用于本文公开

的方法的修饰的GIA必须保留所希望的能够阻断Gal3:TIM-3信号传导途径的功能特性。

[0093] 本文所述的GIA可被连接至另一种功能分子,例如另一种肽或蛋白质(白蛋白、另一种抗体等)、毒素、放射性同位素、细胞毒素或细胞抑制剂。例如,抗体可以通过化学交联或通过重组方法连接。抗体可以以在美国专利号4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192或4,179,337中提出的方式连接至多种非蛋白质聚合物中的一种,例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯。抗体可通过与聚合物共价缀合而被化学修饰,例如以增加其循环半衰期。示例性聚合物及用于附接它们的方法也在美国专利号4,766,106、4,179,337、4,495,285和4,609,546中示出。

[0094] GIA也可以通过改变蛋白质修饰位点来产生。例如,可以改变抗体的糖基化位点以产生缺乏糖基化的抗体,并且如此修饰的GIA通常具有增加的抗体对抗原的亲和力。还可通过在一个或多个PEG基团附接到抗体的条件下与聚乙二醇(PEG)反应来使抗体聚乙二醇化。聚乙二醇化可以增加抗体的生物半衰期。具有这种修饰的抗体也可以用于治疗过度表达Gal3的肿瘤,只要其保留了阻断TIM3-Gal3途径所需的功能特性。

[0095] 抗体也可以用可检测的或功能性的标记进行标记。可检测的标记包括放射性标记例如<sup>131</sup>I或<sup>99</sup>Tc,也可以使用常规化学方法将其附接至抗体。可检测的标记还包括酶标记,如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。可检测的标记进一步包括化学部分如生物素,其可以通过结合至特定的同源可检测部分例如标记的亲合素被检测。

[0096] 在另一个方面,本发明的特征是包含本发明的抗Gal3或抗TIM-3抗体或其片段的双特异性分子。本发明的抗体或其抗原结合部分可以是衍生的或连接至另一功能分子,例如另一肽或蛋白质(例如另一抗体或受体的配体)以产生结合至至少两个不同的结合位点或靶分子的双特异性分子。实际上,本发明的抗体可以是衍生的或连接至多于一个的其他功能分子以产生结合至多于两个的不同的结合位点和/或靶分子的多特异性分子;这种多特异性分子也意图被如本文所用的术语“双特异性分子”所涵盖。为了产生本发明的双特异性分子,可以将本发明的抗体功能地连接(例如通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其他方式)至一个或多个其他结合分子,如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,从而产生双特异性分子。在一个示例性的实施方式中,可以使用杵-臼(knobs-into-holes)策略形成双特异性抗体。通常,该策略涉及首先形成抗体的识别第一抗原例如Gal3的上半部分以及抗体的识别第二抗原的后半部分,然后将两半连接以形成双特异性抗体。

[0097] 因此,本发明包括双特异性分子,其包含对Gal3或TIM-3的至少一个第一结合特异性和对第二靶标的第二结合特异性。在一些实施方式中,第二靶标是已知的癌症靶标,例如PD-L1。在一些实施方式中,第二靶标表位是TIM-3或Gal3,并且双特异性分子能够同时结合至TIM-3和Gal3。在一些实施方式中,第二靶标是Fc受体,例如人Fc $\gamma$ RI(CD64)或人Fc $\alpha$ 受体(CD89)。因此,本发明包括能够结合至表达Fc $\gamma$ R或Fc $\alpha$ R的效应细胞(例如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞(PMN))以及表达Gal3的靶细胞二者的双特异性分子。这些双特异性分子将表达Gal3的细胞靶向效应细胞并触发Fc受体介导的效应细胞活性,例如表达PD-1的细胞的吞噬作用、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、细胞因子释放或超氧阴离子的产生。

[0098] ii. 其他Gal3:TIM-3抑制剂分子

[0099] 在另一个实施方式中,本文公开的Gal3:TIM-3抑制剂是干扰Gal3和TIM-3之间相互作用从而拮抗TIM-3的免疫抑制功能的小分子、非蛋白质化合物。这些小分子通常是具有

50道尔顿至2500道尔顿之间分子量的有机分子。化合物也可以使用本领域已知的以及在例如欧洲专利申请EP2360254中公开的组合文库方法中的许多方法中的任何一种来鉴定。该组合文库包括：生物学文库、空间可寻址的并行固相或溶液相文库、需要去卷积的合成文库方法、“一珠一化合物”文库方法和使用亲和色谱选择的合成文库方法。生物学文库方法限于肽库，而其他四个方法适用于的肽、非肽低聚物或小分子化合物的文库 (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)。

#### [0100] iii. 评估候选物Gal3:TIM-3抑制剂

[0101] 许多众所周知的测定可用于评价候选物，例如通过用包含Gal3蛋白的抗原或来自组合文库的测试化合物免疫动物而生成的抗体是否可以阻断Gal3和TIM-3之间的相互作用。通常，其涉及使用一种或多种以下类型的测定评估候选物：i) 结合测定，用于测试候选物是否结合至靶蛋白，即Gal3或TIM-3；ii) 阻断测定，用于测试候选物是否可以阻断Gal3和TIM-3之间的相互作用；iii) 基于细胞的功能性测定，用于测试候选物是否可以通过阻断Gal3和TIM-3之间的相互作用来激活T细胞；和iv) 体内功效测定，用于测试候选物是否可以减轻肿瘤负担。

#### [0102] 结合测定

[0103] 用于评估两个分子相互作用的任何测定可用于确定候选物是否可以结合至靶蛋白。非限制性示例性检测包括结合测定 - 如酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA) - 荧光激活细胞分选 (FACS) 分析。在一些情况下，可以将靶蛋白即Gal3或TIM-3蛋白与放射性同位素或酶标记物偶联，从而可以通过检测复合物中的标记靶蛋白来确定靶蛋白与候选物的结合。例如，可以直接或间接地用 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 或 $^3\text{H}$ 标记靶蛋白，并通过直接计数辐射发射量 (radio-emission) 或通过闪烁计数来检测放射性同位素。可替代地，可以用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶酶标靶蛋白分子，并通过将合适的底物转化为产物来确定候选物与靶蛋白的结合。

[0104] 在一些实施方式中，诸如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的免疫测定可用于评估Gal3:TIM-3抑制剂候选物与其靶蛋白的结合特异性。在一些实施方式中，将包含候选物的样本添加至预先用靶蛋白涂覆的板中，并孵育一段时间。可以添加识别候选物的标记的第二抗体，并检测来自标记的第二抗体的信号。在一些情况下，第二抗体与酶缀合，且可以通过添加对酶特异性的底物来评价结合，并根据制造商的说明在适当的波长下读取。可被使用的酶的非限制性实例包括辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。对于辣根过氧化物酶，可以使用ABTS底物，并可以采集在415-490nm处的读数以评估候选物结合至Gal3或TIM-3的能力。可替代地，ELISA也可以通过将候选物涂覆在板上、将靶蛋白添加到板上并且如上所述检测结合来进行。

[0105] 候选物的结合动力学 (例如结合亲和力) 也可以通过本领域已知的标准测定来评估，诸如通过Biacore分析 (Biacore AB, Uppsala, 瑞典)。在一个示例性测定中，使用标准胺偶联化学和Biacore提供的试剂盒将靶蛋白共价连接至芯片，例如羧甲基葡聚糖涂覆的芯片。通过使候选物在适当浓度以制造商推荐的流速在缓冲液 (由Biacore AB提供) 中流动来测量结合。记录缔合动力学和解离动力学，并使用BIA评估软件 (Biacore AB) 将缔合动力学和解离曲线拟合至结合模型。可以测量相互作用的 $K_D$ 、 $K_{on}$ 和 $K_{off}$ 值。优选的Gal3:TIM-3抑制剂可以以 $1 \times 10^{-7}$ 或更小，例如 $5 \times 10^{-7}\text{M}$ 或更小或 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 或更小的 $K_D$ 结合至它们的靶蛋白。

#### [0106] 阻断测定

[0107] 然后,在阻断测定中评估已证明具有结合靶蛋白能力的候选物,其阻断TIM-3和Gal3之间的相互作用的能力。在一些实施方式中,阻断测定是免疫测定,例如ELISA。在一个实施方式中,确定候选物是否阻断TIM-3和Gal3之间的相互作用的方法包括用靶蛋白TIM-3或Gal3之一涂覆板,并添加候选物和另一种靶蛋白即Gal3或TIM-3的混合物至所涂覆的板上,并检测对应于TIM-3和Gal3结合的信号。与未添加候选物的对照反应相比,信号下降表明候选物能够阻断Gal3和TIM-3之间的相互作用。

[0108] 在一些实施方式中,阻断测定是流式细胞术测定。通常,将候选物与靶蛋白TIM-3或Gal3之一混合,然后将混合物添加至过度表达另一种靶蛋白Gal3或TIM-3的细胞中。在细胞表面TIM-3和Gal3的结合可以通过荧光标记的抗体来检测。与对照相比,包含候选物的反应中信号的下降表明候选物可以阻断TIM-3和Gal3之间的相互作用。实施例2中描述了可用于确定候选物是否可以阻断TIM-3和Gal3之间的相互作用的示例性阻断测定。

#### [0109] 功能性测定

[0110] 在一些情况下,已证明结合至靶蛋白的候选物使用混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定进一步评估其激活T细胞的能力。一种示例性测定在美国专利号8,008,449中描述,相关公开内容通过引用整体纳入本文。MLR测定可用于测量T细胞增殖、IL-2和/或IFN- $\gamma$ 的产生。在一种示例性测定中,将候选物添加至用不同浓度抗原呈递细胞 (APC) 培养的许多纯化的T细胞中。然后,在37°C下将细胞在候选物存在下培养4天至7天之间的时期。然后取出一定体积的培养基进行细胞因子测量。可以测量IFN- $\gamma$ 和其他细胞因子的水平。测量细胞因子产生的方法是众所周知的,并且商业试剂盒是容易获得的,例如OptEIA ELISA试剂盒 (BD Biosciences)。在一些实施方式中,将细胞在<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷存在下培养12小时至24小时之间的时期,例如18小时,并且分析细胞中<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷的掺入量,其与细胞增殖呈正相关。结果表明,与对照相比,含有候选物的培养物显示出增加的T细胞增殖、增加的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 的产生,表明该候选物通过阻断TIM-3和Gal3的相互作用有效激活T细胞。在实施例11中公开了MLR的一种示例性测定,其可用于评估候选物激活T细胞的能力。

#### [0111] 体内测定

[0112] 在另一个实施方式中,体内测定用于评估候选者是否有效治疗癌症。根据完善建立的程序,体内测定可以在诸如小鼠肿瘤模型的肿瘤模型中进行。简言之,将例如小鼠的动物皮下植入人肿瘤细胞系。当肿瘤生长并达到一定尺寸例如在100mm<sup>3</sup>和300mm<sup>3</sup>之间时,以预定的频率以适当的剂量向小鼠施用候选物。候选物可以通过多种途径,例如腹膜内注射或静脉内注射施用。每周监测一次或两次动物的肿瘤生长,持续通常为4周至8周的时段。三维地 (高度×宽度×长度) 测量肿瘤并且计算肿瘤体积。在实验结束时,当肿瘤达到肿瘤终点时,例如1500mm<sup>3</sup>,或者小鼠示出显著的体重减轻,例如大于15%、大于20%或大于25%的体重减轻,小鼠通常被执行安乐死。显示与对照组相比候选物治疗组中的较慢肿瘤生长或达到肿瘤终点体积的更长均值时间的结果,表明候选物具有抑制癌症生长的活性。在实施例4中公开了可用于评估候选物在治疗肿瘤中的能力的体内功效测定的一种示例性测定。

#### [0113] 4. 评估Gal3:TIM-3抑制剂疗法的功效

[0114] 本文公开的Gal3:TIM-3抑制剂疗法可以减少肿瘤负担,并为癌症患者,尤其是具有过度表达Gal3的癌症的那些患者提供有益的临床结果。用于测量这些应答的方法是癌症

治疗领域的技术人员所众所周知的,例如,如在实体瘤应答评估标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (“RECIST”)指南中所述,可在[ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/docs/recist\\_guideline.pdf](http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/docs/recist_guideline.pdf)获得。

[0115] 在一种方法中,通过测定肿瘤特异性生物标记物的表达来测量肿瘤负担。这种方法对于转移性肿瘤特别有用。肿瘤特异性生物标记物是对癌细胞独特的蛋白质或其他分子,或者与非癌细胞相比,在癌细胞中更丰富的蛋白质或其他分子。对各种癌症有用的生物标记物是已知的,肿瘤特异性遗传标记物的非限制性实例包括:用于肝癌的甲胎蛋白(AFP);用于多发性骨髓瘤的 $\beta$ -2-微球蛋白(B2M);用于绒毛膜癌和生殖细胞肿瘤的 $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -hCG);用于胰腺癌、胆囊癌、胆管癌和胃癌的CA19-9;用于卵巢癌的CA-125和HE4;用于结直肠癌的癌胚抗原(CEA);用于神经内分泌肿瘤的嗜铬粒蛋白A(CgA);用于膀胱癌的纤维蛋白/纤维蛋白原;用于前列腺癌的前列腺特异性抗原(PSA)和用于甲状腺癌的甲状腺球蛋白。参见,[www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet](http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet)。

[0116] 测量肿瘤特异性遗传标记物的表达水平的方法是众所周知的。在一些实施方式中,遗传标记物的mRNA从血液样本或肿瘤组织中分离,并进行实时逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)以定量遗传标记物的表达。在一些实施方式中,进行了免疫印迹、免疫组织化学或流式细胞术分析以评估肿瘤特异性遗传标记物的蛋白质表达。通常,在本发明的疗法期中采集的多个样本中测量肿瘤特异性遗传标记物的水平,并且水平的降低与肿瘤负担的降低相关。

[0117] 在另一种方法中,通过本文中公开的Gal3:TIM-3抑制剂疗法的肿瘤负担的减少经由体内肿瘤尺寸的减少或癌症量的减少来显示。测量肿瘤尺寸通常通过基于成像的技术来获得。例如,计算机断层摄影(CT)扫描可通过鉴定现有病灶的生长或新病灶或肿瘤转移的发展,提供不仅有关肿瘤缩小或生长,而且还有关疾病进展的准确和可靠的解剖学信息。

[0118] 在仍另一种方法中,可以通过功能和代谢成像技术评估肿瘤负担的减少。这些技术可以通过观察灌注、氧合作用和新陈代谢的变化来提供疗法应答的早期评估。例如, $^{18}\text{F}$ -FDG PET使用放射性标记的葡萄糖类似物分子来评估组织新陈代谢。肿瘤通常具有升高的葡萄糖摄取,对应于肿瘤组织新陈代谢的降低的值变化指示肿瘤负担降低。在Kang等, Korean J. Radiol. (2012) 13 (4) 371-390中公开了类似的成像技术。

[0119] 接受本文公开的疗法的患者可呈现出不同程度的肿瘤负担减少。在一些情况下,患者可以呈现出完全应答(Complete Response) (CR),也称为“无疾病证据(NED)”。CR意味着如通过测试、体检和扫描所指示所有可检测到的肿瘤均已消失。在一些情况下,接受本文公开的组合疗法的患者可经历部分应答(Partial Response) (PR),其大致相当于总肿瘤体积减少至少50%,但仍保留一些残留疾病的证据。在一些情况下,深度的部分应答中的残留疾病实际上可能是死的肿瘤或疤痕,因此,一些被分类为具有PR的患者实际上可能具有CR。还有许多在治疗期间中显示出缩小的患者在继续治疗时表现出进一步的缩小,并且可能达到CR。在一些情况下,接受治疗的患者可经历轻微应答(Minor Response) (MR),其大致意味着超过总肿瘤体积的25%但小于50%的少量缩小,其会成为PR。在一些情况下,接受疗法的患者可以呈现出疾病稳定(Stable Disease) (SD),其意味着肿瘤保持大致相同的尺寸,但可包括少量的生长(通常小于20%或25%)或少量的缩小(除非出现轻微应答,否则任何时

候小于PR。如果是,则将SD定义为通常小于25%)。

[0120] 来自疗法的所期望的有益结果或所期望的临床结果还可包括:例如减少的(即在某种程度上减慢和/或停止)癌细胞向周围器官的浸润;抑制的(即在某种程度上减慢和/或停止)肿瘤转移;增加的应答率(reponse rate,RR);增加的应答持续时间;在某种程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状;减少的治疗疾病所需的其他药物的剂量;延迟的疾病进展和/或延长的患者存活和/或改善的生活质量。评估这些效果的方法是众所周知的和/或公开在上述例如cancerguide.org/endpoints.html和RECIST指南中。

[0121] 在一些情况下,如本文公开的Gal3:TIM-3抑制剂的施用可以在治疗期内将肿瘤负荷减少至少20%、至少30%、至少40%或至少46%。

#### [0122] 4. 与其他疗法的组合

[0123] 在一些实施方式中,可以采用Gal3:TIM-3抑制剂和一种或多种第二抗癌试剂(“第二试剂”)的组合以减少患者的肿瘤负担。“组合疗法”或“与.....组合”,并不用于暗示治疗剂必须被同时施用和/或被配制用于一起递送,尽管这些递送方法在本文所述的范围内。Gal3:TIM-3抑制剂和第二试剂可以按照相同或不同的给药方案施用。在一些实施方式中,在整个或部分治疗期间,Gal3:TIM-3抑制剂和第二试剂以任何次序顺序地施用。在一些实施方式中,Gal3:TIM-3抑制剂和第二抗癌试剂同时或近似同时(例如彼此在约1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、20分钟或30分钟内)施用。组合疗法的非限制性实例如下,施用Gal3和第二抗癌试剂,例如Gal3:TIM-3抑制剂为“A”并且第二抗癌试剂或化合物为“B”:

[0124] A/B/AB/A/BB/B/AA/A/BA/B/BB/A/AA/B/B/B B/A/B/B

[0125] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A

[0126] B/B/A/A

[0127] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A

[0128] A/A/B/A

[0129] 如果有的话,考虑到疗法的毒性,向患者施用第二抗癌试剂将遵循这种化合物施用的一般方案。以下公开了可以与Gal3:TIM-3抑制剂组合使用用于治疗癌症的一些示例性第二试剂。

#### [0130] i. 靶向疗法

[0131] 在一些实施方式中,第二抗癌试剂是靶向治疗剂,即包括针对特定分子或遗传靶标的试剂,诸如与受体酪氨酸激酶相关的那些。

#### [0132] ii. 化学疗法和放射疗法

[0133] 适于与本发明的Gal3:TIM-3抑制剂组合使用的化疗剂包括具有杀死癌细胞或抑制癌细胞生长的特性的试剂。与如上所述的靶向疗法相比,化学疗法以非特异性的方式起作用,例如抑制被称为有丝分裂的细胞分裂过程,并且通常排除更选择性地阻断细胞外生长信号的试剂(即信号转导的阻断剂)。这些试剂包括但不限于抗微管试剂(例如紫杉烷和长春花生物碱)、拓扑异构酶抑制剂和抗代谢物(例如像这样起作用的核苷类似物,例如吉西他滨)、有丝分裂抑制剂、烷基化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、有丝分裂抑制剂、萘环类药物、嵌入剂、能够干扰信号转导途径的试剂、促进细胞凋亡的试剂、蛋白体抑制剂等。

[0134] 烷基化剂在细胞的静止期最活跃。这些类型的药物是细胞周期非特异性的。可以与本发明的GAL3:TIM-3抑制剂组合使用的示例性烷基化剂包括但不限于氮芥、乙烯亚胺衍

生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯): 乌拉莫司汀(uracil mustard) (AminouracilMustard<sup>®</sup>、Chlorethaminacil<sup>®</sup>、Demethyldopan<sup>®</sup>、Desmethyldopan<sup>®</sup>、Haemanthamine<sup>®</sup>、Nordopan<sup>®</sup>、UracilnitrogenMustard<sup>®</sup>、Uracillost<sup>®</sup>、Uracilmostaza<sup>®</sup>、Uramustin<sup>®</sup>、Uramustine<sup>®</sup>)、盐酸氮芥(chlormethine) (Mustargen<sup>®</sup>)、环磷酰胺(Cytoxan<sup>®</sup>、Neosar<sup>®</sup>、Clafen<sup>®</sup>、Endoxan<sup>®</sup>、Procytox<sup>®</sup>、Revimmune.TM.)、异环磷酰胺(Mitoxana<sup>®</sup>)、美法仑(melphalan) (Alkeran<sup>®</sup>) ]、苯丁酸氮芥(Chlorambucil) (Leukeran<sup>®</sup>)、哌泊溴烷(Amedel<sup>®</sup>、Vercyte<sup>®</sup>)、三亚乙基蜜胺(Hemel<sup>®</sup>、Hexalen<sup>®</sup>、Hexastat<sup>®</sup>)、三亚乙基硫代磷胺、噻替帕(Thioplex<sup>®</sup>)、白消安(Busilvex<sup>®</sup>、Myleran<sup>®</sup>)、卡莫司汀(BiCNU<sup>®</sup>)、洛莫司汀(CeeNU<sup>®</sup>)、链脲佐菌素(Zanosar<sup>®</sup>)和达卡巴嗪(Dacarbazine) (DTIC-Dome<sup>®</sup>)。另外的示例性烷基化剂包括但不限于奥沙利铂(Oxaliplatin) (Eloxatin<sup>®</sup>)、替莫唑胺(Temozolomide) (Temodar<sup>®</sup>和Temodal<sup>®</sup>)、更生霉素(Dactinomycin) (也称为放线菌素-D, Cosmegen<sup>®</sup>)、美法仑(Melphalan) (也称为L-PAM、L-肌溶蛋白和苯丙氨酸氮芥, Alkeran<sup>®</sup>)、六甲蜜胺(Altretamine) (也称为六甲基三聚氰胺(HMM), Hexalen<sup>®</sup>)、卡莫斯汀(Carmustine) (BiCNU<sup>®</sup>)、苯达莫司汀(Bendamustine) (Treanda<sup>®</sup>)、白消安(Busulfan) (Busulfex<sup>®</sup>和Myleran<sup>®</sup>)、卡铂(Carboplatin) (Paraplatin<sup>®</sup>)、洛莫司汀(Lomustine) (也称为CCNU, CeeNU<sup>®</sup>)、顺铂(Cisplatin) (也称为CDDP, Platinol<sup>®</sup>和Platinol<sup>®</sup>-AQ)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil) (Leukeran<sup>®</sup>)、环磷酰胺(Cyclophosphamide) (Cytoxan<sup>®</sup>和Neosar<sup>®</sup>)、达卡巴嗪(Dacarbazine) (也称为DTIC、DIC和咪唑羧酰胺, DTIC-Dome<sup>®</sup>)、六甲蜜胺(Altretamine) (也称为六甲基三聚氰胺(HMM), Hexalen<sup>®</sup>)、异环磷酰胺(Ifosfamide) (Ifex<sup>®</sup>)、异环磷酰胺(Prednumustine)、丙卡巴肼(Procarbazine) (Matulane<sup>®</sup>)、二氯甲基二乙胺(Mechlorethamine) (也称为氮芥(nitrogen mustard)、氮芥(mustine)和盐酸氮芥(mechloroethamine hydrochloride), Mustargen<sup>®</sup>)、链脲佐菌素(Streptozocin) (Zanosar<sup>®</sup>)、噻替帕(Thiotepa) (也称为硫代磷酰胺、TESPA和TSPA, Thioplex<sup>®</sup>)、环磷酰胺(Cyclophosphamide) (Endoxan<sup>®</sup>、Cytoxan<sup>®</sup>、Neosar<sup>®</sup>、Procytox<sup>®</sup>、Revimmune<sup>®</sup>)和盐酸苯达莫司汀(Bendamustine HCl) (Treanda<sup>®</sup>)。

[0135] 抗肿瘤抗生素是从土壤真菌链霉菌属(*Streptomyces*) 物种产生的天然产物中获得的化学试剂。这些药物在细胞周期的多个阶段起作用, 并且这些药物被认为是细胞周期特异性的。存在数种类型的抗肿瘤抗生素, 其包括但不限于蒽环类(Anthracyclines) (例如阿霉素(Doxorubicin)、柔红霉素(Daunorubicin)、表柔比星(Epirubicin)、米托蒽醌(Mitoxantrone)和伊达比星(Idarubicin))、色霉素(Chromomycins) (例如更生霉素

(Dactinomycin) 和普卡霉素 (Plicamycin)、丝裂霉素 (Mitomycin) 和博来霉素 (Bleomycin)。

[0136] 抗代谢物是细胞周期特异性的化学治疗类型的类型。当细胞将这些抗代谢物物质纳入细胞新陈代谢时,它们不能分裂。这些类型的化疗剂包括叶酸拮抗剂,如甲氨蝶呤 (Methotrexate);嘧啶拮抗剂,如5-氟尿嘧啶 (5-Fluorouracil)、氟尿苷 (Fluoridine)、阿糖胞苷 (Cytarabine)、卡培他滨 (Capecitabine) 和吉西他滨 (Gemcitabine);嘌呤拮抗剂,如6-巯基嘌呤 (6-Mercaptopurine) 和6-巯基鸟嘌呤 (6-Thioguanine);腺苷 (Adenosine) 脱氨酶抑制剂,如克拉屈滨 (Cladribine)、氟达拉滨 (Fludarabine)、奈拉滨 (Nelarabine) 和喷司他丁 (Pentostatin)。

[0137] 可以与本发明的Gal3:TIM-3抑制剂组合使用的示例性蒽环类药物包括,例如阿霉素 (**Adriamycin<sup>®</sup>** 和 **Rubex<sup>®</sup>**)、博来霉素 (Bleomycin) (**Lenoxane<sup>®</sup>**)、柔红霉素 (Daunorubicin) (盐酸柔红霉素、道诺霉素和盐酸红比霉素, **Cerubidine<sup>®</sup>**)、柔红霉素 (Daunorubicin) 脂质体 (柠檬酸柔红霉素脂质体, **DaunoXome<sup>®</sup>**)、米托蒽醌 (Mitoxantrone) (DHAD, **Novantrone<sup>®</sup>**)、表柔比星 (Epirubicin) (Ellence)、伊达比星 (Idarubicin) (**Idamycin<sup>®</sup>**、Idamycin **PFS<sup>®</sup>**)、丝裂霉素C (Mitomycin C) (**Mutamycin<sup>®</sup>**)、格尔德霉素 (Geldanamycin)、除莠霉素 (Herbimycin)、雷维霉素 (Ravidomycin) 和脱乙酰维生霉素 (Desacetylavidomycin)。

[0138] 抗微管试剂包括长春花生物碱和紫杉烷。可与本发明的Gal3:TIM-3抑制剂组合使用的示例性长春花生物碱包括但不限于酒石酸长春瑞滨 (**Navelbine<sup>®</sup>**)、长春新碱 (Vincristine) (**Oncovin<sup>®</sup>**) 和长春地辛 (Vindesine) (**Eldisine<sup>®</sup>**)、长春花碱 (vinblastine) (又称硫酸长春花碱、长春质碱 (vincal leukoblastine) 和 VLB, **Alkaban-AQ<sup>®</sup>** 和 **Velban<sup>®</sup>**)、和长春瑞滨 (vinorelbine) (**Navelbine<sup>®</sup>**)。可与本发明的Gal3:TIM-3抑制剂组合使用的示例性紫杉烷包括但不限于紫杉醇和多西他赛。紫杉醇试剂的非限制性实例包括纳米颗粒白蛋白结合的紫杉醇 (ABRAXANE, 由 Abraxis Bioscience 销售)、二十二碳六烯酸结合的紫杉醇 (DHA-紫杉醇, Taxoprexin, 由 Protarga 销售)、聚谷氨酸盐结合的紫杉醇 (PG-紫杉醇、聚谷氨酸紫杉醇、CT-2103、XYOTAX, 由 Cell Therapeutic 销售)、肿瘤激活的前药 (TAP)、ANG105 (与三个分子紫杉醇结合的 Aniopep-2, 由 ImmunoGen 销售)、紫杉醇-EC-1 (与 erbB2 识别肽 EC-1 结合的紫杉醇, 参见 Li 等, Biopolymers (2007) 87: 225-230) 和与葡萄糖缀合的紫杉醇 (例如, 2'-紫杉醇甲基2-吡喃葡萄糖基琥珀酸酯, 参见 Liu 等, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007) 17:617-620)。

[0139] 可以与本发明的Gal3:TIM-3抑制剂组合使用的示例性蛋白体抑制剂包括但不限于硼替佐米 (Bortezomib) (Velcade.RTM.)、卡非佐米 (Carfilzomib) (PX-171-007, (S)-4-甲基-N-((S)-1-(((S)-4-甲基-1-((R)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-1-氧代戊烷-2-基)氨基)-1-氧代-3-苯丙烷-2-基)-2-((S)-2-(2-吗啉代乙酰胺-o)-4-苯丁酰胺)-戊酰胺)、马里佐米 (marizomib) (NPI-0052)、柠檬酸依沙米布 (ixazomib citrate) (MLN-9708)、地兰佐米 (delanzomib) (CEP-18770) 和 O-甲基-N-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基]-L-丝氨酸-O-甲基-N-



[(1S)-2-[-(2R)-2-甲基-2-环氧乙烷基]-2-氧代-1-(苯基甲基)乙基]-L-丝氨酸酰胺 (ONX-0912)。

[0140] 在一些实施方式中,化疗剂选自以下组成的组:苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、链脲佐菌素、卡莫司汀、洛莫司汀、苯达莫司汀、乌拉莫司汀、雌莫司汀 (estramustine)、卡莫司汀、尼莫司汀 (nimustine)、雷莫司汀 (ranimustine)、甘露舒凡 (mannosulfan)、白消安、达卡巴嗪、替莫唑胺、噻替派、六甲蜜胺、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、6-巯基嘌呤 (6-MP)、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、培美曲塞 (pemetrexed)、柔红霉素、阿霉素、表柔比星、伊达比星、SN-38、ARC、NPC、喜树碱、拓扑替康、9-硝基喜树碱、9-氨基喜树碱、鲁比芬 (rubifen)、吉马替康 (gimatecan)、地氟替康 (diflomotecan)、BN80927、DX-895If、MAG-CPT、安吡啶、依托泊苷 (etoposide)、依托泊苷磷酸酯、替尼泊苷 (teniposide)、阿霉素、紫杉醇、多西他赛、吉西他滨、accatin III、10-脱乙酰紫杉醇、7-木糖基-10-脱乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱、10-脱乙酰-7-表紫杉醇、7-表紫杉醇、10-脱乙酰基巴卡丁 III (10-deacetylbaicatin III)、10-脱乙酰基三尖杉宁碱、吉西他滨、伊立替康 (Irinotecan)、白蛋白结合的紫杉醇、奥沙利铂 (Oxaliplatin)、卡培他滨 (Capecitabine)、顺铂 (Cisplatin)、多西他赛、伊立替康脂质体和依托泊苷及其组合。

[0141] 在某些实施方式中,化疗剂以可通过美国食品药品监督管理局 (U.S. Food and Drug Administration) (FDA) 或其他监管机构批准的剂量和时间表指导的、经过经验优化的剂量和时间表施用。

[0142] 在仍进一步实施方式中,在整个治疗期间或部分治疗期间,可以同时或以任何次序顺序施用多于一种的化疗剂。可以按照相同或不同的给药方案来施用两种试剂。

[0143] 放射疗法需要最大地暴露受影响的组织,同时保留正常的周围组织。间质疗法 (Interstitial therapy) 已成为一种有价值的新方法,其中含有放射性源的针头埋在肿瘤中。通过这种方式,大剂量的辐射可以被局部递送,同时使周围的正常结构不受伤害。手术中放射疗法是另一种专门的放射技术,其中在手术期间将粒子束 (beam) 直接置于肿瘤上,同时将正常结构安全地移离粒子束。再次,这实现了肿瘤的有效照射,同时限制了对周围结构的暴露。尽管基于局部控制辐照的方法具有明显的优势,但患者的存活率仍然很低。

[0144] iii. 其他疗法

[0145] 本发明涉及Gal3:TIM-3抑制剂的方法可以与其他治疗手段,如手术、放射疗法和/或激素疗法结合。激素疗法可以抑制来自传统内分泌激素的促进生长的信号,例如主要用于乳腺癌的雌激素和用于前列腺癌的雄激素。

[0146] 5. 药物组合物

[0147] 本文公开的Gal3:TIM-3抑制剂可用于制造如上所述的用于治疗炎症性疾病的药物组合物或药剂。用于本发明的药物组合物或药剂可以通过标准技术使用一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂配制。合适的药物载体在本文和在例如E. W. Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”(“雷明顿药物科学”)中进行描述。可将本发明的Gal3:TIM-3抑制剂及其生理上可接受的盐和溶剂化物配制成用于通过任何合适的途径施用,所述途径包括但不限于口服、局部地、鼻腔地、直肠地、非肠胃地(例如静脉地、皮下地、肌内地等)及其组合。在一些实施方式中,治疗剂溶解在液体、例如水中。

[0148] 对于口服施用,本文公开的药物组合物或药剂可以采取通过常规手段制备的片剂

或胶囊的形式。优选的是片剂和明胶胶囊,其包含活性成分连同:(a) 稀释剂或填充剂,例如乳糖、右旋糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素(例如乙基纤维素、微晶纤维素)、甘氨酸、果胶、聚丙烯酸酯和/或磷酸氢钙、硫酸钙;(b) 润滑剂,例如二氧化硅、无水胶体二氧化硅、滑石、硬脂酸、其镁盐或钙盐(例如硬脂酸镁或硬脂酸钙)、金属硬脂酸盐、胶体二氧化硅、氢化植物油、玉米淀粉、苯甲酸钠、乙酸钠和/或聚乙二醇;对于片剂,还有(c) 粘合剂,例如硅酸铝镁、淀粉糊、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮和/或羟丙基甲基纤维素;如果需要,(d) 崩解剂,例如淀粉(例如马铃薯淀粉或淀粉钠)、乙醇酸盐、琼脂、藻酸或其钠盐、或泡腾混合物;(e) 润湿剂,例如月桂基硫酸钠;和/或(f) 吸附剂、着色剂、调味剂和甜味剂。在一些实施方式中,片剂包含羟丙基甲基纤维素、聚乙二醇6000和二氧化钛的混合物。根据本领域已知的方法,片剂可以薄膜包衣或肠溶包衣。

[0149] 用于口服施用的液体制剂可以采取例如溶液、糖浆或混悬剂的形式,或可以用于在使用前与水或其他合适的媒介重构(constitution)的干燥产品存在。这种液体制剂可以通过常规手段与药学上可接受的添加剂一起制备,例如助悬剂,例如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪;乳化剂,例如卵磷脂或阿拉伯树胶;非水载体,例如杏仁油、油性酯、乙醇或分馏植物油;和防腐剂,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸。制剂还可以视情况包含缓冲盐、调味剂、着色剂和/或甜味剂。如果需要,用于口服施用的制剂可以适当地配制以得到活性化合物的受控释放。

[0150] 对于局部施用,本发明的组合物可以以乳剂、洗剂、凝胶、霜剂、胶状物(jelly)、溶液、混悬剂、软膏和透皮贴剂的形式存在。为了通过吸入递送,组合物可以通过喷雾器以干燥粉末或液体形式递送。对于肠胃外施用,组合物可以是无菌可注射溶液和无菌包装粉末的形式。优选地,可注射溶液以约4.5至约7.5的pH配制。

[0151] 本发明的组合物也可以以冻干的形式提供。这种组合物可包括缓冲剂,例如碳酸氢盐用于在施用前重构(reconstitution),或者缓冲剂可以包含在冻干的组合物中用于与例如水重构。冻干的组合物可以进一步包含合适的血管收缩剂,例如肾上腺素。冻干的组合物可以在注射器中提供,任选地与用于重构的缓冲剂组合进行包装,从而重构的组合物可以立即施用至患者。

[0152] 化合物可以被封装在受控的药物递送系统,诸如压力控制的递送胶囊(参见,例如Takaya等,J.Control Rel.,50:111-122(1998))、结肠靶向的递送系统、渗透控制的药物递送系统等中。压力控制的递送胶囊可包含乙基纤维素膜。结肠靶向递送系统可包含含有乳糖的片剂芯,其先用酸溶性材料例如Eudragit E<sup>®</sup>包衣,然后用肠溶性材料例如Eudragit L<sup>®</sup>包衣。渗透控制的药物递送系统可以用硬明胶胶囊(例如,胶囊渗透泵;可从例如Alzet,Cupertino,CA商业上获得)封装的单个或多个渗透单元。通常,渗透单元包含渗透推动层和药物层,两者均被半透膜围绕。

## [0153] 6. 剂量

[0154] 药物组合物或药剂可以以治疗有效的剂量向受试者施用以治疗本文所述的癌症。在一些实施方式中,将药物组合物或药物以足以引发受试者有效治疗应答的量施用给受试者。

[0155] 施用的剂量将根据多种因素而变化,该多种因素包括但不限于受试者的体重、年

龄、个体状况、待治疗区域的表面积或体积和/或施用形式。剂量的大小也将通过在特定受试者中施用特定化合物所伴随的任何不良作用的存在、性质和程度来确定。优选地,应当使用产生期望结果所需的最小剂量和浓度。对于儿童、老年人、虚弱的患者以及患有心脏和/或肝脏疾病的患者,应适当调整剂量。可从本领域已知的使用实验动物模型评估剂量的研究中获得更多的指导。

[0156] 调整剂量方案以提供最佳的所需的应答,例如治疗应答或最小的副作用。对于Gal13:TIM-3抑制剂抗体的施用,剂量范围为约0.0001mg/kg至约100mg/kg,通常为约0.001mg/kg至约20mg/kg、或约0.01mg/kg至约40mg/kg,并且更通常为约0.01mg/kg至约10mg/kg的受试者体重。优选地,剂量在0.1-10mg/kg体重的范围内。例如,剂量可以为0.1mg/kg体重、0.3mg/kg体重、1mg/kg、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重,更优选为0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重或10mg/kg体重。

[0157] 根据Ab的典型药代动力学特性,给药时间表通常被设计成实现引起持续受体占有率(R0)的暴露。一种示例性的治疗方案需要每周施用一次、每两周施用一次、每三周施用一次、每四周施用一次、每月施用一次、每三个月施用一次或每三到六个月施用一次。剂量和时间安排在治疗过程中可能改变。例如,给药时间表可包括施用Ab:(i)六周周期中每两周;(ii)每四周六剂量,然后每三个月;(iii)每三周;(iv)每2-3周,3-10mg/kg体重一次,然后1mg/kg体重。考虑到IgG4 Ab通常具有2-3周的半衰期,本发明的Gal13:TIM-3抑制剂的优选剂量方案包括0.3-10mg/kg体重,优选3-10mg/kg体重,更优选通过静脉内施用3mg/kg体重,其中在长达6周或12周的周期内每14天给予Ab,直至完全应答或确认为进展性疾病。

[0158] 在一些情况下,同时施用两种或更多种具有不同结合特异性的抗体,在这种情况下,每种Ab施用的剂量落在指示的范围内。抗体通常在多个场合被施用。单次剂量之间的间隔可以例如每周、每2周、每3周、每月、每三个月或每年。间隔也可以为不规则的,如通过测量患者中对于靶抗原的Ab的血液水平所指示的。在一些方法中,调节剂量以达到约1mg/ml-1000mg/ml的血浆Ab浓度,并且在一些方法中约25mg/ml-300mg/ml的血浆Ab浓度。

[0159] 在一些情况下,Gal13:TIM-3抑制剂是化合物,并且可以以治疗有效的每日剂量多天施用,并且治疗可以持续三天至两周范围的或更长的时期。尽管连续的每日剂量是获得治疗有效剂量的优选的途径,但是即使不每天施用试剂,也可以实现治疗有益的效果,只要频繁地重复施用足以维持在受试者中试剂的治疗有效浓度。例如,一个人可以每天、每隔一天施用试剂,或如果采用更高的剂量范围并且受试者耐受,则每周两次。

[0160] 在一些实施方式中,本公开提供给约50kg至70kg的个体的用于口服施用的单位剂量可包含约20mg至300mg的活性成分。通常,Gal13:TIM-3的剂量是足够实现所需效果的剂量。最佳给药方案可以根据受试者体内试剂积聚的测量计算。通常,剂量可以每天、每周或每月一次或多次给予。本领域普通技术人员可以容易地确定最佳剂量、给药方法论和重复率。

[0161] 因此,在一些实施方式中,本文提供的药物组合物是包含能够干扰癌症患者的T细胞上的Gal13和TIM-3之间相互作用的抗体的无菌溶液,所述溶液包含适于在例如1-4小时时期的时段内静脉内递送的在100ml溶液中的每千克患者体重10 $\mu$ g-100mg抗体,例如10 $\mu$ g-40mg、100 $\mu$ g-40mg或1mg-10mg抗体。无菌溶液中的抗体可以是抗Gal13抗体或抗TIM-3抗体。在一些实施方式中,无菌溶液进一步包含一种或多种靶向治疗剂,例如一种或多种如上所

述的检查点抑制剂治疗剂。在一些实施方式中,无菌溶液进一步包含一种或多种直径在10nm至100nm之间、例如在40nm至100nm之间或在50nm至80nm之间的纳米颗粒。

[0162] 在一些实施方式中,本发明的组合物施用一周或多周,例如,1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周或更多周。在仍其他实施方式中,化合物施用一个月或多个月,例如1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月或更多个月。

[0163] 可替代地,Ab可作为缓释制剂施用,在这种情况下,需要较少的频繁施用。剂量和频率根据患者中Ab的半衰期而变化。通常,人Ab示出最长的半衰期,随后是人源化Ab、嵌合Ab和非人Ab。施用的剂量和频率可以根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,在很长一段时间内以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者在其余生中继续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对短的间隔相对高的剂量,直到疾病的进展减少或终止,并且优选地直到患者示出疾病症状的部分或完全缓解。此后,患者可以被施用预防性方案。

[0164] 根据症状的严重程度、复发频率和/或对治疗方案的生理应答,可以在整个治疗过程中监控和调节本发明组合物的剂量。本领域技术人员通常在治疗方案中进行这种调整。

[0165] 非限制示例性实施方式

[0166] 本发明进一步通过以下非限制性的示例性实施方式说明。

[0167] 1.一种激活患者的免疫应答的方法,包括向所述患者施用干扰所述患者中的Ga13和TIM-3之间的相互作用的Ga13:TIM-3抑制剂,其中所述抑制剂以足以激活免疫应答的量施用。

[0168] 2.实施方式1所述的方法,其中所述TIM-3在所述患者的免疫细胞上表达。

[0169] 3.前述实施方式中任一所述的方法,其中所述患者患有癌症,其中所述Ga13和TIM-3之间的相互作用发生在肿瘤微环境中,并且所述Ga13:TIM-3抑制剂以足以减轻所述患者的癌症负担的量施用。

[0170] 4.实施方式3所述的方法,其中所述癌症包括在肿瘤微环境中的细胞,其中所述细胞在其表面上过度表达Ga13。

[0171] 5.一种激活患有包括在肿瘤微环境中的细胞的癌症的患者的免疫应答的方法,其中所述细胞在它们的表面上过度表达Ga13,所述方法包括向所述患者施用干扰在所述肿瘤微环境中在免疫细胞上的Ga13和TIM-3之间的相互作用的Ga13:TIM-3抑制剂,其中所述抑制剂以足以通过激活所述免疫应答来减轻所述患者的癌症负担的量施用。

[0172] 6.实施方式2或5所述的方法,其中免疫细胞是T细胞和/或NK细胞。

[0173] 7.实施方式3-5中任一所述的方法,其中所述癌症是转移癌或原发性癌。

[0174] 8.前述实施方式中任一所述的方法,其中所述抑制剂结合至TIM-3。

[0175] 9.前述实施方式中任一所述的方法,其中所述抑制剂结合至Ga13。

[0176] 10.前述实施方式中任一所述的方法,其中所述TIM-3:Ga13抑制剂为抗体。

[0177] 11.实施方式5所述的方法,其中所述抗体识别包含选自SEQ ID NO:5-8组成的组中的序列的肽。

[0178] 12.实施方式5所述的方法,其中所述抗体是单链抗体或Fab。

[0179] 13.实施方式5所述的方法,其中所述抗体是人源化抗体或人抗体。

[0180] 14. 前述实施方式中任一所述的方法, 其中所述Ga13:TIM-3抑制剂的施用是通过静脉输注。

[0181] 15. 前述实施方式中任一所述的方法, 其中所述Ga13:TIM-3抑制剂与一种或多种其他疗法组合施用。

[0182] 16. 实施方式15所述的方法, 其中所述一种或多种其他疗法选自由化学疗法、放射疗法、检查点抑制剂疗法组成的组。

[0183] 17. 实施方式15或16所述的方法, 其中所述检查点抑制剂疗法选自由抗PD-1疗法和抗CTLA4疗法组成的组。

[0184] 18. 前述实施方式中任一所述的方法, 其中所述抑制剂的施用是每隔一周施用100 µg/kg体重至40mg/kg体重之间的剂量。

[0185] 19. 一种用于确定患者的癌症是否适于用Ga13:TIM-3抑制剂治疗的方法, 所述方法包括:

[0186] 将从患者的已知类型的肿瘤微环境中获得的细胞与对所述Ga13特异性的抗体结合;

[0187] 确定所述细胞上Ga13的水平;

[0188] 比较所述细胞的表面上Ga13的水平与Ga13的第一阈值活性值; 以及

[0189] 如果所述细胞的表面上Ga13的水平高于所述第一阈值活性值, 则确定所述患者的癌症适于用Ga13:TIM-3抑制剂治疗。

[0190] 20. 实施方式19所述的方法, 其中所述Ga13的第一阈值活性值源自至少100名与所述患者具有相同类型癌症的测试个体的队组。

[0191] 21. 实施方式20所述的方法, 其中确定所述患者的癌症适于治疗的步骤进一步包括确定与Ga13的第二阈值活性值相比从所述肿瘤微环境中获得的细胞表面上Ga13的水平是否是25%或更高, 其中所述第二阈值活性值源自包含来自健康患者的相应细胞的样本。

[0192] 22. 实施方式19-21中任一所述的方法, 其中从所述肿瘤微环境获得的细胞至少包括癌细胞和/或肿瘤相关的巨噬细胞。

[0193] 23. 实施方式21所述的方法, 其中确定所述患者的癌症适于治疗的步骤进一步包括确定与所述第二阈值活性值相比从所述肿瘤微环境获得的细胞表面上Ga13的水平是否是75%或更多。

[0194] 24. 一种能够干扰癌症患者的T细胞上Ga13和TIM-3之间的相互作用的无菌溶液, 其中所述溶液包含在适于1-4小时时段内静脉内递送的100ml溶液中的每公斤患者体重在10µg和100mg之间的抗体, 其中所述抗体可以干扰所述T细胞上Ga13和TIM-3之间的相互作用。

[0195] 25. 实施方式23所述的无菌溶液, 其中所述无菌溶液进一步包含一种或多种其他检查点抑制剂抗体。

[0196] 26. 实施方式23所述的无菌溶液, 其中一种或多种其他检查点抑制剂抗体选自由抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体组成的组。

[0197] 27. 实施方式23-25中任一所述的无菌溶液, 其中所述无菌溶液进一步包含直径在10nm和100nm之间的纳米颗粒。

[0198] 28. 实施方式23所述的无菌溶液, 其中所述抗体是抗Ga13抗体。

- [0199] 29.实施方式23所述的无菌溶液,其中所述抗体是抗Ga13抗体。
- [0200] 30.一种生产能够干扰Ga13和TIM-3之间的相互作用的抗Ga13抗体的方法,所述方法包括:将包含选自由SEQ ID NO:5-8组成的组中的序列的肽引入到动物中,其中所述动物产生所述抗Ga13抗体。
- [0201] 31.一种人源化或嵌合抗Ga13抗体,其中抗体包含:
- [0202] (1) 包含互补决定区(CDR) L1、CDR L2和CDR L3的轻链可变区和(2) 包含CDR H1、CDR H2和CDR H3的重链可变区,其中
- [0203] 所述CDR L1包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,
- [0204] 所述CDR L2包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,
- [0205] 所述CDR L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,
- [0206] 所述CDR H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,
- [0207] 所述CDR H2包含SEQ ID NO:10的氨基酸,以及
- [0208] 所述CDR H3包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。
- [0209] 32.实施方式31所述的人源化或嵌合抗Ga13抗体,其中所述重链可变区具有与SEQ ID NO:25的氨基酸序列具有至少90%同一性的序列。
- [0210] 33.实施方式31或32所述的人源化或嵌合抗Ga13抗体,其中所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少90%同一性的序列。
- [0211] 34.一种选择能够阻断患者中Ga13和TIM-3之间的相互作用、激活免疫应答和/或治疗癌症的化合物的方法,其包括:
- [0212] (a) 使化合物文库与Ga13和TIM-3接触,以及
- [0213] (b) 从所述文库中选择一种或多种能够阻断Ga13和TIM-3之间的相互作用的候选化合物。
- [0214] 35.实施方式所述的方法34,进一步包括:
- [0215] (c) 将选自步骤(b)的一种或多种候选化合物与包含T细胞和同种异体抗原呈递细胞的混合物接触,并且鉴定一种或多种能够刺激所述T细胞的化合物,和/或
- [0216] (d) 向患有肿瘤的哺乳动物施用选自步骤(b)的一种或多种候选化合物,并且鉴定一种或多种能够降低所述哺乳动物的肿瘤负担的化合物,以及任选地
- [0217] (e) 向所述患者施用能够刺激所述T细胞和/或能够降低所述哺乳动物的肿瘤负担的有效量的化合物,从而激活免疫应答和/或治疗所述患者的癌症。
- [0218] 36.实施方式35所述的方法,其中所述化合物是抗体。
- [0219] 37.一种激活患者的免疫应答的方法,包括向所述患者施用干扰Ga13和TIM-3之间的相互作用的Ga13:TIM-3抑制剂,其中所述抑制剂以足以激活免疫应答的量施用,其中所述抑制剂包含实施方式31-33中任一实施方式所述的人源化抗体。
- [0220] 38.一种激活患者的免疫应答的方法,包括向患者施用抗体,其中所述抗体包括用于抑制Ga13和TIM-3之间的相互作用的手段。
- [0221] 39.实施方式38所述的方法,其中所述抗体进一步包括用于结合至Ga13或TIM-3的手段。
- [0222] 实施例
- [0223] 本发明通过参考以下实施例进行描述,实施例通过举例的方式提供且不以任何方

式限制本发明。除非另有说明,否则使用本领域众所周知的标准技术或以下具体描述的技术。

[0224] 实施例1.过度表达Gal3的细胞系的生成

[0225] 从美国组织和细胞培养物保藏中心(American Tissue and cell culture Collection) (ATCC,Manassas,VA)获得的小鼠B淋巴瘤细胞系A20用编码Flag-标记的人Gal3蛋白或Flag-标记的人PDL1蛋白的核酸构建体转染。构建体另外含有抗生素抗性的标记物。基于抗生素抗性选择转化的细胞以形成稳定表达Flag-标记的人Gal3蛋白的A20细胞(A20 Gal3细胞)或稳定表达Flag-标记的人PDL1蛋白的A20细胞(A20 hPDL1细胞)。

[0226] 实施例2.Gal3特异性结合至TIM-3

[0227] 该实施例描述了已经进行用于评估Gal3和TIM-3之间的相互作用的各种测定。

[0228] 结合测定--免疫共沉淀

[0229] 进行免疫共沉淀实验来测试TIM-3是否与Gal3特异性相互作用。293T细胞用编码HA-标记的TIM-3的质粒和编码Flag-标记的Gal3、Flag-标记的Gal9或Flag-标记的CEACAM1的质粒共转染。按照制造商的方案,使用脂质体3000(Waltham,MA)进行转染。转染的细胞生长过夜,然后洗涤并在1ml裂解缓冲液中裂解。离心裂解的细胞并收集上清液(裂解物)。制备裂解物并将其在SDS PAGE上分离,并且分别用抗HA抗体(图1A)和抗Flag抗体(图1B)进行探测。抗Flag抗体和抗HA抗体二者都从Sigma购买。图1A和图1B中的箭头指示各种蛋白的存在。

[0230] 对于免疫沉淀,将抗Flag琼脂糖珠子(Abcam,Cambridge,MA)添加至上述产生的上清液(裂解物)中。在4℃通过旋转孵育珠子和裂解物过夜以允许Flag-标记的蛋白附着。然后珠子用裂解缓冲液洗涤3次且与1xSDS PAGE样本缓冲液混合,煮沸并在SDS-PAGE上分离。将SDS-PAGE凝胶转移至膜上,其用抗HA抗体探测(图1C)。在图1A-图1C中,泳道1-3分别代表来自用编码HA-标记的TIM-3的质粒和编码Flag-标记的Gal3的质粒共转染的细胞;用编码HA-标记的TIM-3的质粒和编码Flag-标记的Gal9的质粒共转染的细胞;或用编码HA-标记的TIM-3的质粒和编码Flag-标记的CEACAM1的质粒共转染的细胞产生的裂解物的结果。

[0231] 如在图1中示出,结果指示人Gal3特异性拉下人TIM-3而人CEACAM1不能拉下HA-标记的人TIM-3。尽管人Gal9似乎也拉下人TIM-3(图1C的轨道2),但是由于Gal9蛋白聚集这似乎是非特异性的-Gal9的分子量似乎比40kD的实际尺寸大得多。Gal9和TIM-3之间的相互作用本质上是非特异性的结论也得到以下图5B中示出的证据的支持。

[0232] 进行另外的免疫共沉淀实验来测试Gal3是否与TIM-3特异性相互作用。将Flag-人Gal3质粒(Origene,Rockville,MD)转染到293T细胞中,其是80%融合。如上所述,使用脂质体3000在10cm板中进行转染。在过夜转染后,将细胞重置于已经涂覆人Fc、人PD1-Fc或人TIM-3Fc的10cm板上,持续3小时。将细胞以1xPBS洗涤一次,然后在1ml裂解缓冲液中裂解。收集细胞裂解物并离心。将蛋白G珠子添加至离心后形成的上清液中,并在4℃旋转孵育,持续4小时。然后,珠子用裂解缓冲液洗涤3次,随后添加1x SDS PAGE样本缓冲液。将含有珠子的样本煮沸并在SDS-PAGE上分离,转移至膜上。然后用抗Flag抗体探测该膜。如在图2中示出,人TIM-3特异性拉下Flag-标记的Gal3。相反,人Fc或人PD1 Fc都不能拉下TIM-3。这表明Gal3不与Fc或PD1 Fc结合,并且Gal3和TIM-3之间的结合是特异性的。

[0233] 结合测定--细胞粘附测定

[0234] 接下来,进行细胞粘附测定来证实Gal3和TIM-3的结合。在这个实验中,96孔板在4℃用人Fc、人PD1-Fc、人VISTA-Fc、人TIM-3-Fc涂覆过夜,然后在37℃用2%BSA的PBS封闭2小时。将A20、过度表达人Gal3的A20细胞(A20 Gal3)或过度表达人PDL1的A20细胞(A20 PDL1)接种入用如上所述的各种Fc蛋白涂覆的孔中。然后将板以720rpm离心,然后停止。将板在37℃孵育30分钟,然后浸入PBS中。将板缓慢翻转180度,并在翻转位置保持30分钟。将板翻转回去并从PBS中移出后,将来自每个孔中的200μl溶液移出并丢弃,并将体积约100μl的剩余溶液转移到96孔板中。通过流式细胞术分析对细胞计数。

[0235] 结果示出,粘附至人TIM-3Fc涂覆的板上的过度表达人Gal3的A20(A20 Gal3)细胞的数量显著地大于粘附到人VISTA Fc或人PD1 Fc涂覆的板上的细胞的数量。如所预期的,由于PDL1是PD1的已知配体,因此示出粘附至hPD1 Fc的A20 PDL1细胞的数量显著大于粘附至人VISTA Fc或人TIM-3Fc涂覆的板上的细胞的数量。这些结果进一步证实Gal3和TIM-3之间的相互作用是特异性的。

#### [0236] 阻断测定一流式细胞术

[0237] 使用A20细胞进行流式细胞术分析以评估TIM-3和Gal3之间的结合。在冰上用含有或不含有小鼠TIM-3Fc的10%FBS HBSS溶液孵育A20Gal3细胞20分钟。有五个实验组:在组1中,不用mTIM-3Fc蛋白孵育的A20 Gal3细胞作为对照;在组2中,用mTIM-3Fc蛋白孵育A20 Gal3细胞;在组3、组4、组5中,除了mTIM-3Fc蛋白外,还添加抗小鼠TIM-3多克隆抗体(R&D System,Minneapolis,MN)(组3)、单克隆抗体RMT3-23(Bio X cell,West Lebanon,NH)(组4)、单克隆抗体215015(R&D Systems)(组5)以测试这些抗体是否能够阻断Gal3和TIM-3结合。为了阻断,细胞用含有所述的抗体的10%FBS HBSS孵育,然后添加含有mTIM-3Fc的10%FBS HBSS,持续20min。离心样本,并将小球添加至含有APC缀合的抗hFc抗体(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)的10%FBS HBSS中,持续20分钟。旋转后,活/死细胞用紫罗兰色死细胞染色试剂盒(Life Technologies)染色。对染色的细胞进行流分析(flow analysis)。

[0238] 图4示出mTIM-3能够结合至死细胞和活细胞上的Gal3蛋白,并且Gal3和死细胞结合TIM-3上不同的表位。在这个测定中,TIM-3Fc结合死细胞(图4C,第2行)和活细胞上表达的Gal3(图4B,第2行)二者。然而,mTIM-3单克隆抗体RMT3-23阻断TIM-3与死细胞的结合(图4C,第4行),而不是与活细胞上表达的Gal3的结合(图4B,第4行)。这显示Gal3和死细胞结合TIM-3上不同的表位。作为对照,mTIM-3多克隆抗体或单克隆抗体215015(R&D System,Minneapolis,MN)都对Tim3与Gal3(图4B,第3行和第5行)或与死细胞(图4C,第3行和第5行)的结合没有任何影响。

#### [0239] 阻断测定--ELISA

[0240] 还进行ELISA测定来测试Gal3和TIM-3之间的相互作用。96孔ELISA板(ThermoFisher Scientific)用小鼠Gal3蛋白(BioLegend,San Diego,CA)的PBS或人Gal9蛋白(R&D systems)的PBS或磷脂酰丝氨酸(PS)(Sigma)的乙醇溶液涂覆,且在4℃孵育过夜。用TBST洗涤板三次,然后在室温用含有2%BSA的PBS缓冲液封闭1小时。在图5A中,将不同的抗Gal3抗体,即mGal3多克隆抗体(R&D systems)、mAb IMT001、mAb M3/38(Thermofisher Scientific)(图5A)添加至已经用Gal3涂覆的孔中。抗体被孵育10分钟,然后将小鼠TIM-3Fc添加至板中且孵育另外一小时孵育。然后洗涤板三次,随后在室温用抗人



IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch) 孵育1h。用TBST洗涤三次后,用TMB底物(subtract) (GeneTex,Irvine,CA) 显色,并用1N HCl终止反应。在450nm处读取光密度(OD)。结果表示为重复的平均OD $\pm$ SD。在图5A中的结果示出在所有测试的抗体中,小鼠Gal3多克隆抗体和单克隆抗体IMT001阻断Gal3和TIM-3之间的相互作用(图5A)。

[0241] 在图5B中,将小鼠Gal3蛋白(BioLegend)的PBS(组1和组2)或PS(Sigma-Aldrich, St.Louis,MO)的乙醇溶液(组3和组4)涂覆在板上且在4℃孵育过夜。将抗mTIM-3小鼠抗体mAb RMT3-23(Bio X cell)仅添加至组2和组4的涂覆的板。如上所述,添加第二抗人-IgG-HRP抗体和底物以检测mTIM-3与mGal3或PS的结合。结果显示,与第3组相比,第4组中的信号显著降低,表明RMT3-23阻断PS与TIM-3的结合;同时,结果显示与第1组相比,第2组中的信号没有显著降低,表明RMT3-23未阻断Gal3与TIM-3的结合。由于TIM-3通过其与外部化且暴露的死细胞表面上的PS相互作用而结合至死细胞,因此这些实验证实了图4A-图4C中的观察,即Gal3和PS结合至TIM-3上的不同表位。

[0242] 对于糖依赖性测定,ELISA板用mGal3(组1和组2)或hGal9(组3和组4)涂覆。在室温,将小鼠TIM-3Fc蛋白(R&D systems)添加至用(组2和组4)或不用(组1和组3)25mM的 $\alpha$ -乳糖(Sigma-Aldrich)涂覆的ELISA板,持续1h。如上所述,添加第二抗人-IgG-HRP抗体和底物以检测mTIM-3-Fc与mGal3或hGal9的结合。图5C示出乳糖阻断Gal9与TIM-3的结合,如通过与组3(不存在乳糖)相比,在组4(存在乳糖)中剧烈的超过10倍的信号减少所示,表明Gal9和TIM-3之间的糖依赖性结合。相反,尽管乳糖对Gal3与TIM-3结合的阻断作用最小-组2(存在乳糖)和组1(不存在乳糖)之间,TIM-3和Gal3的结合产生的信号没有显著的差异。这示出Gal3和TIM-3之间的相互作用不受糖存在的影响,即相互作用是不依赖糖的。

[0243] 实施例3.过度表达Gal3抑制T细胞激活

[0244] 该实施例描述了用于评估A20细胞中过度表达Gal3的功能特性所进行的实验。

[0245] 如上所述,产生稳定地过度表达hGal3的A20克隆#41、#31和#15。图6A示出流式细胞术分析的结果,其示出这些克隆中的hGal3表达水平。A20或A20 Gal3克隆的细胞与小鼠D011.10 T细胞混合。将混合物置于96孔平板的每个孔中,然后将OVA323-339肽(Invivogen, San Diego, CA)添加至板中。过夜孵育后,上清液用于通过ELISA (Thermo Fisher Scientific)测量T细胞的IL-2产生。如图6B中示出,与当T细胞与亲本A20细胞混合时相比,当与三种小鼠A20细胞克隆的任何一种混合时,通过小鼠D011.10 T细胞的IL-2产生显著地减少(图6B)。

[0246] 实施例4.抗Gal3抗体在小鼠肺转移模型中示出抗肿瘤活性

[0247] 进行该实施例中的实验来评估体内Gal3:TIM-3抑制剂的抗肿瘤功效。根据由分子医学研究所机构动物护理和使用委员会(Molecular Medicine Research Institute Institutional Animal Care and Use Committee)批准的方案进行动物实验。C57BL/6小鼠到达后,将其放置在经过实验室动物护理评估和认可协会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)认可的设施中。将36只7周龄的雌性小鼠随机分配为三组(n=12)。在第0天,洗涤B16F10细胞(在0.1mL PBS中,  $2 \times 10^5$  个),并且在使用带有27-ga针头的注射器注入小鼠的尾静脉中之前将其重悬于PBS中。在B16F10细胞的注射之后,动物在第0天、第3天、第7天和第10天腹腔内施用10mg/Kg的小鼠IgG2b(Bio X Cell, West Lebanon, NH),在第0天、第3天和第7天腹腔内施用10mg/Kg的mPD1

抗体 (Bio X Cell, West Lebanon, NH) 或在第0天、第3天、第7天、第10天和第15天腹腔内施用10mg/Kg的Gal3抗体IMT001。在该实验中使用的Gal3抗体克隆IMT001识别Gal3上的表位 (SEQ ID NO:5)。在第21天,动物被人道地处死,肺组织被取出并固定在10% 甲醛缓冲溶液中。计数肺的左叶的一个表面上黑色转移集落的数量 (图7B)。结果表示为均值 $\pm$ SEM。使用单因素方差分析 (one-wayANOVA) 与IgG对照组比较进行统计分析。

[0248] 图7A示出用抗mGal3抗体染色的B16F10细胞的均值荧光强度 (MFI) 比用同种型对照抗体染色的细胞的均值荧光强度高近十倍。详细地,将B16F10细胞用含有对照大鼠IgG PE或大鼠抗小鼠Gal3 PE抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 的10%FBS HBSS溶液在冰上孵育20分钟。旋转后,活/死细胞用紫罗兰色死细胞染色试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 染色。对染色的细胞进行流分析。图7B示出来自三个治疗组的全肺的代表性图像。图7C示出左肺叶的表面上转移集落的数量 (均值 $\pm$ SEM)。图7D和图7E示出不同治疗组的肺重量和体重 (均值 $\pm$ SEM)。与同种型对照组相比, Gal3抗体治疗组示出如由黑色转移集落的数目所指示的肿瘤数目显著的减少 (约46%) ( $p < 0.01$ )。然而,与同种型对照组相比,抗小鼠PD1抗体29F在该肺转移模型中未示出显著的抗肿瘤作用 ( $p > 0.05$ )。

[0249] 实施例5. 抗Gal3抗体在4T1原位肿瘤诱导的肺转移模型中示出抗肿瘤活性

[0250] 动物实验遵循分子医学研究所机构动物护理和使用委员会 (Molecular Medicine Research Institute Institutional Animal Care and Use Committee) 批准的方案。7周龄的雌性Balb/c小鼠到达后,将其放置在经过实验室动物护理评估和认可协会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) 认可的设施中。在肿瘤植入当天,收集4T1细胞,洗涤并重悬浮在PBS中。小鼠通过吸入麻醉剂 (在医用级空气中的3%至5%的异氟烷) 麻醉。通过使用带有25-ga针头的注射器将 $2 \times 10^5$ 细胞的0.1mL PBS皮下注入乳腺中。将小鼠随机分配为两组 ( $n=10$ )。4T1细胞注射之后,在第0天、第3天和第7天小鼠腹腔内施用10mg/Kg的小鼠IgG2b (Bio X Cell) 或在第0天、第3天、第7天、第10天和第14天小鼠腹腔内施用10mg/Kg的Gal3抗体IMT001。每周两次监测肿瘤体积和体重。在第30天,小鼠被人道地处死且肺组织用30%的蔗糖胀大,取出并固定在Bouin溶液 (Sigma-Aldrich) 中。计数肺中左叶的一个表面上转移集落的数量。结果表示为均值 $\pm$ SEM。使用非配对T检验与IgG对照组比较进行统计分析。

[0251] 图8A示出来自治疗组的全肺的代表性图像。图8B示出不同治疗组的体重 (均值 $\pm$ SEM)。图8C示出左肺叶一个表面上转移集落的数量 (均值 $\pm$ SEM)。与用同种型对照抗体治疗的小鼠相比,用单克隆抗人Gal3抗体治疗的动物示出肺转移数量的显著减少 ( $p < 0.05$ )。

[0252] 实施例6. 抗Gal3抗体在原发性小鼠RENCA肾肿瘤模型中示出抗肿瘤活性

[0253] 进行实验来评估在原发性肿瘤模型中Gal3:IM-3抑制剂的抗肿瘤功效 (图9)。根据由分子医学研究所机构动物护理和使用委员会 (Molecular Medicine Research Institute Institutional Animal Care and Use Committee) 批准的方案进行动物实验。Balb/c小鼠到达后,将其放置在经过实验室动物护理评估和认可协会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) 认可的设施中。将七周龄雌性小鼠随机分配为三组 ( $n=15$ )。在肿瘤植入当天,小鼠通过吸入麻醉剂 (在医用级空气中的3%至5%的异氟烷) 麻醉。洗涤Renca细胞,并且在使用带有25-ga针头的注射器皮下注射 $2 \times 10^5$ 细胞的0.1mL PBS之前,将其重悬于PBS中。在注射Renca细胞后,在第0天、第3天和

第7天小鼠腹腔注射(i.p.)施用10mg/Kg的小鼠IgG2b(Bio X Cell)或mPD1抗体(BioXCell),或在第0天、第3天、第7天、第10天和第14天小鼠腹腔注射(i.p.)施用10mg/Kg的Gal3抗体IMT001抗体。当对照组中的肿瘤体积达到 $2000\text{mm}^3$ - $2500\text{mm}^3$ 之间时,动物被人道地处死。结果表示为均值 $\pm$ SEM。使用非配对t检验与IgG2b对照组比较进行统计分析。

[0254] 结果示出在肾癌模型中Gal3抗体(IMT001)的抗肿瘤活性。与同种型对照组相比,抗Gal3抗体治疗组示出肿瘤生长的显著减少(约35%)( $p<0.05$ ),而抗PD-1抗体没有作用(图9)。

[0255] 实施例7.抗Gal3抗体在原发性小鼠MC38结肠肿瘤模型中示出抗肿瘤活性

[0256] 动物实验遵循分子医学研究所机构动物护理和使用委员会(Molecular Medicine Research Institute Institutional Animal Care and Use Committee)批准的方案。7周龄的雌性C57BL/6小鼠到达后,将其放置在经过实验室动物护理评估和认可协会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)认可的设施中。在肿瘤植入当天,收集MC38鼠结肠腺癌细胞,洗涤并将其重悬于PBS中。小鼠通过吸入麻醉剂(在医用级空气中的3%至5%的异氟烷)麻醉。使用带有25-ga针头的注射器将 $5\times 10^5$ 细胞的0.1mL PBS皮下注入小鼠的右肋腹(right flank)中。在第7天,测量肿瘤体积并将小鼠随机分配为两组( $n=8$ )。在第7天、第10天、第14天、第17天和第22天,小鼠腹腔内施用10mg/Kg的小鼠IgG2b(BioXCell)或Gal3抗体IMT001。每周两次监测肿瘤体积和体重。当肿瘤体积达到 $3000\text{mm}^3$ 时,动物被人道地处死。结果表示为均值 $\pm$ SEM。使用非配对T检验与IgG对照组比较进行统计分析。

[0257] 在图10中的结果示出IMT001抗体在MC38结肠癌模型中具有抗肿瘤活性。与用同种型对照抗体治疗的小鼠相比,在第24天IMT001抗体治疗的小鼠示出肿瘤负荷的显著的减少(约33%)( $p<0.05$ )。

[0258] 实施例8.GAL3抗体克隆IMT-001的表位结合

[0259] 合成了包含24个有10个氨基酸重叠的20个氨基酸的肽且覆盖了整个人Gal3蛋白序列的肽阵列(Genscript,Piscataway,NJ)(图11A)。20 $\mu\text{g}$ 的每个肽斑点印迹在膜上。用5%牛奶的PBS封闭后,将膜用1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  IMT001抗体在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗涤三次后,将膜用1:8000稀释的抗mIgG HRP抗体(Southern Biotech,Birmingham,AL)孵育一小时。洗涤三次后,将膜用Western ECL印迹底物(Bio-Rad,Hercules,CA)孵育并显色(图11B)。肽5和肽6示出良好的信号,表明与IMT001结合的hGal3上的表位是PGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYP(SEQ ID NO:7)。

[0260] 为了进一步定义在上述肽上IMT001的结合表位,合成了8个由其衍生的较短的肽(Genscript,Piscataway,NJ)(图11C),并通过ELISA测定它们与IMT001的结合(图11D)。用PBS缓冲液中的这些肽涂覆96孔Elisa板(Thermo Scientific)且在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用TBST洗涤板三次,然后在室温用含有2%BSA的PBST缓冲液封闭1小时。在室温将10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IMT001在涂覆的Elisa板中孵育1小时。将板洗涤三次,之后在室温用1:8000稀释的抗小鼠IgG-HRP孵育1h。用TBST洗涤三次后,用100 $\mu\text{L}$ 的TMB底物(subtract)(GeneTex)显色,并用50 $\mu\text{L}$ 的1N HCl终止。在450nm处读取光密度(OD)。结果表示为重复的平均 $0\text{D}\pm\text{SD}$ 。Pep-2示出良好的信号,表明人Gal3上IMT001的结合表位是GQAPPGAYPG(SEQ ID NO:8)。

[0261] 实施例9.B16F10肺转移小鼠肿瘤的免疫分析(immune profiling)

[0262] 用1百万个B16F10细胞静脉注射植入小鼠中。然后小鼠在第0天、第1天、第3天和第7天用IMT001或同种型对照(10mg/kg腹腔注射)治疗并在第8天处死,用于肺免疫细胞分离和表型分析。细胞从肺分离,然后用针对淋巴细胞标记物CD3、CD4、CD8、CD19、DX5的荧光标记的抗体染色并通过流式细胞术分析。在图12中的结果示出与同种型对照抗体治疗相比,抗Gal3抗体IMT001治疗增加各种免疫效应细胞的数量,免疫效应细胞包括患有肿瘤的肺中的CD3 T淋巴细胞、CD4 T辅助细胞、CD8细胞毒性T细胞、CD19 B细胞和DX5自然杀伤细胞。这表明抗Gal3抗体能够激活免疫细胞。

#### [0263] 实施例10.GAL3在人肺癌相关的巨噬细胞上的表达

[0264] 进行免疫组织化学(IHC)实验来检测人肺癌中Gal3的表达。在室温将人肺癌的冷冻组织切片(US Biomax Inc.)固定在10%中性福尔马林缓冲液(Fisher Scientific)中10分钟,然后在PBS中洗涤两次,5分钟。在室温通过将切片浸入3% $H_2O_2$ 中10分钟来封闭内源性过氧化物酶。在PBS中洗涤两次,5分钟,在室温将切片在链霉亲和素试剂(Molecular Probes)中孵育15分钟,然后用PBS彻底冲洗,在生物素试剂(Molecular Probes)中孵育15分钟,再在PBS中另外冲洗以封闭内源性生物素的背景。用10%FBS、200 $\mu$ g/mL mIgG和200 $\mu$ g/mL hIgG封闭切片1h,用第一抗体IMT001-生物素(5 $\mu$ g/mL)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗涤三次,然后用第二抗体HRP亲和素(BioLegend)以1:100孵育1h,并洗涤3次。染色是通过用DAB底物(Vector Laboratories)孵育来显色,并通过将切片浸入蒸馏水中来终止。最终,将人肺癌切片在苏木精QS(Vector Laboratories)中复染,在蒸馏水中洗涤,在分级的一系列乙醇和二甲苯溶液中脱水,然后封固在VectaMount<sup>TM</sup>封固剂(Vector Laboratories)中。

[0265] 在图13中的结果示出在那些人肺癌切片(鳞状细胞癌和腺癌)中冠状肿瘤相关的巨噬细胞表达了Gal3,如IMT001对其的阳性染色所证明的。

#### [0266] 实施例11.GAL3在人M2巨噬细胞上的表达

[0267] 首先用CD14细胞阳性选择试剂盒(Miltenyi, Auburn, CA)从外周血单核细胞(PBMC)中分离人CD14单核细胞,并在GM-CSF加IL-4或GM-CSF或M-CSF(Rocky Hill, NJ)的存在下分别分化为树突状细胞(DC)、M1巨噬细胞或M2巨噬细胞。然后进行流式细胞术分析来检测Gal3在人树突状细胞(DC)、M1巨噬细胞和M2巨噬细胞上的表达。详细地,在冰上将100,000个DC、M1细胞或M2细胞用含有10 $\mu$ g/ml的对照mIgG生物素(BioLegend)或IMT001生物素的100 $\mu$ l 10%FBS HBSS溶液孵育20分钟。然后洗涤细胞,并在冰上用PE-链霉亲和素(BioLegend)以1:1000孵育20min。旋转后,活/死细胞用紫罗兰色死细胞染色试剂盒(Life Technologies)染色。对染色的细胞进行流分析。在图14C中的结果示出用IMT001染色的M2细胞的均值荧光强度(MFI)大大高于用同种型对照抗体染色的细胞的均值荧光强度,表明IMT001与M2细胞的特异性结合,而树突状细胞(图14A)和M1巨噬细胞(图14B)无法被染色。

#### [0268] 实施例12.抗GAL3抗体增强小鼠巨噬细胞/T细胞反应中的T细胞活性

[0269] 在小鼠巨噬细胞上Gal3的表达通过IHC和流式细胞术分析二者进行检测。在IHC的细节中,每孔接种100,000个细胞过夜。在第二天,细胞用PBS洗涤一次,在室温用3%甲醛固定10min,然后用PBS洗涤两次,并在室温用包含10%FBS和200 $\mu$ g/mL的PBS封闭1小时。封闭后,在4 $^{\circ}$ C细胞用10 $\mu$ g/mL的第一抗体mIgG-生物素(BioLegend)或IMT001-生物素孵育过夜,用PBST洗涤三次,在室温用亲和素-HRP(1:1000)染色1h,然后再次用PBST洗涤三次。染色使用过氧化物酶底物显色并用苏木精QS(Vector Laboratories)复染。结果显示,与mIgG对照

(图15A)相比,IMT001清楚地检测到巨噬细胞上Gal3的表达(图15B)。

[0270] 在流式细胞术的实验中,100,000个RAW细胞在冰上用10%FBS加200 $\mu$ g/mL hIgG封闭20min,然后在冰上用含有10 $\mu$ g/ml的对照mIgG(BD Biosciences)或IMT001的100 $\mu$ l 10%FBS HBSS溶液孵育20分钟。然后洗涤细胞,并在冰上用APC缀合的抗mFc抗体(Jackson ImmunoResearch)以1:100孵育20分钟。旋转后,活/死细胞用紫罗兰色死细胞染色试剂盒(Life Technologies)染色。对染色的细胞进行流分析。图15C示出,与用同种型对照抗体染色的细胞的均值荧光强度相比,用IMT001染色的RAW细胞的均值荧光强度(MFI)高大于10倍。

[0271] 通过混合淋巴细胞反应(MLR)测定展示了IMT001激活T细胞的能力。将RAW小鼠巨噬细胞与D011小鼠T细胞以1:1的比例混合,用OVA肽处理,并在37 $^{\circ}$ C在10 $\mu$ g/ml的mIgG(BD Biosciences)、抗mPD1抗体29F(BioXCell)或IMT001的存在下孵育过夜。取50 $\mu$ l的培养基用于mIL-2测量。根据来自eBioscience的商业试剂盒小鼠IL-2Elisa Ready-SET-Go测量mIL-2的产生。

[0272] 图15D示出,与mIgG或mPD1抗体处理的细胞相比,IMT001抗体而非小鼠PD-1抗体29F增强了IL-2的产生,表明巨噬细胞诱导的T细胞失活的逆转。

[0273] 尽管为了清楚和理解,上述发明已经通过附图和实施例的方式详细描述,但是根据本发明的教导,对于本领域的普通技术人员显而易见的是可以在不背离本发明的精神和范围的情况下对其进行等同的某些变化、改变、修改和替换。结果,本文描述的实施方式可以进行各种修改、改变等,而本发明的范围仅通过参考所附的实施方式来确定。本领域技术人员将容易地意识到可以进行改变、变更或修改各种非关键参数以产生基本相似结果。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述特定实施方式的目的,并不意欲限制,因为本发明的范围仅由所附的权利要求限制。另外,本文提供的每个参考文献通过引用整体纳入本文,其程度与每个参考文献通过引用单独纳入的程度相同。在本申请与本文提供的参考文献之间存在冲突的情况下,以本申请为准。

[0274] 非正式的序列表

[0275] SEQ ID NO:1:小家鼠(Mus musculus)Gal3核酸(cDNA)序列(起始密码子和终止密码子以下划线表示。)

[0276]

GGGAGGGCGG GCCCGGGGAA AAGAGTACTA GAAGCGGCCG AGCCACCGCC CAGCTCTGAC  
AGCTAGCGGA GCGGCGGGTG GAGCACTAAT CAGGTGAGCG GCACAGAGAG CACTACCCAG  
GAAAATGGCA GACAGCTTTT CGCTTAACGA TGCCTTAGCT GGCTCTGGAA ACCCAAACCC  
TCAAGGATAT CCGGGTGCAT GGGGGAACCA GCCTGGGGCA GGGGGCTACC CAGGGGCTGC  
TTATCCTGGG GCCTACCCAG GACAAGCTCC TCCAGGGGCC TACCCAGGAC AGGCTCCTCC  
AGGGGCCTAC CCAGGACAGG CTCCTCCTAG TGCCTACCCC GGCCCAACTG CCCCTGGAGC  
TTATCCTGGC CCAACTGCCC CTGGAGCTTA TCCTGGCTCA ACTGCCCCTG GAGCCTTCCC  
AGGGCAACCT GGGGCACCTG GGGCCTACCC CAGTGCTCCT GGAGGCTATC CTGCTGCTGG  
CCCTTATGGT GTCCCCGCTG GACCACTGAC GGTGCCCTAT GACCTGCCCT TGCCTGGAGG  
AGTCATGCCC CGCATGCTGA TCACAATCAT GGGCACAGTG AAACCCAACG CAAACAGGAT  
TGTTCTAGAT TTCAGGAGAG GGAATGATGT TGCCTTCCAC TTAAACCCCC GCTTCAATGA  
GAACAACAGG AGAGTCATTG TGTGTAACAC GAAGCAGGAC AATAACTGGG GAAAGGAAGA  
AAGACAGTCA GCCTTCCCCT TTGAGAGTGG CAAACCATT CAAAATACAAG TCCTGGTTGA  
AGCTGACCAC TTCAAGGTTG CGGTCAACGA TGCTCACCTA CTGCAGTACA ACCATCGGAT  
GAAGAACCTC CGGGAAATCA GCCAACTGGG GATCAGTGGT GACATAACCC TCACCAGCGC  
TAACCACGCC ATGATCTAAG CCAGAAGGGG CGGCACCGAA ACCGGCCCTG TGTGCCTTAG  
GAGTGGGAAA CTTTGCAATT CTCTCTCCTT ATCCTTCTTG TAAGACATCC ATTTAATAAA  
GTCTCATGCT GAGAGATACC CATCGCTTG GGGGTTTTTA TGATACTGGA TGTCAAATCT  
TAGGACTGCT CGTGA CTGCT AGGCAAGTGT TCTCTCACTG AGCTACACAT CCCTAGCCTT  
TTAACTTTG TGTGTTGTGT GTCTGTGCAC ATGGGTACAG GTGCCTGCTC ACTTGAGAGG  
CACCAGGCCT CCTGGAGCTG GAGTTACAGG TGGTTGTAAG TAAGCTGTGT GACCAGGTTG  
CTGGGAACCA GTCTCAGATC CTCCTGAGAC AGGTCAGGTC CACTGATGCC TCCAGCTGCC  
TGTCTTTATA TGCCCTTTGA TTTGGTGCAG TTTATATAA AGGGAACTAT GTAATTATCA  
ATAAACCATC CTGATTTTTA CAAAGG

[0277] SEQ ID NO:2:小家鼠Gal3多肽序列

MADSFSLNDALAGSGNPNPQGYPGAWGNQPGAGGYPGAAYPGAY

[0278]

PGQAPPGAYPGQAPPGAYPGQAPPSAYPGPTAPGAYPGPTAPGAYPGSTAPGAFFGQP  
GAPGAYPSAPGGYPAAGPYGVPAGPLTPYDLPLPGGVMPRMLITIMGTVKPNANRIV

[0279]

LDFRRGNDVAFHFNPRFNENRRRVIVCNTKQDNNWGKEERQSAFPFESGKPFKIQVLV  
EADHFKVAVNDAHLLQYNHRMKNLREISQLGISGDITLTSANHAMI

[0280] SEQ ID NO:3:智人(Homo sapiens)Gal3核酸(cDNA)序列(起始密码子和终止密码子以下划线表示。)

- GAGTATTTGA GGCTCGGAGC CACCGCCCCG CCGGCGCCCCG CAGCACCTCC TCGCCAGCAG  
CCGTCCGGAG CCAGCCAACG AGCGGAAAAT GGCAGACAAT TTTTCGCTCC ATGATGCGTT  
ATCTGGGTCT GGAAACCCAA ACCCTCAAGG ATGGCCTGGC GCATGGGGGA ACCAGCCTGC  
TGGGGCAGGG GGCTACCCAG GGGCTTCCTA TCCTGGGGCC TACCCCGGGC AGGCACCCCC  
AGGGGCTTAT CCTGGACAGG CACCTCCAGG CGCCTACCCT GGAGCACCTG GAGCTTATCC  
CGGAGCACCT GCACCTGGAG TCTACCCAGG GCCACCCAGC GGCCCTGGGG CCTACCCATC  
TTCTGGACAG CCAAGTGCCA CCGGAGCCTA CCCTGCCACT GGCCCCTATG GCGCCCCTGC  
TGGGCCACTG ATTGTGCCTT ATAACCTGCC TTTGCCTGGG GGAGTGGTGC CTCGCATGCT  
[0281] GATAACAATT CTGGGCACGG TGAAGCCCAA TGCAAACAGA ATTGCTTTAG ATTTCAAAG  
AGGGAATGAT GTTGCCTTCC ACTTTAACCC ACGCTTCAAT GAGAACAACA GGAGAGTCAT  
TGTTTGCAAT ACAAAGCTGG ATAATACTG GGGGAAGGGAA GAAAGACAGT CGGTTTTCCC  
ATTTGAAAGT GGGAAACCAT TCAAATACA AGTACTGGTT GAACCTGACC ACTTCAAGGT  
TGCAGTGAAT GATGCTCACT TGTTGCAGTA CAATCATCGG GTTAAAAAAC TCAATGAAAT  
CAGCAAATG GGAATTTCTG GTGACATAGA CCTCACCAGT GCTTCATATA CCATGATATA  
ATCTGAAAGG GGCAGATTAA AAAAAAAAAA AGAATCTAAA CCTTACATGT GTAAAGGTTT  
CATGTTCACT GTGAGTGAAA ATTTTACAT TCATCAATAT CCCTCTTGTA AGTCATCTAC  
TTAATAAATA TTACAGTGAA TTACCTGTCT CAATATGTCA AAAAAAAAAA AAAAAA  
[0282] SEQ ID NO:4:智人Ga13多肽序列  
MADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPGAWGNQPAGAGGYPGASYPGA  
YPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGAPAGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYP  
[0283] ATGPYGAPAGPLIVPYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFN  
PRFNENRRRVIVCNTKLDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQLVEPDHFKVAVNDAHL  
LQYNHRVKKLNEISKLGISGDIDLTSASYTMI  
[0284] SEQ ID NO:5:对应于图11A中的肽\_5的hGa13表位  
[0285] PGAYPGQAPPGAYPGQAPPG  
[0286] SEQ ID NO:6:对应于图11A中的肽\_6的hGa13表位GAYPGQAPPGAYPGAPGAYP SEQ ID  
NO:7:hGa13表位  
[0287] PGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYP SEQ ID NO:8:对应于图11C中的Pep-2的  
hGa13表位GQAPPGAYPG hIgG4同种型中的人源化IMT001  
[0288] SEQ ID NO:9:重链CDR1  
[0289] GYTFTNY SEQ ID NO:10:重链CDR2  
[0290] NTNTGE SEQ ID NO:11:重链CDR3  
[0291] YDNFFAY SEQ ID NO:12:重链FR1  
[0292] QVQLVQSGSELKKPGASVKVCKAS SEQ ID NO:13:重链FR2



- [0293] GMNWVRQAPGQGLKWMGWI SEQ ID NO:14:重链FR3
- [0294] PTYAEFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCAP SEQ ID NO:15:重链FR4
- [0295] WQGTTTVTS SEQ ID NO:16:重链  
QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTNTGEPTYAEFTG  
RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCAPYDNFFAYWGQTTTVTSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA  
ALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD
- [0296] KRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE  
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS  
VMHEALHNHYTQKSLSLGLG\*\*
- [0297] SEQ ID NO:17:轻链CDR1
- [0298] RSSKSLLYKDGTKYLN SEQ ID NO:18:轻链CDR2
- [0299] LMSTHAS SEQ ID NO:19:轻链CDR3
- [0300] QQLVDYPLT SEQ ID NO:20:轻链FR1
- [0301] DIVLTQSPLSLPVTGPGEASISC SEQ ID NO:21:轻链FR2
- [0302] WFLQKPGQSPQLLIY SEQ ID NO:22:轻链FR3
- [0303] GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYC SEQ ID NO:23:轻链FR4
- [0304] FGGGTKLEIK SEQ ID NO:24:轻链  
DIVLTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLYKDGTKYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTHASGVPDRFSGSGSG  
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF
- [0305] REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNR  
GEC
- [0306] SEQ ID NO:25:重链可变区  
QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTNTGEPTYAEFTG
- [0307] RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCAPYDNFFAYWGQTTTVTS
- [0308] SEQ ID NO:26:轻链可变区  
DIVLTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLYKDGTKYLNWFLQKPGQSPQLLIYLMSTHASGVPDRFSGSGSG
- [0309] TDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQLVDYPLTFGGGTKLEIK
- [0310] SEQ ID NO:27:如图11A中公开的肽\_1
- [0311] ADNFSLHDALSGSGNPNPQG SEQ ID NO:28:如图11A中公开的肽\_2
- [0312] SGSGNPNPQGWPGAWGNQPA SEQ ID NO:29:如图11A中公开的肽\_3
- [0313] WPGAWGNQPAGAGGYPGASY
- [0314] SEQ ID NO:30:如图11A中公开的肽\_4GAGGYPGASYPGAYPGQAPP SEQ ID NO:31:如  
图11A中公开的肽\_7AYPGAPGAYPGAPAGVYYPG SEQ ID NO:32:如图11A中公开的肽\_  
8GAPAGVYYPGPPSGPGAYPS SEQ ID NO:33:如图11A中公开的肽\_9PPSGPGAYPSSGQPSATGAY  
SEQ ID NO:34:如图11A中公开的肽\_10SGQPSATGAYPATGPYGAPA SEQ ID NO:35:如图11A中  
公开的肽\_11PATGPYGAPAGPLIVPYNLP SEQ ID NO:36:如图11A中公开的肽\_



12GPLIVPYNLPLPGGVVPRML SEQ ID NO:37:如图11A中公开的肽\_13LPGGVVPRMLITILGTVKPN  
SEQ ID NO:38:如图11A中公开的肽\_14ITILGTVKPNANRIALDFQR SEQ ID NO:39:如图11A中  
公开的肽\_15ANRIALDFQRGNDVAFHFNP SEQ ID NO:40:如图11A中公开的肽\_  
16GNDVAFHFNPFRFNENRRVI SEQ ID NO:41:如图11A中公开的肽\_17RFNENRRVIVCNTKLDNNW  
SEQ ID NO:42:如图11A中公开的肽\_18VCNTKLDNNWGREERQSVFP SEQ ID NO:43:如图11A中  
公开的肽\_19GREERQSVFPFESGKPFKIQ SEQ ID NO:44:如图11A中公开的肽\_  
20FESGKPFKIQVLVEPDHFKV SEQ ID NO:45:如图11A中公开的肽\_21VLVEPDHFKVAVNDAHLLQY  
SEQ ID NO:46:如图11A中公开的肽\_22AVNDAHLLQYNHRVKKLNEI SEQ ID NO:47:如图11A中  
公开的肽\_23NHRVKKLNEISKLGISGDID SEQ ID NO:48:如图11A中公开的肽\_  
24SKLGISGDIDLTASVTMI SEQ ID NO:49:如图11C中公开的Pep-1PGAYPGQAPP SEQ ID NO:  
50:如图11C中公开的Pep-3GAYPGQAPPGA SEQ ID NO:51:如图11C中公开的Pep-  
4APPGAYPGAP SEQ ID NO:52:如图11C中公开的Pep-5YPGAPGAYP SEQ ID NO:53:如图11C中  
公开的Pep-6APPGAY SEQ ID NO:54:如图11C中公开的Pep-7GAYPGQ SEQ ID NO:55:如图  
11C中公开的Pep-8PGQAPP

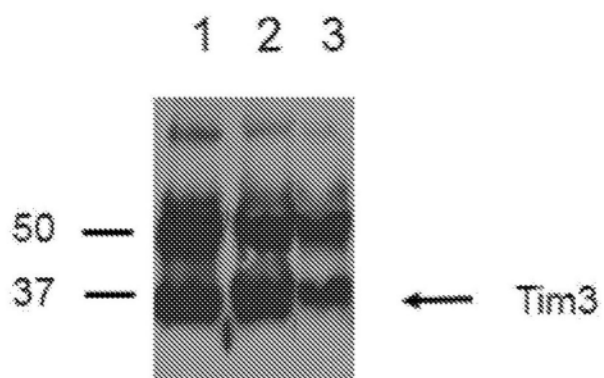


图1A

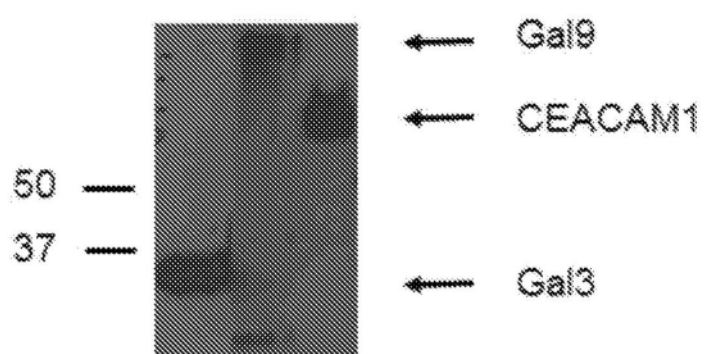


图1B

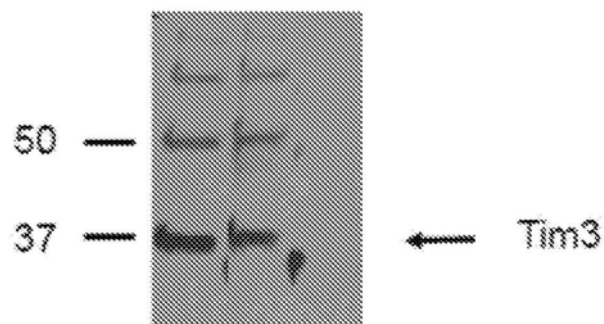


图1C

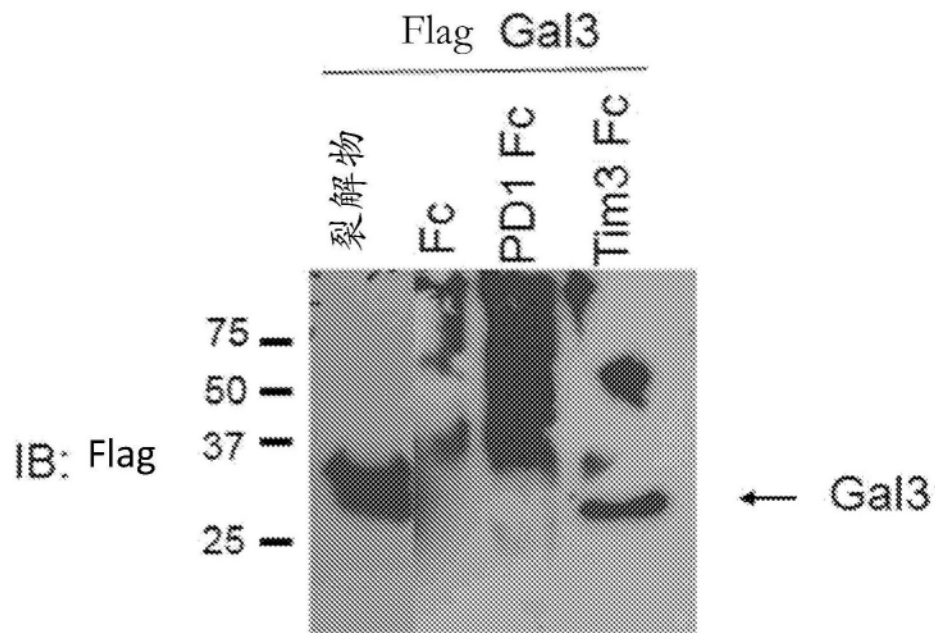


图2

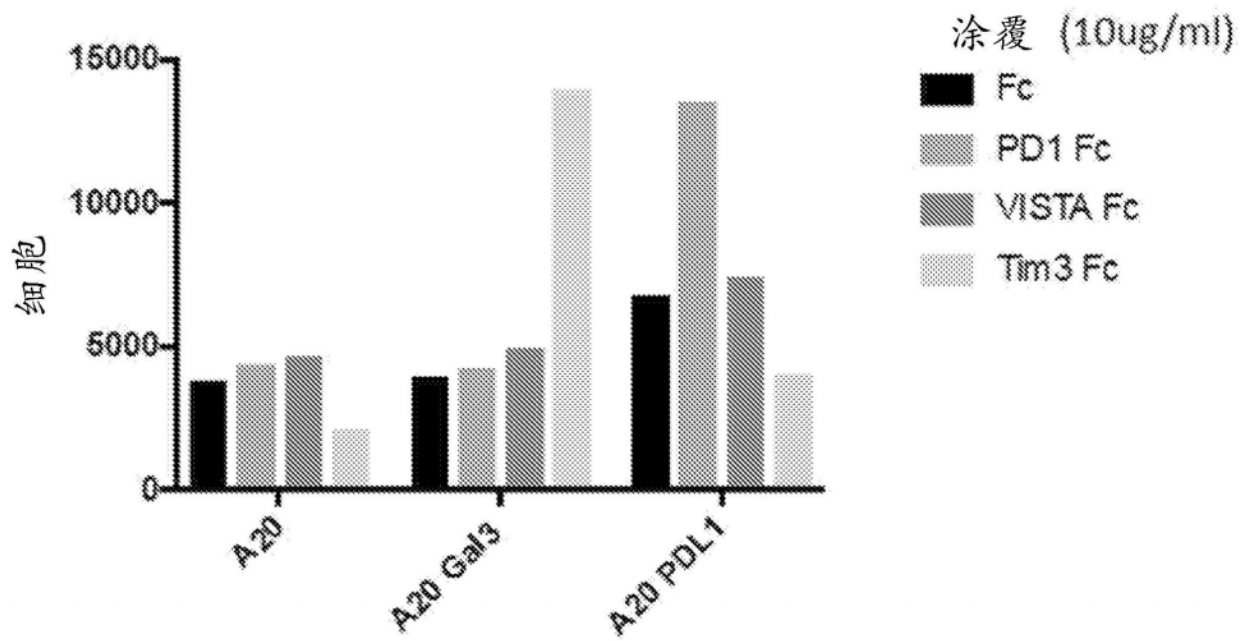
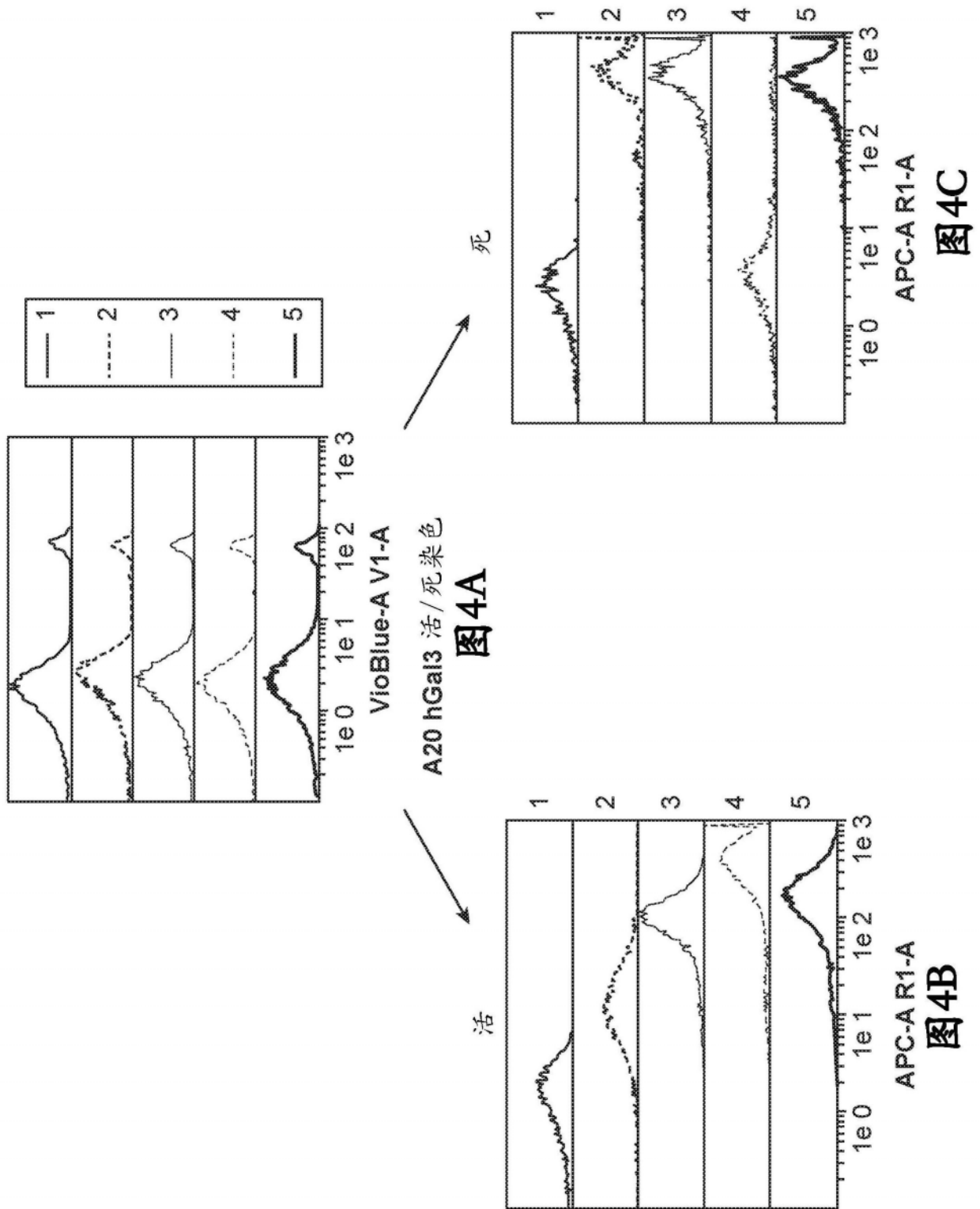


图3



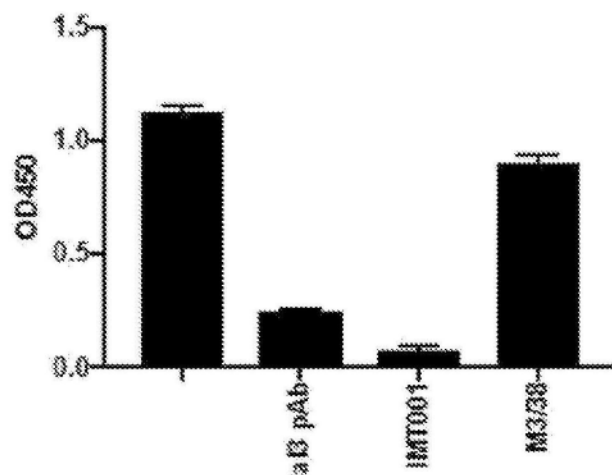


图5A

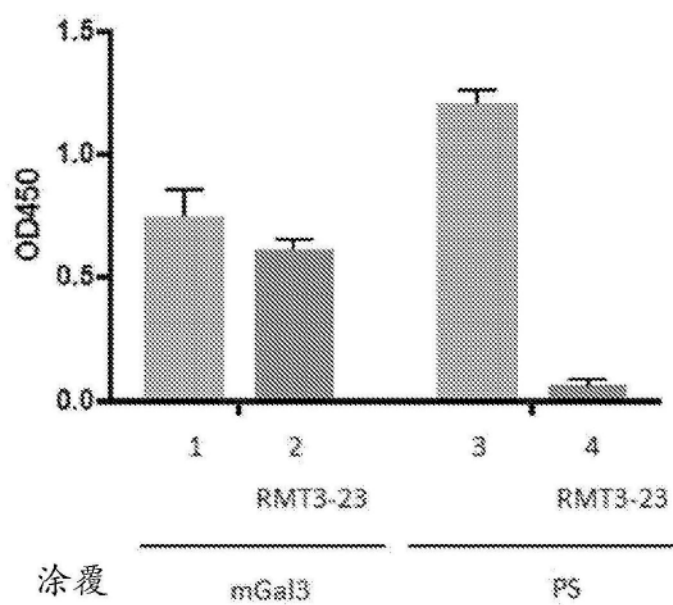


图5B

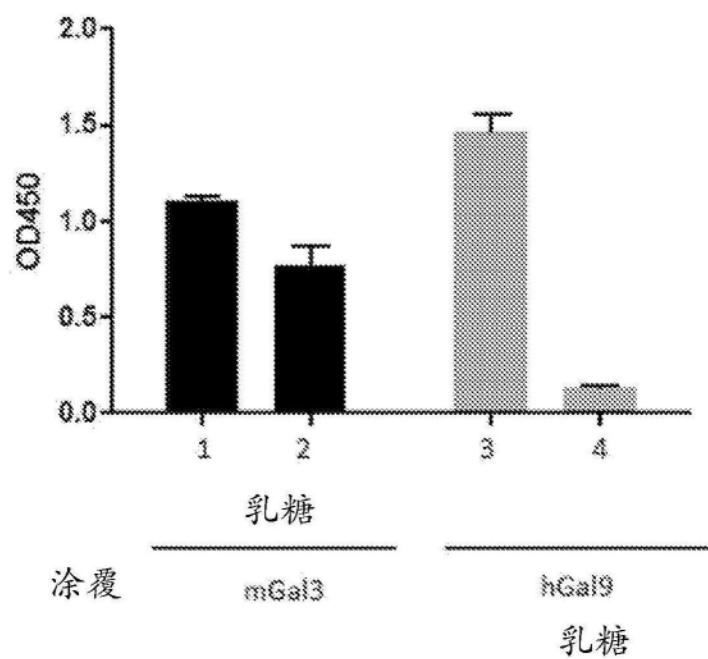


图5C

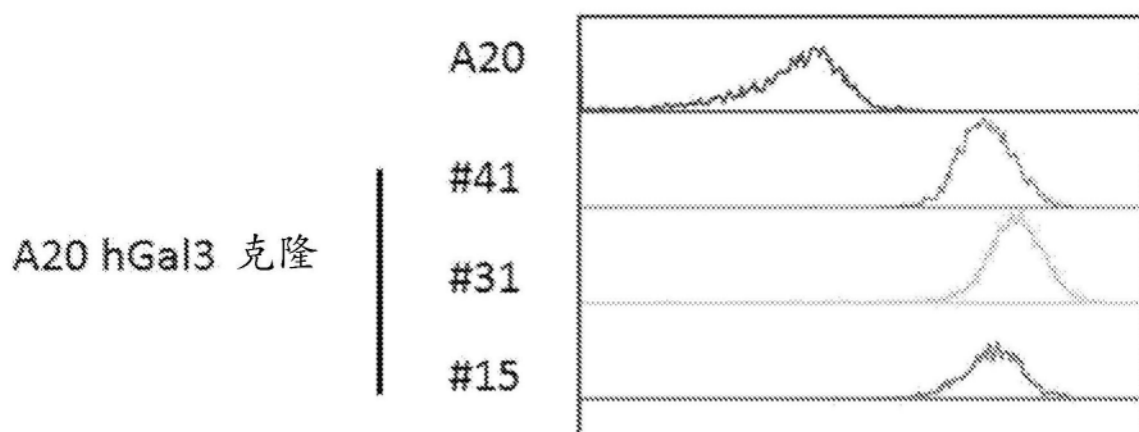


图6A

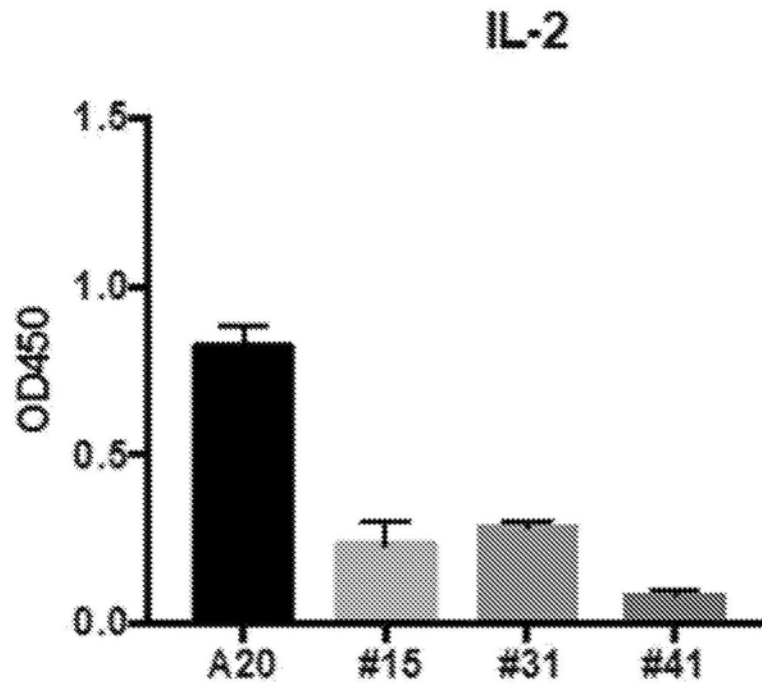


图6B

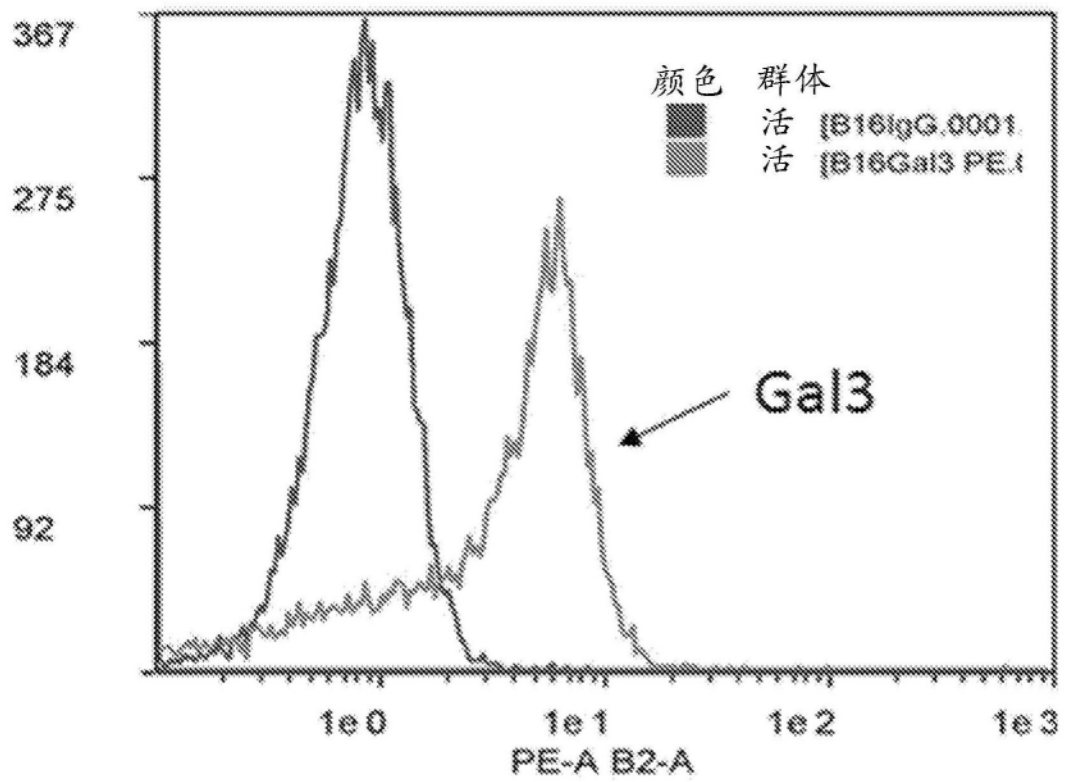


图7A

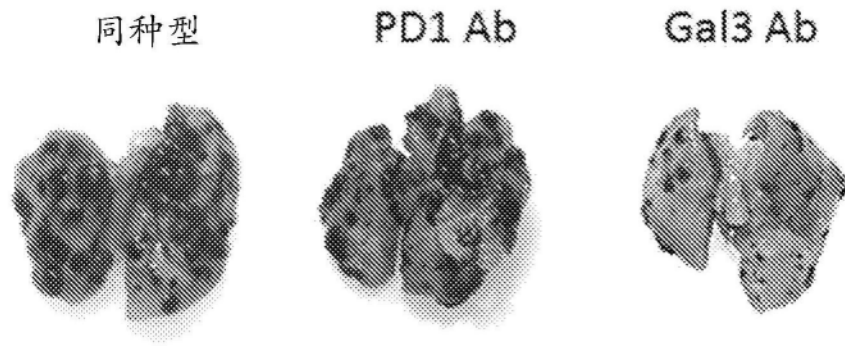


图7B

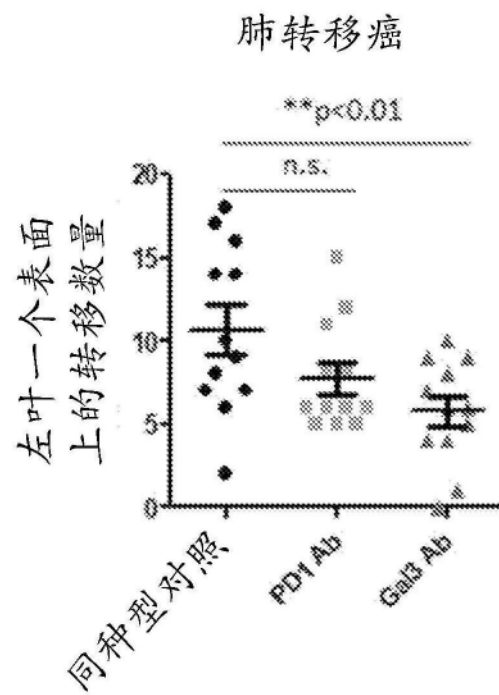


图7C



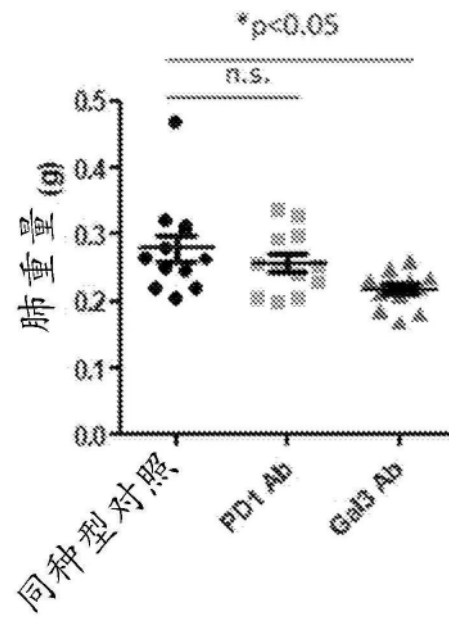


图7D

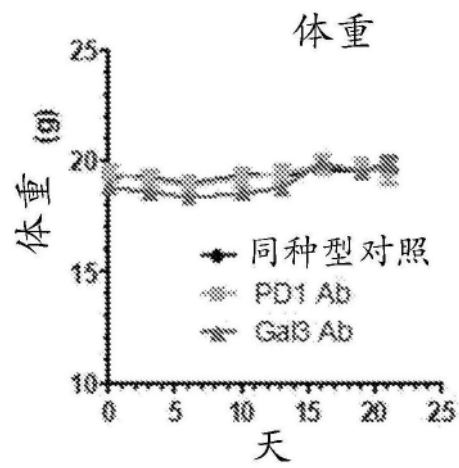


图7E

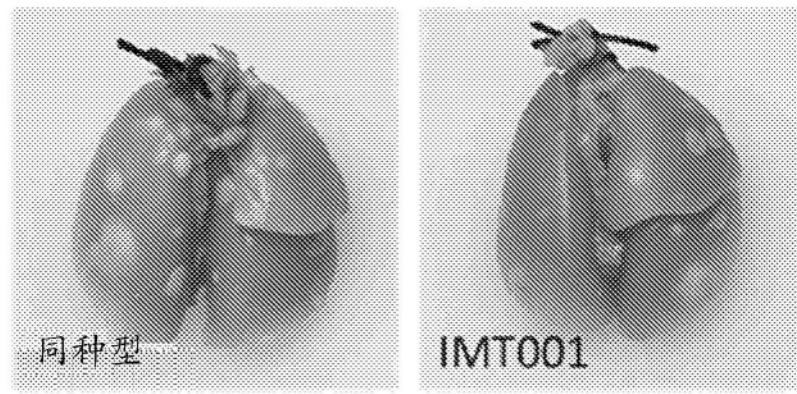


图8A

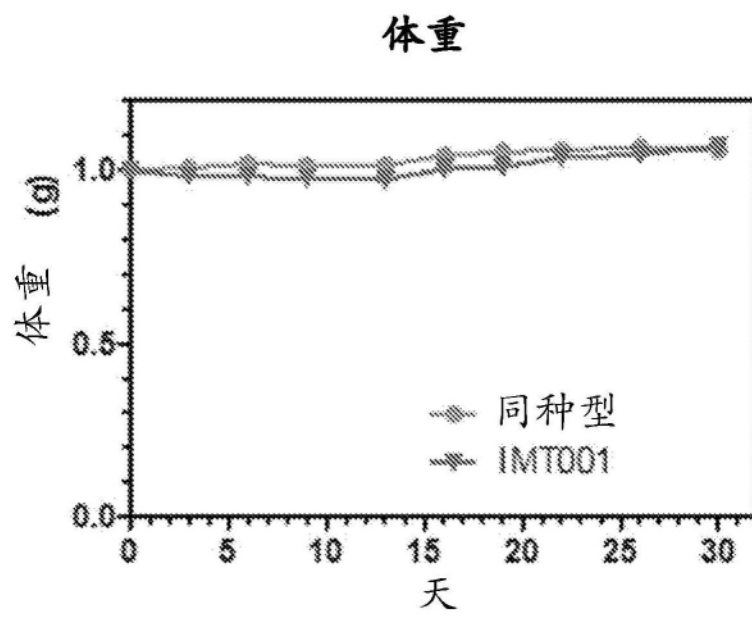


图8B

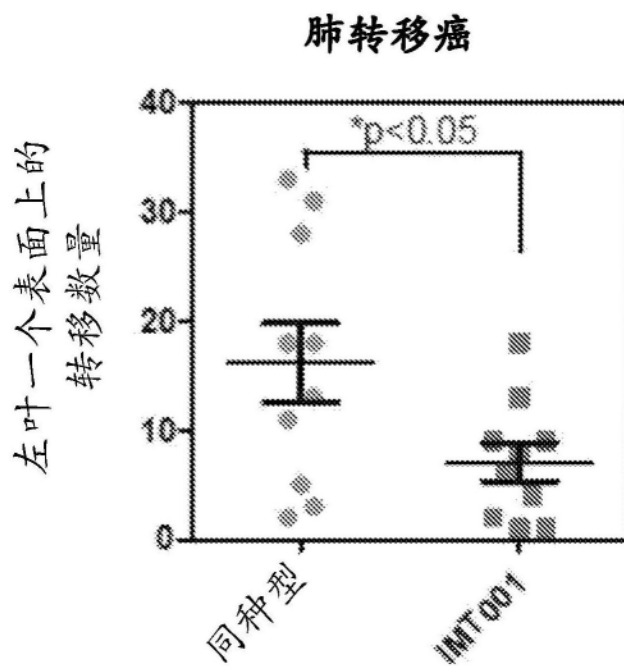


图8C

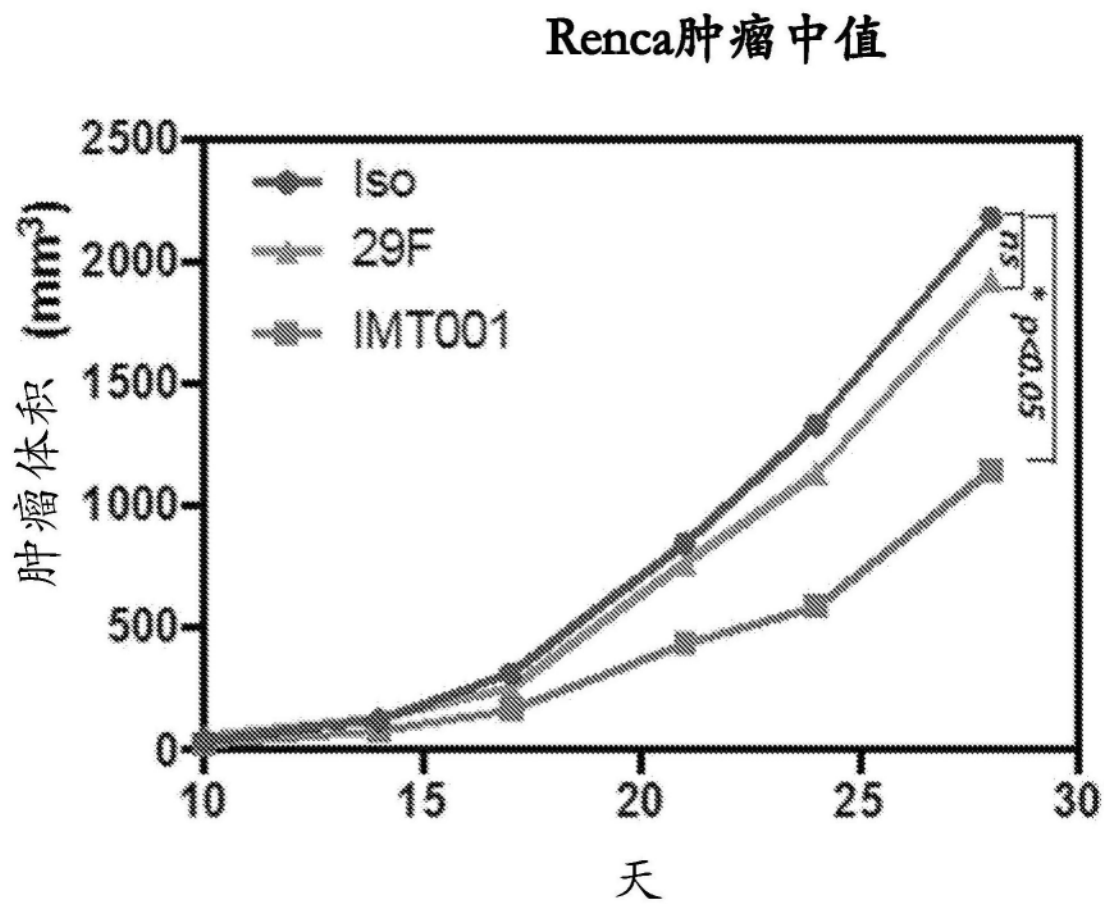


图9

## MC38 结肠肿瘤尺寸

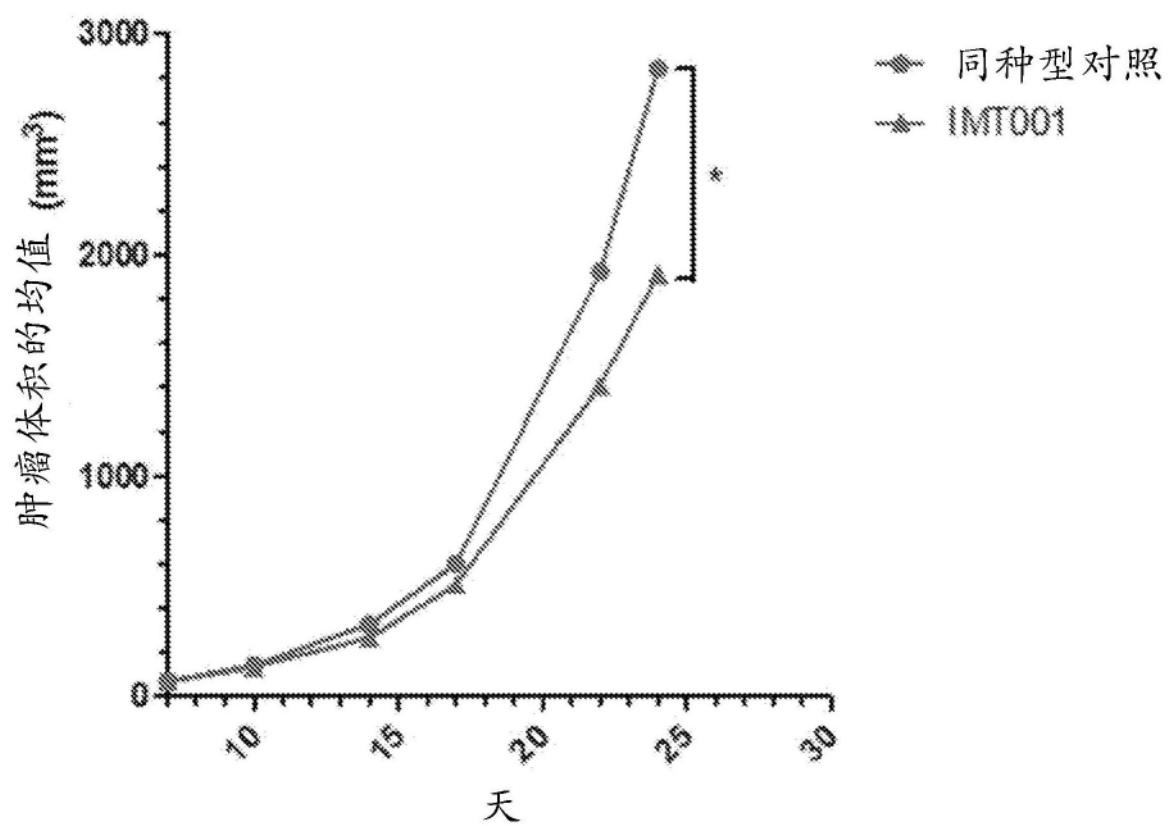


图10

肽 \_1 ADNFSLHDALSGSGNPNPQG  
 肽 \_2 SGSGNPNPQGWPGAWGNQPA  
 肽 \_3 WPGAWGNQPAGAGGYPGASY  
 肽 \_4 GAGGYPGASYPGAYPGQAPP  
 肽 \_5 PGAYPGQAPPAYPGQAPPG  
 肽 \_6 GAYPGQAPPAYPGAPGAYP  
 肽 \_7 AYPGAPGAYPGAPAGVYPG  
 肽 \_8 GAPAGVYPGPPSGPGAYPS  
 肽 \_9 PPSGPGAYPSSGQPSATGAY  
 肽 \_10 SGQPSATGAYPATGPYGAPA  
 肽 \_11 PATGPYGAPAGPLIVPYNLP  
 肽 \_12 GPLIVPYNLPLPGGVVPRML  
 肽 \_13 LPGGVVPRMLITILGTVKPN  
 肽 \_14 ITILGTVKPNANRIALDFQR  
 肽 \_15 ANRIALDFQRGNDVAFHFNP  
 肽 \_16 GNDVAFHFNPRFNENRRVI  
 肽 \_17 RFNENRRVIVCNTKLDNNW  
 肽 \_18 VCNTKLDNNWGREERQSVFP  
 肽 \_19 GREERQSVFPFESGKPFKIQ  
 肽 \_20 FESGKPFKIQVLVEPDHFKV  
 肽 \_21 VLVEPDHFKVAVNDAHLLQY  
 肽 \_22 AVNDAHLLQYNHRVKKLNEI  
 肽 \_23 NHRVKKLNEISKLGISGDID  
 肽 \_24 SKLGISGDIDLTASAYTMI

图11A

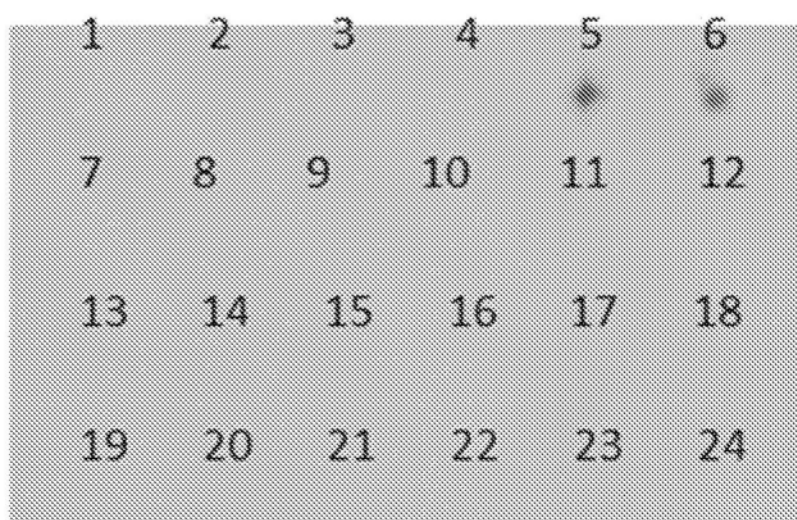


图11B

## Gal3 肽

Pep-1 PGAYPGQAPP  
Pep-2 GQAPPGAYPG  
Pep-3 GAYPGQAPPGA  
Pep-4 APPGAYPGAP  
Pep-5 YPGAPGAYP  
Pep-6 APPGAY  
Pep-7 GAYPGQ  
Pep-8 PGQAPP

图11C

## IMT001与Gal3肽结合

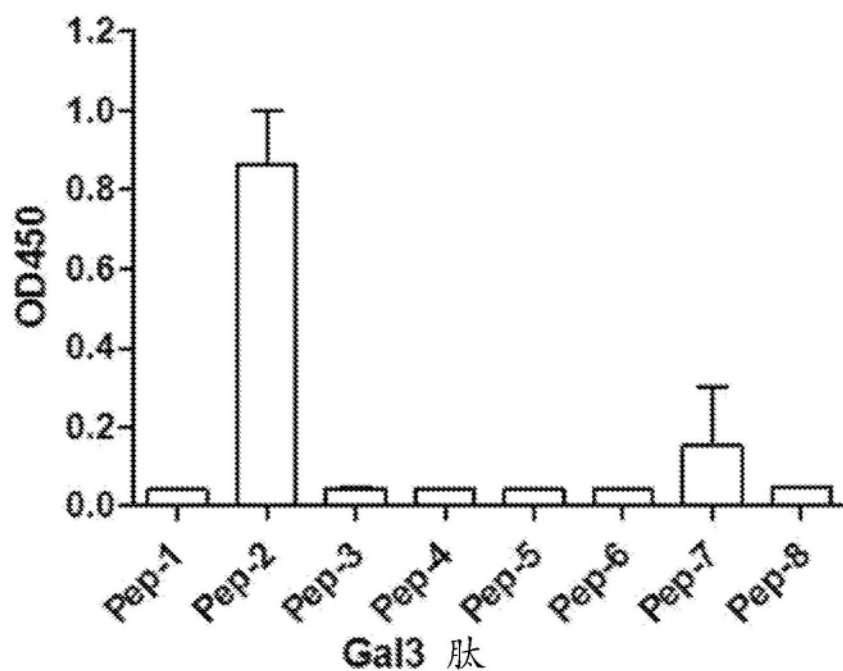


图11D

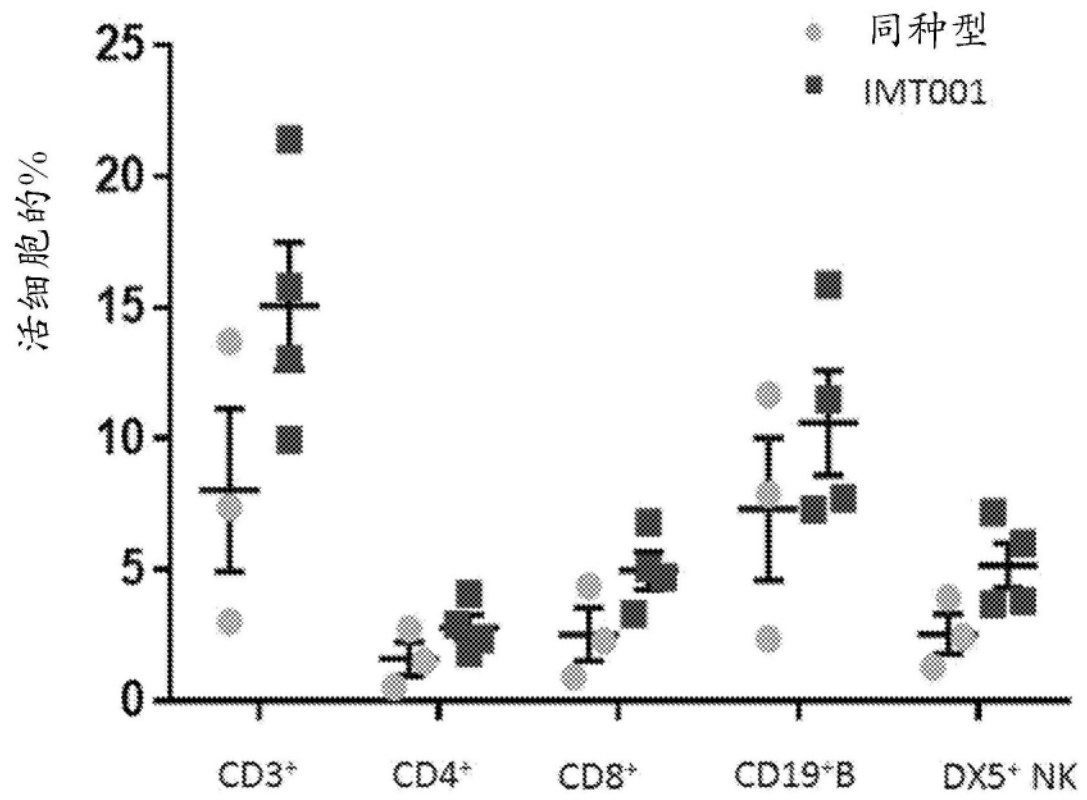
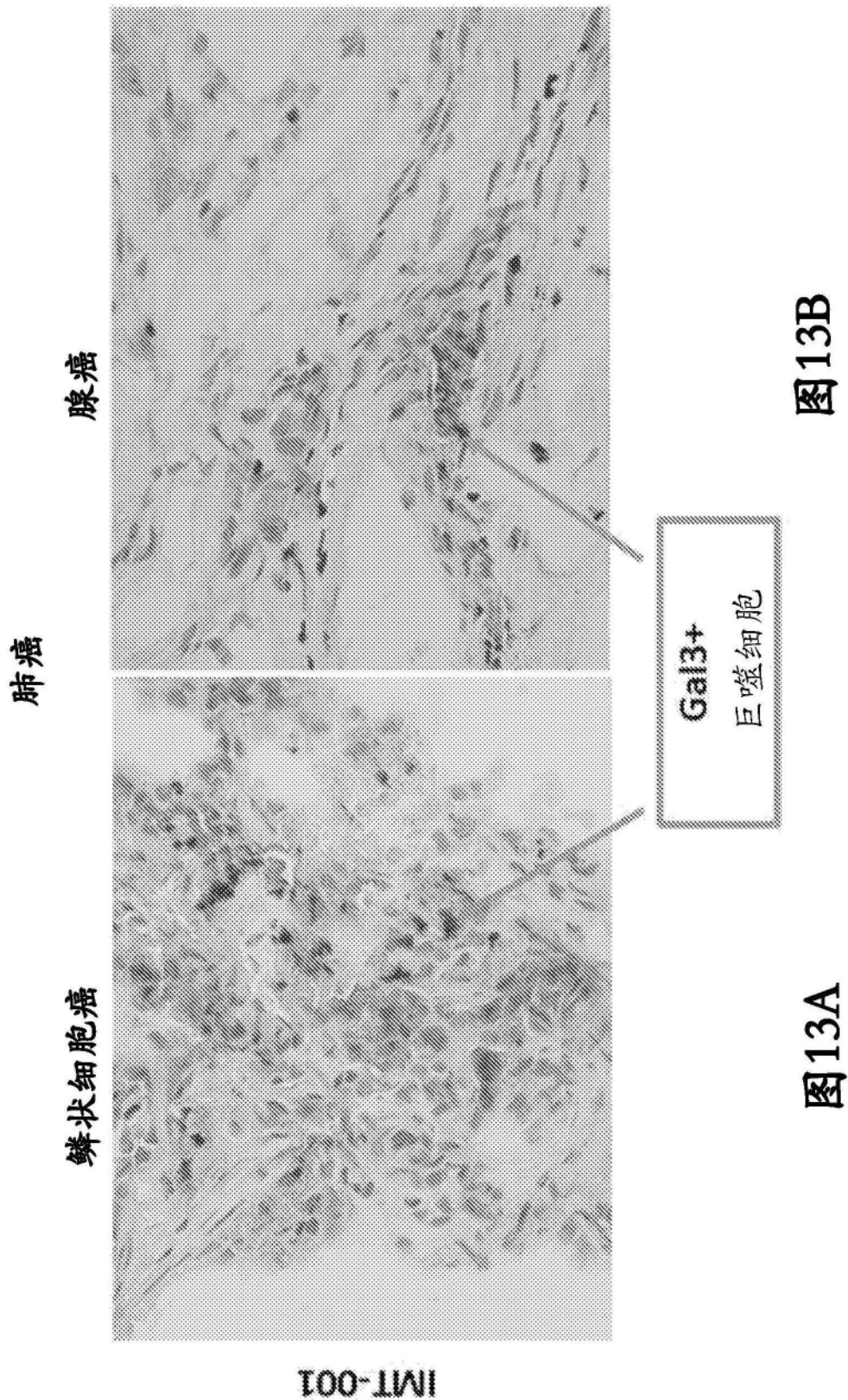


图12





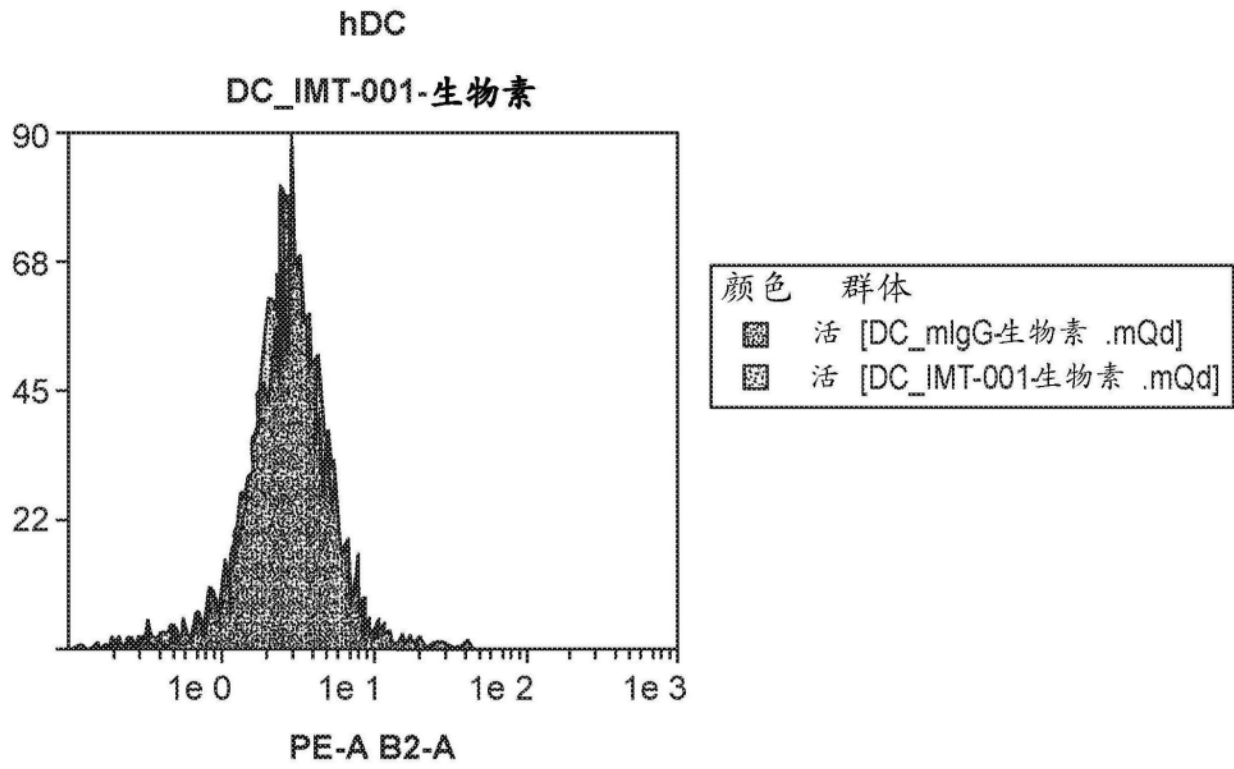


图14A

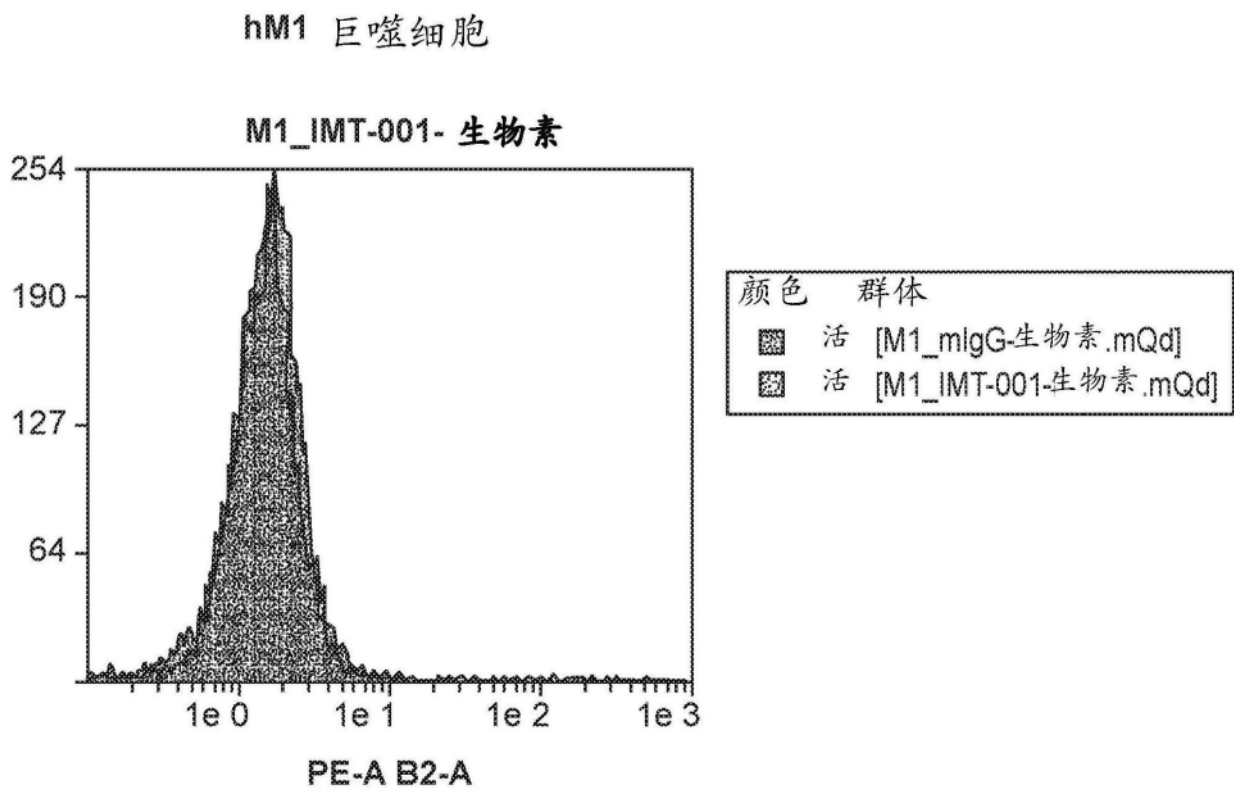


图14B

## hM2 巨噬细胞

## M2\_IMT-001- 生物素

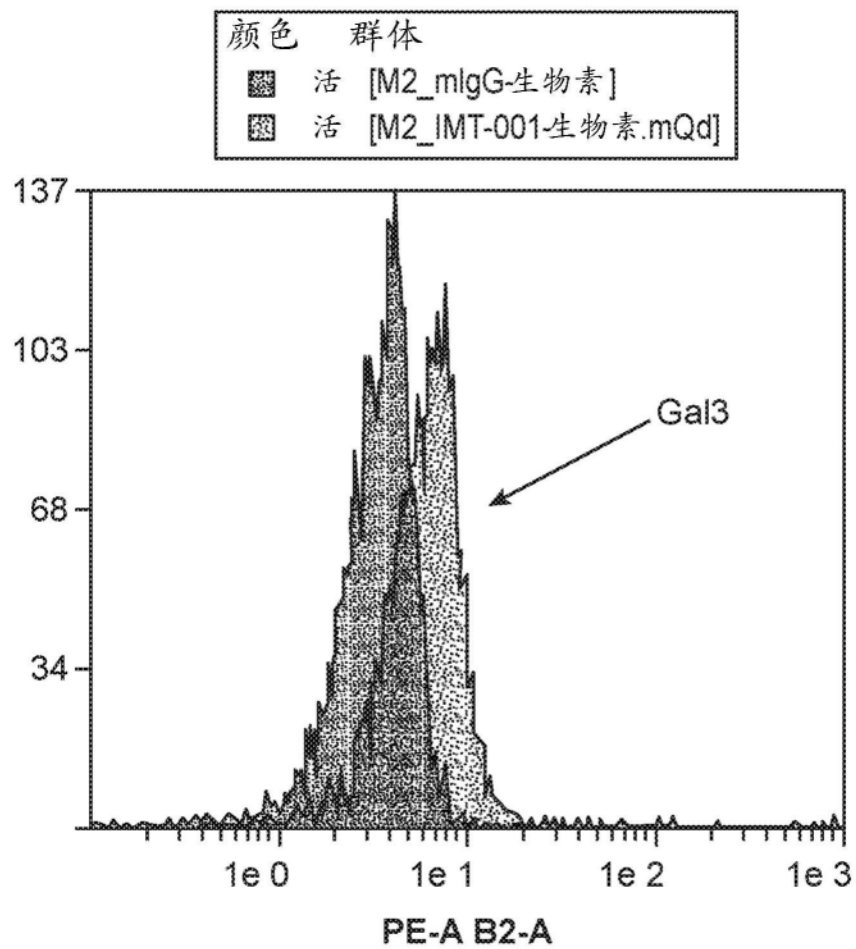


图14C

mlgG

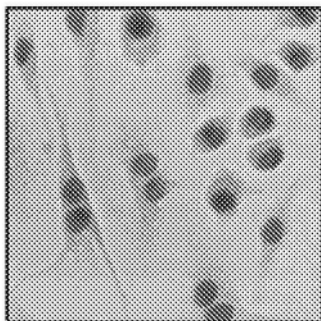


图15A

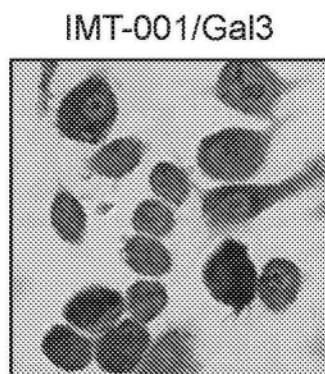


图15B

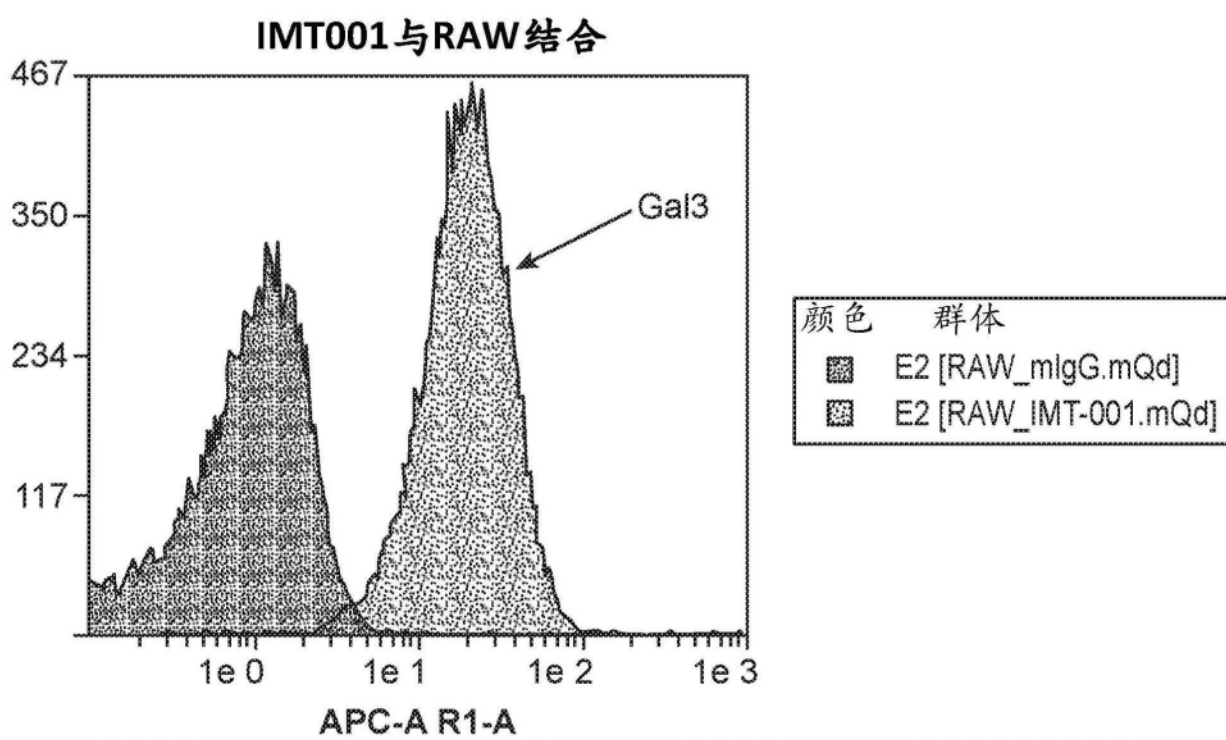


图15C

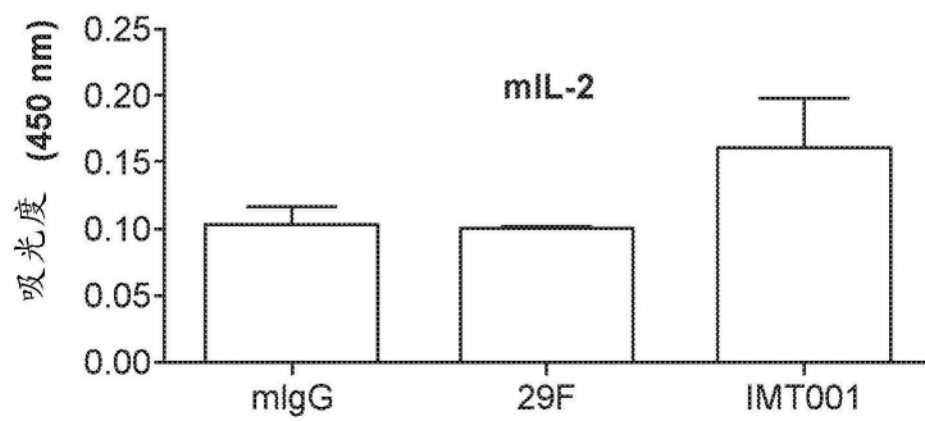


图15D