

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019年10月31日 (31.10.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/206095 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01) *A61P 7/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/083727

(22) 国际申请日: 2019年4月22日 (22.04.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810371407.3 2018年4月24日 (24.04.2018) CN

(71) 申请人: 安源医药科技(上海)有限公司 (AMPSOURCE BIOPHARMA SHANGHAI INC.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。四川科伦博泰生物医药股份有限公司 (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。

(72) 发明人: 李强 (LI, Qiang); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。薛彤彤 (XUE, Tongtong); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。郑云程 (ZHENG, Yuncheng); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。肖亮 (XIAO, Liang); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。刘登念 (LIU, Dengnian); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。孙见宇 (SUN, Jianyu); 中国上海市浦东新区紫萍路

908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。胡江江 (HU, Jiangjiang); 中国四川省成都市温江区海峡两岸科技产业开发园区新华大道二段666号, Sichuan 611138 (CN)。马心鲁 (MA, Xinlu); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。朱康勇 (ZHU, Kangyong); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。李媛丽 (LI, Yuanli); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。

(74) 代理人: 北京品源专利代理有限公司 (BEYOND ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市海淀区莲花池东路39号西金大厦6层, Beijing 100036 (CN)。

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

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

(54) Title: ANTIBODY AGAINST TIM-3 AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 针对TIM-3的抗体及其用途

(57) Abstract: Provided by the present invention are an antibody against human TIM-3 or an antigen-binding fragment thereof, and further provided are a nucleic acid molecule encoding the antibody, an expression vector for expressing the antibody and a host cell, and a method for producing the antibody. Further provided by the present invention are a pharmaceutical composition comprising the antibody or an antigen-binding fragment of the antibody, and an application of the pharmaceutical composition in the preparation of a medicine, the medicine is used for preventing and/or treating various diseases (including tumors, infectious diseases and autoimmune diseases).

(57) 摘要: 本发明提供针对人TIM-3的抗体或其抗原结合片段, 还提供了编码所述抗体的核酸分子, 用于表达所述抗体的表达载体和宿主细胞, 以及所述抗体的生产方法。此外, 本发明还提供了包含所述抗体或其抗原结合片段的药物组合物, 以及其在制备药物中的用途, 所述药物用于预防和/或治疗多种疾病(包括肿瘤、感染性疾病和自身免疫性疾病)的药物中的用途。

WO 2019/206095 A1

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

针对 TIM-3 的抗体及其用途

技术领域

本发明属于治疗性单克隆抗体领域，更具体地，本发明涉及一种针对人 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段；还涉及所述抗体在抗感染、抗肿瘤和自身免疫疾病等方面的用途。

背景技术

T 细胞免疫球蛋白黏蛋白-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3, TIM-3) 是近年来发现的重要免疫检查点分子。TIM-3 分子是一种单跨膜分子，其结构包含 IgV 亚单位、黏蛋白样结构域、单跨膜结构域和富含 Tyr 的胞内段(Lee J 等, *Genes Immun*, 2011, 12 : 595-604)。IgV 亚单位位于细胞的外侧，它和黏蛋白样结构域共同参与配体的识别。

TIM-3 在分泌 IFN- γ 的 CD4⁺ T 辅助细胞 1 (Th1) 和 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞 (Tc1) 表面高表达 (Rodriguez-Manzanet R 等, *Immunol Rev*, 2009, 229(1): 259-270)。半乳糖凝集素-9 (Galectin-9, Gal-9) 是 TIM-3 的天然配体之一，Gal-9 属于内源性半乳糖苷结合凝集素蛋白家族成员，在组织中的分布十分广泛，在细胞聚集、黏附、分化、凋亡、调节肿瘤转移和炎症反应等方面发挥重要作用。Gal-9 通过与 T 细胞表面的 TIM-3 结合，触发胞内信号通路，诱导 T 细胞的功能耗竭或凋亡，从而下调免疫反应，它在自身免疫性疾病、变态反应性疾病以及排斥反应中发挥重要的调节作用。因此，TIM-3 被认为是一种负性免疫调节分子。随后发现 TIM-3 也表达在天然免疫细胞表面，包括调节性 T 细胞 (regulatory cell, Treg)，单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞 (dendritic cells, DCs)、自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 等 (Andemon AC 等, *Science*, 2007, 318 (5853): 1141-1143)。目前，研究证实 TIM-3/Gal-9 可调节多种细胞的免疫应答，广泛参与炎症、自身免疫疾病及肿瘤的发生发展 (Anderson DE, *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11(8): 1005-1009; Anderson AC, *Curr Opin Immunol*, 2006, 18 (6): 665-669; Degauque N 等, *Transplantation*, 2007, 84: S12-16; Zhu C 等, *Nat Immunol*, 2005, 6: 1245-1252)。

近年来不断有研究发现，病原体感染过程中 TIM-3 在 T 细胞上高表达与 T 细胞的功能耗竭密切相关，另发现其在巨噬细胞上的表达也上调 (Gorman JV 等, *J Immunol*, 2014, 192(7): 3133-3142; Jost S 等, *Retrovirology*, 2013, 10: 74)，提示 TIM-3 在感染免疫的过程中也发挥重要作用。Wang 等发现，在人结核菌感染患者中，外周血单核细胞经过鼠抗人 TIM-3 抗体阻

断 TIM-3 通路后,能显著增强 T 细胞生成 IFN- γ ,改善了 T 细胞耗竭,增强了机体对结核菌的抵抗 (Wang X 等, *J Infect*, 2011, 62(4):292-300)。Jayaraman 等发现,在 C57BL/6J 小鼠通过呼吸道感染结核分枝菌后,注射 TIM3-Ig 融合蛋白能增强体内结核菌的清除 (Jayaraman P 等, *J Exp Med*, 2010, 207(11): 2343-2354)。Ma 等发现,正常或感染 HCV 的人 DC 细胞在用 TIM-3 抗体阻断后,能增强抗原摄取、加快成熟和增加 IL-12 分泌 (Ma CJ 等, *PLoS One*, 2014, 9(1): e87821)。Nebbia 等发现,用重组 TIM3-Fc 融合蛋白阻断 TIM-3 通路能改善 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞的功能衰竭。在体外阻断 TIM-3 通路,能使部分慢性 HBV 患者外周血单核细胞 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞恢复表达 IFN- γ 和 TNF- α (Nebbia G 等, *PLoS One*, 2012, 7(10): e47648)。上述一系列研究都证实,通过 TIM-3 抗体(拮抗剂抗体)或融合蛋白(仅由 TIM-3 的胞外段组成)阻断其信号通路能在体内和体外逆转免疫细胞功能,从而增强机体的抗感染能力。因此, TIM-3 是一个潜在的用于抗感染免疫治疗的干预靶点。

TIM-3 作为重要的免疫调控靶点,它在多种免疫细胞上的异常表达与多种肿瘤的发生、发展密切相关。目前发现 TIM-3 在包括泌尿系统肿瘤、肾细胞癌、结肠癌、乳腺癌、血液肿瘤等多种恶性肿瘤的 CD8⁺ T 细胞表面表达上调。TIM-3 可调节 T 细胞功能耗竭并抑制其免疫应答,用封闭性抗体或用融合蛋白来抑制 TIM-3 下游信号可使 T 细胞分泌的 IFN- γ 增加。在肾透明细胞癌、肝癌的体外实验中,利用单克隆抗体抑制 TIM-3/Gal-9 通路后,肿瘤受到明显的抑制 (Komohara Y 等, *Cancer Immunol Res*, 2015, 3 (9): 999-1007; Yan W 等, *Gut*, 2015, 64(10): 1593-1604)。皮下注射抗 TIM-3 单克隆抗体能抑制小鼠体内 EIA 淋巴瘤的生长 (Fourcade J 等, *Exp Med*, 2010, 207(10): 2175-2186)。

因此,临床上迫切需要一种具有高特异性和亲和力,更低毒副作用及更佳临床药效的 TIM-3 阻断抗体,这也将给肿瘤、感染性或自身免疫疾病患者提供更多的用药选择。

发明内容

本发明中公开了以高亲和性和特异性与 TIM-3 结合的抗体或其抗原结合片段。还提供了编码抗体分子的核酸分子、表达载体、宿主细胞和用于制造抗体分子的方法。还提供了包含抗体分子的双特异性抗体、多双特异性抗体、和药物组合物。另外,还提供了本发明公开的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段(单独或与其它活性剂或治疗方式组合)在制备用于治疗、预防和/或诊断癌症、感染性疾病、克罗恩氏病、脓毒病、全身性炎症反应综合征(SIRS)和肾小球性肾炎等疾病的药物中的应用。

在第一个方面，本发明提供了一种能够特异性结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的互补决定区（CDR）：

(a) 下述 3 个重链可变区（VH）的 CDR：

(i) CDR-H1，其具有如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 中含有的 CDR-H1 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H1 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(ii) CDR-H2，其具有如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 中含有的 CDR-H2 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H2 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和

(iii) CDR-H3，其具有如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 中含有的 CDR-H3 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H3 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和/或，

下述 3 个轻链可变区（VL）的 CDR：

(iv) CDR-L1，其具有如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 中含有的 CDR-L1 的序列，或者与所述 VL 中含有的 CDR-L1 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(v) CDR-L2，其具有如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 中含有的 CDR-L2 的序列，或者与所述 VL 中含有的 CDR-L2 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和

(vi) CDR-L3，其具有如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 中含有的 CDR-L3 的序列，或者与所述 VL 中含有的 CDR-L3 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

或，

(b) 下述 3 个重链可变区（VH）的 CDR：

(i) CDR-H1，其具有如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 中含有的 CDR-H1 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H1 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(ii) CDR-H2，其具有如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 中含有的 CDR-H2 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H2 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和

(iii) CDR-H3, 其具有如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 中含有的 CDR-H3 的序列, 或者与所述 VH 中含有的 CDR-H3 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列; 和/或,

下述 3 个轻链可变区 (VL) 的 CDR:

(iv) CDR-L1, 其具有如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 中含有的 CDR-L1 的序列, 或者与所述 VL 中含有的 CDR-L1 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(v) CDR-L2, 其具有如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 中含有的 CDR-L2 的序列, 或者与所述 VL 中含有的 CDR-L2 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列; 和

(vi) CDR-L3, 其具有如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 中含有的 CDR-L3 的序列, 或者与所述 VL 中含有的 CDR-L3 的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi) 任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中, 所述重链可变区 (VH) 中含有的 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3, 和/或所述轻链可变区 (VL) 中含有的 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3 由 Kabat、Chothia 或 IMGT 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 选自下列的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR:

如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 11 中任一项所示的 VH;

和/或

(b) 选自下列的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR:

如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、和 SEQ ID NO: 12 中任一项所示的 VL。

在某些优选的实施方案中, 所述重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR 和/或所述轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR 由 Kabat、Chothia 或 IMGT 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 1 所

示的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR; 和/或, 如 SEQ ID NO: 2 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR; 其中, 所述重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR 和所述轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR 通过 IMGT 编号系统确定。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 下述 3 个重链可变区 (VH) CDR:

(i) CDR-H1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 18, 或与 SEQ ID NO: 18 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) CDR-H2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 19, 或与 SEQ ID NO: 19 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列, 和

(iii) CDR-H3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 20, 或与 SEQ ID NO: 20 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

和/或

(b) 下述 3 个轻链可变区 (VL) CDR:

(iv) CDR-L1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 27, 或与 SEQ ID NO: 27 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列,

(v) CDR-L2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 25, 或与 SEQ ID NO: 25 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列, 和

(vi) CDR-L3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 23, 或与 SEQ ID NO: 23 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

其中, 所述重链可变区 (VH) CDR 和所述轻链可变区 (VL) CDR 由 IMGT 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 18 所示的 CDR-H1; 如 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR-H2; 以及, 如 SEQ ID NO: 20 所示的 CDR-H3; 并且, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR-L1; 如 SEQ ID NO: 25 所示的 CDR-L2; 以及, 如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR-L3。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 如 SEQ ID NO: 1 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR; 和/或, 如 SEQ ID NO: 2 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR;

其中，所述重链可变区（VH）中含有的3个CDR和所述轻链可变区（VL）中含有的3个CDR由Chothia编号系统定义。

在某些优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 下述3个重链可变区（VH）CDR：

(i) CDR-H1，其由下述序列组成：SEQ ID NO：16，或与SEQ ID NO：16相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如1个，2个或3个置换、缺失或添加）的序列，

(ii) CDR-H2，其由下述序列组成：SEQ ID NO：17，或与SEQ ID NO：17相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如1个，2个或3个置换、缺失或添加）的序列，和

(iii) CDR-H3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：15，或与SEQ ID NO：15相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如1个，2个或3个置换、缺失或添加）的序列；

和/或

(b) 下述3个轻链可变区（VL）CDR：

(iv) CDR-L1，其由下述序列组成：SEQ ID NO：24，或与SEQ ID NO：24相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如1个，2个或3个置换、缺失或添加）的序列，

(v) CDR-L2，其由下述序列组成：SEQ ID NO：25，或与SEQ ID NO：25相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如1个，2个或3个置换、缺失或添加）的序列，和

(vi) CDR-L3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：26，或与SEQ ID NO：26相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如1个，2个或3个置换、缺失或添加）的序列；

其中，所述重链可变区（VH）CDR和所述轻链可变区（VL）CDR由Chothia编号系统定义。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的VH包含：如SEQ ID NO：16所示的CDR-H1；如SEQ ID NO：17所示的CDR-H2；以及，如SEQ ID NO：15所示的CDR-H3；并且，所述抗体或其抗原结合片段的VL包含：如SEQ ID NO：24所示的CDR-L1；如SEQ ID NO：25所示的CDR-L2；以及，如SEQ ID NO：26所示的CDR-L3。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 如SEQ ID NO：1所示的重链可变区（VH）中含有的3个CDR；和/或，如SEQ ID NO：2所示的轻链可变区（VL）中含有的3个CDR；或，

(b) 如 SEQ ID NO: 7 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR; 和/或, 如 SEQ ID NO: 8 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR;

其中, 所述重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR 和所述轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR 由 Kabat 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 下述 3 个重链可变区 (VH) CDR:

(i) CDR-H1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 13, 或与 SEQ ID NO: 13 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) CDR-H2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 14, 或与 SEQ ID NO: 14 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列, 和

(iii) CDR-H3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或与 SEQ ID NO: 15 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

和/或

(b) 下述 3 个轻链可变区 (VL) CDR:

(iv) CDR-L1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 21, 或与 SEQ ID NO: 21 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列,

(v) CDR-L2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 22, 或与 SEQ ID NO: 22 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列, 和

(vi) CDR-L3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 23, 或与 SEQ ID NO: 23 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

其中, 所述重链可变区 (VH) CDR 和所述轻链可变区 (VL) CDR 由 Kabat 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中, (i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1; 如 SEQ ID NO: 14 所示的 CDR-H2; 以及, 如 SEQ ID NO: 15 所示的 CDR-H3; 并且, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 21 所示的 CDR-L1; 如 SEQ ID NO: 22 所示的 CDR-L2; 以及, 如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR-L3。

在某些优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 下述 3 个重链可变区 (VH) CDR:

(i) CDR-H1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 13, 或与 SEQ ID NO: 13 相比具有一个

或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列，

(ii) CDR-H2，其由下述序列组成：SEQ ID NO：28，或与 SEQ ID NO：28 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列，和

(iii) CDR-H3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：15，或与 SEQ ID NO：15 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

和/或，

(b) 下述 3 个轻链可变区（VL）的 CDR：

(iv) CDR-L1，其由下述序列组成：SEQ ID NO：29，或与 SEQ ID NO：29 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列，

(v) CDR-L2，其由下述序列组成：SEQ ID NO：30，或与 SEQ ID NO：30 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列，和

(vi) CDR-L3，其由下述序列组成：SEQ ID NO：23，或与 SEQ ID NO：23 相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

其中，所述重链可变区（VH）CDR 和所述轻链可变区（VL）CDR 由 Kabat 编号系统定义。

在某些优选的实施方案中，(i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO：13 所示的 CDR-H1；如 SEQ ID NO：28 所示的 CDR-H2；以及，如 SEQ ID NO：15 所示的 CDR-H3；并且，所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO：29 所示的 CDR-L1；如 SEQ ID NO：30 所示的 CDR-L2；以及，如 SEQ ID NO：23 所示的 CDR-L3。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段进一步包含来源于哺乳动物（例如，鼠或人）免疫球蛋白的构架区（FR）。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含来源于鼠免疫球蛋白的重链可变区（VH）构架区（FR），和/或所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含来源于鼠免疫球蛋白的轻链可变区（VL）构架区（FR）。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的 VH 包含来源于人免疫球蛋白的重链可变区（VH）构架区（FR），和/或所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含来源于人免疫球蛋白的轻链可变区（VL）构架区（FR）。在此类实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链可变区 FR 和/或轻链可变区 FR 可以包含一个或多个非人源（例如，鼠源）

氨基酸残基，例如所述重链构架区 FR 和/或轻链构架区 FR 可以包含一或多个氨基酸回复突变，在这些回复突变中有相应的鼠源氨基酸残基。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链构架区或其变体，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个氨基酸保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个保守置换）；和/或

(b) 人免疫球蛋白的轻链构架区或其变体，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个氨基酸保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个保守置换）。

因此，在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段是人源化的。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的人源化程度为至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100%。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区（VH），其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9、11 任一项所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9、11 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9、11 任一项所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

和/或

(b) 轻链可变区（VL），其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NOs: 2、4、6、8、10、12 任一项所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NOs: 2、4、6、8、10、12 任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NOs: 2、4、6、8、10、12 任一项所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区 (VH)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 1 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 1 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

和

(b) 轻链可变区 (VL)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 2 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO: 2 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区 (VH)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 3 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 3 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 3 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

和

(b) 轻链可变区 (VL)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 4 所示的序列;

(v) 与 SEQ ID NO: 4 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个置换、缺失或添加) 的序列; 或

(vi) 与 SEQ ID NO: 4 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区 (VH), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO: 5 所示的序列;

(ii) 与 SEQ ID NO: 5 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个置换、缺失或添加) 的序列; 或

(iii) 与 SEQ ID NO: 5 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列;

和

(b) 轻链可变区 (VL), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(iv) SEQ ID NO: 6 所示的序列;

(v) 与 SEQ ID NO: 6 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个置换、缺失或添加) 的序列; 或

(vi) 与 SEQ ID NO: 6 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 重链可变区 (VH), 其包含选自下列的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO: 7 所示的序列;

(ii) 与 SEQ ID NO: 7 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加 (例如 1

个，2个，3个，4个或5个置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 7 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；

和

(b) 轻链可变区（VL），其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 8 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 8 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO: 8 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区（VH），其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 9 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 9 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 9 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；

和

(b) 轻链可变区（VL），其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 10 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 10 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO: 10 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区 (VH)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 11 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 11 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 11 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；

和

(b) 轻链可变区 (VL)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 12 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 12 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO: 12 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 具有如 SEQ ID NO: 1 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的 VL；

(2) 具有如 SEQ ID NO: 3 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 4 所示的序列的 VL；

(3) 具有如 SEQ ID NO: 5 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 6 所示的序列的 VL；

(4) 具有如 SEQ ID NO: 7 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 8 所示的序列的 VL；

(5) 具有如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 10 所示的序列的 VL；

或

(6) 具有如 SEQ ID NO: 11 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 12 所示的序列的 VL。

在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段进一步包含来源于哺乳动物（例如，鼠或人）免疫球蛋白的恒定区序列或其变体，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个置换、缺失或添加。在某些优选的实施方案中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个保守置换。在某些实施方案中，抗 TIM-3 抗体分子具有重链恒定区(Fc)，其选自例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重链恒定区；特别地选自例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区，更特别地选自 IgG1 或 IgG4（例如是人 IgG1 或 IgG4）的重链恒定区。在一些实施方案中，抗 TIM-3 抗体分子具有轻链恒定区，其选自例如 κ 或 λ 的轻链恒定区，优选 κ 轻链恒定区（例如人 κ 轻链）。

在某些优选实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链包含人免疫球蛋白的重链恒定区（CH）或其变体，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个置换、缺失或添加（例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个置换、缺失或添加；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）；和/或，

本发明的抗体或其抗原结合片段的轻链包含人免疫球蛋白的轻链恒定区（CL）或其变体，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个保守置换）。

在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链包含鼠免疫球蛋白的重链恒定区（CH）或其变体，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个氨基酸保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个保守置换）；和/或，

本发明的抗体或其抗原结合片段的轻链包含鼠免疫球蛋白的轻链恒定区（CL）或其变体，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个氨基酸保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个保守置换）。

在一些实施方案中，恒定区被改变，例如被突变，以修饰抗 TIM-3 抗体分子的性质（例如改变下列中的一个或多个特性：Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能）。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基，产生功能改变，例如，改变抗体对效应子配体（如 FcR 或补体 C1q）的亲和力，从而改变效应子功能（例如增强、降低或消除）。替换抗体的 Fc 区中的氨基酸残基以改变其效应子功能的方法是本领域已知的（参见，例如 EP388,151A1, US564,8260, US562,4821）。抗体的 Fc 区介导几种重要的效应子功能，例如 ADCC、吞噬作用、CDC 等。在某些情况下，这些效应子功能

对于治疗性抗体是需要的；但在其他情况下，这些效应子功能可能是不必要的或甚至是有害的，这取决于预期目的。因此，在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段具有降低或甚至消除的效应子功能（例如 ADCC 和/或 CDC 活性）。也考虑在人 IgG4 中使抗体结构稳定的氨基酸突变，例如 S228P (EU 命名法，在 Kabat 命名法中为 S241P)。

在此类实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含人 IgG 重链恒定区的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有以下置换中的至少一个：Ser228Pro、Leu234Ala、Leu235Ala、Gly237Ala、Asp265Ala、Asn297Ala、Pro329Ala、Asp356Glu 和 Leu358Met（以上提及的氨基酸位置是根据 EU 编号系统的位置，Edelman GM 等, Proc Natl Acad USA, 63, 78-85 (1969). PMID: 5257969)。

在某些示例性实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含人 IgG1 重链恒定区的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有以下置换：Leu234Ala、Leu235Ala（根据 EU 编号系统的位置）。在此类实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段具有降低的 ADCC 和 CDC 活性。

在某些示例性实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含人 IgG1 重链恒定区的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有以下置换：Asn297Ala（根据 EU 编号系统的位置）。在此类实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段具有消除的 ADCC 活性。

在某些示例性实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含人 IgG1 重链恒定区的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有以下置换：Asp265Ala、Pro329Ala（根据 EU 编号系统的位置）。在此类实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段具有消除的 ADCC 活性。

在某些示例性实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含人 IgG4 重链恒定区的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有以下置换：Ser228Pro（根据 EU 编号系统的位置）。在此类实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段结构稳定，可以降低 Fab-arm 的交换，从而不易形成半抗体。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段的重链包含人免疫球蛋白的重链恒定区 (CH) 的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有基本不变的效应子功能。在此类实施方案中，所述变体与其所源自的野生型序列相比可以具有至多 20 个氨基酸保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个保守置换）。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 38 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 38 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 38 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

和

(b) 轻链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 40 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 40 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NO: 40 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 42 所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NO: 42 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NO: 42 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

和

(b) 轻链，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 44 所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NO: 44 所示的序列相比具有一个或几个氨基酸置换、缺失或添加（例如

1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个置换、缺失或添加) 的序列; 或

(vi) 与 SEQ ID NO: 44 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

在某些示例性实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 具有如 SEQ ID NO: 38 所示的序列的重链和具有如 SEQ ID NO: 40 所示的序列的轻链; 或

(2) 具有如 SEQ ID NO: 42 所示的序列的重链和具有如 SEQ ID NO: 44 所示的序列的轻链。

本文中公开的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段可以抑制、减小或中和 TIM-3 的一种或更多种活性, 例如导致对 T 细胞或 NK 细胞上免疫检查点的阻断或减小, 或通过调整抗原呈递细胞而使免疫应答重新激活。

在一种实施方案中, 抗体分子或其抗原结合片段可以显示出以下性质中的至少一种:

a) 以 100nM 或更低, 优选 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 100\text{ pM}$ 或 $\leq 1\text{pM}$ 的 KD 结合 TIM-3 (特别是人 TIM-3);

b) 增进混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定中的 T 细胞 (例如 CD4^+ 或 CD8^+ T 细胞) 增殖;

c) 增进 MLR 测定中的干扰素- γ (IFN- γ) 产生;

d) 增进 MLR 测定中白介素-2 (IL-2) 分泌;

e) 对表达 TIM-3 的细胞具有细胞毒性 (抗体依赖性细胞介导的细胞毒性, ADCC), 如表达 TIM-3 的急性骨髓性白血病细胞;

f) 增强 NK 细胞的细胞毒性活性;

g) 减小调节性 T 细胞 (Treg) 或巨噬细胞的抑制子活性; 或

h) 增大巨噬细胞或树突细胞刺激免疫应答的能力。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段衍生自下列的单克隆抗体, 或是下列的单克隆抗体:

杂交瘤细胞株 #22 所产生的单克隆抗体, 其中, 杂交瘤细胞株 #22 保藏于中国典型培养

物保藏中心(CCTCC) (地址: 中国.武汉.武汉大学), 且具有保藏号 CCTCC NO.C2017181。

在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体或人源化抗体。在某些优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv 片段、双抗体(diabody)、双特异性抗体、多特异性抗体。

本发明第二方面, 公开了包含编码本发明所述抗 TIM-3 抗体分子的核苷酸序列。在某些实施方案中, 编码所述抗 TIM-3 抗体分子的核苷酸序列是密码子最优化的。例如本发明的特征是分别地编码抗 TIM-3 的抗体分子的重链和轻链可变区的第一和第二核酸, 该抗体分子选自下列中的任一种: Mab22、AB12S3、AB12S4、AB12S5、AB12S6 和 AB12S7; 或与其基本上相同的序列。例如, 核酸可以包含表 4 中所示的 AB12S3 和 AB12S4 核苷酸序列或与其基本上相同的序列(例如与其至少大约 85%、90%、95%、99% 或更高度相似的序列或具有一个或多个核苷酸取代(例如保守性取代)) 的序列, 或与表 4 中所示的序列相差不超过 3、6、15、30 或 45 个核苷酸的序列)。

本发明第三方面, 本发明提供了一种载体(例如克隆载体或表达载体), 其包含本发明的分离的核酸分子。在某些优选的实施方案中, 本发明的载体是例如质粒, 粘粒, 噬菌体等。在某些优选的实施方案中, 所述载体能够在受试者(例如哺乳动物, 例如人)体内表达本发明的抗体或其抗原结合片段。

本发明第四方面, 本发明提供了一种宿主细胞, 其包含本发明的分离的核酸分子或本发明的载体。宿主细胞可以是真核细胞(例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞)或原核细胞(例如大肠杆菌)。合适的真核细胞包括但不限于 NS0 细胞、Vero 细胞、Hela 细胞、COS 细胞、CHO 细胞、HEK293 细胞、BHK 细胞、和 MDCKII 细胞。适宜的昆虫细胞包括但不限于 Sf9 细胞。在某些优选的实施方案中, 本发明的宿主细胞是哺乳动物细胞, 例如 CHO (例如 CHO-K1、CHO-S、CHO DXB11、CHO DG44)。

本发明第五方面, 提供了制备本发明的抗体或其抗原结合片段的方法, 其包括, 在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下, 培养本发明的宿主细胞, 和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

本发明第六方面，公开了药物组合物，其包含药学上可接受的载体、和/或赋形剂和/或稳定剂和至少一种本发明中描述的抗 TIM-3 抗体分子。

在某些优选的实施方案中，所述药物组合物还可以包含另外的药学活性剂。在某些优选的实施方案中，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物。在某些优选的实施方案中，所述另外的药学活性剂是用于治疗感染的药物。在某些优选的实施方案中，所述另外的药学活性剂是用于治疗自身免疫性疾病的药物。

某些优选的实施方案中，在所述药物组合物中，本发明的抗体或其抗原结合片段与所述的另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。因此，本发明的抗体或其抗原结合片段与所述的另外的药学活性剂可以同时、分开或相继施用。

某些实施方案中，本发明的药物组合物还包含特异性结合选自以下受体或配体的第二抗体或编码所述第二抗体的核酸，其中，所述受体或配体选自：PD-1、PD-L1、PD-L2，LAG-3、TIGIT、VISTA、CTLA-4、OX40、BTLA、4-1BB、CD96、CD27、CD28、CD40、LAIR1、CD160、2B4、TGF-R、KIR、ICOS、GITR、CD3、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、SLAMF7、NKp80、B7-H3 及其任意组合。

在某些特定的实施方案中，所述第二抗体是结合人 PD-1 的抗体或其抗原结合片段。在某些优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含结合人 PD-1 的抗体或其抗原结合片段。在某些优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含的结合人 PD-1 的抗体或其抗原结合片段选自：Nivolumab（纳武单抗或 Opdivo[®]或欧狄沃）或其抗原结合片段，和 Pembrolizumab（帕博利珠单抗或 Keytruda[®]或可瑞达）或其抗原结合片段。

在某些特定的实施方案中，所述第二抗体是结合人 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段。在某些优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含结合人 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段。

某些实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段用于制备药物，所述药物用于至少下列中的任一项：(1) 在体外或受试者（例如人）体内提高免疫细胞活性；(2) 在受试者（例如人）中增强免疫应答；(3) 在受试者（例如人）中治疗癌症；(4) 在受试者（例如人）中治疗感染性疾病；(5) 在受试者（例如人）中治疗自身免疫性疾病；和；(6) (1) - (5) 的任意组合。

本发明第七方面，提供一种制备针对治疗对象中 TIM-3 介导的病症或疾病(例如，癌症、感染性疾病、自身免疫性疾病)的药物中的用途；所述肿瘤选自实体肿瘤、血液肿瘤 (例如，

白血病、淋巴瘤、骨髓瘤，例如，多发性骨髓瘤)和转移性病灶；癌症的非限定性的实例癌症选自肺癌(例如，肺腺癌或非小细胞肺癌)(NSCLC)(例如，具有鳞状和/或非鳞状病史的 NSCLC，或 NSCLC 腺癌)、黑色素瘤(例如，晚期黑色素瘤)、肾癌(例如，肾细胞癌)、肝癌(例如肝细胞癌)、骨髓瘤(例如，多发性骨髓瘤)、前列腺癌、乳腺癌(例如，不表达雌激素受体、孕酮受体或 Her2/neu 中的一种、两种或全部的乳腺癌，例如，三阴性乳腺癌)、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈癌(例如，头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、肛门癌、胃-食道癌(例如食管鳞状细胞癌)、间皮瘤、鼻咽癌、甲状腺癌、宫颈癌、淋巴增殖性疾病(例如，移植后淋巴增殖性疾病)或血液学癌症(例如弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、B-细胞淋巴瘤、或非霍奇金淋巴瘤)、或白血病(例如，髓性白血病或淋巴细胞性白血病)。

在一个实施方案中，癌症选自晚期或转移性癌、黑色素瘤或肺癌，例如，非小细胞肺癌。

在一个实施方案中，癌症是肺癌，例如，肺腺癌、非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

在一个实施方案中，癌症是黑色素瘤，例如，晚期黑色素瘤。在一个实施方案中，癌症是对其他治疗不应答的晚期或不可切除的黑色素瘤。在其他实施方案中，癌症是具有 BRAF 突变(例如，BRAFF600 突变)的黑色素瘤。

在另一个实施方案中，癌症是肝癌，例如，晚期肝癌，具有或不具有病毒感染，例如，慢性病毒性肝炎。

在另一个实施方案中，癌症是前列腺癌，例如，晚期前列腺癌。

在再另一个实施方案中，癌症是骨髓瘤，例如，多发性骨髓瘤。

在再另一个实施方案中，癌症是肾癌，例如，肾细胞癌(RCC)(例如，转移性 RCC 或透明细胞肾细胞癌(CCRCC)或肾乳头细胞癌)。

在一个实施方案中，肿瘤微环境具有升高水平的 PD-L1 表达。备选地或组合地，肿瘤微环境可以具有增加的 IFN γ 和/或 CD8 表达。

在一些实施方案中，对象已经被鉴定为，或被鉴定为，患有具有高 PD-L1 水平或表达的一种或多种的肿瘤，或被鉴定为肿瘤浸润型淋巴细胞(TIL)⁺，或前述两种情况。

在一些实施方案中，所述感染性疾病选自病毒感染、细菌感染、真菌感染和寄生虫感染，例如，感染性疾病的非限定性实例包括 HIV、(甲型、乙型或丙型)肝炎病毒、疱疹病毒或脓毒症等。

在一些实施方案中，所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、系统性红斑狼疮、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少性紫癜、胰岛素依赖性糖尿病、格雷夫斯病、重症肌无力、自生免疫肝炎和多发性硬化。

本发明第八方面，提供了调整(例如刺激或抑制)对象中免疫应答的方法。方法包括单独地或与一种或更多种活性剂(例如与其它免疫调节剂组合)或手术组合，向对象施用本文中公开的抗 TIM-3 抗体分子(例如治疗有效量的抗 TIM-3 抗体分子)，使得对象中的免疫应答被调整。在一些实施方案中，抗体分子增强、刺激或增加对象中的免疫应答。在一些实施方案中，抗体分子抑制、减小或中和对象中的免疫应答。对象可以是哺乳动物，例如猴子、灵长类，优选地高等灵长类，例如人(例如患有或处于患本发明中描述的病症的危险之中的患者)。

本发明第九方面，提供了一种治疗(例如，抑制和/或延迟进展)对象癌症或肿瘤的方法。该方法包括：将本文中所述的抗 TIM-3 抗体分子，例如，治疗有效量的抗 TIM-3 抗体分子，单独地或组合一种或多种活性剂或程序，施用于对象。在特定实施方案中，抗 TIM-3 抗体分子与共刺激分子的调节剂(例如，共刺激分子的激动剂)或抑制分子的调节剂(例如，免疫检查点分子的抑制剂)组合施用，例如，如本发明中所述的。

本发明第十方面，还提供了减少或抑制对象中癌症或肿瘤细胞生长(例如治疗癌症)的方法，包括单独地或与第二活性剂例组合，向对象施用本文中描述的抗 TIM-3 抗体分子，例如治疗有效量的抗 TIM-3 抗体分子。

本发明第十一方面，提供了诊断性或治疗性试剂盒，其包括本发明中描述的抗 TIM-3 抗体分子和使用说明书。

本发明制备的抗 TIM-3 人源化抗体与 TIM-3 的结合亲和力高，且具有极强的特异性。体内抗肿瘤研究数据显示，本发明所提供的人源化抗体能显著地抑制小鼠移植瘤的生长，甚至部分小鼠的肿瘤完全消失。此外，本发明所述抗体采用 CHO 细胞表达，具有产量高、活性高、纯化工艺简单以及生产成本低的优势。

发明详述

缩写和定义

TIM-3 T 细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域 3

CDR 用 Kabat 编号系统界定的免疫球蛋白可变区中的互补决定区

EC ₅₀	产生 50% 功效或结合的浓度
ELISA	酶联免疫吸附测定
FR	抗体构架区：将 CDR 区排除在外的免疫球蛋白可变区
HRP	辣根过氧化物酶
IL-2	白细胞介素 2
IFN	干扰素
IC ₅₀	产生 50%抑制的浓度
IgG	免疫球蛋白 G
Kabat	由 Elvin A Kabat 倡导的免疫球蛋白比对及编号系统
mAb	单克隆抗体
PCR	聚合酶链式反应
V 区	在不同抗体之间序列可变的 IgG 链区段。其延伸到轻链的 109 位 Kabat 残基和重链的第 113 位残基。
VH	免疫球蛋白重链可变区
VL	免疫球蛋白轻链可变区
VK	免疫球蛋白 κ 轻链可变区
K _D	平衡解离常数
<i>ka</i>	结合速率常数
<i>kd</i>	解离速率常数

本发明所使用的术语“TIM-3”包括同种型、哺乳动物(例如人)的 TIM-3、人 TIM-3 的物种同源物和包含至少一个与 TIM-3 的共同表位的类似物。TIM-3(例如人 TIM-3)的氨基酸序列是本领域中已知的，例如 Sabatos 等人, Nat Immunol, 2003, 4(11):1102。在一些实施方案中，本发明所提供的抗体分子与哺乳动物(例如，人或食蟹猴)的 TIM-3 上的表位(例如，线性或构象表位) 特异性结合。在一些实施方案中，结合表位是人或食蟹猴 TIM-3 的 IgV 结构域的至少一部分。人 TIM-3 的核苷酸和蛋白质序列可见于 Genbank 登录号 AF251707.1 和 Uniprot 登录号 Q8TDQ0。

术语“抗体”涵盖全长抗体(包含两条重链和两条轻链)、其各种功能性片段(例如可仅包含抗原结合部分，如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fd、Fd'、Fv 或 scFv 片段)以及经过修饰的抗体(例如人源化、糖基化等)。本发明还包括具有糖基化修饰的抗 TIM-3 抗体。在一些应

用中，进行修饰以除去不期望的糖基化位点，例如在寡糖链上去岩藻糖修饰以增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能；在另一些应用中，可进行半乳糖基化修饰以改变补体依赖性细胞毒性(CDC)。本发明中抗 TIM3 抗体分子可以是人源化的、嵌合的、骆驼(camelid)、鲨鱼或体外产生的抗体分子。抗体和抗体片段可以来自任何抗体类别，包括但不限于 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE 并且来自任何抗体亚类(例如，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)。抗体也可以是人抗体、人源化抗体、CDR 移植抗体或体外生成的抗体。抗体可以具有例如选自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区。抗体还可以具有例如选自 κ 或 λ 的轻链。

术语“单克隆抗体或 mAb”，指由单一的克隆细胞株得到的抗体，所述的细胞株不限于真核的，原核的或噬菌体的克隆细胞株。单克隆抗体或抗原结合片段可以用如杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术，合成技术(如 CDR-grafting)，或其它现有技术进行重组得到。

“抗体片段”和“抗原结合片段”意即抗体的抗原结合片段及抗体类似物，其通常包括至少部分母体抗体(parental antibody)的抗原结合区或可变区(例如一个或多个 CDR)。抗体片段保留母体抗体的至少某些结合特异性。通常，当基于摩尔来表示活性时，抗体片段保留至少 10%的母体结合活性。优选地，抗体片段保留至少 20%、50%、70%、80%、90%、95%或 100%或更多的母体抗体对靶标的结合亲和力。抗体片段实例包括但不限于：Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体(linear antibody)；单链抗体分子，例如 ScFv、单抗体、纳米抗体、单结构域抗体；和由抗体片段形成的多特异性抗体。工程改造的抗体变体综述于 Holliger 等, 2005; Nat Biotechnol, 23: 1126-1136 中。

“Fab 片段”由一条轻链和一条重链的 CH1 及可变区组成。Fab 分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

“Fc”区含有包含抗体的 CH1 和 CH2 结构域的两个重链片段。两个重链片段由两个或多个二硫键并通过 CH3 结构域的疏水作用保持在一起。

“Fab'片段”含有一条轻链和一条重链的 VH 结构域和 CH1 结构域以及 CH1 和 CH2 结构域之间的恒定区部分，由此可在两个 Fab'片段的两条重链之间形成链间二硫键以形成 F(ab')₂ 分子。

“F(ab')₂ 片段”含有两条轻链和两条重链的 VH 结构域和 CH1 结构域以及 CH1 和 CH2 结构域之间的恒定区部分，由此在两条重链间形成链间二硫键。因此，F(ab')₂ 片段由通过两条重链间的二硫键保持在一起的两个 Fab'片段组成。

“Fv 区”包含来自重链和轻链二者的可变区，但缺少恒定区。

“单链 Fv 抗体”(或“scFv 抗体”)是指包含抗体的 VH 和 VL 结构域的抗体片段，其中

这些结构域存在于单个多肽链中。对于 scFv 综述,可参见 Pluckthun(1994) *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* (单克隆抗体药理学), 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 主编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页。还参见国际专利申请公开号 WO 88/01649 和美国专利第 4,946,778 号和第 5,260,203 号。

“抗原结合片段”是仅含有重链可变区或轻链可变区链的具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。抗原结合片段的例子包括 (i) Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段; (ii)F(ab')₂ 片段,包含由二硫键在铰链区连接的两个 Fab 片段的双价片段; (iii)由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段; (v)由 VH 域组成的双体抗体(dAb)片段; (vi)骆驼(或骆驼化可变结构域); (vii)单链 Fv(scFv); (viii)单结构域抗体。使用任何适当的方法,包括本领域技术人员已知的若干常规技术,可以获得这些抗体片段,并且按照与完整抗体相同的方式能筛选所述片段的用途。

本文所用术语“超变区”或“CDR 区”或“互补决定区”是指负责抗原结合的抗体氨基酸残基。CDR 区序列可以由 IMGT、Kabat、Chothia 和 AbM 方法来定义或本领域熟知的任何 CDR 区序列确定方法而鉴定的可变区内的氨基酸残基。抗体 CDR 可鉴定为最初由 Kabat 等人定义的高变区,例如,轻链可变结构域的 24-34(L1)、50-56(L2)和 89-97(L3)位残基和重链可变结构域的 31-35(H1)、50-65(H2)和 95-102(H3)位残基,参见 Kabat 等, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (免疫目的物的蛋白质序列), 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.; CDR 的位置亦可鉴定为最初由 Chothia 等人描述的“超变环”(HVL)结构来界定的,例如,轻链可变结构域的 26-32(L1)、50-52(L2)和 91-96(L3)位残基和重链可变结构域的 26-32(H1)、52-56(H2)和 95-102(H3)位残基(参见例如 Chothia 等人, *J Mol Biol*, 1992, 227: 799-817; Tomlinson 等人, *J Mol Biol*, 1992, 227: 776-798)。IMGT(ImMunoGeneTics)也提供了包括 CDR 的免疫球蛋白可变区的编号系统,根据 IMGT 编号定义 CDR 区,例如,轻链可变结构域的 27-32(L1)、50-52(L2)和 89-97(L3)位残基和重链可变结构域的 26-35(H1)、51-57(H2)和 93-102(H3)位残基,参见如 Lefranc, M.P. 等的 *Dev Comp Immunol*, 2003, 27: 55-77, 其通过引用并入本文。用于 CDR 鉴定的其它方法包括“AbM 定义”,其为 Kabat 与 Chothia 之间的折衷且使用 Oxford Molecular's AbM 抗体模型软件得到;或 CDR 的“接触定义”,其基于所观察的抗原接触且阐述于 MacCallum 等人, 1996, *J.Mol.Biol.*, 262: 732-745 中。CDR 的“构型定义”方法中,CDR 的位置可鉴定为对抗原结合作出焓贡献的残基,参见例如 Makabe 等人, 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283: 1156-1166。本发明所用的方法可利用或根据这些方法中的任一种所定义的

CDR, 包括但不限于 Kabat 定义、IMGT 定义、Chothia 定义、AbM 定义、接触定义和/或构型定义中的任一者来定义。

在一些实施方案中, 抗 TIM-3 抗体分子包含至少一个、两个或三个来自本发明中描述的抗体的重链可变区的互补决定区(CDR), 该抗体例如是选自下列中任何的抗体: Mab22、AB12S3、AB12S4、AB12S5、AB12S6 和 AB12S7; 或表 1 中描述的; 或由表 4 中核苷酸序列编码的; 或与上述序列中的任何基本上相同的(例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列。在一些实施方案中, 抗 TIM-3 抗体分子包含至少一个、两个或三个来自本发明中描述的抗体的重链可变区和轻链可变区的互补决定区(CDR), 该抗体例如是选自下列中任何的抗体: Mab22、AB12S3、AB12S4、AB12S5、AB12S6 和 AB12S7; 或表 1 中描述的; 或由表 4 中核苷酸序列编码的; 或与上述序列中的任何基本上相同的(例如至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代(例如保守性取代))的序列。在一些实施方案中, 抗 TIM-3 抗体分子包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个来自重链和轻链可变区的 CDR, 该重链和轻链可变区包括表 1 中所示的或由表 4 中所示的核苷酸序列编码的氨基酸序列。在一些实施方案中, 相对于表 1 中所示的或由表 4 中所示的核苷酸序列编码的 CDR, CDR 中的一个或更多个(或所有 CDR)具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个改变, 例如氨基酸取代(例如保守性取代)、插入或缺失。

术语“构架区”“可变构架区”、“FR 区”为除本发明定义的超变区残基之外的可变结构域残基。在某些实施方案中, 抗 TIM-3 抗体分子的轻链可变构架区或重链可变构架区可以选自: (a)包含至少 70、75、80、85、86、87、88、89、90、91、92、94、95、96、97、98、99% 或优选地 100% 的来自人轻链或重链可变构架区的氨基酸残基(例如来自人成熟抗体、人种系序列或人共有序列的轻链或重链可变构架区残基)的轻链或重链可变构架区; (b)非人构架区(例如啮齿类动物构架); 或(c)已经被修饰的(例如被修饰以除去抗原决定簇或细胞毒性决定簇)的非人构架区, 例如去免疫的或部分地人源化的构架。在一些实施方案中, 轻链或重链可变构架区包含与人生殖细胞基因的 V_L 或 V_H 段的构架区至少 70、75、80、85、86、87、88、89、90、91、92、94、95、96、97、98、99% 相同或相同的轻或重链可变构架区序列。在某些实施方案中, 抗 TIM-3 抗体分子包括来自例如完整可变区(例如在表 1 中所示的)中 FR 区的氨基酸序列的具有至少 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、10 个、15 个、20 个或更多个改变(例如氨基酸取代、插入或缺失)的重链可变区。在某些实施方案中, 抗 TIM-3 抗体分子包括来自例如完整可变区(例如在表 1 中所示的)中 FR 区的氨基酸序列的具有至少 1

个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、10个、15个、20个或更多个改变(例如氨基酸取代、插入或缺失)的轻链可变区。

术语“嵌合抗体 (Chimeric antibody)”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。可以通过任何合适的重组 DNA 技术产生嵌合抗体。一些是本领域已知的(参见 PCT/US86/02269; EP184,187; EP171,496; EP173,494; WO86/01533; US4,816,567; EP125,023; Better 等人, Science, 1988,240:1041-1043); Liu 等人, PNAS, 1987, 84:3439-3443; Liu 等人, J Immunol, 1987, 139:3521-3526; Sun 等人, PNAS, 1987, 84:214-218; Nishimura 等人, Canc Res, 1987,47:999-1005; Wood 等人, Nature, 1985,314:446-449; 和 Shaw 等人, J Natl Cancer Inst, 1988, 80:1553-1559)。在本发明的一优选实施方案中，所述的 TIM-3 嵌合抗体的抗体轻链可变区进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链 FR 区。所述 TIM-3 嵌合抗体的抗体重链可变区进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链 FR 区。人抗体的恒定区可选自人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG1 或 IgG4 重链恒定区。

术语“多特异性抗体”由第一抗体或其抗原结合片段与其他抗体或其抗原结合片段或抗体类似物通过偶联形成，并且其中各抗体或其抗原结合片段或抗体类似物保持原结合特异性，例如，多特异性抗体为三特异性抗体或四特异性抗体。术语“双特异性抗体”，是指本发明的抗 TIM-3 抗体或其抗原结合片段可以进行衍生化或连接至另一功能性分子上，例如另一种肽或蛋白质（例如肿瘤相关抗原、细胞因子和细胞表面受体）以生成与至少两种不同结合位点或靶分子结合的双特异性抗体。为创建本发明的双特异性抗体，可以将本发明的抗体在功能上连接（例如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其它方式）至一种或多种其它结合分子，诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模仿物，从而产生双特异性抗体。例如，“双特异性抗体”是指包含两个可变结构域或 ScFv 单位使得所得抗体识别两种不同抗原。

本文使用的术语“免疫结合”和“免疫结合性质”是指一种非共价相互作用，其发生在免疫球蛋白分子和抗原（对于该抗原而言免疫球蛋白为特异性的）之间。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以相互作用的平衡解离常数(K_D)表示，其中 K_D 值越小，表示亲和力越高。所选多肽的免疫结合性质可使用本领域中公知的方法定量。一种方法涉及测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速度。“结合速率常数”(k_a 或 k_{on})和“解离速率常数”(k_d 或 k_{off})两者都可通过浓度及缔合和解离的实际速率而计算得出。(参见 Malmqvist M, Nature,1993, 361:186-187)。 k_d/k_a 的比率等于解离常数 K_D (通常参见 Davies 等人, Annual Rev Biochem, 1990; 59:439-473)。可用任何有效的方法测量 K_D 、 k_a 和 k_d 值。在优选的实施方案

中，用生物发光干涉测量法(例如，实施例 5.2 中所述的 ForteBio Octet 法)来测量解离常数。在其它优选的实施方案中，可用表面等离子共振技术(例如 Biacore)或 Kinexa 来测量解离常数。当平衡结合常数(K_D)为 $\leq 10 \mu\text{M}$ ，优选为 $\leq 100 \text{ nM}$ ，更优选为 $\leq 10 \text{ nM}$ ，和最优选为 $\leq 100 \text{ pM}$ ~约 1 pM 时，本发明的抗体被认为特异性地结合至 TIM-3 表位。

同源抗体

在又一方面，本发明抗体包含的重链和轻链可变区所包含的氨基酸序列与本文所述的优选抗体的氨基酸序列同源，且其中所述抗体保留了本发明抗 TIM-3 抗体的期望的功能特性。

例如，本发明提供了人源化的结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：(a)所述重链可变区包含与选自 SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9 和 11 的氨基酸序列至少 80%同源的氨基酸序列；更优地，所述重链可变区包含与选自 SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9 和 11 的氨基酸序列至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同源的氨基酸序列；(b)所述轻链可变区包含与选自 SEQ ID NOs: 2、4、6、8、10 和 12 的氨基酸序列至少 80%同源的氨基酸序列；更优选地，所述轻链可变区包含与选自 SEQ ID NOs: 2、4、6、8、10 和 12 的氨基酸序列至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同源的氨基酸序列。

具有保守修饰的抗体

术语“保守修饰”意图指氨基酸修饰不会显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特征。此类保守修饰包括氨基酸的取代、添加和缺失。修饰可以通过本领域已知的标准技术，例如定点诱变和 PCR 介导的优点引入到本发明的抗体中。保守氨基酸取代指氨基酸残基用具有类似侧链的氨基酸残基替换。本领域中对具有类似侧链的氨基酸残基家族已有详细说明。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此，可以用来自同一侧链家族的其他氨基酸残基替换本发明抗体 CDR 区中的一个或多个氨基酸残基。

抗 TIM-3 抗体的用途

本文中公开的抗 TIM-3 抗体分子可以抑制、减小或中和 TIM-3 的一种或更多种活性，例如导致对 T 细胞或 NK 细胞上免疫检查点的阻断，或通过调整抗原呈递细胞而使免疫应答重新激活。在一种实施方案中，抗体分子具有下列一种或更多种活性：增强 T 细胞中 IFN- γ 和/或 TNF α 分泌；增强 T 细胞(例如 CD4⁺或 CD8⁺ T 细胞) 的增殖；增强 NK 细胞的细胞毒性作用；或减小调节性 T 细胞(Treg)或巨噬细胞的抑制子活性；或增大巨噬细胞或树突细胞刺激免疫应答的能力。因此，可以使用这样的抗体分子来治疗或预防想要增强对象中的免疫应答的病症，例如，癌症、感染性疾病和自身免疫性疾病。

癌症

在一些实施方案中，使用抗 TIM-3 抗体分子来治疗表达 TIM-3 的癌症。表达 TIM-3 的癌症包括宫颈癌(Cao 等人, PLOS One, 2013, 8(1): e53834), 肺癌 (Zhuang 等人, Am J Clin Pathol, 2012,137(6):978-985) (例如, 非小细胞肺癌)、急性髓样白血病(Kikushige 等人, Cell Stem Cell, 2010, 7(6):708-17)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、黑色素瘤(Fourcade 等人, JEM, 2010, 207(10):2175)、肾癌(例如肾细胞癌(RCC), 例如肾透明细胞癌、肾乳头细胞癌或转移性肾细胞癌)、鳞状细胞癌、食道鳞状细胞癌、鼻咽癌、结肠直肠癌、乳腺癌(例如不表达雌激素受体蛋白、孕酮受体或 Her2/neu 中的一种、两种或所有的乳腺癌, 例如三重阴性的乳腺癌)、间皮瘤、肝细胞癌和卵巢癌。表达 TIM-3 的癌症可以是转移性癌症。在一种实施方案中，使用抗 TIM-3 抗体分子来治疗以一种或更多种下列巨噬细胞的细胞标志物为特征的癌症：LILRB4(巨噬细胞抑制性受体)、CD14、CD16、CD68、MSR1、SIGLEC1、TREM2、CD163、ITGAX、ITGAM、CD11b 或 CD11c。这样的癌症的实例包括但是不局限于弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、多形性胶质母细胞瘤、肾脏肾透明细胞癌、胰腺腺癌、肉瘤、肝脏肝细胞癌、肺腺癌、肾脏肾乳头细胞癌、皮肤的皮肤黑色素瘤、大脑低级神经胶质瘤、肺鳞状细胞癌、卵巢浆液囊性腺癌、头部和颈部鳞状细胞癌、乳房浸润性癌、急性髓样白血病、子宫颈鳞状细胞癌、子宫颈内腺癌、子宫癌、结肠直肠癌、子宫体子宫内膜癌、甲状腺癌、膀胱泌尿道上皮癌、肾上腺皮质癌、肾嫌色细胞和前列腺腺癌。

在某些方面中，本发明提供了调整(例如刺激或抑制)对象中免疫应答的方法。方法包括单独地或与一种或更多种活性剂或手术组合(例如与其它免疫调节剂组合)，向对象施用本文中公开的抗 TIM-3 抗体分子(例如治疗有效量的抗 TIM-3 抗体分子)，使得对象中的免疫应答被调整。在一些实施方案中，抗体分子增强、刺激或增加对象中的免疫应答。在一些实施方案中，抗体分子抑制、减小或中和对象中的免疫应答。

对象可以是哺乳动物，例如猴子、灵长类，优选地高等灵长类，例如人(例如患有或处于患本文中描述的病症的危险之中的患者)。在一些实施方案中，对象需要增强免疫应答，以及在一些实施方案中，对象需要抑制免疫应答。在一个实施方案中，对象具有本文中所述的病症或处于罹患本文中所述病症的风险中，例如，如本文中所述的癌症和感染性病症。在特定实施方案中，对象是免疫受损的或处于免疫受损的风险中。例如，对象正经历或已经经历化疗和/或放疗。备选地，或组合地，对象是因感染而免疫受损或处于免疫受损风险中的。

在一个方面中，提供了一种治疗(例如抑制和/或延迟进展)对象癌症或肿瘤的方法。该方法包括：将本文中所述的抗 TIM-3 抗体分子，例如，治疗有效量的抗 TIM-3 抗体分子，单独地或组合一种或多种活性剂或程序，施用于对象。在特定实施方案中，抗 TIM-3 抗体分子与共刺激分子的调节剂(例如，共刺激分子的激动剂)或抑制分子的调节剂(例如，免疫检查点分子的抑制剂)组合施用，例如，如本文中所述的。

本公开还提供了减少或抑制对象中癌症或肿瘤细胞生长(例如治疗癌症)的方法，包括单独地或与第二活性剂例组合，向对象施用本文中描述的抗 TIM-3 抗体分子，例如治疗有效量的抗 TIM-3 抗体分子。

在某些实施方案中，用抗 TIM-3 抗体分子(单独地或与一种或更多种免疫调节剂组合)治疗的癌症，包括但不限于，实体肿瘤，血液学肿瘤(例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤，例如，多发性骨髓瘤)和转移性病灶。在一个实施方案中，癌症是实体肿瘤。实体肿瘤的实例包括恶性肿瘤，例如，肉瘤和癌，例如，各种器官系统的腺癌，如影响肺、乳房、卵巢、淋巴、胃肠(例如，结肠)、肛门、生殖器和泌尿生殖道(例如，肾、尿道、膀胱细胞、前列腺)、咽、CNS(例如，脑、神经或胶质细胞)、头颈、皮肤(例如，黑色素瘤)和胰腺的那些，以及包括恶性肿瘤的腺癌，如结肠癌、肾癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠的癌症和食道的癌症。癌症可以是早期、中期、晚期或转移性癌症。

在一个实施方案中，癌症选自肺癌(例如，肺腺癌或非小细胞肺癌)(NSCLC)(例如，具有鳞状和/或非鳞状病史的 NSCLC，或 NSCLC 腺癌)、黑色素瘤(例如，晚期黑色素瘤)、肾癌(例如，肾细胞癌)、肝癌(例如肝细胞癌)、骨髓瘤(例如，多发性骨髓瘤)、前列腺癌、乳腺癌(例如，不表达雌激素受体、孕酮受体或 Her2/neu 中的一种、两种或全部的乳腺癌，例如，三阴性乳腺癌)、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、头颈癌(例如，头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、肛门癌、胃-食道癌(例如食管鳞状细胞癌)、间皮瘤、鼻咽癌、甲状腺癌、宫颈癌、淋巴增殖性疾病(例如，移植后淋巴增殖性疾病)或血液学癌症(例如弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、B-细胞淋巴瘤、或非霍奇金淋巴瘤)、或白血病(例如，髓性白血病或淋巴细胞性白血病)。

在另一个实施方案中，癌症选自癌(例如，晚期或转移性癌)、黑色素瘤或肺癌，例如，非小细胞肺癌。

在一个实施方案中，癌症是肺癌，例如，肺腺癌、非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

在一个实施方案中，癌症是黑色素瘤，例如，晚期黑色素瘤。在一个实施方案中，癌症是对其他治疗不应答的晚期或不可切除的黑色素瘤。在其他实施方案中，癌症是具有 BRAF 突变(例如，BRAFFV600 突变)的黑色素瘤。

在另一个实施方案中，癌症是肝癌，例如，晚期肝癌，具有或不具有病毒感染，例如，慢性病毒性肝炎。

在另一个实施方案中，癌症是前列腺癌，例如，晚期前列腺癌。

在再另一个实施方案中，癌症是骨髓瘤，例如，多发性骨髓瘤。

在再另一个实施方案中，癌症是肾癌，例如，肾细胞癌(RCC) (例如，转移性 RCC 或透明细胞肾细胞癌(CCRCC)或肾乳头细胞癌)。

在一个实施方案中，癌微环境具有升高水平的 PD-L1 表达。备选地或组合地，癌微环境可以具有增加的 IFN γ 和/或 CD8 表达。

在一些实施方案中，对象已经被鉴定为，或被鉴定为，患有具有高表达 PD-L1 的肿瘤，或被鉴定为肿瘤浸润型淋巴细胞(TIL)⁺ (例如，具有数目增加的 TIL)，或前述两种情况。在某些实施方案中，对象患有或被鉴定为患有高表达 PD-L1 并且 TIL⁺ 的肿瘤。在某些实施方案中，本文所述的方法进一步包括基于患有或被鉴定为高表达 PD-L1 肿瘤且 TIL⁺。在一些实施方案中，TIL⁺ 的肿瘤为 CD8 和 IFN γ 阳性。在一些实施方案中，对象具有或被鉴定为具有高百分数的对 PD-L1、CD8 和/或 IFN γ 中一者、两者或更多者为阳性的细胞。在某些实施方案中，对象具有或被鉴定为具有高百分数的对 PD-L1、CD8 和 IFN γ 均为阳性的细胞。在一些实施方案中，对象具有或被鉴定为具有 PD-L1、CD8 和/或 IFN γ 中一者、两者或更多者，并且患有或被鉴定为患有以下一种或多种癌症：肺癌，例如，鳞状细胞肺癌或肺腺癌；头颈癌；鳞状细胞宫颈癌；胃癌；食管癌；甲状腺癌；黑色素瘤和/或鼻咽癌(NPC)。在某些实施方案中，本文所述的方法还描述了基于对象患有或被鉴定为具有 PD-L1、CD8 和/或 IFN γ 中一者、两者或更多者，例如，鳞状细胞肺癌或肺腺癌；头颈癌；鳞状细胞宫颈癌；胃癌；甲状腺癌；黑色素瘤和/或鼻咽癌中的一种或多种。

在一些实施方案中，对象患有或被鉴定为患有肿瘤，其具有下列中的一种、两种或更多种特征：高表达 PD-1、高表达 TIM-3 和/或调节性 T 细胞在肿瘤中的高水平浸润。在某些实施方案中，对象患有或被鉴定为患有肿瘤，其具有高的 PD-1 和 TIM-3 水平且在肿瘤中调节

性 T 细胞水平升高。在一些实施方案中，本文中所描述的方法进一步包括对象具有或被鉴定为基于下列中的一种、两种或更多种特征：高百分比的 PD-1⁺ 细胞、高百分比的 TIM-3⁺ 细胞、和/或调节性 T 细胞在肿瘤中的高水平浸润（例如增大数量或百分比的 Treg 存在于肿瘤中）。在一些实施方案中，本文中所描述的方法进一步包括基于对象患有或被鉴定具有下列中的一种、两种或更多种特征：高百分比的 PD-1⁺ 细胞、高百分比的 TIM-3⁺ 细胞、和/或调节性 T 细胞在肿瘤中的高水平浸润并且患有下列癌症中的一种或多种：肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))；肝细胞性癌症(例如肝细胞癌)；或卵巢癌症(例如卵巢癌)。

感染性疾病

基于涉及的感染性生物或物质的种类，广泛地把感染分类为细菌性的、病毒性的、真菌性的或寄生虫的。其它不太常见类型的感染包括例如涉及立克次氏体、支原体和物质的感染性疾病，所述物质引起瘙痒病、牛海绵状脑病(BSE)和普里昂病(例如库鲁症和克-雅二氏病)的感染。引起感染的细菌、病毒、真菌和寄生虫的实例是本领域中熟知的。感染可以是急性的、亚急性的、慢性的或潜伏的，并且它可以是局部的或全身的。在多种实施方案中，可以单独地或以佐剂形式、与疫苗组合使用抗 TIM-3 抗体分子，来刺激针对例如病原体或毒素的免疫应答。这种治疗方法可能对其特别有用的病原体的实例包括目前没有对其特别有效的疫苗的病原体或常规疫苗对其不完全有效的病原体。这些包括但不限于 HIV、(甲型、乙型和丙型)肝炎、流感、疱疹、贾第鞭毛虫(*Giardia*)、疟疾、利什曼原虫(*Leishmania*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

TIM-3 抗体可治疗的感染的致病性病毒的一些例子包括疱疹病毒(例如，VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、CMV、EpsteinBarr 病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞体病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV 病毒、登革病毒、乳头状瘤、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC 病毒、虫媒脑炎病毒和埃波拉病毒(例如 BDBV、EBOV、RESTV、SUDV 和 TAFV)。

根据本发明的方法可以预防、治疗或管理的炎症性疾病的实例包括，但不限于，哮喘(asthma)、脑炎(encephalitis)、炎症肠病(inflammatory bowel disease)、慢性梗阻性肺病(chronic obstructive pulmonary disease(COPD))、变应性疾病(allergic disorders)、脓毒性休克(septic shock)、肺纤维化(pulmonary fibrosis)、未分化脊柱关节病(undifferentiated spondyloarthritis)、未分化关节病(undifferentiated arthropathy)、关节炎(arthritis)、炎性骨溶

解(inflammatory osteolysis)以及由慢性病毒或细菌感染引起的慢性炎症。

因此，本发明的抗体及其抗原结合片段在炎性和自身免疫疾病的治疗中具有实用性。

自身免疫性疾病

免疫系统的下调在炎症和自身免疫疾病以及移植抗宿主疾病(GvHD)的治疗中是期望的。可以通过施用本发明抗体治疗的自身免疫疾病的实例包括，但不限于，斑秃(alopecia areata)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis)、抗磷脂综合征(antiphospholipid syndrome)、自身免疫性阿狄森氏病(auto-immune Addison's disease)、肾上腺自身免疫疾病、自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia)、自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis)、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎(autoimmune oophoritis and orchitis)、自身免疫性血小板减少症(autoimmune thrombocytopenia)、白塞病(Behcet's disease)、大疱性类天疱疮(bullous pemphigoid)、心肌病(cardiomyopathy)、乳糜泻-皮炎(celiac sprue-dermatitis)、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(chronic fatigue immune dysfunction syndrome(CFIDS))、慢性炎症脱髓鞘性多神经病(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)、Churg-Strauss 综合征、疤痕性类天疱疮(cicatricial pemphigoid)、CREST 综合征、冷凝集素病(cold agglutinin disease)、克罗氏病(Crohn's disease)、盘状狼疮(discoid lupus)、特发性混合性冷球蛋白血症(essential mixed cryoglobulinemia)、纤维肌痛-纤维肌炎(fibromyalgia-fibromyositis)、肾小球肾炎(glomerulonephritis)、Graves'病、Guillain-Barre、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis)、特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP))、IgA 神经病、幼年型关节炎(juvenile arthritis)、扁平苔藓病(lichen planus)、红斑狼疮(lupus erythematosus)、梅尼埃病(Meniere's disease)、混合性结缔组织病(mixed connective tissue disease)、多发性硬化(multiple sclerosis)、视神经脊髓炎(Neuromyelitis optica(NMO))、1型或免疫介导的糖尿病(diabetes mellitus)、重症肌无力(myasthenia gravis)、寻常型天疱疮(pemphigus vulgaris)、恶性贫血(pernicious anemia)、结节性多动脉炎(polyarteritis nodosa)、多软骨炎(polychondritis)、多腺体综合征(polyglandular syndromes)、风湿性多肌痛(polymyalgia rheumatica)、多肌炎(polymyositis)和皮肌炎(dermatomyositis)、原发性无丙种球蛋白血症(primary agammaglobulinemia)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis)、银屑病(psoriasis)、银屑病关节炎(psoriatic arthritis)、雷诺氏现象(Raynaud's phenomenon)、莱特尔综合征(Reiter's syndrome)、类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis)、结节病(sarcoidosis)、硬皮病(scleroderma)、Sjogren's 综合征、全身肌强直综合征(stiff-man syndrome)、全身性红斑狼疮

(systemic lupus erythematosus)、红斑狼疮(lupus erythematosus)、大动脉炎(takayasu arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎(temporal arteritis/giant cell arteritis)、横贯性脊髓炎(transverse myelitis)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)、葡萄膜炎(uveitis)、脉管炎(vasculitides)(如疱疹样皮炎和血管炎(dermatitis herpetiformis and vasculitis))、白癜风(vitiligo)和韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

检测方法和试剂盒

在一些方面，本发明提供了(例如，体外或体内)检测TIM-3在样品(例如，生物样品，例如，血液、血清、精液或尿或组织活检样品(例如，来自过度增生性或癌性病灶))中存在或其水平的方法。该方法可以用来评价(例如，监测对象中本发明所述疾病(例如，免疫病症、癌症或感染性疾病)的治疗或进展、其诊断和/或分期)。该方法可以包括：(i)在允许相互作用发生的条件下使样品与如本发明所述的抗TIM-3抗体分子接触或向对象施用所述抗TIM-3抗体分子和(ii)检测是否存在抗体分子和样品之间复合物的形成。复合物的形成表示存在TIM-3，并且可以显示本文所述治疗的适宜性或需求。该方法可以涉及，例如免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术、抗体分子复合的磁珠、ELISA测定法、PCR-技术(例如，RT-PCR)。一般，体内和体外诊断方法中所用的抗TIM-3抗体分子直接或间接地用可检测物质标记以输出检测信号。合适的可检测物质包括各种生物活性酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。

在另一个方面，本发明提供了一种试剂盒，其包括本发明的抗体或其抗原结合片段。在某些优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记。在一个优选的实施方案中，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别本发明的抗体或其抗原结合片段。优选地，所述第二抗体还包括可检测的标记。

在本发明中，所述可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。特别优选的是，此类标记能够适用于免疫学检测(例如，酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等)。这类标记是本领域熟知的，包括但不限于，酶(例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等)、放射性核素(例如， ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、荧光染料(例如，异硫氰酸荧光素(FITC)、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明(TRITC)、藻红蛋白(PE)、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物(例如Cy7、Alexa 750))、吡啶酯类化合物、磁珠(例如，Dynabeads®)、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料(例

如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等）珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）的生物素。教导该标记物的使用的专利包括，但不限于，美国专利 3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,277,437；4,275,149；及 4,366,241（全部通过引用并入本文）。本发明中涵盖的标记物可通过本领域已知的方法检测。例如，放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计数器检测，荧光标记物可使用光检测器检测，以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测，及测热标记物通过简单可视化着色标记物来检测。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头将如上所述的可检测的标记连接至本发明的重组蛋白，以降低潜在的位阻。

在另一个方面，提供了本发明的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 TIM-3 在样品中的存在或其水平。

药物组合物及组合疗法

本发明所提供的抗体可单独使用或与其它治疗剂或治疗方法联合使用。TIM-3 抗体也可以与标准癌症治疗组合。

在某些优选的实施方案中，所述药物组合物还可以包含另外的药学活性剂。在某些优选的实施方案中，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物。在某些优选的实施方案中，所述另外的药学活性剂是用于治疗感染的药物。在某些优选的实施方案中，所述另外的药学活性剂是用于治疗自身免疫性疾病的药物。

某些优选的实施方案中，在所述药物组合物中，本发明的抗体或其抗原结合片段与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。因此，本发明的抗体或其抗原结合片段与所述另外的药学活性剂可以同时、分开或相继施用。

某些实施方案中，本发明的药物组合物还包含特异性结合选自以下受体或配体的第二抗体或编码所述第二抗体的核酸，其中，所述受体或配体选自：PD-1、PD-L1、PD-L2，LAG-3、TIGIT、VISTA、CTLA-4、OX40、BTLA、4-1BB、CD96、CD27、CD28、CD40、LAIR1、CD160、2B4、TGF-R、KIR、ICOS、GITR、CD3、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、SLAMF7、NKp80、B7-H3 及其任意组合。

在某些特定的实施方案中，所述第二抗体是结合人 PD-1 的抗体或其抗原结合片段。在某些优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含结合人 PD-1 的抗体或其抗原结合片段。

在某些优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含的结合人 PD-1 的抗体或其抗原结合片段选自：Nivolumab（纳武单抗或 Opdivo®或欧狄沃）或其抗原结合片段，和

Pembrolizumab（帕博利珠单抗或 Keytruda®或可瑞达）或其抗原结合片段。

在某些特定的实施方案中，所述第二抗体是结合人 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段。在某些优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含结合人 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段。

某些实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段用于制备药物，所述药物用于至少下列中的任一项：(1) 在体外或受试者（例如人）体内提高免疫细胞活性；(2) 在受试者（例如人）中增强免疫应答；(3) 在受试者（例如人）中治疗癌症；(4) 在受试者（例如人）中治疗感染性疾病；(5) 在受试者（例如人）中治疗自身免疫性疾病；和；(6) (1) - (5) 的任意组合。

某些优选的实施方案中，所述癌症选自实体肿瘤、血液肿瘤（例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤，例如，多发性骨髓瘤）和转移性病灶；例如，包括但不限于肺癌、鳞状细胞肺癌、黑色素瘤、肾癌、乳腺癌、IM-TN 乳腺癌、结肠直肠癌、白血病或癌症的转移性病灶。

某些优选的实施方案中，所述感染性疾病选自病毒感染、细菌感染、真菌感染和寄生虫感染，包括但不限于 HIV、肝炎病毒、疱疹病毒或脓毒症。

某些优选的实施方案中，所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、系统性红斑狼疮、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少性紫癜、胰岛素依赖性糖尿病、格雷夫斯病、重症肌无力、自身免疫性肝炎和多发性硬化。

衍生的抗体

本发明的抗体或其抗原结合片段可进行衍生化，例如被连接至另一个分子（例如另一个多肽或蛋白）。通常，抗体或其抗原结合片段的衍生化（例如，标记）不会不利影响其对 TIM-3（特别是人 TIM-3）的结合。因此，本发明的抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。例如，可以将本发明的抗体或其抗原结合片段功能性连接（通过化学偶合、基因融合、非共价连接或其它方式）于一个或多个其它分子基团，例如另一个抗体（例如，形成双特异性抗体），检测试剂，药用试剂，和/或能够介导抗体或抗原结合片段与另一个分子结合的蛋白或多肽（例如，抗生物素蛋白或多组氨酸标签）。

一种类型的衍生化抗体（例如，双特异性抗体）是通过交叉连接 2 个或多个抗体（属于同一类型或不同类型）而产生的。获得双特异性抗体的方法是本领域公知的，其实例包括但不限于，化学交联法、细胞工程法（杂交瘤法）或基因工程法。

另一种类型的衍生化抗体是与治疗性部分连接的抗体。本发明所述的治疗性部分可以是细菌毒素、细胞毒性药物或放射性毒素，其实例包括但不限于，泰素（taxol）、细胞松弛

素 B (cytochalasin B)、丝裂霉素 (mitomycin)、依托泊苷 (etoposide)、长春新碱 (vincristine) 或其它抗代谢物、烷化剂、抗生素或抗有丝分裂药物。

另一种类型的衍生化抗体是标记的抗体。例如，可以将本发明的抗体或其抗原结合片段连接至可检测的标记。本发明所述的可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。这类标记是本领域熟知的，其实例包括但不限于，酶（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如， ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P ）、荧光染料（例如，异硫氰酸荧光素 (FITC)、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明 (TRITC)、藻红蛋白 (PE)、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物（例如 Cy7、Alexa 750））、吡啶酯类化合物、磁珠（例如，Dynabeads®）、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等）珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）的生物素。教导该标记物的使用的专利包括，但不限于，美国专利 3,817,837；3,850,752；3,939,350；3,996,345；4,277,437；4,275,149；及 4,366,241（全部通过引用并入本文）。如上所述的可检测的标记可通过本领域已知的方法检测。例如，放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计数器检测，荧光标记物可使用光检测器检测，以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测，及测热标记物通过简单可视化着色标记物来检测。在某些实施方案中，此类标记能够适用于免疫学检测（例如，酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等）。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头 (linker) 将如上所述的可检测的标记连接至本发明的抗体或其抗原结合片段，以降低潜在的位阻。

此外，本发明的抗体或其抗原结合片段还可以用化学基团进行衍生，例如聚乙二醇 (PEG)，甲基或乙基，或者糖基。这些基团可用于改善抗体的生物学特性，例如增加血清半衰期。

单克隆抗体制备

本发明的单克隆抗体 (mAb) 可以通过多种技术进行制备，包括常规单克隆抗体方法学，例如 Kohler 和 Milstein, *Nature*, 1975; 256:495 中所述的标准体细胞杂交技术。虽然优选体细胞杂交规程，但是原则上也可以使用制备单克隆抗体的其它方法，例如 B 淋巴细胞的病毒或致癌转化。

用于制备杂交瘤的优选动物系统为鼠科动物系统。在小鼠中制备杂交瘤是非常完善的规

程。分离用于融合的经免疫的脾细胞的免疫方案和技术是本领域已知的。融合配偶体（例如鼠骨髓瘤细胞）和融合规程也是已知的。

为表达抗体或其抗体片段，可以通过标准分子生物学技术（例如 PCR 扩增或使用表达目标抗体的杂交瘤的 cDNA 克隆）获得编码部分或全长轻链和重链的 DNA，并且可以将 DNA 插入到表达载体中，从而使得目的基因与转录和翻译调控序列可操作的连接，转染宿主细胞进行表达，表达宿主优选真核表达载体，更优选哺乳动物细胞，例如 CHO 及其衍生细胞系。

抗体可通过公知的技术，例如使用蛋白 A 或蛋白 G 的亲层析纯化。随后或备选地，可将特异性抗原或其表位固定在柱上以通过免疫亲和层析而纯化免疫特异性抗体。免疫球蛋白的纯化例如由 D. Wilkinson 论述(The Scientist, 由 The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (2000 年 4 月 17 日), 25-28 页公布)。

本发明的嵌合或人源化抗体可以根据上述制备的鼠单克隆抗体的序列进行制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的 DNA 可以从目标鼠杂交瘤中获得，并且使用标准分子生物学技术进行工程改造以包含非鼠（例如人）免疫球蛋白序列。例如，为创造嵌合抗体，可使用本领域已知的方法将鼠可变区连接至人恒定区（参见例如 Cabilly 等人的美国专利 No.4,816,567）。通过将编码 VH 的 DNA 可操作的连接至编码重链恒定区（CH1、CH2 和 CH3）的另一 DNA 分子可以将编码 VH 区的分离的 DNA 转变为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的（参见例如 Kabat, E.A.等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242），包含这些区的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区，但是最优选为 IgG1 或 IgG4 恒定区。

为创造人源化抗体，可以使用本领域已知的方法将鼠 CDR 区插入人源框架序列（参见 Winter 的美国专利 No.5,225,539 及 Queen 等人的美国专利 Nos.5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370）。还可以利用转基因动物，例如，HuMAb 小鼠(Medarex,Inc.)含有编码未重排的人重链（ μ 和 γ ）和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座(miniloci)，加之使内源 μ 和 κ 链基因座失活的靶向突变（参见例如 Lonberg 等人(1994) Nature 368(6474):856-859）；或携带人重链转基因和人轻链转染色体的“KM 小鼠TM”（参见专利 WO02/43478）进行抗体人源化改造。其他抗体人源化改造的方法包括噬菌体展示技术。

通过下列实施例进一步说明本发明，所述实施例不应解释为进一步限制。在此将整篇申请中引用的所有附图和所有参考文献、专利和已公开专利申请的内容明确收入本文作为参考。

附图说明

图 1、鼠源抗体与人 Tim-3 抗原的结合能力测定。

图 2、五个抗人 TIM-3 人源化抗体 AB12S3、AB12S4、AB12S5、AB12S6 和 AB12S7 与鼠源抗体 Mab22 重链可变区氨基酸序列的并列比较。

图 3、五个抗人 TIM-3 人源化抗体 AB12S3、AB12S4、AB12S5、AB12S6 和 AB12S7 与鼠源抗体 Mab22 轻链可变区氨基酸序列的并列比较。

图 4、人源化抗体与人 TIM-3 抗原的结合能力测定。

图 5、人源化抗体 Tm 值测定。

图 6、ELISA 检测抗体 AB12S3 与不同种属来源的 TIM-3 抗原的亲和力。

图 7、ELISA 检测抗体 AB12S3 与 TIM-3 抗原特异性结合的检测。

图 8、HTRF 检测 AB12S1、AB12S3 阻断 TIM-3/Galectin-9 结合能力的检测。

图 9、竞争 ELISA 检测 AB12S1、AB12S3 阻断 TIM-3/PS 结合能力的检测。

图 10、AB12S1、AB12S3、AB12S4 对 CD8⁺ T 细胞表面 CD69 的表达的影响。

图 11、抗 TIM-3 人源化抗体 AB12S3 体外增强 T 细胞杀伤肿瘤细胞的能力。

图 12、AB12S3 抗体与对照抗体 AB12S1 在转基因小鼠的体内药效检测。

图 13、抗人 TIM-3 人源化抗体 AB12S3、阳性对照抗体 AB12S1 对 SEB 刺激供体 A 来源的 PBMC 分泌 IFN- γ 的促进作用。

图 14、抗人 TIM-3 人源化抗体 AB12S3、阳性对照抗体 AB12S1 对 SEB 刺激供体 B 来源的 PBMC 分泌 IFN- γ 的促进作用。

图 15、抗人 TIM-3 人源化抗体 AB12S3、及其与 OPDIVO® 联用对供体 A 来源的 MLR 中 IFN- γ 分泌的刺激作用。

图 16、抗人 TIM-3 人源化抗体 AB12S3、及其与 OPDIVO® 联用对供体 B 来源的 MLR 中 IFN- γ 分泌的刺激作用。

具体实施方式

实施例 1：抗人 TIM-3 鼠源单克隆抗体的制备

将人 TIM-3 抗原（（安源医药（上海）有限公司以常规方法表达的 TIM-3 胞外域带 His 标签，蛋白序列：Uniport entry 号 Q8TDQ））50 μ g 以完全弗氏佐剂充分乳化后，采用多点免疫方式免疫雄性 Balb/C 小鼠，免疫周期为三周一次。在第 3 次免疫后第 10 天，通过尾静

脉取血, ELISA 测试血浆抗人 TIM-3 抗体滴度以监测小鼠免疫应答程度, 然后在融合前 3 天, 对产生抗人 TIM-3 抗体滴度最高的小鼠加强免疫一次。3 天后, 处死小鼠并取出该小鼠脾脏与小鼠骨髓瘤 Sp2/0 细胞株融合。混合 2×10^8 个 Sp2/0 细胞与 2×10^8 个脾细胞在 50% 聚乙二醇 (分子量为 1450) 和 5% 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液中融合。用 Iscove 培养基 (含有 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 0.1 mM 次黄嘌呤, 0.4 μ M 氨基蝶呤和 16 μ g 胸苷) 来调整脾脏细胞数至 5×10^5 /mL, 以 0.3 mL 加入 96 孔培养板孔内, 并置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱内。培养 10 天后, 采用高通量 ELISA 法分别检测上清中抗体与 TIM3-His 高亲和结合的克隆。再将上述单克隆抗体的孔内融合细胞进行亚克隆。在通过 HTRF 的方法, 以此筛选出与人 Galectin-9 竞争结合 TIM-3 的阳性孔 (方法参见实施例 5.6 抗 TIM-3 人源化抗体阻断 TIM-3/Galectin-9 结合测试), 获得杂交瘤细胞株#22。

在补充 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中培养产生特异性抗体的克隆。当细胞密度达到大约 5×10^5 个细胞/mL 时, 用无血清培养基替换该培养基。2 至 4 天后, 将培养过的培养基离心, 以收集培养物上清液。将蛋白 G 柱用于纯化抗体。用 150mM NaCl 透析单克隆抗体洗脱液。通过 0.2 μ m 滤器将透析的溶液过滤除菌, 以获得待测试的纯化的鼠单克隆抗体 Mab22。

实施例 2、ELISA 法测定鼠源抗体与人 TIM-3 抗原的结合能力

以人 TIM-3 ((安源医药 (上海) 有限公司表达的 TIM-3 胞外域带 His 标签, 蛋白序列: Uniport entry 号 Q8TDQ)) 包被酶标板, 室温过夜。弃去包被溶液, 用溶解在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 的脱脂奶封闭各孔 0.5 小时, 用含有 0.05% 吐温-20 (Tween-20) 的 PBS 洗孔。然后加入每孔 50 μ L 纯化的抗人 TIM-3 鼠源抗体 Mab22, 室温孵育 1 小时, 用含有 0.05% 吐温 (Tween)20 的 PBS 洗孔, 然后每孔加入 50 μ L HRP 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体 (购自 Jackson Laboratory) 作为检测抗体。

结果如图 1 所示, 鼠源抗体 Mab22 与人 TIM-3 具有较高的亲和力, EC₅₀ 为 6.30ng/mL。

实施例 3、抗 TIM-3 鼠源单抗的亚型鉴定及可变区扩增

抗体亚型鉴定: 取杂交瘤细胞培养上清液, 采用 IsoStripTM 小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒 (Santa Cruz Biotechnology, 货号 sc-24958) 鉴定抗体亚型。鼠单抗 Mab22 亚型经鉴定为 IgG1 (Kappa) 型。

抗体可变区扩增: 将候选杂交瘤细胞 #22 培养至总数量 107 个细胞, 1000 rpm 离心 10 分钟收集细胞, 并以 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 提取总 RNA, 用反转录试剂盒 SMARTer RACE 合成第一链 cDNA, 以第一链 cDNA 为后续模板扩增杂交瘤细胞所对应的抗体可变区 DNA 序列。根据亚型鉴定结果, 获取该抗体亚型的重链和轻链恒定区序列, 设计特异性的巢式 PCR

引物，该扩增反应中所使用的引物序列与抗体可变区第一框架区和恒定区互补。采用常规 PCR 方法扩增目的基因，将扩增产物测序后，得到杂交瘤克隆#22 分泌抗体 Mab22 的重链可变区序列 SEQ ID NO: 1 和轻链可变区序列 SEQ ID NO: 2。杂交瘤细胞株 #22 已于 2017 年 10 月 25 日保藏于中国典型培养物保藏中心（保藏号 CCTCC NO: C2017181）。

实施例 4、抗 TIM-3 鼠单克隆抗体的人源化

根据上述获得的 Mab22 鼠源抗体可变区序列，利用计算机辅助抗体三维建模以及结构分析进行抗体人源化改造。CDR 移植（CDR-Grafting）是一种常见的抗体人源化方法，是通过将人源抗体的 FR 替换鼠源抗体的 FR 来达到保持活性、降低免疫原性的目的。结合 Discovery Studio 分析工具进行 CDR 移植抗体人源化改造的方法主要包括以下步骤：(1) 抗体三维结构建模；(2) 关键残基分析。利用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列，考察其空间立体结合方式以确定对于保持 CDR 区构象至关重要的关键残基，主要有三类：1、位于 VL 和 VH 结合界面上的残基，对于两个结构域的折叠起到关键作用；2、靠近 CDR 区并且包埋于蛋白内部的残基；3、与 CDR 区有直接相互作用的残基，相互作用包括：疏水相互作用/氢键/盐桥；(3) 人源模板选择。须同时满足下面两个条件：首先，把各杂交瘤细胞分泌的抗体氨基酸序列与人胚胎系抗体氨基酸序列进行比对，找出同源性高的序列；其次，选择其中与 MHC II (HLA-DR)亲和力低的人胚胎系（germline）抗体框架序列，以降低其免疫原性；(4) 基于关键残基分析的反向嫁接，获得人源化抗体序列。

共获得 5 个人源化抗体，分别是 AB12S3、AB12S4、AB12S5、AB12S6 和 AB12S7。5 个人源化抗体及其亲本鼠源抗体的可变区氨基酸序列如表 1 所示。

表 1、鼠源抗体 Mab22 及其衍生的人源化抗体可变区氨基酸序列

Mab22		
SEQ ID NO: 1	VH	EVQLQLSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMH WMRQKPGQGLEWIGYIDPDNDGIKYNEKIKGKATL TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARDFGYVDW FPYWGQGTLLVTVSA
SEQ ID NO: 2	VL	DIVMTQSHKFMSTSVGNRVSITCKASQDVTTAVAW YQQKSGQSPKLLIYSASNRYIGVPDRFTGSGSGTD FTFTISSVQTEDLAVYYCQQHYSIPPTFGGGTNLE IK
AB12S3		

SEQ ID NO: 3	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYVMH WVRQAPGQRLEWIGYIDPDNDGIKYNEKIKGKATL TSDKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDFGYVDW FPYWGQGTFTVTVSS
SEQ ID NO: 4	VL	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASNRYIGVPDRFTGSGSGTD FTFTISSLQPEDIAATYYCQQHYSIPPTFGGGTKVE IK
AB12S4		
SEQ ID NO: 5	VH	EVQLVLSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMH WVRQKPGQRLEWIGYIDPDNDGIKYNEKIKGKATL TSDKSSSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARDFGYVDW FPYWGQGTFTVTVSS
SEQ ID NO: 6	VL	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVTITCKASQDVTTAVAW YQQKPGKSPKLLIYSASNRYIGVPDRFTGSGSGTD FTFTISSVQPEDIAVYYCQQHYSIPPTFGGGTNLE IK
AB12S5		
SEQ ID NO: 7	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYVMH WVRQAPGQRLEWIMGWIDPDNDGIKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDFGYVDW FPYWGQGTFTVTVSS
SEQ ID NO: 8	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDVTTALNW YQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFTGSGSGTD FTFTISSLQPEDIAATYYCQQHYSIPPTFGGGTKVE IK
AB12S6		
SEQ ID NO: 9	VH	QVQLQLSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYVMH WVRQAPGQRLEWIMGWIDPDNDGIKYSQKFQGRVTL TSDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDFGYVDW

		FPYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 10	VL	DIQMTQSPSSMSASVGDRVITTCQASQDVTTALNW YQQKPGKSPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGSGTD FTFTISLQPEDATYYCQQHYSIPPTFGGGTNLE IK
AB12S7		
SEQ ID NO: 11	VH	EVQLQLSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYVMH WMRQKPGQRLEWMGWIDPDNDGIKYSQKFQGRVTI TRDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDVDFGYVDW FPYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 12	VL	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDVTTALNW YQQKSGQSPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGSGTD FTFTISLQPEDATYYCQQHYSIPPTFGGGTNLE IK

图 2 显示 5 个人源化抗体和鼠源抗体 Mab22 的重链可变区氨基酸序列的并列比较。图 3 显示 5 个人源化的抗体和鼠源抗体 Mab22 的轻链可变区氨基酸序列的并列比较。可变区中，互补决定区(CDRs)与构架区(FRs)有如标示，重链和轻链可变区 CDR 采用 IMGT 法定义。

本发明制备的鼠源单抗 Mab22 及其衍生的 5 个人源化抗体 AB12S3、AB12S4、AB12S5、AB12S6、和 AB12S7 的可变区所包含的 CDR 区的氨基酸序列如表 2 所示，分别采用 Kabat、Chothia 和 IMGT 方法来定义。

表 2、关于示例性的抗 TIM-3 抗体 Mab22 及其衍生的人源化抗体的 CDR 区序列

抗体编号	CDR	Kabat	Chothia	IMGT
Mab22	CDR-H1	NYVMH (SEQ ID NO: 13)	GYTFTNY (SEQ ID NO: 16)	GYTFTNYV (SEQ ID NO: 18)
	CDR-H2	YIDPDNDGIKYNEKIKG (SEQ ID NO: 14)	DPDNDG (SEQ ID NO: 17)	IDPDNDGI (SEQ ID NO: 19)
	CDR-H3	DFGYVDWFPY	DFGYVDWFPY	ARDFGYVDWFPY

		(SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 20)
	CDR-L1	KASQDVTTAVA (SEQ ID NO: 21)	SQDVTTA (SEQ ID NO: 24)	QDVTTA (SEQ ID NO: 27)
	CDR-L2	SASNRYI (SEQ ID NO: 22)	SAS (SEQ ID NO: 25)	SAS (SEQ ID NO: 25)
	CDR-L3	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)	HYSIPP (SEQ ID NO: 26)	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)
AB12S3	CDR-H1	NYVMH (SEQ ID NO: 13)	GYTFTNY (SEQ ID NO: 16)	GYTFTNYV (SEQ ID NO: 18)
	CDR-H2	YIDPDNDGIKYNEKIKG (SEQ ID NO: 14)	DPDNDG (SEQ ID NO: 17)	IDPDNDGI (SEQ ID NO: 19)
	CDR-H3	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	ARDFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 20)
	CDR-L1	KASQDVTTAVA (SEQ ID NO: 21)	SQDVTTA (SEQ ID NO: 24)	QDVTTA (SEQ ID NO: 27)
	CDR-L2	SASNRYI (SEQ ID NO: 22)	SAS (SEQ ID NO: 25)	SAS (SEQ ID NO: 25)
	CDR-L3	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)	HYSIPP (SEQ ID NO: 26)	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)
AB12S4	CDR-H1	NYVMH (SEQ ID NO: 13)	GYTFTNY (SEQ ID NO: 16)	GYTFTNYV (SEQ ID NO: 18)
	CDR-H2	YIDPDNDGIKYNEKIKG (SEQ ID NO: 14)	DPDNDG (SEQ ID NO: 17)	IDPDNDGI (SEQ ID NO: 19)
	CDR-H3	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	ARDFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 20)

	CDR-L1	KASQDVTTAVA (SEQ ID NO: 21)	SQDVTTA (SEQ ID NO: 24)	QDVTTA (SEQ ID NO: 27)
	CDR-L2	SASNRYI (SEQ ID NO: 22)	SAS (SEQ ID NO: 25)	SAS (SEQ ID NO: 25)
	CDR-L3	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)	HYSIPP (SEQ ID NO: 26)	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)
AB12S5	CDR-H1	NYVMH (SEQ ID NO: 13)	GYTFTNY (SEQ ID NO: 16)	GYTFTNYV (SEQ ID NO: 18)
	CDR-H2	WIDPDNDGIKYSQKFQG (SEQ ID NO: 28)	DPDNDG (SEQ ID NO: 17)	IDPDNDGI (SEQ ID NO: 19)
	CDR-H3	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	ARDFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 20)
	CDR-L1	QASQDVTTALN (SEQ ID NO: 29)	SQDVTTA (SEQ ID NO: 24)	QDVTTA (SEQ ID NO: 27)
	CDR-L2	SASNLET (SEQ ID NO: 30)	SAS (SEQ ID NO: 25)	SAS (SEQ ID NO: 25)
	CDR-L3	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)	HYSIPP (SEQ ID NO: 26)	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)
AB12S6	CDR-H1	NYVMH (SEQ ID NO: 13)	GYTFTNY (SEQ ID NO: 16)	GYTFTNYV (SEQ ID NO: 18)
	CDR-H2	WIDPDNDGIKYSQKFQG (SEQ ID NO: 28)	DPDNDG (SEQ ID NO: 17)	IDPDNDGI (SEQ ID NO: 19)
	CDR-H3	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	ARDFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 20)
	CDR-L1	QASQDVTTALN	SQDVTTA	QDVTTA

		(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 24)	(SEQ ID NO: 27)
	CDR-L2	SASNLET (SEQ ID NO: 30)	SAS (SEQ ID NO: 25)	SAS (SEQ ID NO: 25)
	CDR-L3	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)	HYSIPP (SEQ ID NO: 26)	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)
AB12S7	CDR-H1	NYVMH (SEQ ID NO: 13)	GYTFTNY (SEQ ID NO: 16)	GYTFTNYV (SEQ ID NO: 18)
	CDR-H2	WIDPDNDGIKYSQKFQG (SEQ ID NO: 28)	DPDNDG (SEQ ID NO: 17)	IDPDNDGI (SEQ ID NO: 19)
	CDR-H3	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	DFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 15)	ARDFGYVDWFPY (SEQ ID NO: 20)
	CDR-L1	QASQDVTTALN (SEQ ID NO: 29)	SQDVTTA (SEQ ID NO: 24)	QDVTTA (SEQ ID NO: 27)
	CDR-L2	SASNLET (SEQ ID NO: 30)	SAS (SEQ ID NO: 25)	SAS (SEQ ID NO: 25)
	CDR-L3	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)	HYSIPP (SEQ ID NO: 26)	QQHYSIPPT (SEQ ID NO: 23)

为了获得由两条重链和两条轻链组成的全长抗体序列，将表 1 中所示 VH 和 VL 序列的与抗体重链恒定区（优选自人 IgG1 或 IgG4）和轻链恒定区（优选自人 κ 轻链）序列采用常规技术进行拼接或组装。例如，在一种实施方案中，抗 TIM-3 抗体分子包含表 3 中所示的野生型人 IgG4 的重链恒定区和人 κ 轻链恒定区。或采用修饰的人 IgG4 恒定区序列，例如，在一种实施方案中，如表 3 所示，抗 TIM-3 抗体分子包括在根据 EU 编号的第 228 位突变（例如 S 变为 P）的人 IgG4。在另一种实施方案中，抗 TIM-3 抗体分子包含野生型人 IgG1 的重链恒定区和人 κ 轻链恒定区。或采用修饰的人 IgG1 恒定区序列，例如，如表 3 所示，人 IgG1 在根据 EU 编号的第 297 位包含取代（例如 Asn 取代为 Ala）。在另一种实施方案中，如表 3 所示，人 IgG1 在根据 EU 编号的第 265 位包含取代、在根据 EU 编号的第 329 位包含取代或

包含这两种取代(例如在第 265 位 Asp 取代为 Ala 和/或在第 329 位 Pro 取代为 Ala)。在又一种实施方案中, 如表 3 所示, 人 IgG1 在根据 EU 编号的第 234 位包含取代、在根据 EU 编号的第 235 位包含取代或包含这两种取代(例如在第 234 位 Leu 取代为 Ala 和/或在第 235 位 Leu 取代为 Ala)。

表 3、人 IgG 重链和人 κ 轻链的恒定区氨基酸序列

人 κ 恒定区氨基酸序列				
SEQ ID NO: 31	RTVAAPSVFI	FPPSDEQLKS	GTASVVCLLN	NFYPREAKVQ
	WKVDNALQSG	NSQESVTEQD	SKDSTYSLSS	TLTLSKADYE
	KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK	SFNRGEC	
IgG1 野生型氨基酸序列				
SEQ ID NO: 32	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS
	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
	YICNVNHKPS	NTKVDRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW
	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK
	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSREE
	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV
	LDSGDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT
	QKSLSLSPGK			
IgG1 (N297A) 突变体恒定区氨基酸序列 (EU 编号)				
SEQ ID NO: 33	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS
	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
	YICNVNHKPS	NTKVDRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW
	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYA	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK
	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSREE
	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV
	LDSGDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT
	QKSLSLSPGK			

IgG1 (D265A, P329A) 突变体恒定区氨基酸序列 (EU 编号)				
SEQ ID NO: 34	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS
	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
	YICNVNHKPS	NTKVDRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVAVS	HEDPEVKFNW
	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	STYRVSVLT	VLHQDWLNGK
	EYKCKVSNKA	LAAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSREE
	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV
	LDSGDGFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT
	QKSLSLSPGK			
IgG1 (L234A, L235A) 突变体恒定区氨基酸序列 (EU 编号)				
SEQ ID NO: 35	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS
	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
	YICNVNHKPS	NTKVDRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPEAAGG
	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW
	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	STYRVSVLT	VLHQDWLNGK
	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSREE
	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV
	LDSGDGFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT
	QKSLSLSPGK			
IgG4 野生型氨基酸序列				
SEQ ID NO: 36	ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS
	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT
	YTCNVDPKPS	NTKVDRVES	KYGPPCPSCP	APEFLGGPSV
	FLFPPPKPDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD
	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK
	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS
	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS

	LSLSLGK
IgG4 (S228P) 突变体恒定区氨基酸序列 (EU 编号)	
SEQ ID NO: 37	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

如表 4 所示，人源化抗体 AB12S3 和 AB12S4 包括在根据 EU 编号的第 228 位突变 (S 变为 P) 的人 IgG4 和人 κ 轻链恒定区。因抗 Tim-3 阻断抗体发挥功能不需要 ADCC 和 CDC 效应，因而 AB12S3 和 AB12S4 的恒定区优先选择人 IgG4，但 IgG4 容易形成半抗体（发生 Fab-arm 的交换），因此进行 S228P 改造可以降低 Fab-arm 的交换。

表 4、人源化抗体 AB12S3 和 AB12S4 的重链和轻链氨基酸序列及对应的核苷酸序列

AB12S3		
SEQ ID NO: 38	HC	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYVMHWM RQAPGQRLEWIGYIDPDNDGIKYNEKIKGKATLTSDK SSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDFGYVDWFPYWGQ GTTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK

<p>SEQ ID NO: 39</p>	<p>HC DNA</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGA AGCCAGGAGCTTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCTC TGGCTATACATTACCAACTACGTGATGCACTGGATG AGACAGGCTCCAGGACAGCGCCTGGAGTGGATCGGCT ATATCGACCCTGATAACGACGGCATCAAGTACAATGA GAAGATCAAGGGCAAGGCCACACTGACCTCCGATAAG TCCAGCTCTACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGA GAAGCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCTCGCGA TTTTGGCTATGTGGACTGGTTCCCCTACTGGGGCCAG GGCACCACAGTGACCGTGTCTTCCGCCTCTACCAAGG GCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCATGTTCCCAGCAG CACCTCTGAGTCCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTG AAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGA ACAGCGGCGCTCTGACCTCCGGAGTGCACACATTTCC CGCCGTGCTGCAGTCTTCCGGCCTGTACAGCCTGAGC TCTGTGGTGACCGTGCCATCCAGCTCTCTGGGCACCA AGACATATACCTGTAACGTGGATCATAAGCCCTCCAA TACAAAGGTGGACAAGCGCGTGGAGAGCAAGTACGGA CCACCATGTCCTCCATGCCAGCTCCCGAGTTTCTGG GCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAA GGATACCCTGATGATCAGCAGGACCCCTGAGGTGACA TGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCAGAGG TGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA CAATGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTTAAAT TCCACCTACAGAGTGGTGGAGCGTGTGACAGTGTGC ATCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGTAA GGTGTCCAATAAGGGCCTGCCATCCAGCATCGAGAAG ACCATCAGCAAGGCTAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCTC AGGTGTACACACTGCCACCCTCTCAGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTGAAGGGC TTCTATCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCC AGTGCTGGATTCTGACGGCTCCTTCTTTCTGTATTCC CGGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGCA ACGTGTTTAGCTGTTCTGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAATCATTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTG GGCAAG</p>
<p>SEQ ID NO: 40</p>	<p>LC</p>	<p>DIVMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASNRYIGVDPDRFTGSGSGTDFTF</p>

		ISSLQPEDIATYYCQQHYSIPPTFGGGTKVEIKRTVA APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 41	LC DNA	GACATCGTGATGACACAGAGCCCTAGCTCTCTGAGCG CCTCTGTGGGCGATAGAGTGACAATCACCTGTAAGGC TTCTCAGGACGTGACCACAGCCGTGGCTTGGTACCAG CAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATT CCGCTAGCAATAGATACATCGGCGTGCCTGATCGCTT TACCGGCTCTGGCTCCGGCACAGACTTACATTCACC ATCTCCAGCCTGCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACT ATTGCCAGCAGCATTATAGCATCCCCCTACCTTCGG CGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCT GCCCCCTCCGTGTTCATCTTTCCCCCTCCGATGAGC AGCTGAAGTCCGGCACAGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCTAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAATTCTCAGG AGTCCGTGACCGAGCAGGATAGCAAGGACTCTACATA TTCCCTGTCCAGCACACTGACCCTGAGCAAGGCTGAT TACGAGAAGCACAAGGTGTATGCCTGTGAGGTGACCC ATCAGGGCCTGTCTTCCCCTGTGACAAAGTCTTTCAA CCGGGGCGAGTGC
AB12S4		
SEQ ID NO: 42	HC	EVQLVLSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHWM RQKPGQRLIEWIGYIDPDNDGIKYNEKIKGKATLTSK SSSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARDFGYVDWFPYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSL GK
SEQ ID NO: 43	HC DNA	GAGGTGCAGCTGGTGCTGTCCGGAGCTGAGGTGGTGA AGCCAGGAGCTTCCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCTC TGGCTATACATTACCAACTACGTGATGACTGGATG

		<p>AGACAGAAGCCAGGACAGCGCCTGGAGTGGATCGGCT ATATCGACCCTGATAACGACGGCATCAAGTACAATGA GAAGATCAAGGGCAAGGCCACACTGACCTCCGATAAG TCCAGCTCTACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGA GAAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTATTGCGCTCGCGA TTTTGGCTATGTGGACTGGTTCCCCTACTGGGGCCAG GGCACCACAGTGACCGTGTCTTCCGCCTCTACCAAGG GCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCATGTTCCCGCAG CACCTCTGAGTCCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTG AAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGA ACAGCGGCGCTCTGACCTCCGGAGTGCACACATTTCC CGCCGTGCTGCAGTCTTCCGGCCTGTACAGCCTGAGC TCTGTGGTGACCGTGCCATCCAGCTCTCTGGGCACCA AGACATATACCTGTAACGTGGATCATAAGCCCTCCAA TACAAAGGTGGACAAGCGCGTGGAGAGCAAGTACGGA CCACCATGTCCTCCATGCCCAGCTCCCGAGTTTCTGG GCGGCCCTAGCGTGTTCTGTTCCTCCCTAAGCCAAA GGATACCCTGATGATCAGCAGGACCCCTGAGGTGACA TGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCAGAGG TGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA CAATGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTTAAT TCCACCTACAGAGTGGTGGAGCGTGCTGACAGTGCTGC ATCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGTAA GGTGTCCAATAAGGGCCTGCCATCCAGCATCGAGAAG ACCATCAGCAAGGCTAAGGGCCAGCCAGGGAGCCTC AGGTGTACACACTGCCACCCTCTCAGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTGAAGGGC TTCTATCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCC AGTGCTGGATTCTGACGGCTCCTTCTTTCTGTATTCC CGGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGCA ACGTGTTTAGCTGTTCTGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAATCATTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTG GGCAAG</p>
<p>SEQ ID NO: 44</p>	<p>LC</p>	<p>DIVMTQSPSSMSTSVGDRVTITCKASQDVTTAVAWYQ QKPGKSPKLLIYSASNRYIGVPDRFTGSGSGTDFTF ISSVQPEDIAVYYCQQHYSIPPTFGGGTNLEIKRTVA APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD</p>

SEQ ID NO: 45	LC DNA	YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GACATCGTGATGACACAGAGCCCTAGCTCTATGAGCA CCTCTGTGGGCGATAGAGTGACAATCACCTGTAAGGC TTCTCAGGACGTGACCACAGCCGTGGCTTGGTACCAG CAGAAGCCCGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATT CCGCTAGCAATAGATACATCGGGCGTGCCTGATCGCTT TACCGGCTCTGGCTCCGGCACAGACTTTACATTACC ATCTCCAGCGTGCAGCCAGAGGACATCGCCGTGTACT ATTGCCAGCAGCATTATAGCATCCCCCTACCTTCGG CGGCGGCACAAATCTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCT GCCCCCTCCGTGTTCATCTTTCCCCCTTCCGATGAGC AGCTGAAGTCCGGCACAGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCTAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAATTCTCAGG AGTCCGTGACCCGAGCAGGATAGCAAGGACTCTACATA TTCCCTGTCCAGCACACTGACCCTGAGCAAGGCTGAT TACGAGAAGCACAAGGTGTATGCCTGTGAGGTGACCC ATCAGGGCCTGTCTTCCCCTGTGACAAAGTCTTTCAA CCGGGGCGAGTGC
---------------	--------	---

实施例 5、抗 TIM-3 人源化抗体的定性

5.1 抗 TIM-3 人源化抗体与人 TIM-3 的结合能力的测定

采用常规 ELISA 方法测定人源化抗体 AB12S3 和 AB12S4 结合人 TIM-3((安源医药(上海)有限公司表达的 TIM-3 胞外域带 His 标签, 蛋白序列: Uniport entry 号 Q8TDQ)) 抗原的能力, 具体方法同实施例 2。结果见图 4, 人源化抗体 AB12S3 和 AB12S4 同对照抗体 AB12S1 (AB12S1 可变区序列来自于美国专利 9,605,070 中的抗 TIM-3 抗体 ABTIM3, 在本发明中其重链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 46, 轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 47) 一样, 都能特异地结合人 TIM-3 抗原; 而另一种作为阴性对照的人源化的 IgG 不相关抗体不能与人 TIM-3 结合。

5.2 抗 TIM-3 人源化抗体亲和力分析试验

采用生物薄膜干涉技术 (BLI) 对纯化的人源化抗体 AB12S3、AB12S4、AB12S5、AB12S6 和 AB12S7 与抗原的结合亲和力常数进行测定 (ForteBio Octet RED&QK 系统, PALL 公司)。抗人 IgG Fc 的多克隆抗体通过氨基偶联法固定在 CM5 芯片表面, 人源化抗体流过与多克隆抗体作用被捕获到芯片表面, 用抗原蛋白作为流动相, 流过抗体表面与之相互作用。处理得到的数据, 并用 Biacore T200 的分析软件 1: 1 结合的模型拟合实验数据, 拟合数据与实验数据基本重叠, 得到结合和解离速率常数 ka 和 kd , 用 kd 除 ka 得到平衡解离常数 K_D (见表

5)。结果显示, 获得的人源化抗体亲和力没有明显损失, 候选抗体 AB12S3、AB12S4、AB12S5、AB12S6 和 AB12S7 与人 TIM-3 的结合亲和力与鼠抗 Mab22 的亲和力也相当, KD 值均达到 pM 级, 较好地保留了亲本鼠单克隆抗体的亲和力, 大大降低了其免疫原性。

表 5、抗体的亲和力测定结果

Ab	KD (M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)
AB12S3	2.711E-12	2.51E+05	6.806E-07
AB12S4	<1.0E-12	2.54E+05	<1.0E-07
AB12S5	4.821E-12	1.31E+05	6.315E-07
AB12S6	4.382E-12	1.98E+05	8.676E-07
AB12S7	3.437E-12	2.23E+05	7.664E-07
Mab22	<1.0E-12	3.45E+05	<1.0E-07

5.3 抗 TIM-3 人源化抗体 Tm 值测定

采用 DSF (差示荧光扫描技术) 方法测定抗 TIM-3 抗体的 Tm 值。具体实验步骤如下, 将 AB12S1、AB12S3 以及 AB12S4 用 PBS 稀释到 1mg/mL, 取 12.5 μ L 加入 40 \times SYPRO Orange dye(Life technologies 公司, 货号 4306737)5 μ L 以及 7.5 μ L ddH₂O。然后将上述样品加入 Q-PCR 系统 (AB Applied Biosystems ABI, 7500) 中反应, Q-PCR 参数设置: Target (ROX), 程序 (25 $^{\circ}$ C, 3min; 1%速率, 95 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C, 2min)。

结果见图 5, 候选抗体 AB12S3 的 Tm 值(67.89 $^{\circ}$ C)和候选抗体 AB12S4 的 Tm 值(66.61 $^{\circ}$ C) 比对照抗体 AB12S1 (58.54 $^{\circ}$ C) 高至少 8 $^{\circ}$ C, 可以明确本发明制备的人源化抗体 AB12S3 和 AB12S4 具有更优的热稳定性。

5.4 抗 TIM-3 人源化抗体种属交叉反应测定

采用常规 ELISA 方法测定抗 TIM-3 人源化抗体 AB12S3 与不同种属的 TIM-3 抗原的交叉反应性。

具体实验步骤: 以 (安源医药 (上海) 有限公司表达的 TIM-3 胞外域带 His 标签, 蛋白序列: Uniport entry 号 Q8TDQ)、猴 TIM-3 (北京义翘神州生物技术有限公司, 货号 90312-C02H)、鼠 TIM-3 蛋白 (北京义翘神州生物技术有限公司, 货号 51152-M08H) 1 μ g/mL 100 μ L 包被酶标板, 室温过夜。弃去包被溶液, 用溶解在磷酸盐缓冲盐水(PBS) 的脱脂奶封闭各孔 0.5 小时, 用含有 0.05% 吐温-20 (Tween-20) 的 PBS 洗孔。然后分别加入每孔 50 μ L 纯化的 HRP 标记的 AB12S3 抗体, 室温孵育 1 小时, 用含有 0.05% 吐温 20 (Tween-20) 的

PBS 清洗 5 次，加入 100 μ L TMB 对应的孔中，室温显色 5 分钟；加入 50 μ L 2N H₂SO₄ 终止，酶标仪 450nm 读数。结果导入 Graph Prism，计算 EC₅₀ 值。

如图 6 所示，结果表明 AB12S3 能结合人 TIM-3 和猴 TIM-3 抗原，而不结合鼠 TIM-3 抗原。

5.5 抗 TIM-3 人源化抗体特异性测定

人的 TIM-3 同源家族还有 TIM-1 和 TIM-4 蛋白，通过 ELISA 方法验证抗 TIM-3 人源化抗体 AB12S3 是否特异性结合人 TIM-3 蛋白。

具体实验步骤：用 pH9.6 的碳酸缓冲液稀释人 TIM-1（北京义翘神州生物技术有限公司，货号 11051-H08H1）、人 TIM-3（北京义翘神州生物技术有限公司，货号 10390-H08H）、人 TIM-4（北京义翘神州生物技术有限公司，12161-H08H）抗原至 1 μ g/mL，100 μ L/well 包被酶标板，4 $^{\circ}$ C 过夜；300 μ L PBST 清洗一次；加入 200 μ L 含有 2% BSA 的 PBS 溶液，37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时；用含 2% BSA 的 PBST 溶液稀释 AB12S3，10 μ g/mL 作为起始浓度，4 倍稀释，一共 11 个浓度梯度，每孔 100 μ L 加入对应的孔中，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时；300 μ L PBST 清洗 3 次；用含有 2% BSA 的 PBS 溶液 1:10000 稀释 HRP 标记的羊抗人 IgG (Jackson Immuno Research)，每孔 100 μ L 加入到对应的孔中，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时；300 μ L PBST 清洗 5 次；每孔 100 μ L TMB 显色液加入到对应的孔中，室温显色 5 分钟；随后加入 50 μ L 1M H₂SO₄ 溶液终止显色，酶标仪 450nm 测定吸光度，结果导入 Graph Prism 计算 EC₅₀ 值。

如图 7 所示，结果表明 AB12S3 特异性结合人 TIM-3 蛋白，而不结合人 TIM-1 和人 TIM-4 蛋白。

5.6 抗 TIM-3 人源化抗体阻断 TIM-3/Galectin-9 结合检测

HTRF 方法，即均相时间分辨荧光技术的简称。该技术是利用了波长检测来分析分子的结合作用。当生物分子相互作用时，有两个激发光 620nm 和 665nm；当不存在相互作用时，只有 620nm 一个激发光。

采用 TIM-3/Gal9 结合测定试剂盒（Cibio，货号：63ADK000CTLPEF）测定抗 TIM-3 人源化抗体对 TIM-3/Galectin-9 结合的阻断作用，按照说明书所述方法操作。具体实验步骤：将 AB12S1 和 AB12S3 抗体用 PBS 分别稀释 10000ng/mL、1000ng/mL、100ng/mL、10ng/mL 和 1ng/mL。取 384 孔荧光板，每孔加入 4 μ L 5nM TIM3-Euk 溶液，再加入 2 μ L 稀释好的抗体，接着加入 40nM Tag-Gal9，每孔 4 μ L，室温孵育 5 分钟。最后加入 Anti-Tag-XL665，每孔 4 μ L，用封板膜封闭 384 孔板，室温孵育 1 小时。使用多功能酶标仪读取 665nm/620nm 荧光值，结果导入 Graph Prism 计算 IC₅₀ 值。

如图 8 所示, 结果表明 AB12S3 抗体 ($IC_{50}=202.4 \text{ ng/mL}$) 阻断 TIM-3/Galectin-9 结合的能力比 AB12S1 抗体 ($IC_{50}=258.7 \text{ ng/mL}$) 强。

5.7 抗 TIM-3 人源化抗体阻断 TIM-3/PtdSer 结合测试

采用竞争 ELISA 的方法, 检测 TIM-3 人源化抗体阻断 TIM-3/PtdSer 结合的检测。

具体实验步骤: 用 pH9.6 的碳酸缓冲液稀释 PtdSer (购自 Sigma 公司, 货号: P6641) 至 $1.3 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{L}$ /孔加入到酶标板, 4°C 过夜; $300 \mu\text{L}$ PBST 清洗一次, 加入 $100 \mu\text{L}$ 含 2% BSA 的 PBS 溶液, 37°C 封闭 2 小时; 用含 2% BSA 的 PBST 溶液分别稀释 AB12S1 和 AB12S3 (起始浓度为 $800 \mu\text{g/mL}$, 3 倍梯度稀释, 一共 7 个浓度梯度) 和 TIM-3 (终浓度 $6 \mu\text{g/mL}$), 1:1 混合后每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 2 小时; $300 \mu\text{L}$ PBST 清洗 3 次; 用含 2% BSA 的 PBST 溶液 1:4000 稀释 HRP 标价的 anti-6×His tag mAb (购买 Biolegend 公司, 货号: 652504), 每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 小时; $300 \mu\text{L}$ PBST 清洗 5 次; 加入 $100 \mu\text{L}$ TMB 溶液至对应的孔中, 室温显色 20 分钟; 加入 $50 \mu\text{L}$ 1M H_2SO_4 溶液终止显色, 酶标仪 450 nm 读取吸光度, 结果导入 Graph Prism 软件计算 IC_{50} 值。

如图 9 所示, 结果表明 AB12S3 ($IC_{50}=1.33 \mu\text{g/mL}$) 阻断 TIM-3/PtdSer 结合的能力强于 AB12S1 ($IC_{50}=3.20 \mu\text{g/mL}$)。

5.8 抗 TIM-3 人源化抗体增强 CD8⁺ T 细胞的激活

静止状态的 T 细胞在活化后, 细胞膜表面会表达 CD69, 通过 FACS 测定在抗 Tim-3 抗体存在情况下超抗原 SEB 刺激 CD8⁺ T 细胞后 CD69 的表达, 来评估抗 TIM-3 抗体对 T 淋巴细胞功能的增强作用。采用密度梯度离心法 (Lymphoprep™, 人淋巴细胞分离液, STEMCELL 公司) 从人外周血获得新鲜单个核细胞 (人 PBMC 细胞), 使用 T 细胞分选试剂 (STEMCELL 公司, #19053) 获得高纯度 CD8⁺ T 细胞。获得的 CD8⁺ T 细胞用含有 1 ng/mL 的葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 的培液重悬, 调整细胞密度为 $5.6 \times 10^5/\text{mL}$, 每孔 $180 \mu\text{L}$ (10^5 细胞/孔) 接种 96 孔细胞培养板。将抗体 AB12S3 和 AB12S4 按 10 倍梯度稀释后, 每个孔分别加入 $20 \mu\text{L}$, 另外以 AB12S1 作为阳性对照, 每个样品共 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 三个浓度。每种抗体每个浓度对应 3 个复孔。48 小时后, 收集细胞, 用 FACS 检测 CD8⁺ T 细胞表面 CD69 的表达, 方法如下: 细胞 300 g 离心 5 min 后弃上清, 用 2% BSA 的 PBS $200 \mu\text{L}$ /孔洗涤, 离心后 $100 \mu\text{L}$ /孔重悬, 加入 CD69 抗体 (BD 公司, #555531), $2.5 \mu\text{L}$ /孔, 4°C 孵育 1 小时后, 离心, $100 \mu\text{L}$ 含 2% BSA 的 PBS 重悬后, 上机, 检测 CD69 的表达。

结果如图 10 所示, 相对于 AB12S1 和 AB12S4, AB12S3 处理情况下 CD8⁺ T 细胞表面 CD69 的表达明显上调。

5.9 抗 TIM-3 人源化抗体在体外刺激 T 细胞杀伤肿瘤细胞的能力

分别将人非小细胞肺癌细胞株 HCC827 细胞（中国科学院细胞库）和人乳腺导管癌细胞株 HCC1954 细胞（中国科学院细胞库）接种于 96 孔细胞培养板，加入浓度 5 μ g/mL 的人源化 TIM-3 抗体 AB12S3，并以分离的健康志愿者血清 IgG 作为阴性对照，然后按照 4: 1 的效靶比加入抗 CD3 抗体（OKT3）以及白介素-2（义翘神州，11848-HNAY1）活化的 T 细胞，培养 24 小时，使用细胞增殖试剂 CCK-8（东仁化学）测定细胞的存活情况，以不添加 T 细胞的培养孔（即靶细胞组）存活率记作 100%，测定细胞的存活情况，并以下列公式计算杀伤率（%）：杀伤率% = (1-测试组 OD 值/靶细胞组 OD 值) \times 100%，使用 SPSS 统计 AB12S3 组和人 IgG 组三个复孔的差异，计算 *p* 值。

结果如图 11 所示，AB12S3 组和 HuIgG 组相比较，对靶细胞 HCC827 的杀伤率从 59.2% 上升到 75.8%，杀伤率上调 27.9%，*p* < 0.01；对靶细胞 HCC1954 的杀伤率从 42.4% 上升到 60.8%，杀伤率上调 43.3%，*p* < 0.01。实验表明抗 TIM-3 人源化抗体 AB12S3 可以显著增强 T 细胞杀伤肿瘤细胞的能力。

5.10 抗 TIM-3 人源化抗体在 hTIM3 转基因小鼠的体内药效检测

使用小鼠皮下荷瘤模型验证 AB12S3 抗体的药效，采用转基因小鼠模型进行评价。6-7 周龄的人 Tim-3 雄性转基因小鼠（百奥赛图），每只皮下注射 0.1 mL（5 \times 10⁵ 个）MC38 细胞，待肿瘤体积达到 100mm³ 左右，进行随机分组，每组 5 只，分 3 组：阴性对照组（生理盐水）、10mg/kg AB12S1 抗体组、10mg/kg AB12S3 抗体组。给药方式：腹腔给药，每三天一次，共六次，测量肿瘤体积。

结果如图 12 所示，与阴性对照组相比较，AB12S3 抗体有明显抑制肿瘤生长的功能；而对照抗体 AB12S1 无明显的抑瘤效果。

5.11 抗 TIM-3 人源化抗体促进 SEB 刺激 PBMC 分泌 IFN- γ 的作用

TIM-3 可表达在活化的 T 细胞中，如 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、Th1 细胞等，抗 TIM-3 抗体通过结合 TIM-3，抑制 TIM-3 活性，最终促进 IFN- γ 分泌。本实施例采用 SEB 刺激 PBMC（含有 T 淋巴细胞等），以 IFN- γ 分泌作为检测指标检测抗 TIM-3 抗体的活性。从人（供体 A 和供体 B）外周血获得新鲜单个核细胞（PBMC 细胞）后接种 PBMC 于 96 孔板中，加入 1 ng/ml SEB 溶液及不同浓度的 AB12S3 和对照抗体 AB12S1 于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱孵育 72 h。作用结束后，吸取上清，用 IFN- γ 检测试剂盒检测上清液中 IFN- γ 的含量。如图 13 和 14 所示，AB12S3 显著促进 SEB 刺激 PBMC 分泌 IFN- γ 的活性，并且强于对照

抗体 AB12S1。

5.12 抗 TIM-3 人源化抗体对混合淋巴细胞反应 (MLR) 中细胞因子分泌的影响

用 CD14 磁珠分选试剂盒从供体 A 和供体 B 的 PBMC 中分选出 CD14⁺单核细胞后, 用 GM-CSF 及 rhIL-4 诱导 7 天, 使其分化为成熟的树突状细胞 (DC); 用 CD4⁺ T 细胞磁珠分选试剂盒从 PBMC 中分选出 CD4⁺ T 细胞, 然后将 CD4⁺ T 细胞与成熟的 DC 细胞混合, 加入不同浓度 AB12S3, 设置单药或 OPDIVO®联用组 (OPDIVO®的浓度均为 0.02 μg/ml), 放入 37°C 培养箱中作用 5 天。作用结束后, 吸取上清, 用 IFN-γ 检测试剂盒检测上清液中 IFN-γ 的含量。检测 AB12S3、PD-1 抗体 OPDIVO®, AB12S3 与 PD-1 抗体 OPDIVO®联用对 MLR 中 IFN-γ 分泌的作用, 如图 15 和 16 所示, AB12S3 与 OPDIVO®联用对 MLR 中 IFN-γ 分泌有协同促进作用。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

0-1	PCT/RO/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	CEPCT 版本 10.20.32 MT/FOP 20140331/0.20.5.21
0-2	国际申请号	PCT/CN2019/083727
0-3	申请人或代理人的档案号	PCT190361PPC

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	第17页第25和26行; 第39页第30行; 第40页第1行
1-2	行号:	
1-3	保藏事项	中国典型培养物保藏中心 中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。 2017年 10月 25日 (25.10.2017) CGTCC C2017181
1-3-1	保藏单位名称	
1-3-2	保藏单位地址	
1-3-3	保藏日期	
1-3-4	保藏号	
1-4	补充说明	
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
1-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	授权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	

权利要求书

1. 能够特异性结合 TIM-3 的抗体或其抗原结合片段，其包含选自下组的互补决定区（CDR）：

(a) 下述 3 个重链可变区（VH）的 CDR：

(i) CDR-H1，其具有如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 中含有的 CDR-H1 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H1 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(ii) CDR-H2，其具有如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 中含有的 CDR-H2 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H2 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和

(iii) CDR-H3，其具有如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 中含有的 CDR-H3 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H3 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和/或，

下述 3 个轻链可变区（VL）的 CDR：

(iv) CDR-L1，其具有如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 中含有的 CDR-L1 的序列，或者与所述 VL 中含有的 CDR-L1 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(v) CDR-L2，其具有如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 中含有的 CDR-L2 的序列，或者与所述 VL 中含有的 CDR-L2 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和

(vi) CDR-L3，其具有如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 中含有的 CDR-L3 的序列，或者与所述 VL 中含有的 CDR-L3 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

或，

(b) 下述 3 个重链可变区（VH）的 CDR：

(i) CDR-H1，其具有如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 中含有的 CDR-H1 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H1 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；

(ii) CDR-H2，其具有如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 中含有的 CDR-H2 的序列，或者与所述 VH 中含有的 CDR-H2 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个置换、缺失或添加）的序列；和

(iii) CDR-H3, 其具有如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 中含有的 CDR-H3 的序列, 或者与所述 VH 中含有的 CDR-H3 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列; 和/或,

下述 3 个轻链可变区 (VL) 的 CDR:

(iv) CDR-L1, 其具有如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 中含有的 CDR-L1 的序列, 或者与所述 VL 中含有的 CDR-L1 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

(v) CDR-L2, 其具有如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 中含有的 CDR-L2 的序列, 或者与所述 VL 中含有的 CDR-L2 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列; 和

(vi) CDR-L3, 其具有如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 中含有的 CDR-L3 的序列, 或者与所述 VL 中含有的 CDR-L3 的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换;

优选地, 所述重链可变区 (VH) 中含有的 CDR-H1、CDR-H2 及 CDR-H3, 和/或所述轻链可变区 (VL) 中含有的 CDR-L1、CDR-L2 及 CDR-L3 由 Kabat、Chothia 或 IMGT 编号系统定义。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 选自下列的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR:

如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 11 任一项所示的 VH;

和/或,

(b) 选自下列的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR:

如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 12 任一项所示的 VL;

优选地, 所述重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR 和/或所述轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR 由 Kabat、Chothia 或 IMGT 编号系统定义。

3. 根据权利要求 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 如 SEQ ID NO: 1 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR; 和/或, 如 SEQ ID NO: 2 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR;

其中, 所述重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR 和所述轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR 由 IMGT 编号系统定义;

(2) (a) 如 SEQ ID NO: 1 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR; 和/或, 如 SEQ ID NO: 2 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR; 或 (b) 如 SEQ ID NO: 7 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR; 和/或, 如 SEQ ID NO: 8 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR;

其中, 所述重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR 和所述轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR 由 Kabat 编号系统定义; 或

(3) 如 SEQ ID NO: 1 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR; 和/或, 如 SEQ ID NO: 2 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR;

其中, 所述重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR 和所述轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR 由 Chothia 编号系统定义。

4. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(1) IMGT 编号系统所定义的 CDR:

(a) 下述 3 个重链可变区 (VH) 的 CDR:

(i) CDR-H1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 18, 或与 SEQ ID NO: 18 相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列,

(ii) CDR-H2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 19, 或与 SEQ ID NO: 19 相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列, 和

(iii) CDR-H3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 20, 或与 SEQ ID NO: 20 相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列;

和/或

(b) 下述 3 个轻链可变区 (VL) 的 CDR:

(iv) CDR-L1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 27, 或与 SEQ ID NO: 27 相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列,

(v) CDR-L2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 25, 或与 SEQ ID NO: 25 相比具有一个或几个置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加) 的序列, 和

(vi) CDR-L3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 23, 或与 SEQ ID NO: 23 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列;

或,

(2) Chothia 编号系统所定义的 CDR:

(a) 下述 3 个重链可变区 (VH) CDR:

(i) CDR-H1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 16, 或与 SEQ ID NO: 16 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列,

(ii) CDR-H2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 17, 或与 SEQ ID NO: 17 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列, 和

(iii) CDR-H3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或与 SEQ ID NO: 15 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列;

和/或,

(b) 下述 3 个轻链可变区 (VL) CDR:

(iv) CDR-L1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 24, 或与 SEQ ID NO: 24 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列,

(v) CDR-L2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 25, 或与 SEQ ID NO: 25 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列, 和

(vi) CDR-L3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 26, 或与 SEQ ID NO: 26 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列;

或,

(3) Kabat 编号系统所定义的 CDR:

(a) 下述 3 个重链可变区 (VH) CDR:

(i) CDR-H1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 13, 或与 SEQ ID NO: 13 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列,

(ii) CDR-H2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 14, 或与 SEQ ID NO: 14 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列, 和

(iii) CDR-H3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或与 SEQ ID NO: 15 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列;

和/或,

(b) 下述 3 个轻链可变区 (VL) CDR:

(iv) CDR-L1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 21, 或与 SEQ ID NO: 21 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列,

(v) CDR-L2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 22, 或与 SEQ ID NO: 22 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列, 和

(vi) CDR-L3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 23, 或与 SEQ ID NO: 23 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列;

或,

(4) Kabat 编号系统所定义的 CDR:

(a) 下述 3 个重链可变区 (VH) CDR:

(i) CDR-H1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 13, 或与 SEQ ID NO: 13 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列,

(ii) CDR-H2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 28, 或与 SEQ ID NO: 28 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列, 和

(iii) CDR-H3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 15, 或与 SEQ ID NO: 15 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列;

和/或,

(b) 下述 3 个轻链可变区 (VL) CDR:

(iv) CDR-L1, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 29, 或与 SEQ ID NO: 29 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列,

(v) CDR-L2, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 30, 或与 SEQ ID NO: 30 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列, 和

(vi) CDR-L3, 其由下述序列组成: SEQ ID NO: 23, 或与 SEQ ID NO: 23 相比具有一个或几个置换、缺失或添加(例如 1 个, 2 个或 3 个置换、缺失或添加)的序列;

优选地, (i)-(vi)任一项中所述的置换为保守置换。

5. 根据权利要求 4 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中:

所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含: 如 SEQ ID NO: 18 所示的 CDR-H1; 如 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR-H2; 以及, 如 SEQ ID NO: 20 所示的 CDR-H3; 并且, 所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含: 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR-L1; 如 SEQ ID NO: 25 所示的 CDR-L2; 以及, 如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR-L3;

其中, 上述各 CDR 由 IMGT 编号系统定义。

6. 根据权利要求 4 所述的抗体或其抗原结合片段，其中：

所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 16 所示的 CDR-H1；如 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR-H2；以及，如 SEQ ID NO: 15 所示的 CDR-H3；并且，所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 24 所示的 CDR-L1；如 SEQ ID NO: 25 所示的 CDR-L2；以及，如 SEQ ID NO: 26 所示的 CDR-L3；

其中，上述各 CDR 由 Chothia 编号系统定义。

7. 根据权利要求 4 所述的抗体或其抗原结合片段，其中：

(a) 所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1；如 SEQ ID NO: 14 所示的 CDR-H2；以及，如 SEQ ID NO: 15 所示的 CDR-H3；并且，所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 21 所示的 CDR-L1；如 SEQ ID NO: 22 所示的 CDR-L2；以及，如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR-L3；或者

(b) 所述抗体或其抗原结合片段的 VH 包含：如 SEQ ID NO: 13 所示的 CDR-H1；如 SEQ ID NO: 28 所示的 CDR-H2；以及，如 SEQ ID NO: 15 所示的 CDR-H3；并且，所述抗体或其抗原结合片段的 VL 包含：如 SEQ ID NO: 29 所示的 CDR-L1；如 SEQ ID NO: 30 所示的 CDR-L2；以及，如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR-L3；

其中，上述各 CDR 由 Kabat 编号系统定义。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 重链可变区 (VH)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9、11 任一项所示的序列；

(ii) 与 SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9、11 任一项所示的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(iii) 与 SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9、11 任一项所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

和/或

(b) 轻链可变区 (VL)，其包含选自下列的氨基酸序列：

(iv) SEQ ID NOs: 2、4、6、8、10、12 任一项所示的序列；

(v) 与 SEQ ID NOs: 2、4、6、8、10、12 任一项所示的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(vi) 与 SEQ ID NOs: 2、4、6、8、10、12 任一项所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；

优选地，(ii)或(v)中所述的置换是保守置换。

9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- (1) 具有如 SEQ ID NO: 1 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 2 所示的序列的 VL；
- (2) 具有如 SEQ ID NO: 3 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 4 所示的序列的 VL；
- (3) 具有如 SEQ ID NO: 5 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 6 所示的序列的 VL；
- (4) 具有如 SEQ ID NO: 7 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 8 所示的序列的 VL；
- (5) 具有如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 10 所示的序列的 VL；

或

- (6) 具有如 SEQ ID NO: 11 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 12 所示的序列的 VL。

10. 根据权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含：

(a) 人免疫球蛋白的重链恒定区（CH）或其变体，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个保守置换）；和

(b) 人免疫球蛋白的轻链恒定区（CL）或其变体，所述变体与其所源自的序列相比具有至多 20 个保守置换（例如至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个保守置换；例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个保守置换）；

优选地，所述重链恒定区是 IgG 重链恒定区，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含选自下列的重链恒定区：

(1) 人 IgG1 重链恒定区；

(2) 人 IgG4 重链恒定区；

(3) 人 IgG1 重链恒定区的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有以下置换：
Leu234Ala、Leu235Ala；

(4) 人 IgG1 重链恒定区的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有以下置换：
Asn297Ala；

(5) 人 IgG1 重链恒定区的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有以下置换：
Asp265Ala、Pro329Ala；

(6) 人 IgG4 重链恒定区的变体，所述变体与其所源自的野生型序列相比具有以下置换：
Ser228Pro；

其中，以上提及的氨基酸位置是根据 EU 编号系统的位置；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NOs: 32-37 任一项所示的重链恒定区 (CH)；

优选地，所述轻链恒定区是 κ 轻链恒定区；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO: 31 所示的轻链恒定区 (CL)。

11. 根据权利要求 1-10 任一项所述抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体或人源化抗体。

12. 根据权利要求 1-11 任一项所述抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv 片段、双抗体(diabody)、双特异性抗体和多特异性抗体。

13. 根据权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段以约 100×10^{-12} M 或更低的 KD 结合 TIM-3 (例如，人 TIM-3)；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段以约 1×10^{-12} M 或更低的 KD 结合 TIM-3 (例如，人 TIM-3)。

14. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或其重链可变区和/或轻链可变区。

15. 载体，其包含权利要求 14 所述的核酸分子；优选地，所述载体为克隆载体或表达载体。

16. 宿主细胞，其包含权利要求 14 所述的核酸分子或权利要求 15 所述的载体。

17. 制备权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括：

在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养权利要求 16 所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

18. 一种杂交瘤细胞株，其为：

杂交瘤细胞株#22，其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，且具有保藏号 CCTCC NO.C2017181。

19. 一种单克隆抗体，其由权利要求 18 所述的杂交瘤细胞株产生。

20. 药物组合物，其含有权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体和/或赋形剂和/或稳定剂；

优选地，所述药物组合物还包含另外的药学活性剂；

优选地，所述另外的药学活性剂是具有抗肿瘤活性的药物；

优选地，所述另外的药学活性剂是用于治疗感染的药物；

优选地，所述另外的药学活性剂是用于治疗自身免疫性疾病的药物；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段与所述另外的药学活性剂作为分离的组分或作为同一组合物的组分提供。

21. 根据权利要求 20 所述的药物组合物，其还包含特异性结合选自以下受体或配体的第二抗体或编码所述第二抗体的核酸，其中，所述受体或配体选自：PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIGIT、VISTA、CTLA-4、OX40、BTLA、4-1BB、CD96、CD27、CD28、CD40、LAIR1、CD160、2B4、TGF-R、KIR、ICOS、GITR、CD3、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、SLAMF7、NKp80、B7-H3 及其任意组合；

优选地，所述第二抗体为结合人 PD-1 的抗体或其抗原结合片段；更优选地，所述结合人 PD-1 的抗体或其抗原结合片段选自：Nivolumab 或其抗原结合片段、或 Pembrolizumab 或其抗原结合片段；

优选地，所述第二抗体为结合人 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段。

22. 权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备药物中的用途，所述药物用于至少下列中的任一项：

- (1) 在体外或受试者（例如人）体内提高免疫细胞活性；
- (2) 在受试者（例如人）中增强免疫应答；
- (3) 在受试者（例如人）中治疗癌症；
- (4) 在受试者（例如人）中治疗感染性疾病；
- (5) 在受试者（例如人）中治疗自身免疫性疾病；和；
- (6) (1)-(5)的任意组合；

优选地，所述癌症选自实体肿瘤、血液肿瘤（例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤，例如，多发性骨髓瘤）和转移性病灶；例如，包括但不限于肺癌、鳞状细胞肺癌、黑色素瘤、肾癌、乳腺癌、IM-TN 乳腺癌、结肠直肠癌、白血病或癌症的转移性病灶；

优选地，所述感染性疾病选自病毒感染、细菌感染、真菌感染和寄生虫感染，包括但不限于 HIV、肝炎病毒、疱疹病毒或脓毒症；

优选地，所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、系统性红斑狼疮、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少性紫癜、胰岛素依赖性糖尿病、格雷夫斯病、重症肌无力、自生免疫肝炎和多发性硬化。

23. 刺激对象中的免疫应答的方法，其包括以有效地刺激免疫应答的量，向需要其的对象施用权利要求 1-12 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 20 或 21 的药物组合物。

24. 治疗癌症的方法，其包括以有效剂量的量向需要其的对象施用权利要求 1-12 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 20 或 21 的药物组合物。

25. 根据权利要求 24 的方法，其中所述癌症选自肺癌、鳞状细胞肺癌、黑色素瘤、肾癌、乳腺癌、IM-TN 乳腺癌、结肠直肠癌、白血病或癌症的转移性病灶。

26. 一种用于在受试者（例如人）中预防和/或治疗自身免疫性疾病的方法，其包括向有此需要的受试者施用有效量的权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 20 或 21 所述的药物组合物。

27. 一种诊断性或治疗性试剂盒，其包括权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段和使用说明书。

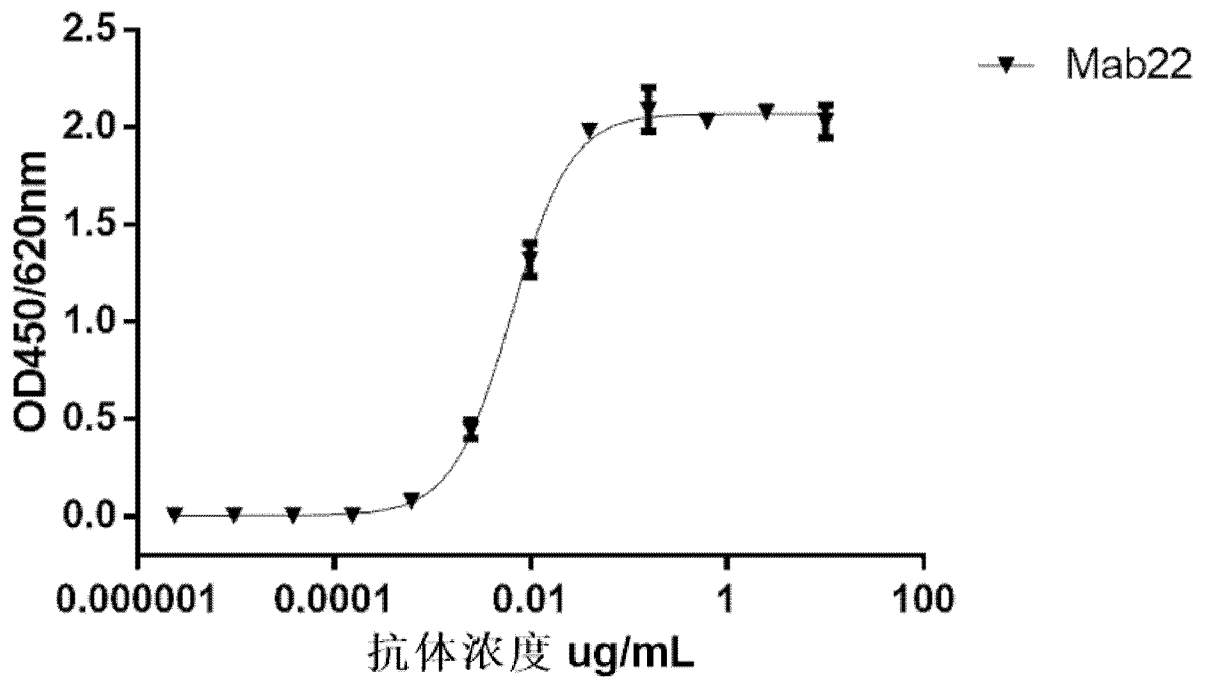


图 1

	FR-H1	CDR-H1	FR-H2
Mab22-V _H	EVQLQLSGPELVKPGASVKMSCKAS	<u>GYFTNYV</u>	MHWMRQKPGQGL
AB12S3-V _H	----VQ--A-VK-----V-----	-----	-----A--R-
AB12S4-V _H	----V---A-V-----	-----	-----R-
AB12S5-V _H	Q---VQ--A-VK-----V-----	-----	---V--A--R-
AB12S6-V _H	Q-----A-VK-----V-----	-----	---V--A--R-
AB12S7-V _H	-----A-VK-----V-----	-----	-----R-

	CDR-H2	FR-H3
Mab22-V _H	EWIGY <u>IDPDNDGI</u>	KYNEKIKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSED
AB12S3-V _H	-----	-----R---
AB12S4-V _H	-----	-----R---
AB12S5-V _H	--M-W	--SQ-FQ-RV-I-R-T-A-----R---
AB12S6-V _H	--M-W	--SQ-FQ-RV-----A-----R---
AB12S7-V _H	--M-W	--SQ-FQ-RV-I-R-----R---

	CDR-H3	FR-H4
Mab22-V _H	SAVYYC <u>ARDFGYVDWFPY</u>	WGQGLVTVSA
AB12S3-V _H	T-----	-----T---S
AB12S4-V _H	-----	-----T---S
AB12S5-V _H	T-----	-----T---S
AB12S6-V _H	T-----	-----S
AB12S7-V _H	T-----	-----S

图 2

	FR-L1	CDR-L1	FR-L2
Mab22-V _L	DIIVMTQSHKFMSTSVGNRVSI <u>TCKAS</u>	<u>QDVTTA</u>	VAWYQOKSGQSPK
AB12S3-V _L	-----PSSL-A---D--T-----	-----	-----P-KA--
AB12S4-V _L	-----PSS-----D--T-----	-----	-----P-K---
AB12S5-V _L	--Q---PSSL-A---D--T---Q--	-----	LN-----P-KA--
AB12S6-V _L	--Q---PSS--A---D--T---Q--	-----	LN-----P-K---
AB12S7-V _L	-----PSSL-A---D--T---Q--	-----	LN-----

	CDR-L2	FR-L3
Mab22-V _L	LLIY <u>SAS</u> NRYIGVPDRFTGSGSGTDFTF <u>TISSVQTEDLAVYYC</u> <u>QQ</u>	
AB12S3-V _L	----	-----L-P--I-T--- --
AB12S4-V _L	----	-----P--I----- --
AB12S5-V _L	---- -- -LET---S--S-----	-----L-P--I-T--- --
AB12S6-V _L	---- -- -LET---S--S-----	-----L-P--I-T--- --
AB12S7-V _L	---- -- -LET---S--S-----	-----L-P--I-T--- --

	CDR-L3	FR-L4
Mab22-V _L	<u>HYSIPPT</u> FGGGTNLEIK	
AB12S3-V _L	-----	-----KV---
AB12S4-V _L	-----	-----
AB12S5-V _L	-----	-----KV---
AB12S6-V _L	-----	-----
AB12S7-V _L	-----	-----

图 3

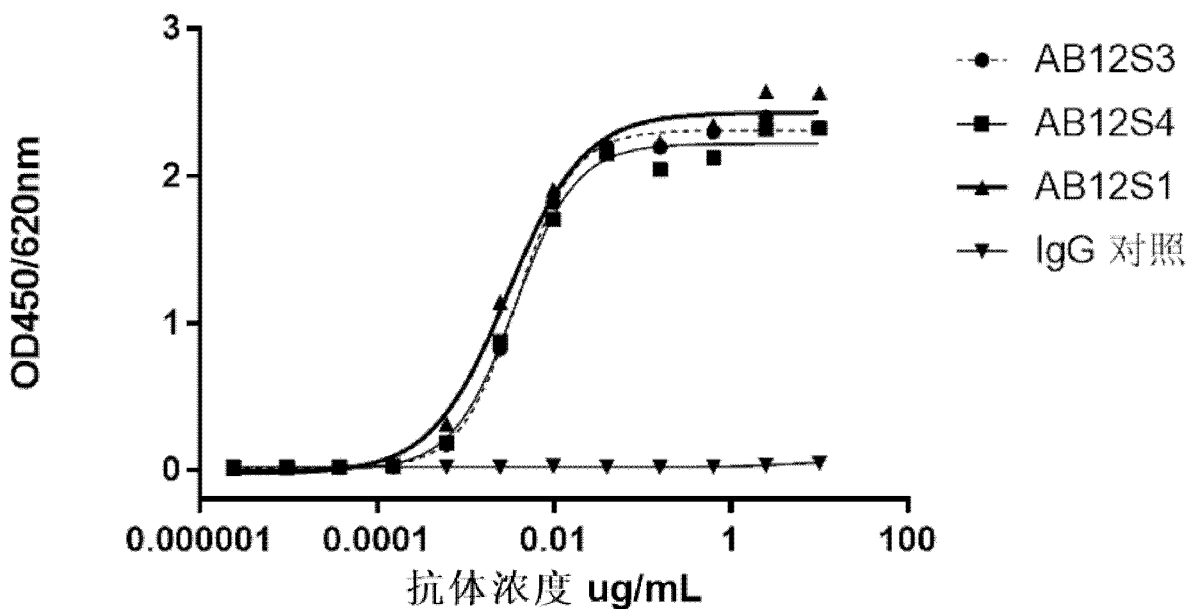


图 4

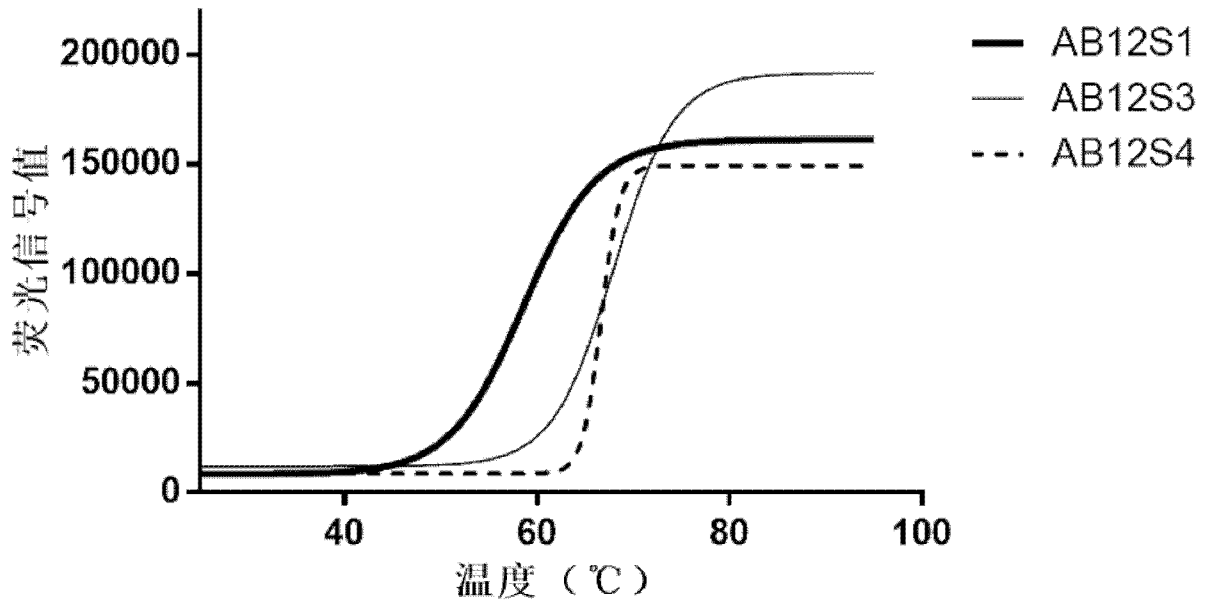


图 5

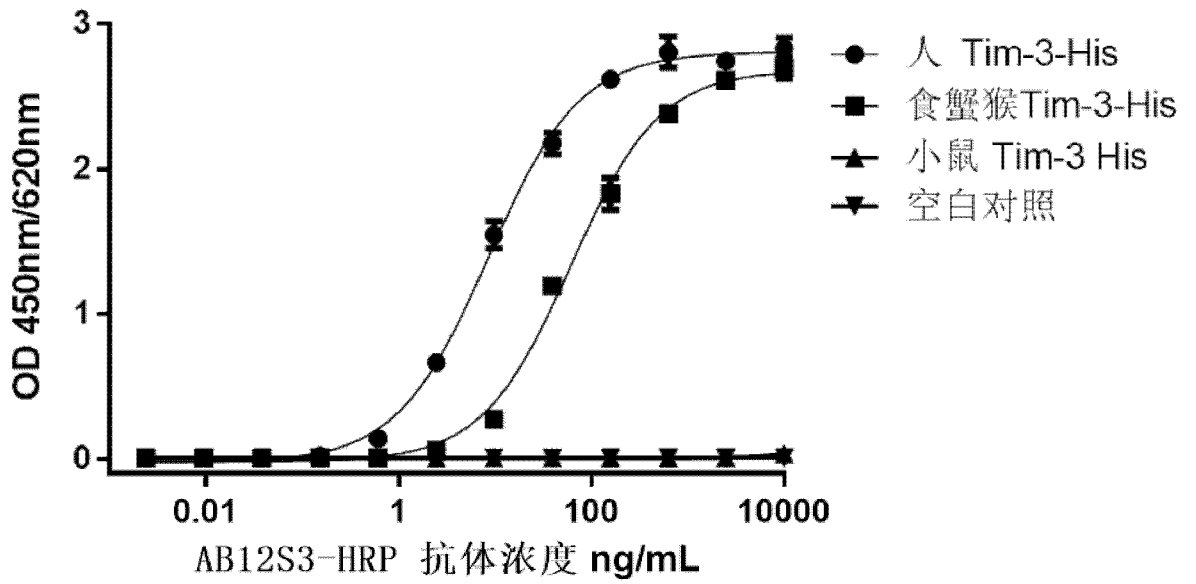


图 6

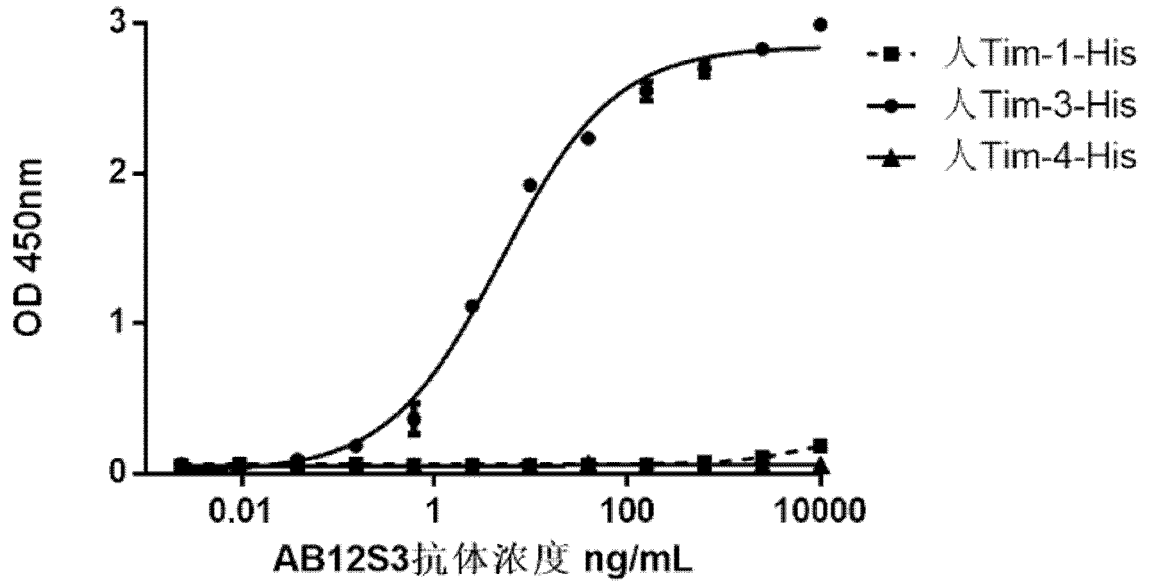


图 7

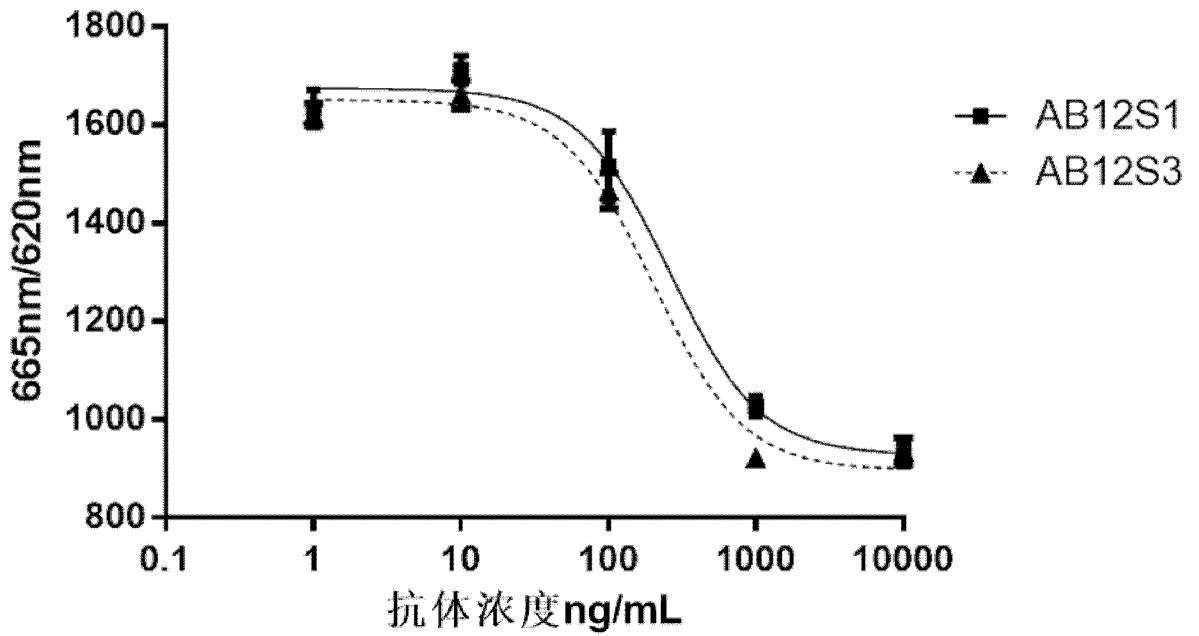


图 8

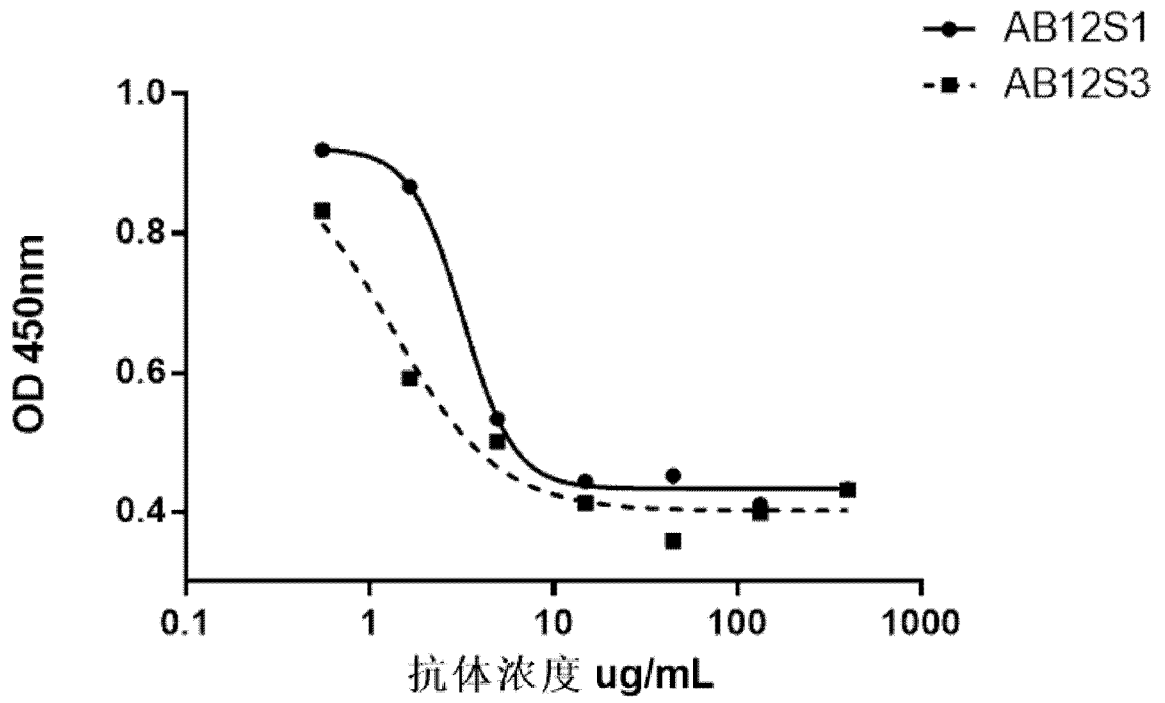


图 9

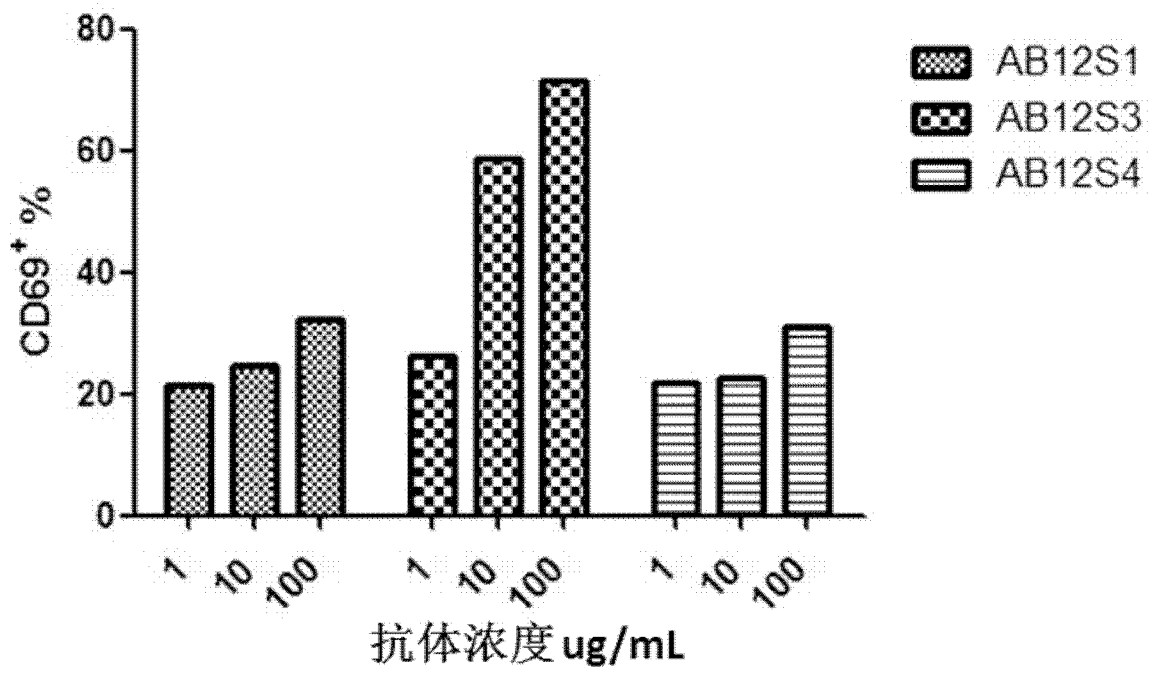


图 10

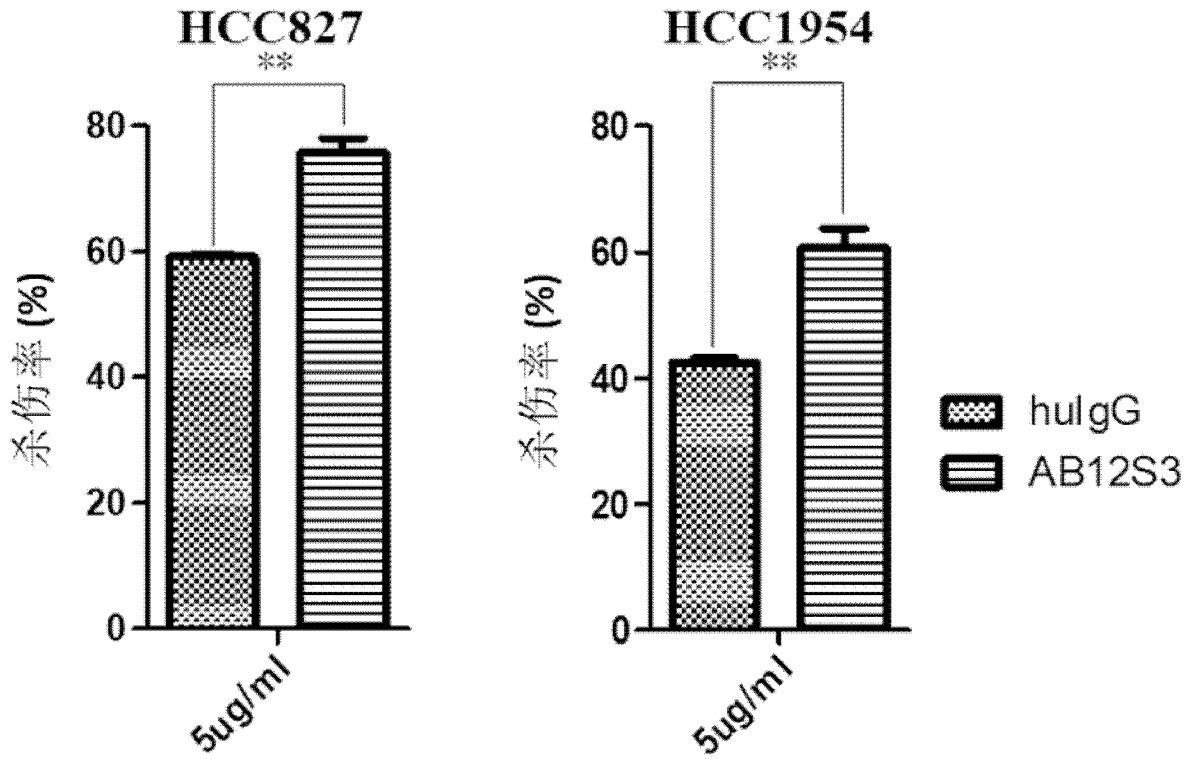


图 11

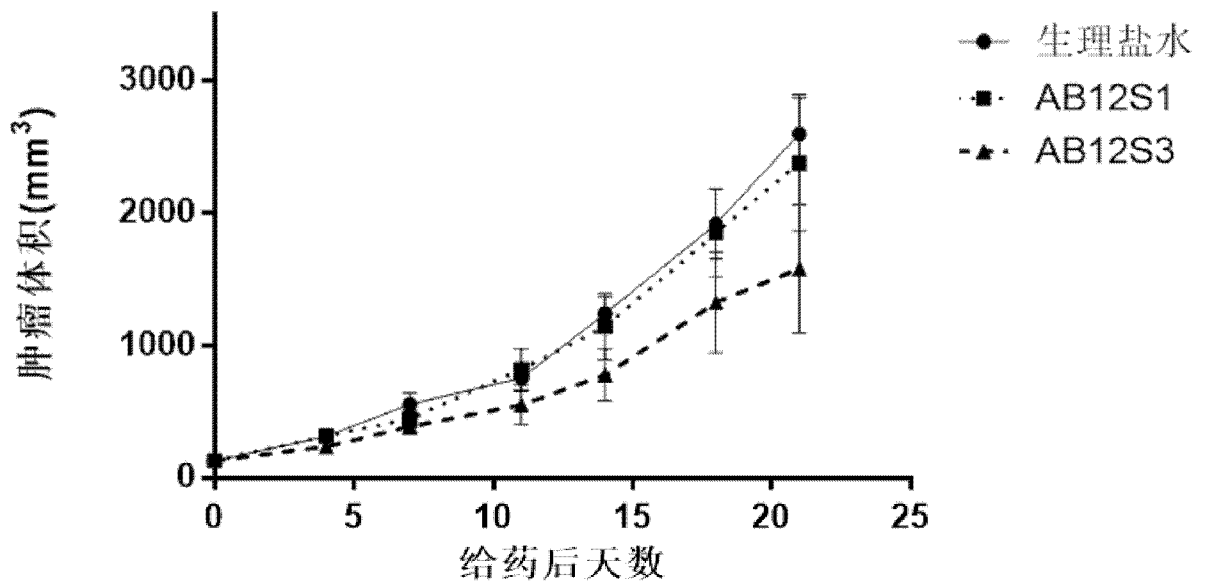


图 12

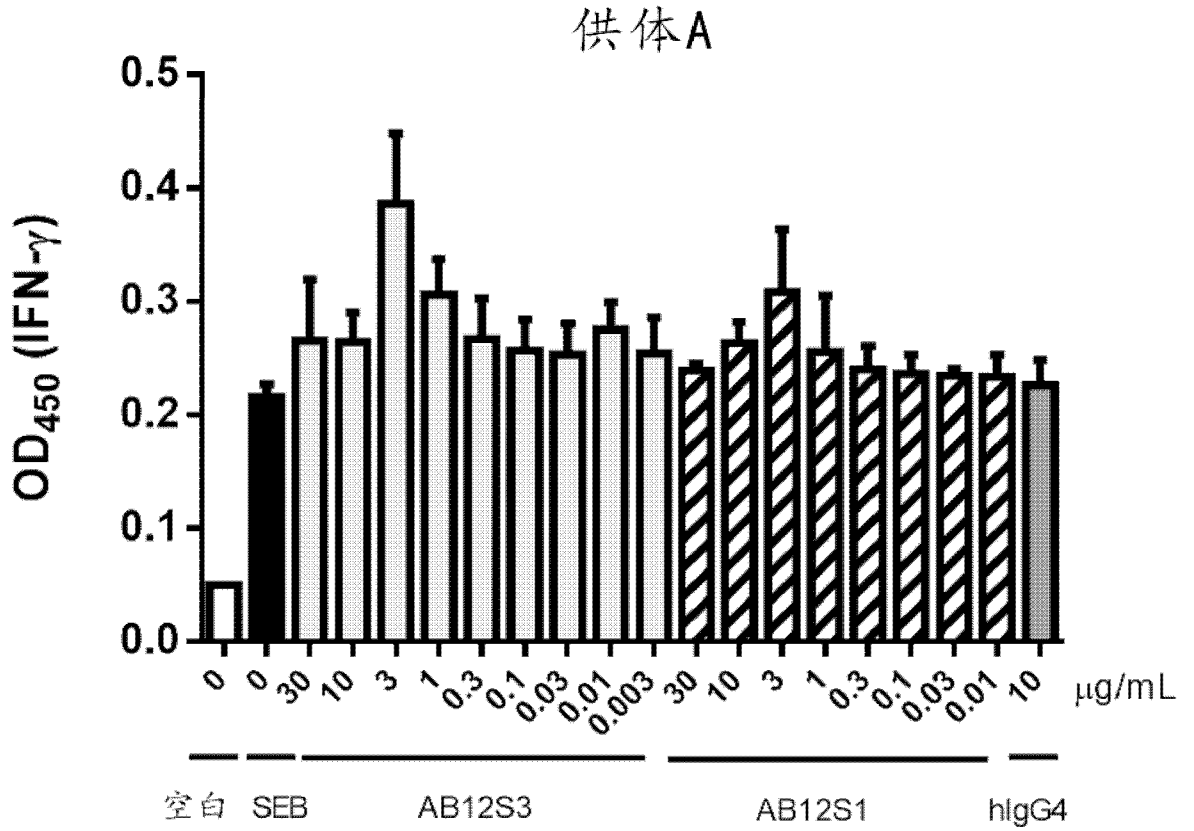


图 13

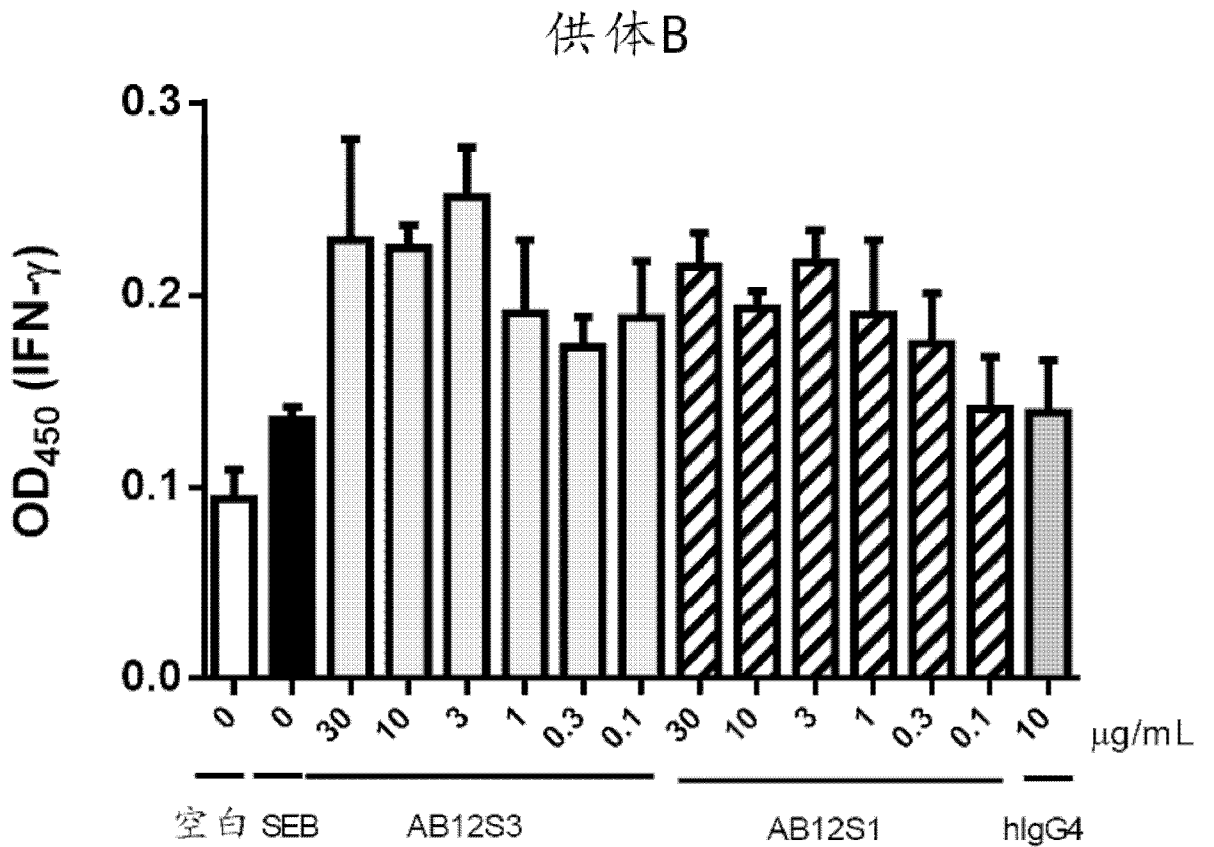


图 14

供体A

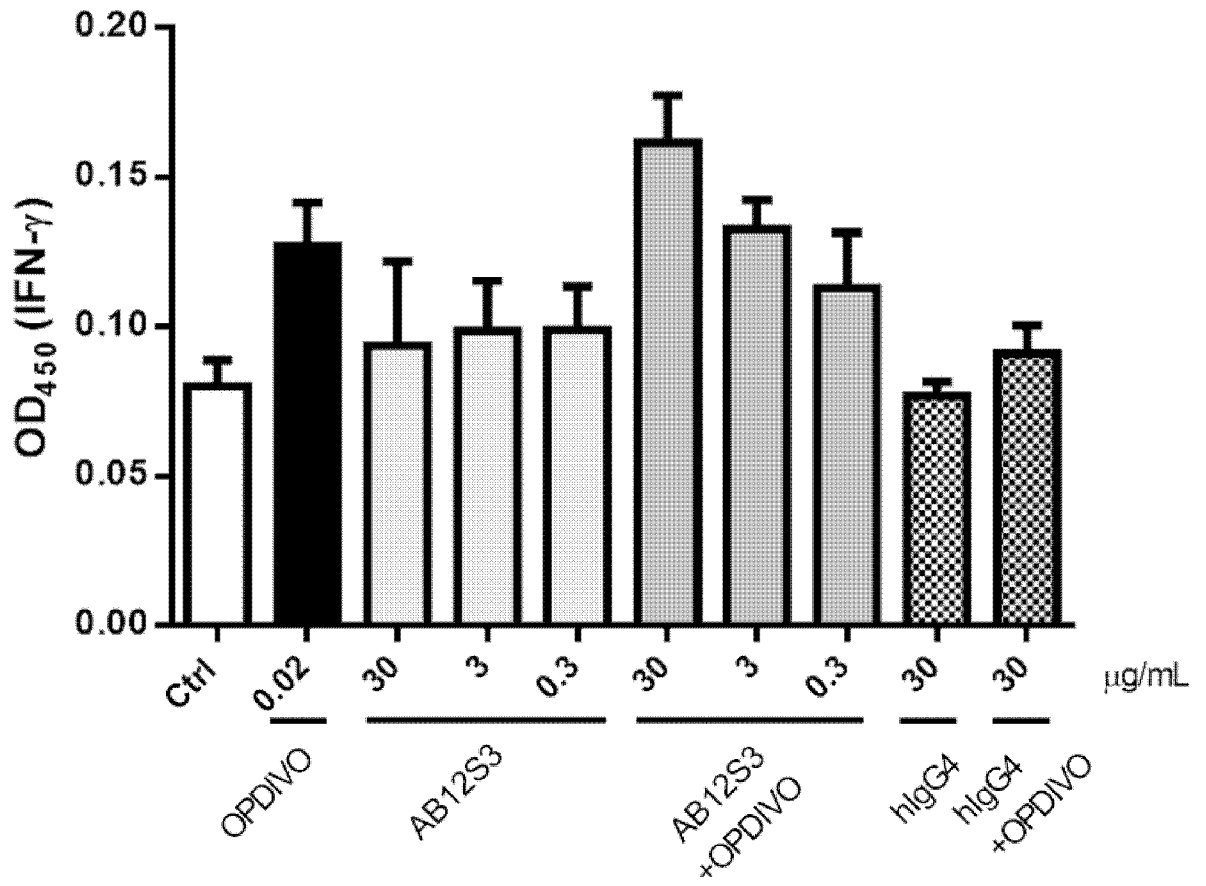


图 15

供体B

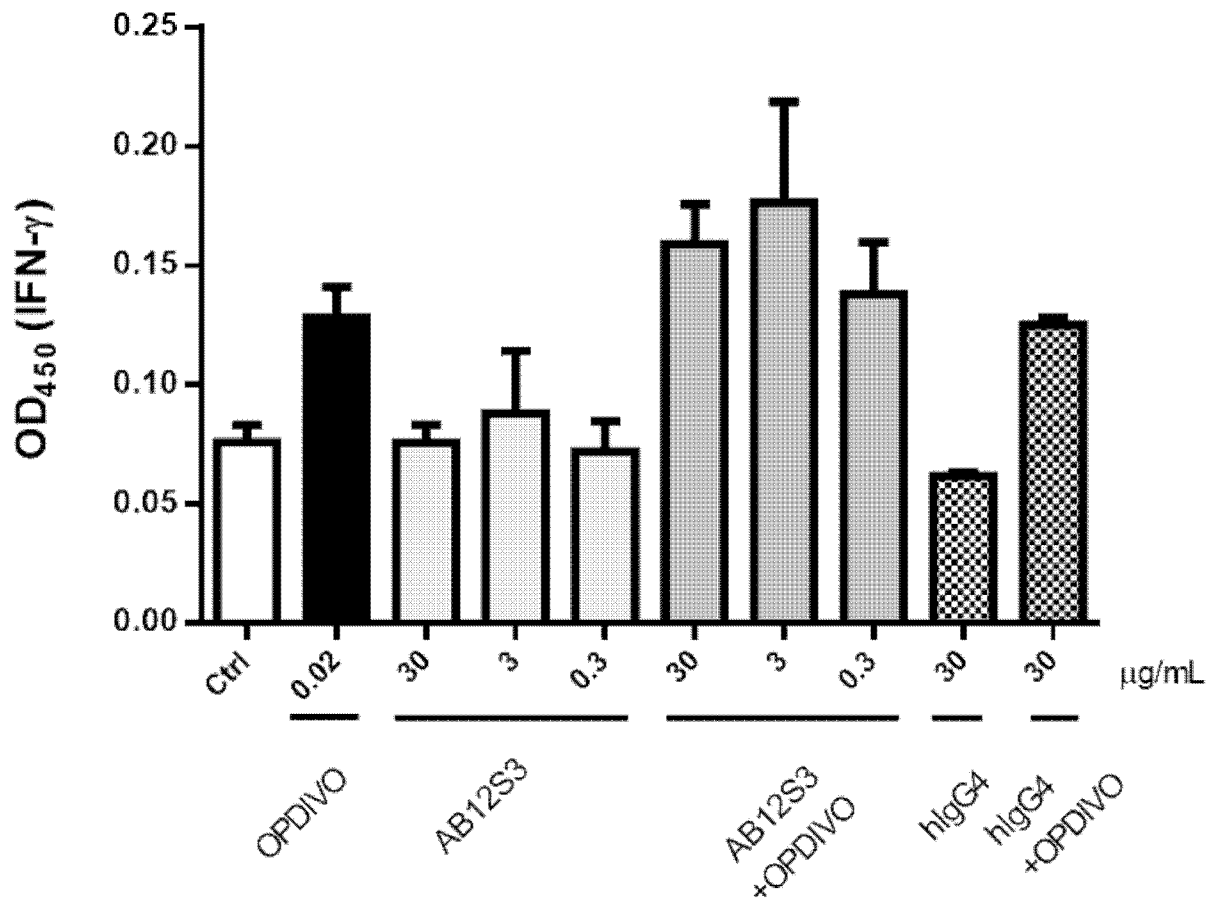


图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/083727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 39/395(2006.01)i; A61K 39/44(2006.01)i; C12N 5/12(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; A61P 35/04(2006.01)i; A61P 7/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P; C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPL, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度搜索, BAIDU XUESHU SEARCH, WEB OF SCIENCE, PubMed: 黏蛋白, T细胞, TIM, 抗体, "3", 粘蛋白, 抗体, antibody, T-cell immunoglobulin and mucin domain 3, TIM-3 GenBank; EMBL: 基于SEQ ID NOs: 3和4的序列检索, EMBL: sequence search on SEQ ID NOs: 3 and 4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016068803 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 06 May 2016 (2016-05-06) see entire document	1-27
A	WO 2017079115 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 11 May 2017 (2017-05-11) see entire document	1-27
A	WO 2015117002 A1 (NOVARTIS AG ET AL.) 06 August 2015 (2015-08-06) see entire document	1-27
A	WO 2011155607 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. ET AL.) 15 December 2011 (2011-12-15) see entire document	1-27
A	WO 2017178493 A1 (SYMPHOGEN AS) 19 October 2017 (2017-10-19) see entire document	1-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 July 2019		Date of mailing of the international search report 26 July 2019
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/083727

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016068803	A1	06 May 2016	EP	3212231	A4	28 March 2018
				AU	2015340056	A1	25 May 2017
				US	2019185564	A1	20 June 2019
				CA	2965960	A1	06 May 2016
				JP	2017536111	A	07 December 2017
				US	2017240633	A1	24 August 2017
				KR	20170075778	A	03 July 2017
				EP	3212231	A1	06 September 2017
				SG	10201803042P	A	28 June 2018
				CN	107405397	A	28 November 2017
				SG	11201703403T	A	30 May 2017
				US	10259874	B2	16 April 2019
				WO	2017079115	A1	11 May 2017
CN	108697791	A	23 October 2018				
AU	2016350700	A1	17 May 2018				
EP	3370768	A1	12 September 2018				
KR	20180069070	A	22 June 2018				
EA	201891093	A1	31 October 2018				
JP	2019500892	A	17 January 2019				
TW	201730213	A	01 September 2017				
EP	3370769	A1	12 September 2018				
CN	108473584	A	31 August 2018				
BR	112018008867	A2	06 November 2018				
CA	3004134	A1	11 May 2017				
KR	20180072821	A	29 June 2018				
IL	258909	D0	28 June 2018				
PH	12018500906	A1	05 November 2018				
CA	3004117	A1	11 May 2017				
PE	13262018	A1	20 August 2018				
EP	3370769	A4	22 May 2019				
AU	2016348391	A1	17 May 2018				
AU	2016348388	A1	17 May 2018				
US	2017121409	A1	04 May 2017				
WO	2017079116	A3	20 July 2017				
CL	2018001177	A1	12 October 2018				
JP	2019500891	A	17 January 2019				
CN	108430509	A	21 August 2018				
KR	20180069071	A	22 June 2018				
BR	112018008891	A2	06 November 2018				
BR	112018008904	A2	27 November 2018				
CA	3004138	A1	11 May 2017				
WO	2017079116	A2	11 May 2017				
MX	2018005551	A	09 November 2018				
JP	2019500893	A	17 January 2019				
SG	11201803520P	A	30 May 2018				
EP	3371226	A2	12 September 2018				
CO	2018005614	A2	31 May 2018				
AR	106583	A1	31 January 2018				
CR	20180234	A	11 September 2018				
WO	2015117002	A1	06 August 2015	SG	11201605627T	A	30 August 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/083727

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CR 20160347 A	10 March 2017
		TW 201612193 A	01 April 2016
		US 9884913 B2	06 February 2018
		US 2015218274 A1	06 August 2015
		BR 112016016436 A2	12 December 2017
		US 2017198041 A1	13 July 2017
		EP 3099717 A1	07 December 2016
		CA 2936863 A1	06 August 2015
		CN 106132991 A	16 November 2016
		US 2017190777 A1	06 July 2017
		UY 35973 A	31 August 2015
		IL 246693 D0	31 August 2016
		AU 2015210750 A1	21 July 2016
		CL 2016001716 A1	09 June 2017
		PE 03302017 A1	21 April 2017
		CU 20160118 A7	02 February 2017
		JP 2017511687 A	27 April 2017
		CU 24427 B1	04 June 2019
		MX 2016009961 A	11 January 2017
		EP 3099717 B1	27 March 2019
		PH 12016501482 A1	22 August 2016
		EA 201691556 A1	30 December 2016
		US 9605070 B2	28 March 2017
		KR 20160113272 A	28 September 2016
WO	2011155607 A1	15 December 2011	
		AU 2011262758 B8	04 September 2014
		EP 2581113 A4	25 December 2013
		CA 2814155 A1	15 December 2011
		AU 2011262758 A1	10 January 2013
		US 2017088616 A1	30 March 2017
		EP 3363499 A1	22 August 2018
		KR 101846590 B1	09 April 2018
		TR 201807750 T4	21 June 2018
		EP 2581113 A1	17 April 2013
		TW 201207397 A	16 February 2012
		HU E040213 T2	28 February 2019
		AU 2011262758 B2	24 April 2014
		US 8552156 B2	08 October 2013
		CN 103079644 B	15 February 2017
		AU 2011262758 A8	04 September 2014
		US 2012189617 A1	26 July 2012
		ES 2682078 T3	18 September 2018
		JP WO2011155607 A1	15 August 2013
		US 9556270 B2	31 January 2017
		US 2014044728 A1	13 February 2014
		CN 103079644 A	01 May 2013
		EP 2581113 B1	09 May 2018
		TW 1629483 B	11 July 2018
		JP 2017189168 A	19 October 2017
		PL 2581113 T3	30 November 2018
		KR 20130132695 A	05 December 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/083727

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
-----				JP	6158511	B2	05 July 2017
WO	2017178493	A1	19 October 2017	CA	3020647	A1	19 October 2017
				IL	262176	D0	29 November 2018
				MX	2018012076	A	20 February 2019
				CN	109451741	A	08 March 2019
				BR	112018070919	A2	29 January 2019
				EP	3443009	A1	20 February 2019
				TW	201736397	A	16 October 2017
				KR	20180133482	A	14 December 2018
				CO	2018010458	A2	10 October 2018
				AU	2017251250	A1	18 October 2018
				CL	2018002878	A1	26 April 2019
				SG	11201808724S	A	29 November 2018
				PE	18052018	A1	19 November 2018
				EA	201892294	A1	30 April 2019

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 39/395(2006.01)i; A61K 39/44(2006.01)i; C12N 5/12(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; A61P 35/04(2006.01)i; A61P 7/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P; C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CPRABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, WEB OF SCIENCE, PubMed: 黏蛋白, T 细胞, TIM, 抗体, "3", 粘蛋白, 抗体, antibody, T-cell immunoglobulin and mucin domain 3, TIM-3 GenBank; EMBL: 基于SEQ ID NOs: 3和4的序列检索</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016068803 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES) 2016年 5月 6日 (2016 - 05 - 06) 参见全文</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017079115 A1 (JANSSEN BIOTECH INC) 2017年 5月 11日 (2017 - 05 - 11) 参见全文</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015117002 A1 (NOVARTIS AG等) 2015年 8月 6日 (2015 - 08 - 06) 参见全文</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2011155607 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD等) 2011年 12月 15日 (2011 - 12 - 15) 参见全文</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017178493 A1 (SYMPHOGEN AS) 2017年 10月 19日 (2017 - 10 - 19) 参见全文</td> <td>1-27</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	WO 2016068803 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES) 2016年 5月 6日 (2016 - 05 - 06) 参见全文	1-27	A	WO 2017079115 A1 (JANSSEN BIOTECH INC) 2017年 5月 11日 (2017 - 05 - 11) 参见全文	1-27	A	WO 2015117002 A1 (NOVARTIS AG等) 2015年 8月 6日 (2015 - 08 - 06) 参见全文	1-27	A	WO 2011155607 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD等) 2011年 12月 15日 (2011 - 12 - 15) 参见全文	1-27	A	WO 2017178493 A1 (SYMPHOGEN AS) 2017年 10月 19日 (2017 - 10 - 19) 参见全文	1-27
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	WO 2016068803 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES) 2016年 5月 6日 (2016 - 05 - 06) 参见全文	1-27																		
A	WO 2017079115 A1 (JANSSEN BIOTECH INC) 2017年 5月 11日 (2017 - 05 - 11) 参见全文	1-27																		
A	WO 2015117002 A1 (NOVARTIS AG等) 2015年 8月 6日 (2015 - 08 - 06) 参见全文	1-27																		
A	WO 2011155607 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD等) 2011年 12月 15日 (2011 - 12 - 15) 参见全文	1-27																		
A	WO 2017178493 A1 (SYMPHOGEN AS) 2017年 10月 19日 (2017 - 10 - 19) 参见全文	1-27																		
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 7月 3日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 7月 26日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>赵彦豪</p> <p>电话号码 62411043</p>																		

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:

a. 作为国际申请的一部分提交的:

附件C/ST. 25文本文件形式

纸件或图形文件形式

b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/083727

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2016068803	A1	2016年 5月 6日	EP	3212231	A4	2018年 3月 28日
				AU	2015340056	A1	2017年 5月 25日
				US	2019185564	A1	2019年 6月 20日
				CA	2965960	A1	2016年 5月 6日
				JP	2017536111	A	2017年 12月 7日
				US	2017240633	A1	2017年 8月 24日
				KR	20170075778	A	2017年 7月 3日
				EP	3212231	A1	2017年 9月 6日
				SG	10201803042P	A	2018年 6月 28日
				CN	107405397	A	2017年 11月 28日
				SG	11201703403T	A	2017年 5月 30日
				US	10259874	B2	2019年 4月 16日
				WO	2017079115	A1	2017年 5月 11日
CN	108697791	A	2018年 10月 23日				
AU	2016350700	A1	2018年 5月 17日				
EP	3370768	A1	2018年 9月 12日				
KR	20180069070	A	2018年 6月 22日				
EA	201891093	A1	2018年 10月 31日				
JP	2019500892	A	2019年 1月 17日				
TW	201730213	A	2017年 9月 1日				
EP	3370769	A1	2018年 9月 12日				
CN	108473584	A	2018年 8月 31日				
BR	112018008867	A2	2018年 11月 6日				
CA	3004134	A1	2017年 5月 11日				
KR	20180072821	A	2018年 6月 29日				
IL	258909	D0	2018年 6月 28日				
PH	12018500906	A1	2018年 11月 5日				
CA	3004117	A1	2017年 5月 11日				
PE	13262018	A1	2018年 8月 20日				
EP	3370769	A4	2019年 5月 22日				
AU	2016348391	A1	2018年 5月 17日				
AU	2016348388	A1	2018年 5月 17日				
US	2017121409	A1	2017年 5月 4日				
WO	2017079116	A3	2017年 7月 20日				
CL	2018001177	A1	2018年 10月 12日				
JP	2019500891	A	2019年 1月 17日				
CN	108430509	A	2018年 8月 21日				
KR	20180069071	A	2018年 6月 22日				
BR	112018008891	A2	2018年 11月 6日				
BR	112018008904	A2	2018年 11月 27日				
CA	3004138	A1	2017年 5月 11日				
WO	2017079116	A2	2017年 5月 11日				
MX	2018005551	A	2018年 11月 9日				
JP	2019500893	A	2019年 1月 17日				
SG	11201803520P	A	2018年 5月 30日				
EP	3371226	A2	2018年 9月 12日				
CO	2018005614	A2	2018年 5月 31日				
AR	106583	A1	2018年 1月 31日				
CR	20180234	A	2018年 9月 11日				
WO	2015117002	A1	2015年 8月 6日	SG	11201605627T	A	2016年 8月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/083727

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CR 20160347 A	2017年 3月 10日
		TW 201612193 A	2016年 4月 1日
		US 9884913 B2	2018年 2月 6日
		US 2015218274 A1	2015年 8月 6日
		BR 112016016436 A2	2017年 12月 12日
		US 2017198041 A1	2017年 7月 13日
		EP 3099717 A1	2016年 12月 7日
		CA 2936863 A1	2015年 8月 6日
		CN 106132991 A	2016年 11月 16日
		US 2017190777 A1	2017年 7月 6日
		UY 35973 A	2015年 8月 31日
		IL 246693 D0	2016年 8月 31日
		AU 2015210750 A1	2016年 7月 21日
		CL 2016001716 A1	2017年 6月 9日
		PE 03302017 A1	2017年 4月 21日
		CU 20160118 A7	2017年 2月 2日
		JP 2017511687 A	2017年 4月 27日
		CU 24427 B1	2019年 6月 4日
		MX 2016009961 A	2017年 1月 11日
		EP 3099717 B1	2019年 3月 27日
		PH 12016501482 A1	2016年 8月 22日
		EA 201691556 A1	2016年 12月 30日
		US 9605070 B2	2017年 3月 28日
		KR 20160113272 A	2016年 9月 28日
WO 2011155607 A1	2011年 12月 15日	AU 2011262758 B8	2014年 9月 4日
		EP 2581113 A4	2013年 12月 25日
		CA 2814155 A1	2011年 12月 15日
		AU 2011262758 A1	2013年 1月 10日
		US 2017088616 A1	2017年 3月 30日
		EP 3363499 A1	2018年 8月 22日
		KR 101846590 B1	2018年 4月 9日
		TR 201807750 T4	2018年 6月 21日
		EP 2581113 A1	2013年 4月 17日
		TW 201207397 A	2012年 2月 16日
		HU E040213 T2	2019年 2月 28日
		AU 2011262758 B2	2014年 4月 24日
		US 8552156 B2	2013年 10月 8日
		CN 103079644 B	2017年 2月 15日
		AU 2011262758 A8	2014年 9月 4日
		US 2012189617 A1	2012年 7月 26日
		ES 2682078 T3	2018年 9月 18日
		JP W02011155607 A1	2013年 8月 15日
		US 9556270 B2	2017年 1月 31日
		US 2014044728 A1	2014年 2月 13日
		CN 103079644 A	2013年 5月 1日
		EP 2581113 B1	2018年 5月 9日
		TW 1629483 B	2018年 7月 11日
		JP 2017189168 A	2017年 10月 19日
		PL 2581113 T3	2018年 11月 30日
		KR 20130132695 A	2013年 12月 5日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/083727

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
-----				JP	6158511	B2	2017年 7月 5日
W0	2017178493	A1	2017年 10月 19日	CA	3020647	A1	2017年 10月 19日
				IL	262176	D0	2018年 11月 29日
				MX	2018012076	A	2019年 2月 20日
				CN	109451741	A	2019年 3月 8日
				BR	112018070919	A2	2019年 1月 29日
				EP	3443009	A1	2019年 2月 20日
				TW	201736397	A	2017年 10月 16日
				KR	20180133482	A	2018年 12月 14日
				CO	2018010458	A2	2018年 10月 10日
				AU	2017251250	A1	2018年 10月 18日
				CL	2018002878	A1	2019年 4月 26日
				SG	11201808724S	A	2018年 11月 29日
				PE	18052018	A1	2018年 11月 19日
				EA	201892294	A1	2019年 4月 30日
