(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 116685601 B
(45)授权公告日 2025.04.08

(21)申请号 202180081569.3
(22)申请日 2021.10.01
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116685601 A
(43)申请公布日 2023.09.01
(30)优先权数据
20199829.1 2020.10.02 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.06.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/077106 2021.10.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/069712 EN 2022.04.07

(73)专利权人 翁科奥内研发有限责任公司
地址 奥地利克洛斯特新堡
(72)发明人 A·席纳格尔 I·米尔基娜
R·克施鲍默 R·M·蒂勒
(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有限公司 44205
专利代理师 黄琳娟

(51)Int.Cl.
C07K 16/24(2006.01)
(56)对比文件
CN 101983207 A,2011.03.02
US 2009220521 A1,2009.09.03
审查员 黎舒婷

权利要求书1页 说明书39页
序列表26页 附图21页

(54)发明名称

聚集潜在性降低和疏水性降低的改良抗oxMIF抗体

(57)摘要

本发明涉及抗oxMIF抗体以及其在治疗oxMIF相关病症中的用途,所述抗oxMIF抗体具有改善的特性,例如由于轻链和重链可变结构域中选定氨基酸取代而降低的聚集潜在性和降低的疏水性,以及任选地由于重链恒定区中的进一步取代而增强的效应子功能。

CN 116685601 B

1.一种聚集潜在性降低和疏水性降低的重组抗oxMIF抗体或其抗原结合片段,其由以下组成:

SEQ ID NO:8的重链可变结构域,SEQ ID NO:11的轻链可变结构域,SEQ ID NO:4的重链恒定区,和SEQ ID NO:38的轻链恒定区;或

SEQ ID NO:8的重链可变结构域,SEQ ID NO:13的轻链可变结构域,SEQ ID NO:4的重链恒定区,和SEQ ID NO:38的轻链恒定区;或

SEQ ID NO:8的重链可变结构域,SEQ ID NO:9的轻链可变结构域,SEQ ID NO:1的重链恒定区,和SEQ ID NO:38的轻链恒定区;或

SEQ ID NO:6的重链可变结构域,SEQ ID NO:11的轻链可变结构域,SEQ ID NO:1的重链恒定区,和SEQ ID NO:38的轻链恒定区;或

SEQ ID NO:7的重链可变结构域,SEQ ID NO:10的轻链可变结构域,SEQ ID NO:1的重链恒定区,和SEQ ID NO:38的轻链恒定区;或

SEQ ID NO:7的重链可变结构域,SEQ ID NO:11的轻链可变结构域,SEQ ID NO:1的重链恒定区,和SEQ ID NO:38的轻链恒定区;或

SEQ ID NO:8的重链可变结构域,SEQ ID NO:10的轻链可变结构域,SEQ ID NO:1的重链恒定区,和SEQ ID NO:38的轻链恒定区;或

SEQ ID NO:8的重链可变结构域,SEQ ID NO:11的轻链可变结构域,SEQ ID NO:1的重链恒定区,和SEQ ID NO:38的轻链恒定区;或

SEQ ID NO:8的重链可变结构域,SEQ ID NO:13的轻链可变结构域,SEQ ID NO:1的重链恒定区,和SEQ ID NO:38的轻链恒定区。

2.根据权利要求1所述的抗oxMIF抗体,其用于制备药物。

3.一种药物组合物,其包含权利要求1或2所述的抗体。

4.根据权利要求3所述的药物组合物,其还包含药物载体或佐剂。

5.根据权利要求3或4所述的药物组合物,其中所述组合物包含10至250mg/ml的权利要求1或2所述的抗体。

6.根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述组合物包含>50mg/ml的权利要求1或2所述的抗体。

7.根据权利要求3或4所述的药物组合物,其中所述药物组合物经配制用于皮下施用。

8.根据权利要求3或4所述的药物组合物,其中所述组合物用于作为单独的物质施用,或者与包含一种或多种活性物质的另一种药物组合物一起施用。

9.根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述一种或多种活性物质选自抗病毒、抗炎、抗癌、抗血管生成和抗生素物质。

10.一种分离的核酸,其编码根据权利要求1或2所述的抗体。

11.一种表达载体,其包含一种或多种根据权利要求10所述的核酸。

12.一种宿主细胞,其包含根据权利要求10所述的核酸或根据权利要求11所述的表达载体。

13.一种生产根据权利要求1或2所述的抗体的方法,所述方法包括培养根据权利要求12所述的宿主细胞并且从细胞培养物中回收所述抗体。

聚集潜在性降低和疏水性降低的改良抗oxMIF抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及抗oxMIF抗体以及其在治疗oxMIF相关病症中的用途,所述抗oxMIF抗体具有改善的特性,例如由于轻链和重链可变结构域中选定氨基酸取代而降低的聚集潜在性和降低的疏水性,以及任选地由于重链恒定区中的进一步取代而增强的效应子功能。

背景技术

[0002] 早在1966年就已经描述了细胞因子巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)(David,J.R.,1966;Bloom B.R.和Bennet,B.,1966)。然而,MIF与其他细胞因子和趋化因子明显不同,因为它是组成型表达的,储存在细胞质中,并且存在于健康受试者的循环中。由于这种蛋白普遍存在的性质,MIF可以被认为是不适当的治疗干预靶标。然而,MIF以两种免疫学上不同的构象异构体出现,称为还原MIF(redMIF)和氧化MIF(oxMIF)(Thiele M.等,2015)。发现redMIF是丰富表达的MIF异构体,其可以在任何受试者的细胞质和循环中找到。redMIF似乎代表了一种潜伏的非活性储存形式(Schinagl.A.等,2018)。

[0003] 相反,oxMIF似乎是生理相关的和疾病相关的异构体,其可以在肿瘤组织中,特别是在患有结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌和肺癌的患者的肿瘤组织中被检测到,表明oxMIF的高肿瘤特异性(Schinagl.A.等,2016),而且还在患有炎性疾病的患者的循环中检测(Thiele等,2015)。

[0004] 治疗癌症的成功药物靶标(如以上提及的oxMIF阳性指征)的数量是有限的。例如,描述了超过300种潜在的免疫肿瘤学靶标,但是许多临床研究侧重于抗PD1和抗PDL1抗体(Tang J.,等2018)。因此,科学界和医学界急切地等待靶向肿瘤特异性抗原的潜在药物,以为预后不良的癌症患者增加治疗方案。

[0005] WO 2009/086920A1中描述了单克隆抗MIF抗体。

[0006] 靶向oxMIF的抗体在体外和体内炎症和癌症模型中显示出功效(Hussain F.等,2013;Schinagl.A.等,2016;Thiele等,2015)。在1期临床试验中,oxMIF特异性抗体(伊玛鲁单抗Imalumab)证明了可接受的安全性特征、令人满意的组织穿透性和抗肿瘤活性指征(Mahalingam D.等,2015;Mahalingam D.等2020)。

[0007] WO 2019/234241A1中披露了双特异性抗oxMIF/抗CD3抗体。

[0008] 在生物加工的几个阶段(包括蛋白质表达、纯化和储存)中经常观察到蛋白质聚集,特别是抗体聚集。抗体聚集可能影响治疗蛋白制造过程的总产率,并且可能影响治疗性抗体的稳定性和免疫原性。

[0009] 因此,抗体的蛋白质聚集成为了其发育中的重要问题,并且仍然是抗体生产中的主要关注方面。抗体聚集可能通过以下方面触发:其结构域的部分未折叠,导致单体-单体缔合,随后成核和聚集物生长。尽管抗体和基于抗体的蛋白质的聚集倾向可能受到外部实验条件的影响,但它们强烈依赖于如通过其序列和结构确定的内在抗体特性。

[0010] 例如,可以通过稳定天然状态(即,抵抗解折叠)或通过降低未折叠或部分折叠状态的蛋白质的聚集倾向来实现抗聚集性。稳定天然状态的缺点是蛋白质将很可能暴露在它

们将解折叠的环境中。通常,当蛋白质变性或解折叠时,通常介导在蛋白质内部的分子内接触的氨基酸残基被暴露出来。此类暴露通常使蛋白质易于形成分子间接触和聚集。与抵抗解折叠的蛋白质相反,当解折叠时聚集倾向降低的蛋白质在暴露于此类环境后将容易地再折叠成生物活性的非聚集状态。

[0011] 包含其抗原结合结构域的抗体和蛋白质的抗聚集性或聚集倾向通常受限于其中包含的一个或多个最易于聚集的结构域以及其与周围结构域(如果存在)相互作用的强度。

[0012] 这是因为一旦该结构域解折叠,如果它不能再折叠,则它可能与同一蛋白质或其他蛋白质中的其他结构域相互作用并且形成聚集体。抗体的恒定结构域通常不聚集并且不发生很大变化。因此,就聚集潜在性和稳定性而言,抗体最弱的结构域通常被认为是可变结构域(例如,重链可变结构域(V_H)和/或轻链可变结构域(V_L),Ewert S.等,2003)。就此而言,将易于聚集的V_H或V_L结构域掺入其他稳定的重组抗体产物中通常为新的重组体设计赋予这些通常不希望的特质。因此,将可变结构域工程化成抗聚集性是最有可能使可能包含该可变结构域的整个蛋白质具有抗聚集性。已经提出了减少可变结构域聚集的各种策略,例如,抗聚集性蛋白的合理设计、互补决定区(CDR)移植、或在可变结构域中引入二硫键。抗聚集性蛋白的合理设计通常涉及使用计算机模拟分析来预测点突变对蛋白质聚集倾向的影响。然而,这种方法有几个困难。例如,仅鉴定可能降低解折叠蛋白聚集的突变是不够的。相反,突变也不得增加折叠蛋白的聚集或影响折叠蛋白的功能,尤其是结合特性,例如抗体的亲和力或特异性。此外,合理的设计需要对被改善的特定蛋白质进行详细的结构分析,并且因此,难以用于未被彻底表征的蛋白质,并且不容易应用于各种不同的蛋白质。CDR移植涉及将CDR从一个可变结构域移植到另一个可变结构域的框架区(FR)上。显示了这种策略在稳定抗EGP-2scFv方面是有用的(Willuda J.等,1999)。这种方法的缺点包括在CDR移植后可能发生亲和力降低。这种亲和力损失可以通过向FR中引入突变来克服,然而此类突变可能在蛋白质中产生免疫原性表位,使得从治疗的角度来看蛋白质不再符合需要。此外,CDR移植通常需要分析供体和受体可变结构域的晶体结构或同源性建模,以评估移植的适合性。此类方法很费力并且需要专业知识。此外,由于每个可变结构域具有不同的结构,该方法不容易应用于多种分子。至于涉及将二硫键引入可变结构域的方法,虽然二硫键可能有助于蛋白质正确再折叠,但它也向可变结构域中引入了刚性。此类刚性可能降低抗体对抗原的亲和力。此外,不是所有的可变结构域都可以支持引入二硫键形成所必需的半胱氨酸残基而不损失亲和力或不引入免疫原性表位。此外,在高蛋白质浓度下二硫键的形成可能导致蛋白质聚集,从而抵消二硫键的任何潜在的积极作用。

[0013] 然而,已显示聚集倾向的降低伴随着表达滴度的增加,显示了降低蛋白质聚集在整个发育过程中是有益的并且可以导致更高效的临床研究途径。对于治疗蛋白,聚集体是患者中有害免疫反应的重要风险因素并且可以通过多种机制形成。控制聚集可以改善蛋白质稳定性、可制造性、损耗率、安全性、配制、滴度、免疫原性和溶解度(Wei Li等,2016;Van der Kant R.等,2017)。

[0014] 蛋白质的其他内在特性,例如疏水性,也在抗体溶解度方面发挥重要作用。由于表面疏水性引起的这些治疗蛋白的低溶解度已经显示出使得配制品开发更加困难并且可能导致不良的生物分布、不希望的药代动力学行为和体内免疫原性。因此,降低候选单克隆抗体的整体表面疏水性可以提供与纯化和给药方案相关的益处和成本节约。

[0015] 据信,抗癌作用涉及多种机制。具体地,Fcγ受体(FcγR)IIIA依赖性和FcγRIIA依赖性效应子功能可能是负责治疗性抗体(Ab)的临床功效的两种主要关键机制。已知FcγRIIIA是自然杀伤(NK)细胞中抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的主要触发受体,并且已知FcγRIIA是巨噬细胞中抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的主要触发受体。作为抗体的另一种效应子功能的补体依赖性细胞毒性(CDC)也被认为是一种可能的抗肿瘤机制。已被许可并且开发为医用药剂的大多数治疗性抗体是人IgG1同种型的,其可以诱导ADCC和CDC。这些效应子功能是通过Fc与FcγR或补体相互作用来激活的,并且所述相互作用受到与抗体Fc区附接的N-连接的二分枝复合型寡糖(N-linked biantennary complex-type oligosaccharide)的影响(Natsume等,2009)。几项体外和体内研究证明了抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)是对抗癌细胞的主要作用模式。已经证明这些抗体的抗肿瘤作用需要Ab与针对抗体Fc区的受体(FcR)之间的直接相互作用。因此,携带FcR的免疫效应细胞在介导其效应中起重要作用(Ianello A.和Ahmad A.,2005)。然而,本领域中已知的MIF抗体既不诱导MIF反应性细胞的补体依赖性细胞裂解,也不诱导抗体依赖性细胞毒性(Hussain等,2013)。

[0016] US 2011/236375A1描述了效应子功能增强的Fc变体。

[0017] 降低的聚集潜在性和降低的疏水性的组合将使抗体的特性非常有利。本领域中需要疏水性降低的抗聚集性抗oxMIF抗体,而且还需要效应子功能增强的抗oxMIF抗体,这一需求通过目前的抗体修饰尚未得到满足。

发明内容

[0018] 本发明的目的是提供聚集倾向和疏水性降低的靶向oxMIF的改良抗体或其抗原结合片段。

[0019] 该目的通过本发明的主题解决。

[0020] 本发明公开了一种聚集潜在性降低和疏水性降低的重组抗oxMIF抗体或其抗原结合片段,其包括以下可变结构域:

[0021] (a1)包含SEQ ID NO:9和氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域,或

[0022] (a2)包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:9,进一步包含在位置36的保守酪氨酸以及氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域;以及以下中的一种:

[0023] (b1)包含SEQ ID NO:6的重链可变结构域;或

[0024] (b2)包含SEQ ID NO:6和氨基酸取代L5Q和/或W97Y的重链可变结构域,或

[0025] (b3)包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6和氨基酸取代L5Q和/或W97Y的重链可变结构域;其中氨基酸位置根据Kabat编号,其中与包含缺乏所述氨基酸取代的SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:9的抗体或其抗原结合片段相比,聚集潜在性和疏水性降低。

[0026] 本文还公开了一种聚集潜在性降低和疏水性降低的重组抗oxMIF抗体或其抗原结合片段,其包括以下可变结构域:

[0027] (a)包含SEQ ID NO:9的轻链可变结构域,或与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的包含位置36的酪氨酸的轻链可变结构域,和

[0028] (b)包含SEQ ID NO:6和氨基酸取代W97Y和/或L5Q的重链可变结构域,或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6并且进一步包含氨基酸取代W97Y和/或L5Q的重链可变结构域,其中氨基酸位置根据Kabat编号,其中与包含缺乏所述氨基酸取代的SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:9的抗体或其抗原结合片段相比,聚集潜在性和疏水性降低。

[0029] 具体地,参考SEQ ID NO:9,所述重组抗oxMIF抗体包含氨基酸取代W93F。

[0030] 具体地,参考SEQ ID NO:6,所述重组抗oxMIF抗体包含氨基酸取代W97Y。

[0031] 根据又一个具体实施方案,所述重组抗oxMIF抗体包含氨基酸取代W93F和W97Y。

[0032] 令人惊讶地,已经显示即使在CDR结构域内的选定位置也可以被取代以降低聚集潜在性和/或疏水性,而对oxMIF结合亲和力没有任何负面影响。

[0033] 具体地,所述轻链可变结构域包含氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中的1、2、3、4种或全部。

[0034] 具体地,所述重组抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:38的恒定轻链(CL)结构域。

[0035] 根据一个具体实施方案,本文所述的重组抗oxMIF抗体还具有增强的效应子功能并且包含重链恒定区,所述重链恒定区包含:

[0036] (a)SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸239D和332E的重链恒定区;或

[0037] (b)SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸239D、268F、324T和332E的重链恒定区;或

[0038] (c)SEQ ID NO:4或与SEQ ID NO:4具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸239D和332E的重链恒定区;或

[0039] (d)SEQ ID NO:5或与SEQ ID NO:5具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸235V、243L、292P、300L和396L的重链恒定区,

[0040] 其中氨基酸位置根据EU编号索引编号。

[0041] 具体地,本文所述的抗oxMIF抗体包含VH或VL结构域,所述结构域包含选自SEQ ID NO:7、8、10、11、12和13的氨基酸序列。

[0042] 根据一个替代实施方案,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:6、11以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个。

[0043] 在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:7、10以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个。

[0044] 在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:7、11以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个。

[0045] 在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:8、10以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个。

[0046] 在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:8、11以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个,或者SEQ ID NO:39,或SEQ ID NO:40。

[0047] 在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:8、13以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个,或者SEQ ID NO:41,或SEQ ID NO:42。

[0048] 本文进一步提供了根据权利要求1至3中任一项所述的抗oxMIF抗体,其包含SEQ ID NO:39、40、41或42,或所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:39、44、41或45。

[0049] 更具体地,所述重组抗oxMIF抗体或其抗原结合片段是双特异性抗体。

[0050] 在一个具体实施方案中,本文所述的抗oxMIF抗体选自单特异性和双特异性抗体、scFv、(scFv)2、scFv-Fc、Fab、Fab'、和F(ab')2、Fab'-SH、Fab-scFv融合体、Fab-(scFv)2-融合体、Fab-scFv-Fc、Fab-(scFv)2-Fc、不同抗体的两个单链可变片段(scFv)的融合蛋白(例如,BiTE)、微抗体(minibody)、TandAb®、DutaMab™、DART、和CrossMab®。

[0051] 具体地,本文所述的抗体用于制备药物。

[0052] 具体地,本文提供了一种药物组合物,其包含本发明的抗体,任选地包含药物载体或佐剂。

[0053] 具体地,所述组合物包含约10至250mg/ml的本文所述抗体,特别是包含>50mg/ml。

[0054] 具体地,所述药物组合物配制用于皮下施用。

[0055] 更具体地,所述药物组合物可以用于治疗oxMIF相关病症。

[0056] 具体地,所述组合物用于作为单独的物质施用或与包含一种或多种活性物质的另一种药物组合物组合施用,优选地所述一种或多种活性物质选自抗病毒、抗炎、抗癌、抗血管生成和抗生素物质。

[0057] 在又一个实施方案中,所述药物组合物用于治疗患有炎性疾病、过度增殖性障碍、感染性疾病或癌症的患者,特别是用于治疗哮喘、血管炎、关节炎、脓毒症、脓毒性休克、内毒素性休克、中毒性休克综合征、获得性呼吸窘迫综合征、肾小球性肾炎、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、腹膜炎、肾炎和银屑病、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌和肺癌。

[0058] 本文进一步提供了一种分离的核酸,其编码本发明的抗体。

[0059] 本文还提供了一种表达载体,其包含一种或多种本文所述核酸分子。

[0060] 在又一个实施方案中,提供了一种宿主细胞,其含有本文所述的核酸或表达载体。

[0061] 还提供了一种生产本发明抗体的方法,其包括培养宿主细胞并且从细胞培养物中回收所述抗体。

[0062] 本文进一步提供了一种生产本发明抗体的方法,其包括在宿主细胞中表达编码所述抗体的核酸。

附图说明

[0063] 图1:氨基酸序列

[0064] 图2:新设计抗oxMIF抗体的改善的SEC(A、B)和HIC(C)特征曲线。

[0065] 图3:新设计抗oxMIF抗体与固定化MIF的结合(KD确定)。

[0066] 图4:新设计抗oxMIF抗体与oxMIF和redMIF的差异性结合。

[0067] 图5:在改良的ADCC报告物生物测定中新设计抗oxMIF抗体的效应子功能增强。

[0068] 图6:新设计抗oxMIF抗体C0083的肿瘤穿透性。A:C0008的生物分布(5mg/kg/d);B:C0083的生物分布(5mg/kg/d);C:未处理对照小鼠。

[0069] 图7:新设计抗oxMIF抗体C0083改善的产生。

[0070] 图8:与效应子功能增强但包含C0008的VH和VL结构域的对应物相比(C0097与C0064、C0098与C0065和C0100与C0067比较),效应子功能增强并且疏水性和聚集倾向降低的新设计抗oxMIF抗体的产生改善。

[0071] 图9:证明了新设计抗oxMIF抗体的聚集性和疏水性降低的色谱特征曲线(profile)。(A)在使用1x PBS作为流动相的Enrich 650凝胶过滤柱上C0008(对照抗体,灰色区域)以及效应子功能增强的新设计抗体C0108和C0109的洗脱特征曲线的比较;(B)在HiTrap Butyl HP HIC柱上C0008(对照抗体,灰色区域)以及新设计抗体C0083、C0090、C0108和C0109的洗脱特征曲线的比较。

[0072] 图10:通过FACS确定,新设计抗oxMIF抗体在A2780MIF$^{-/-}$细胞上的非特异性结合减少。将A2780 MIF$^{-/-}$细胞用新设计抗oxMIF抗体C0090、C0109(A);C0083、C0108(B)或对照抗体C0008以及作为阴性对照的同种型IgG染色。相对于抗体浓度绘制活细胞的几何平均值(GeoMean)(AF488的平均荧光强度)。

[0073] 图11:效应子功能增强的新设计抗oxMIF抗体与固定化oxMIF的结合曲线(K_D评估);将抗oxMIF抗体C0008用作参考抗体。

[0074] 图12:新设计抗体与oxMIF和redMIF的差异性结合。将C0008用作参考抗体,并且将同种型IgG用作阴性对照。

[0075] 图13:在BALB/c裸小鼠中新设计抗oxMIF抗体C0083和C0090与对照抗oxMIF抗体C0008相比的药代动力学。在单次静脉内注射10mg/kg的抗oxMIF抗体后4、10、24、48和96h通过定量抗oxMIF ELISA确定抗体的血浆浓度,并且通过GraphPad Prism中的单相衰变模型计算半衰期。

[0076] 图14:通过报告物测定确定的新设计抗体C0108和C0109的效应子功能增强。(A-B)与具有wt Fc的抗oxMIF对照抗体C0008相比,用效应子功能增强的新设计抗体C0108和C0109使用稳定表达FcyRIIIa(V高反应者同种异型,F低反应者同种异型)的工程化Jurkat效应细胞和HCT116-pMIF(A)或A2780-pMIF(B)靶细胞进行ADCC报告物生物测定;(C)与具有wt Fc的抗oxMIF对照抗体C0008相比,用效应子功能增强的新设计抗体C0108和C0109使用稳定表达FcyRIIa的工程化Jurkat效应细胞和HCT116-pMIF靶细胞进行ADCP报告物生物测定。示出了平均值和SEM(n=2-4)。

[0077] 图15:通过PBMC介导的细胞毒性测定确定的在Fc部分中含有增强ADCC/ADCP的突变的新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109的ADCC活性增强。与具有wt Fc的抗oxMIF对照抗体C0008相比,用新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109以及PBMC作为效应细胞(A:22%NK细胞,B:7%NK细胞)和HCT116-pMIF作为靶细胞的ADCC生物测定。示出了使用来自两个健康供体的PBMC的两个或三个重复的平均值和SEM。

[0078] 图16:新设计抗oxMIF抗体显示从人PBMC释放的非特异性细胞因子显著减少。将在Fc部分中含有增强ADCC/ADCP的突变的新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109(70nM)和对照抗oxMIF抗体C0008(70nM)与人PBMC一起孵育过夜,并且在LegendPlex细胞计数珠测定(BioLegend)中分析上清液的人IL-6(A)和人MCP-1(B)。示出了来自三个不同PMBC供体的细胞因子浓度的平均值+/-SEM。

具体实施方式

[0079] 除非另有指示或定义,否则本文所用的所有术语都具有其在本领域中的通常含义,这对技术人员来说将是清楚的。例如参考标准手册,例如分子克隆:实验室手册(Sambrook et al,"Molecular Cloning:ALaboratory Manual"(4th Ed.),Vols.1 -3,

Cold Spring Harbor Laboratory Press(2012));Lewin基因XI(Krebs et al.,"Lewin's Genes XI",Jones&Bartlett Learning,(2017)),以及詹韦免疫生物学(Murphy&Weaver,"Janeway's Immunobiology"(9th Ed.,or more recent editions),Taylor&Francis Inc,2017)。

[0080] 权利要求的主题具体涉及人工产物或者使用或生产此类人工产物的方法,所述人工产物可以是天然(野生型)产物的变体。尽管与天然结构可能存在一定程度的序列同一性,但可以理解的是,本发明的材料、方法和用途(例如,具体是指分离的核酸序列、氨基酸序列、融合构建体、表达构建体、转化的宿主细胞和经修饰的蛋白质)是"人造的"或合成的,因此不应认为是"自然法则"的结果。

[0081] 本文所用的术语"包括"、"包含"、"具有"和"包含"可以用作同义词,并且应当理解为开放性定义,允许存在其他构件或部分或元件。"由…组成"被认为是最封闭的定义,没有组成定义特征以外的其他元件。因此,"包括"更广并且包含"由…组成"的定义。

[0082] 如本文所用的术语"约"是指相同的值或与给定值相差+/-5%的值。

[0083] 如本文和权利要求中所用,单数形式,例如"一个/种(a)"、"一个/种(an)"和"所述(the)"包括复数,除非上下文中另有明确说明。

[0084] 如本文所用,氨基酸是指由61种三联体密码子编码的20种天然存在的氨基酸。这20种氨基酸可以分为带中性电荷、正电荷和负电荷的氨基酸:

[0085] "中性"氨基酸及其相应的三字母和单字母代码和极性如下所示:丙氨酸(Ala,A;非极性,中性)、天冬酰胺(Asn,N;极性,中性)、半胱氨酸(Cys,C;非极性,中性)、谷氨酰胺(Gln,Q;极性,中性)、甘氨酸(Gly,G;非极性,中性)、异亮氨酸(Ile,I;非极,中性)、亮氨酸(Leu,L;非极性,中性)、甲硫氨酸(Met,M;非极性,中性)、苯丙氨酸(Phe,F;非极性,中性)、脯氨酸(Pro,P;非极性,中性)、丝氨酸(Ser,S;极性,中性)、苏氨酸(Thr,T;极性,中性)、色氨酸(Trp,W;非极性,中性)、酪氨酸(Tyr,Y;极性,中性)、缬氨酸(Val,V;非极性,中性)和组氨酸(His,H;极性,阳性(10%),中性(90%))。

[0086] 带"正"电荷的氨基酸是:精氨酸(Arg,R;极性,阳性)和赖氨酸(Lys,K;极性,阳性)。

[0087] 带"负"电荷的氨基酸是:天冬氨酸(Asp,D;极性,阴性)和谷氨酸(Glu,E;极性,阴性)。

[0088] 本发明的抗体或抗原结合片段包含至少一个特异性识别oxMIF的结合位点,并且由于可变重链结构域和轻链结构域中的靶向氨基酸取代而展现出与缺乏所述氨基酸取代的未经修饰的抗体相比降低的聚集倾向和降低的疏水性。

[0089] 聚集潜在性的降低是由于在本文所述抗体的可变结构域中选定位置的氨基酸取代。

[0090] 抗体聚集水平可以使用多种已知技术来测量,包括质谱法、尺寸排阻色谱法(SEC)、疏水相互作用色谱法(HIC)、动态光散射(DLS)、光遮蔽(LO)、动态成像颗粒分析(DIPA)技术,例如微流成像(MFI)、和库尔特计数器(CC)、差示扫描荧光测定术(DSF)。

[0091] 如本文所用,降低的疏水性和降低的聚集潜在性是指与参考抗体例如抗体C0008(其包含如本文公开的SEQ ID NO:1、6、38和9)相比,新设计抗体的表面疏水性降低和聚集潜在性降低。C0008的序列含有在提出的INN列表111(WHO药物信息,第28卷,第2期,2014)中

公布的伊玛鲁单抗的序列,但缺乏C端赖氨酸。可以使用多种已知技术进行测量,包括但不限于疏水相互作用色谱法(HIC)或亲和捕获自相互作用纳米颗粒光谱法(AC-SINS,Estep P.等,2015)。

[0092] 在一个实施方案中,聚集潜在性降低和疏水性降低的本发明oxMIF抗体具体包含具有根据Kabat编号的氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域;或者与SEQ ID NO:9具有至少95%,具体至少96%、97%、98%或99%的序列同一性的包含位置36的天然酪氨酸,并且进一步包含氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域;以及包含SEQ ID NO:6的重链可变结构域;或者包含SEQ ID NO:6的具有根据Kabat编号的氨基酸取代L5Q和/或W97Y的重链可变结构域;或者包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6并且进一步包含氨基酸取代L5Q或W97Y中至少一种的重链可变结构域。

[0093] 在一个替代实施方案中,包含SEQ ID NO:9的轻链可变结构域具有1、2、3、4、5个氨基酸取代,条件是保留位置36的天然酪氨酸并且进一步在位置M30、F49、A51、P80、W93取代至少一个氨基酸。

[0094] 具体地,优选在位置W93和W97的氨基酸取代。

[0095] 此外,优选在位置F49的氨基酸取代。

[0096] 本文进一步描述了聚集潜在性降低和疏水性降低的抗oxMIF抗体,其具体地包含:包含SEQ ID NO:9的轻链可变结构域,或与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的包含位置36的酪氨酸的轻链可变结构域;以及包含SEQ ID NO:6和氨基酸取代W97Y或氨基酸取代L5Q和W97Y的重链可变结构域,或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6并且进一步包含氨基酸取代W97Y(任选地包含L5Q)的重链可变结构域。

[0097] 在轻链位置36的天然酪氨酸保持未被修饰,以保留本文所述抗体的结合特性。在所述氨基酸位置的任何修饰都可能导致不希望的受损结合特性。

[0098] 具体地,可变轻链结构域包含SEQ ID NO:10,并且可变重链结构域包含SEQ ID NO:7。

[0099] 具体地,可变轻链结构域包含SEQ ID NO:10,并且可变重链结构域包含SEQ ID NO:8。

[0100] 具体地,可变轻链结构域包含SEQ ID NO:11,并且可变重链结构域具有SEQ ID NO:6。

[0101] 具体地,可变轻链结构域包含SEQ ID NO:11,并且可变重链结构域包含SEQ ID NO:7。

[0102] 具体地,可变轻链结构域包含SEQ ID NO:11,并且可变重链结构域包含SEQ ID NO:8。

[0103] 具体地,可变轻链结构域包含SEQ ID NO:12,并且可变重链结构域具有SEQ ID NO:6。

[0104] 具体地,可变轻链结构域包含SEQ ID NO:12,并且可变重链结构域包含SEQ ID NO:8。

[0105] 具体地,可变轻链结构域包含SEQ ID NO:13,并且可变重链结构域具有SEQ ID NO:6。

[0106] 具体地,可变轻链结构域包含SEQ ID NO:13,并且可变重链结构域包含SEQ ID NO:8。

[0107] 如本文所用的“效应子功能”意指由抗体Fc区与Fc受体或配体相互作用产生的生物化学事件。效应子功能包括但不限于ADCC、ADCP和CDC。

[0108] 如本文所用的“效应细胞”意指表达一种或多种Fc受体并且介导一种或多种效应子功能的免疫系统细胞。效应细胞包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、B细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞和T细胞,并且可以来自任何生物体,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔和猴。在一个具体实施方案中,本文所述的抗oxMIF抗体还由于在重链恒定区中选定位置的氨基酸取代而具有增强的效应子功能。由于增强的补体介导的和FcR介导的活性而增强的这些抗体的效应子功能可以包括增强的补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。Fc受体介导的ADCC是一种重要的作用机制,抗体通过所述机制靶向患病细胞以进行清除。当靶结合的抗体的Fc效应子部分也结合效应细胞的细胞表面上的Fc γ RIIIA受体时,两种细胞类型发生多重交联,导致ADCC通路激活。

[0109] 具有增强的补体活性的抗体可以通过基于细胞的CDC测定法确定,并且通过例如SPR或ELISA来确定与C1q改善的结合。

[0110] 与参考(即,未经修饰的野生型抗体,例如C0008)相比,提高或增加的CDC活性被确定为至少1.5倍,具体是至少1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍,更具体地至少5倍,更具体地至少6倍增加。

[0111] 与参考抗体(即,未经修饰的野生型抗体,例如C0008)相比,增加的ADCC活性被确定为至少1.5倍,具体是至少1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍,更具体地至少5倍,更具体地至少6倍增加的效力。

[0112] 除了上述轻链和重链可变结构域之外,所述oxMIF抗体可以进一步包含:包含SEQ ID NO:1的至少具有根据EU编号索引的氨基酸取代S239D和I332E的重链恒定区,或与SEQ ID NO:1具有至少95%,具体是至少96%、97%、98%或99%的序列同一性并且至少包含氨基酸取代S239D、I332E并且任选地进一步包含氨基酸取代H268F和/或S324T的功能变体。

[0113] 具体地,所述oxMIF-抗体含有包含SEQ ID NO:2的重链恒定区,或与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸239D和332E的重链恒定区。

[0114] 作为替代方案,所述oxMIF-抗体含有包含SEQ ID NO:3的重链恒定区,或与SEQ ID NO:3具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸239D、268F、324T和332E的重链恒定区。

[0115] 可替代地,所述oxMIF抗体可以进一步含有:包含SEQ ID NO:4的重链恒定区,或与SEQ ID NO:4具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸239D和332E的重链恒定区。

[0116] 在又一个替代实施方案中,所述抗oxMIF抗体可以进一步包含:SEQ ID NO:5的重链恒定区,或与SEQ ID NO:5具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸235V、243L、292P、300L和396L的重链恒定区。

[0117] 在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、7、10和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、7、10和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、7、10和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、7、10和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、7、10和38。

在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、8、10和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、8、10和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、8、10和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、8、10和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、8、10和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、6、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、6、11和38。

[0118] 在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、6、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、6、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、6、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、7、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、7、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、7、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、7、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、7、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、8、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、8、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、8、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、8、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、8、11和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、6、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、6、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、6、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、6、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、6、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、7、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、7、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、7、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、7、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、7、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、8、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、8、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、8、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、8、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、8、12和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、6、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、6、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、6、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、6、13和150。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、6、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、7、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、7、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、7、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、7、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、7、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:1、8、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:2、8、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:3、8、13和38。在又一个实施方案中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:4、8、13和38。在又一个实施方案

中,所述抗oxMIF抗体包含SEQ ID NO:5、8、13和38。

[0119] 本文所述抗体的oxMIF结合位点对氧化形式的MIF具有特异性,即对于动物oxMIF,特别是对于哺乳动物oxMIF,例如但不限于小鼠、大鼠、猴和人,特别是对于人oxMIF,但对还原MIF没有显示出显著的交叉反应性。oxMIF是MIF的疾病相关结构异构体,其可以特定且主要地在患有炎性疾病的受试者的循环中和癌症患者的肿瘤组织中检测到。在一个实施方案中,人源化或人抗oxMIF结合位点包括本文所述人源化或人抗oxMIF结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)轻链互补决定区,诸如包含在例如SEQ ID NO:9、10、11、12或13中的CDR,和/或本文所述人源化或人抗oxMIF结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区,例如SEQ ID NO:6、7或8。

[0120] oxMIF结合特异性可以通过适于确定与oxMIF选择性结合的任何测定来确定,例如关于与oxMIF结合的针对对照抗体(诸如伊玛鲁单抗)的任何竞争测定,或者本领域中已知和如本文公开的各种测定。

[0121] 术语“抗体”在本文中以最广泛的意义使用,并且涵盖由抗体结构域组成或包含抗体结构域的多肽或蛋白质,所述抗体结构域应理解为具有或没有接头序列的免疫球蛋白重链和/或轻链的恒定和/或可变结构域。该术语涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体、三特异性抗体)和抗体片段,只要它们展现出所希望的抗原结合活性,即与oxMIF的结合。该术语还涵盖融合蛋白,例如与免疫毒素或抗体缀合物的融合体,例如与oxMIF结合的抗体药物缀合物。

[0122] 抗体结构域可以是天然结构的或通过诱变或衍生修饰的,例如以改良抗原结合特性或任何其他特性,例如稳定性或功能特性,例如与Fc受体的结合,例如FcRn和/或Fc-γ受体的结合。如果多肽序列包含由通过环序列连接的抗体结构域结构的至少两条β链组成的β-桶状结构,则被认为是抗体结构域。

[0123] 应当理解,术语“抗体”包括抗原结合衍生物及其片段。衍生物是本发明的一种或多种抗体结构域或抗体的任何组合和/或融合蛋白,在所述融合蛋白中本发明抗体的任何结构域可以在一种或多种其他蛋白(例如其他抗体或抗体形式,例如,包含CDR环的结合结构、受体多肽,而且还有配体、支架蛋白、酶、标记、毒素等)的任何位置融合。

[0124] 术语“抗体”应具体地是指展现出与靶抗原oxMIF结合特性的多肽或蛋白质。

[0125] “抗体片段”是指除完整抗体以外的分子,所述分子包含完整抗体的抗原结合部分,所述抗原结合部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab’-SH、单链抗体分子(例如,scFv)、Fab-scFv融合体、Fab-$(scFv)_2$、Fab-scFv-Fc、Fab-$(scFv)_2$-Fc、$F(ab')_2$、ScFv-Fc、双抗体、交叉-Fab片段;线性抗体;和由抗体片段形成的多特异性抗体。另外,抗体片段包含单链多肽,所述单链多肽具有VH结构域的特征,即能够与VL结构域装配在一起,或者具有VL结构域的特征,即能够与VH结构域装配在一起成功能性抗原结合位点,并且从而提供全长抗体的抗原结合特性。如本文提及的抗体片段还涵盖包含一个或多个含有抗原结合区的结构环区的Fc结构域,例如Fcab™;或具有IgG结构的全长抗体形式,其中Fc区已被含有第二种不同抗原结合位点的Fcab™替代。

[0126] 术语“功能变体”或“功能活性变体”还包括天然存在的等位基因变体以及突变体或任何其他非天然存在的变体。如本领域已知的,等位基因变体,或也称为同源物,是核酸或肽的替代形式,其特征为具有一个或多个核苷酸或氨基酸的取代、缺失或添加,其基本上

不改变核酸或多肽的生物功能。具体地,功能变体可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸残基的取代、缺失和/或添加或其组合,所述取代、缺失和/或添加是保守性修饰并且不改变抗原结合特性。具体地,如本文所述的功能变体包含不超过或最多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸的取代、缺失和/或添加,所述取代、缺失和/或添加是保守性修饰并且不改变抗体的功能。具体地,如本文所述的功能活性变体包含最多15个,优选最多10或5个氨基酸取代、缺失和/或添加,所述取代、缺失和/或添加是保守性修饰并且不改变抗体的功能。

[0127] 通过多肽或核苷酸序列中的序列改变,例如通过一个或多个点突变,可以获得功能变体,其中当在本发明组合中使用时,序列改变保留或改善了未改变的多肽或核苷酸序列的功能。此类序列改变可以包括但不限于(保守性)取代、添加、缺失、突变和插入。保守性取代是发生在氨基酸家族中的取代,所述取代在它们的侧链和化学特性上是相关的。此类家族的例子是具有碱性侧链、酸性侧链、非极性脂族侧链、非极性芳族侧链、不带电荷的极性侧链、小侧链、大侧链等的氨基酸。

[0128] 点突变应具体理解为对多核苷酸的工程化,其导致与非工程化氨基酸序列不同的氨基酸序列的表达,所述不同在于对不同氨基酸进行一个或多个单一(非连续)或成对氨基酸的取代或交换、缺失或插入。

[0129] 如本文所用,“Fab片段或Fab”所指的抗体片段包含含有轻链(CL)的VL结构域和恒定结构域的轻链片段以及重链的VH结构域和第一恒定结构域(CH1)。本发明的抗体可以包含至少一个Fab片段,其中重链和轻链的可变区或恒定区被交换。由于可变区或恒定区的交换,所述Fab片段也称为“交叉-Fab片段(cross-Fab fragment)”或“交叉Fab片段(crossover Fab fragment)”。交叉Fab分子可能有两种不同的链组成,并且包含在本发明的抗体中:Fab重链和轻链的可变区可以交换,即交叉Fab分子包含由轻链可变区(VL)和重链恒定区(CH1)构成的肽链,以及由重链可变区(VH)和轻链恒定区(CL)构成的肽链。这种交叉Fab分子也称为CrossFab(VLVH)。当Fab重链和轻链的恒定区交换时,交叉Fab分子可以包含由重链可变区(VH)和轻链恒定区(CL)构成的肽链,以及由轻链可变区(VL)和重链恒定区(CH1)构成的肽链。这种交叉Fab分子也称为CrossFab(CLCH1)。

[0130] “(scFv)2”是指一种人工单克隆抗体,其为由不同抗体或相同抗体的两个单链可变片段(scFv),或在约50千道尔顿的单肽链上的来自四个或两个不同基因的氨基酸序列组成的融合蛋白。

[0131] “bs(scFv)2”是指一种人工单克隆抗体,其为由具有不同靶抗原的抗体的两个单链可变片段(scFv),或在约50千道尔顿的单链肽链上的来自四个不同基因的氨基酸序列组成的融合蛋白。

[0132] “单链Fab片段”或“scFab”是由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定结构域1(CH1)、抗体轻链可变结构域(VL)、抗体轻链恒定结构域(CL)和接头组成的多肽,其中所述抗体结构域和所述接头在N端到C端方向上可以具有以下顺序:VH-CH1-接头-VL-CL、VL-CL-接头-VH-CH1、VH-CL-接头-VL-CH1或VL-CH1-接头-VH-CL;其中所述接头是至少20个氨基酸、至少30个氨基酸、特别是32至50个氨基酸的多肽。所述单链Fab片段VH-CH1-接头-VL-CL、VL-CL-接头-VH-CH1、VH-CL-接头-VL-CH1和VL-CH1-接头-VH-CL可以通过在CL结构域与CH1结构域之间的天然二硫键来稳定。另外,这些单链Fab分子可以通过经由插入半胱氨酸

残基产生链间二硫键而进一步稳定。

[0133] 术语“N端”表示N端的最后一个氨基酸。

[0134] 术语“C端”表示C端的最后一个氨基酸。

[0135] “双特异性T细胞衔接子”的“BiTE”是指一种人工单克隆抗体,其为由不同抗体的两个单链可变片段(scFv),或在约50千道尔顿的单链肽链上的来自四个不同基因的氨基酸序列组成的融合蛋白。所述scFv中的一个可以例如但不限于结合至T细胞(例如,经由CD3),另一个经由oxMIF结合至肿瘤细胞。具体地,BiTE为约50kDa。

[0136] 术语“微抗体”是指由以下构成的抗体:经由CH3结构域连接的一对单链Fv片段(单链Fv-CH3)以及通过异二聚化过程与前一部分配对的具有不同特异性的Fv(Hu S.Z.等,1996,Cancer Research,56,3055-3061)。为了促进异二聚化效率,可以将单残基突变引入每个CH3结构域中,以实现“杵臼(knobs-into-hole)”方法。不仅如此,也可以将另外的半胱氨酸残基引入CH3结构域中以稳定双特异性微抗体结构。TriBi微抗体(一种微抗体形式)包含设计为经由其两个Fv片段识别抗原的链,而另一条具有Fv片段的链负责募集效应细胞,例如T细胞毒性细胞或NK细胞。由于添加了这个额外的结合结构域,TriBi微抗体的亲和力高于双特异性微抗体的亲和力。具体地,微抗体为约75kDa。

[0137] 术语“**DART®**”是指双亲和力再靶向抗体,其为最简单形式的双特异性抗体(BsAb)。DART分子由两个工程化Fv片段组成,所述片段自身的VH与另一个交换。Fv1由来自抗体A的VH和来自抗体B的VL组成,而Fv2由来自Ab-B的VH和来自Ab-A的VL组成。Fv结构域的这种相互交换通过短连接肽从构象束缚中释放变体片段。

[0138] 术语“DutaMab™”是指一种BsAb形式,它通过连接单个免疫球蛋白链中的两个独立互补位而形成。

[0139] 术语“**TandAb®**”或“串联抗体”是指具有串联的来自两种不同Fv的两对VL/VH的抗体,这也意味着串联抗体不携带Fc结构域。TandAb小于完整IgG或IgG衍生的双特异性Ab,但大于单结构域双特异性Ab。适中的大小也赋予TandAb增加的组织穿透能力和更长的血清半衰期。另外,四价特性(这意味着每种抗原都是二价的)可以改善其结合效率和随后的治疗效果。具体地,TandAb为约100kDa。

[0140] 术语“双抗体”是指单链Fv(scFv)片段的非共价二聚体,其由通过小肽接头连接的重链可变(VH)和轻链可变(VL)区组成。双抗体的另一种形式是单链$(Fv)_2$,其中两个scFv片段彼此共价连接。另外,通过用内部接头串联连接每条链中的基因,四个VH和VL结构域可以串联表达并且折叠为单链双抗体(scDb),这也是产生双特异性抗体的有效策略。此外,将重组可变结构域融合到Fc区或CH3结构域(scDb-Fc和scDb-CH3,双抗体-CH3)可以使最终产物的化合价加倍。增加的大小也可以延长双抗体在血清中的半衰期。具体地,双抗体-CH3为约125kDa。

[0141] 术语“**crossMab®**”(其中Mab是指单克隆抗体)是一种源自独立亲本抗体的双特异性Ab形式。通过应用杵臼(KIH)方法来避免重链错配。避免了轻链错配,因为双特异性抗体是用抗体结构域交换产生的,而一个Fab臂的可变结构域或恒定结构域(CL和CH1)在轻链与重链之间交换。这种“交叉”保持了抗原结合亲和力,并且也保留了两个不同的臂,从而避免轻链错配。CrossMab的例子可以是但不限于在不同区域中交换的Fab、VH-VL和CH1-CL。在CrossMAb Fab中,完整的VH-CH1和VL-CL区被交换;在CrossMAb VH-VL形式中,仅交换VH和

VL区;在CrossMAb CH1-CL1形式中,双特异性抗体的CH1和CL区被交换。具体地,CrossMab为约150kDa。

[0142] 术语“IgG-scFv”是指一种双特异性抗体,其通过将两个scFv分别融合到单特异性IgG上而工程化为双特异性。每个scFv的特异性可以相同或不同。此外,每个轻链或重链的氨基或C端可以附加成对抗体可变结构域,这导致产生多样类型的IgG-scFv BsAb:IgG(H)-scFv或scFv-(H)IgG:IgG(H)-scFv,连接到全长IgG HC的C端的具有相同特异性的两个scFv;scFv-(H)IgG,与IgG(H)-scFv相似,除了scFv连接到HC N端。IgG(L)-scFv或scFv-(L)IgG:连接到IgG轻链的C端或N端的两个相同scFv,分别形成IgG(L)-scFv或scFv-(L)IgG。2scFv-IgG或IgG-2scFv:通过将具有不同特异性的两对scFv融合至N端(2scFv-IgG)或C端(IgG-2scFv)而产生。具体地,IgG(H)-scFv为约200kDa。

[0143] 根据一个具体实施方案,本文所述的抗体可以包含一个或多个用于纯化和/或检测的标签,例如但不限于亲和力标签、溶解度增强标签和监测标签。

[0144] 具体地,亲和力标签选自聚组氨酸标签、聚精氨酸标签、抗体的肽底物、几丁质结合结构域、RNAse S肽、蛋白A、β-半乳糖苷酶、FLAG标签、Strep II标签、链霉亲和素结合肽(SBP)标签、钙调素结合肽(CBP)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、S-标签、HA标签和c-Myc标签,具体地,所述标签是包含一个或多个H的His标签,例如六组氨酸标签。

[0145] “融合”或“连接”意指组分(例如,Fab分子和Fc结构域亚基)通过肽键直接或经由一个或多个肽接头连接。

[0146] 如本文所用的术语“接头”是指肽接头,并且优选是长度为2、3、4、5、6、7或更多个氨基酸,优选长度为2-10,更优选长度为3-5个氨基酸的氨基酸序列的肽。

[0147] 术语“免疫球蛋白”是指具有天然存在的抗体的结构的蛋白质。例如,IgG类型的免疫球蛋白是由二硫键结合的两条轻链和两条重链构成的约150,000道尔顿的异源四聚糖蛋白。从N端到C端,每条重链具有可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,其后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),也称为重链恒定区。类似地,从N端到C端,每条轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,其后是恒定轻(CL)结构域,也称为轻链恒定区。IgG类型的免疫球蛋白基本上由通过免疫球蛋白铰链区连接的两个Fab分子和一个Fc结构域组成。免疫球蛋白的重链可以分配至五种类型之一,称为α(IgA)、δ(IgD)、ε(IgE)、γ(IgG)或μ(IgM),其中一些可以进一步分为亚型,例如γ_1(IgG_1)、γ_2(IgG_2)、γ_3(IgG_3)、γ_4(IgG_4)、α_1(IgA_1)和α_2(IgA_2)。免疫球蛋白的轻链可以分配至两种类型(称为卡帕(κ)型和拉姆达(λ)型)之一。

[0148] 术语“嵌合抗体”是指一种抗体,其中重链和/或轻链的一部分源自特定的来源或物种,而重链和/或轻链的剩余部分源自不同的来源或物种,通常通过重组DNA技术制备。嵌合抗体可以包含兔或鼠可变区和人恒定区。嵌合抗体是包含编码免疫球蛋白可变区的DNA区段和编码免疫球蛋白恒定区的DNA区段的表达免疫球蛋白基因的产物。用于产生嵌合抗体的方法涉及常规重组DNA,并且基因转染技术是本领域众所周知的(Morrison,S.L.,等,1984)。

[0149] “人抗体”具有的氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列或者源自利用人抗体库或其他人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。人抗体的这一定义明确地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。还如针对嵌合和人源化抗体所提

及的,如本文所用的术语“人抗体”还包括在恒定区中被修饰的此类抗体,例如通过“类型转换”,即Fc部分的改变或突变(例如,IgG1到IgG4和/或IgG1/IgG4突变)。

[0150] 如本文所用的术语“重组人抗体”旨在包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如从宿主细胞(例如HEK细胞、NSO或CHO细胞)中或从针对人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如,小鼠)中分离的抗体,或者使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体。重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列,其虽然源自人类种系序列并且与人类种系序列相关,但可能不会天然存在于体内的人抗体库内。

[0151] “人共有框架”是一种代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常出现的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,所述序列的亚组是如在Kabat等,1991中描述的亚组。

[0152] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自经历人源化的人框架区(FR)的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个并且通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。本发明涵盖的其他形式的人源化抗体,其中已经从原始抗体的恒定区进行了对恒定区的额外修饰或改变,以产生新的特性,例如在C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合方面。

[0153] 如本文所用的术语“双特异性”应是指至少与oxMIF抗原和另一种抗原(例如但不限于例如CD3抗原)的结合反应。双特异性抗体具体地可以包含至少两个具有特异性结合特性的位点,其中所述抗体识别两种不同的靶抗原、oxMIF和另一种抗原。示例性的双特异性抗体形式可以包含两个结合位点,其中每个结合位点能够特异性结合不同的抗原,例如CD3和oxMIF。另一个示例性的双特异性形式可以包含多于两个结合位点,其中一个或多个结合位点结合至oxMIF,一个或多个结合位点能够特异性结合一个或多个不同的抗原,例如CD3。

[0154] 根据本发明的“双特异性抗体”是具有两种不同结合特异性的抗体。双特异性抗体可以制备成全长抗体或抗体片段,如本文所述。免疫球蛋白Fc异二聚体可以通过对CH3结构域界面的修饰来工程化,其中在每个结构域上具有不同的突变,使得携带CH3变体对的工程化Fc片段优先形成异二聚体而不是同二聚体(Ha J-H.等,2016)。双特异性抗体形式的例子可以是但不限于双特异性IgG(BsIgG)、附加有额外抗原结合部分的IgG、BsAb片段、双特异性融合蛋白、BsAb缀合物、杂交bsIgG、仅可变结构域的双特异性抗体分子、CH1/CL融合蛋白、Fab融合蛋白、经修饰的Fc和CH3融合蛋白、附加有IgG的HC融合体、附加有IgG的LC融合体、附加有IgG的HC和LC融合体、Fc融合体、CH3融合体、IgE/IgM CH2融合体、$F(ab')_2$融合体、CH1/CL、经修饰的IgG、非免疫球蛋白融合蛋白、Fc修饰的IgG、双抗体等,如Spiess C.等,2015以及Brinkmann U.和Kontermann R.E.,2017中所述。

[0155] 本发明的oxMIF抗体可以进一步包含至少一个结合位点,其特异性识别另一个表位,例如,CD3的表位,特别是人CD3的表位,包括细胞表面上存在的CD3γ(γ)链、CD3δ(δ)链和两条CD3ε(ε)链。T细胞上CD3的簇集,例如通过固定化抗CD3抗体,导致T细胞激活,类似于T细胞受体的衔接,但不依赖于其克隆典型的特异性。在某些实施方案中,本文所述抗体的CD3结合结构域不仅展现出与人CD3的有效CD3结合亲和力,而且还显示出与相应的食蟹猴CD3蛋白的优异交叉反应性。在一些情况下,抗体的CD3结合结构域与来自食蟹猴的CD3交叉

反应。在一个实施方案中,抗CD3结合位点包含本文所述抗CD3结合结构域的一个或多个(例如,所有三个)轻链互补决定区和/或本文所述抗CD3结合结构域的一个或多个(例如,所有三个)重链互补决定区,例如抗CD3结合结构域包含一个或多个(例如,所有三个)LC CDR和一个或多个(例如,所有三个)HC CDR。

[0156] 具体地,抗oxMIF抗体包括针对CD3的第二种或另一种结合特异性,如WO2019234241A1中所述。此类双特异性抗oxMIF抗体可以包含特异性识别CD3的结合位点,其包含:

[0157] (a)重链可变区,所述重链可变区包含:

[0158] CDR1-H2序列,其包含选自RYTMH(SEQ ID NO:14)、GYGMH(SEQ ID NO:15)和SFPMA(SEQ ID NO:16)的任一个序列或与其具有至少70%,特别是80%、90%、95%或99%的序列同一性,和

[0159] CDR2-H2,其包含选自YINPSRGYTNYNQKFKD(SEQ ID NO:17)、VIWYDGSKKYYVDSVKG(SEQ ID NO:18)和TISTSGGRTYYRDSVKG(SEQ ID NO:19)的任一个序列或与其具有至少70%,特别是80%、90%、95%或99%的序列同一性,和

[0160] CDR3-H2,其与选自YYDDHYCLDY(SEQ ID NO:20)、QMGYWHFDL(SEQ ID NO:21)、FRQYSGGFDY(SEQ ID NO:22)和YYDDHYSLDY(SEQ ID NO:23)的任一个序列具有至少70%,特别是80%、90%、95%或99%的序列同一性,以及

[0161] (b)轻链可变区,所述轻链可变区包含:

[0162] CDR1-L2,其包含选自RASSSVSYMN(SEQ ID NO:24)、SASSSVSYMN(SEQ ID NO:25)、RASQSVSSYLA(SEQ ID NO:26)和TLSSGNIENNYVH(SEQ ID NO:27)的任一个序列或与其具有至少70%,特别是80%、90%、95%或99%的序列同一性,和

[0163] CDR2-L2,其包含选自DTSKVAS(SEQ ID NO:28)、DTSKLAS(SEQ ID:NO 29)、DASNRAT(SEQ ID NO:30)和DDDKRPD(SEQ ID NO:31)的任一个序列或与其具有至少70%,特别是80%、90%、95%或99%的序列同一性,和

[0164] CDR3-L2,其包含选自QQWSSNPLT(SEQ ID NO:32)、QQWSSNPFT(SEQ ID NO:33)、QQRSNWPPLT(SEQ ID NO:34)、SQWLYGMDV(SEQ ID NO:35)和QQWSSNP(SEQ IDNO:36)的任一个序列或与其具有至少70%,特别是80%、90%、95%或99%的序列同一性。

[0165] 更具体地,双特异性抗oxMIF/抗CD3抗体在以上列出的每个CDR序列中包含0、1或2个点突变。

[0166] 另一个具体实施方案涉及抗oxMIF/抗CD3bs(scFv)2,其中相应的可变重链区(VH)和相应的可变轻链区(VL)区从N端到C端以VH(oxMIF)-V_L(oxMIF)-VH(CD3)-VL(CD3)、VH(CD3)-VL(CD3)-VH(oxMIF)-VL(oxMIF)或VH(CD3)-VL(CD3)-VL(oxMIF)-VH(oxMIF)的顺序排列。

[0167] 在又一个实施方案中,所述抗体是双特异性抗体,特别地选自双特异性IgG、附加CD3结合位点的IgG、BsAb片段、双特异性融合蛋白、BsAb缀合物。

[0168] 如本文中可与术语“靶”或“靶抗原”互换使用的术语“抗原”应是指全靶分子或被抗体结合位点识别的此类分子的片段。具体地,抗原的亚结构(例如,多肽或碳水化合物结构,通常称为“表位”,例如免疫相关的B细胞表位或T细胞表位)可以被此类结合位点识别。

[0169] 如本文所用的术语“表位”具体所指的分子结构,其可以完全构成针对本发明抗体

形式的结合位点的特异性结合配偶体或者是特异性结合配偶体的一部分。表位可以由碳水化合物;肽结构;脂肪酸;有机、生物化学或无机物质或其衍生物及其任何组合构成。如果表位包含在肽结构(例如肽、多肽或蛋白质)中,它将通常包含至少3个氨基酸,具体是5至40个氨基酸,并且具体是少于10个氨基酸,具体是4至10个的氨基酸。表位可以是线性表位或构象表位。线性表位由多肽或碳水化合物链的一级序列的单区段构成。线性表位可以是连续或重叠的。构象表位由氨基酸或碳水化合物构成,所述氨基酸或碳水化合物通过折叠多肽而在一起形成三级结构,并且氨基酸在线性序列中不一定彼此相邻。此类oxMIF表位可以是位于oxMIF中心区内的序列EPCALCS(SEQ ID NO:43)。

[0170] 术语“抗原结合结构域”或“结合结构域”或“结合位点”是指抗原结合部分的一部分,其包含特异性结合至并且互补于抗原的部分或全部的区域。当抗原很大时,抗原结合分子可以仅结合至抗原的特定部分,该特定部分称为表位。抗原结合结构域可以通过例如一个或多个抗体可变结构域(也称为抗体可变区)来提供。优选地,抗原结合结构域包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0171] 如本文中关于本发明抗体所用的术语“结合位点”是指能够与抗原结合相互作用的分子结构。典型地,结合位点位于抗体的互补决定区(CDR)内,本文也称为“CDR结合位点”,它是具有赋予各种抗原结合功能的不同结构的特定区域。不同结构可以源自天然抗体库,例如鼠或人库,或者可以重组或合成产生,例如通过诱变并且具体是通过随机化技术。这些包括诱变的CDR区、可变抗体结构域的环区,特别是抗体的CDR环,例如VL和/或VH抗体结构域中的任一个的CDR1、CDR2和CDR3环。如根据本发明使用的抗体形式典型地包含一个或多个CDR结合位点,每个位点对一种抗原具有特异性。

[0172] 如本文所用的术语“特异性”应是指在异质分子群体中决定目标同源配体的结合反应。本文中,结合反应至少与oxMIF抗原发生。因此,在指定条件(例如,免疫测定条件)下,特异性结合其特定靶标的抗体不会以显著的量结合至样品中存在的其他分子,具体地,它不会显示出与还原MIF显著的交叉反应性。

[0173] 特定的结合位点通常不与其他靶标发生交叉反应。再者,特异性结合位点可以特异性结合至靶标的一个或多个表位、异构体或变体,或者与其他相关靶抗原,例如同源物或类似物交叉反应。

[0174] 特异性结合意指就针对所选定的靶标特性;高、中或低结合亲和力或亲合力而言,结合是选择性的。如果与非靶抗原的抗原的结合常数或结合动力学相比,与靶抗原例如oxMIF的结合常数或结合动力学相差至少10倍,优选相差至少100倍,更优选至少1000倍,则通常实现选择性结合。

[0175] 如本申请中所用的术语“价”表示抗体分子中存在特定数量的结合位点。因此,术语“二价”、“四价”和“六价”分别表示在抗体分子中存在两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。

[0176] 如本文中关于抗体结合位点所用的术语“单价”应是指包含仅一个针对靶抗原的结合位点的分子。因此,术语“价”被理解为针对相同靶抗原的结合位点的数量,所述结合位点特异性结合抗原的相同或不同表位。

[0177] 本发明的抗体被理解为包含特异性结合oxMIF的单价、二价、四价或多价结合位点。

[0178] 根据又一个实施方案,抗体可以包含一个或多个另外的结合位点,其特异性识别效应T细胞、NK细胞或巨噬细胞上表达的一种或多种抗原,特别是CD3、ADAM17、CD2、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11a、CD11b、CD14、CD16、CD16b、CD25、CD28、CD30、CD32a、CD40、CD 40L、CD44、CD45、CD56、CD57、CD64、CD69、CD74、CD89、CD90、CD137、CD177、CEAECAM6、CEACAM8、HLA-Dra cahin、KIR、LSECtin或SLC44A2中的一种或多种。

[0179] 根据一个替代实施方案,本发明的抗体是双特异性抗体,其进一步包含莫妥珠单抗(mosunetuzumab)、帕妥昔珠单抗(pasotuxizumab)、赛必妥单抗(cibisatamab)、奥昔组单抗(otelixizumab)、替利组单抗(teplizumab)、维西珠单抗(visilizumab)或福雷芦单抗(foralumab)的CD3可变结合结构域中的一种或多种。

[0180] 根据一个具体实施方案,抗CD3结合位点包含选自以下的互补决定区(CDR):莫罗单抗(muromonab)-CD3(OKT3)、奥昔组单抗(TRX4)、替利组单抗(MGA031)、维西珠单抗(Nuvion)、索利托单抗(solitomab)、博纳吐单抗(blinatumomab)、帕妥昔珠单抗、赛必妥单抗、莫妥珠单抗、SP34、X35、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1和WT-31及其任何人源化衍生物,如果适用的话。

[0181] 具体地,包含莫罗单抗、奥昔组单抗、替利组单抗、维西珠单抗、索利托单抗、博纳吐单抗、帕妥昔珠单抗、赛必妥单抗、莫妥珠单抗的任何CDR序列或与其具有至少70%,具体是80%、90%、95%或99%序列同一性的抗CD3可变区或CDR中的一个或多个CDR可以用作根据本发明的CD3结合结构域。

[0182] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域的在序列上是高变的和/或形成结构上确定的环(“高变环”)的每个区域。通常,天然四链抗体包含六个HVR;三个在VH(H1、H2、H3)中,三个在VL(L1、L2、L3)中。HVR通常包含来自高变环和/或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列可变性和/或参与抗原识别(Kabat等,1991)。高变区(HVR)也称为互补决定区(CDR),并且这些术语在本文中关于可变区的形成抗原结合区的部分可互换使用。包含特定CDR的确切残基数将根据CDR的序列和大小而变化。在给定抗体的可变区氨基酸序列的情况下,本领域技术人员可以常规地确定哪些残基包含特定CDR。

[0183] Kabat定义了可应用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员可以毫无疑义地将这种“Kabat编号”系统分配至任何可变区序列,而不依赖于序列本身以外的任何实验数据。对于给定的抗体,残基的Kabat编号可以通过将抗体序列的同源区域与“标准”Kabat编号序列进行比对来确定。如本文所用,“Kabat编号”是指由Kabat等(目标免疫蛋白质序列,Kabat et al.,1983,U.S.Dept.of Health and Human Services,″Sequence of Proteins of Immunological Interest″)提出的编号系统。除非另有说明,否则对抗体可变区中特定氨基酸残基位置的编号都是根据Kabat编号系统进行参考的。恒定区的编号是根据EU编号索引的。

[0184] CDR还包含“特异性决定残基”或“SDR”,它们是接触抗原的残基。SDR包含在称为简略-CDR或a-CDR的CDR区中。除非另有指示,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如,FR残基)在本文中是根据前述Kabat等编号的。

[0185] “点突变”具体理解为对多核苷酸的工程化,其导致与非工程化氨基酸序列不同的氨基酸序列的表达,所述不同在于对不同氨基酸进行一个或多个单一(非连续)或成对氨基酸的取代或交换、缺失或插入。优选的点突变是指相同极性和/或电荷的氨基酸的交换。在这方面,氨基酸是指由61种三联体密码子编码的20种天然存在的氨基酸。这20种氨基酸可以分为带中性电荷、正电荷和负电荷的氨基酸。

[0186] 关于本文鉴定的多肽序列的“序列同一性百分比(%)”定义为在比对序列和引入空位(如有必要)以达到最大序列同一性百分比之后,候选序列中与特定多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分。本领域技术人员可以确定用于测定比对的适当参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0187] 根据本发明,可变区或恒定区序列与本文所述相应序列的序列同一性为至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%。

[0188] “受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如,牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物,例如猴)、兔和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或受试者是人。

[0189] “分离的”核酸是指已从其自然环境的组分中分离出的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中所含的核酸分子,但所述核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0190] “编码抗oxMIF的分离的核酸”是指一个或多个编码抗体重链和轻链的核酸分子(或其片段),包括在单一载体或分离载体中的一个或多个此类核酸分子以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置的一个或多个此类核酸分子。

[0191] “无显著交叉反应性”意指分子(例如,抗体)不识别或特异性结合与所述分子的实际靶抗原不同的抗原(例如,与靶抗原密切相关的抗原),具体是还原MIF,特别是当与该靶抗原相比时。例如,抗体可以以少于约10%至少于约5%结合至与实际靶抗原不同的抗原,或者可以以由以下组成的量结合所述与实际靶抗原不同的抗原:少于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%或0.1%,优选少于约2%、1%或0.5%并且最优选少于约0.2%或0.1%结合至与实际靶抗原不同的抗原。结合可以通过本领域已知的任何方法来确定,例如但不限于ELISA或表面等离子体共振。

[0192] 本发明抗体的重组产生优选使用表达系统,例如包括包含编码抗体形式的核苷酸序列的表达构建体或载体。

[0193] 术语“表达系统”是指含有可操作连接的希望编码序列和控制序列的核酸分子,使得用这些序列转化或转染的宿主能够产生编码的蛋白质。为了实现转化,表达系统可以包含在载体上;然而,相关的DNA也可以然后整合到宿主染色体中。可替代地,表达系统可以用于体外转录/翻译。

[0194] 本文所用的“表达载体”定义为克隆的重组核苷酸序列(即,重组基因)的转录以及其mRNA在合适的宿主生物体中的翻译所需的DNA序列。表达载体包含表达盒,并且另外通常包含用于在宿主细胞中自主复制的起点或基因组整合位点、一个或多个选择性标记(例如,氨基酸合成基因或赋予抗生素抗性的基因,所述抗生素例如博莱霉素、卡那霉素、G418或潮霉素)、许多限制性酶切割位点、合适的启动子序列和转录终止子,所述组件可操作地连接

在一起。如本文所用的术语“质粒”和“载体”包括自主复制的核苷酸序列以及基因组整合的核苷酸序列。

[0195] 具体地,该术语所指的载体,通过所述载体,可以将DNA或RNA序列(例如,外来基因)(例如,编码本发明抗体形式的核苷酸序列)引入宿主细胞中,从而转化宿主并且促进所引入序列的表达(例如,转录和翻译)。质粒是本发明的优选载体。

[0196] 载体典型地包含转移因子(transmissible agent)的DNA,其中插入外来DNA。将一个DNA区段插入另一个DNA区段中的常见方法涉及使用称为限制性酶的酶,其在称为限制性位点的特定位点(特定组的核苷酸)处切割DNA。

[0197] “盒”是指编码表达产物的DNA编码序列或DNA区段,其可以插入载体中限定的限制性位点处。盒限制性位点设计为确保盒插入正确的阅读框。通常,将外来DNA插入载体DNA的一个或多个限制性位点处,然后与转移载体DNA一起被载体带入宿主细胞中。已插入或添加DNA的DNA区段或序列,例如表达载体,也可以称为“DNA构建体”。一种常见类型的载体是“质粒”,它通常是独立的双链DNA分子,其可以容易地接受额外的(外来的)DNA并且可以容易地被引入合适的宿主细胞中。本发明的载体通常含有编码DNA和表达控制序列,例如启动子DNA,并且具有一个或多个适用于插入外来DNA的限制性位点。编码DNA是编码特定多肽或蛋白质(例如本发明的抗体形式)的特定氨基酸序列的DNA序列。启动子DNA是启动、调节或在其他方面介导或控制编码DNA的表达的DNA序列。启动子DNA和编码DNA可以来自相同的基因或不同的基因,并且可以来自相同或不同的生物体。本发明的重组克隆载体将通常包含一个或多个用于克隆或表达的复制系统、一个或多个用于在宿主中选择(例如,抗生素抗性)的标记以及一个或多个表达盒。

[0198] 用于连接DNA序列(例如,分别提供或编码本发明的因子和/或感兴趣的蛋白质、启动子、终止子和其他序列)并且将它们插入含有整合或宿主复制所需的信息的合适载体中的程序是本领域技术人员众所周知的,例如由Sambrook等,2012所述。

[0199] 宿主细胞具体理解为用表达构建体(例如根据本发明的载体)转染的细胞、重组细胞或细胞系。

[0200] 如本文所用的术语“宿主细胞系”是指已建立的特定细胞类型的克隆,其获得了在延长的时间段内增殖的能力。该术语宿主细胞系是指如用于表达内源或重组基因以产生多肽(例如本发明的重组抗体形式)的细胞系。

[0201] “生产宿主细胞”或“生产细胞”通常理解为其随时可用于在生物反应器中培养,以获得生产过程的产物(本发明的重组抗体形式)的细胞系或细胞培养物。根据本发明的宿主细胞类型可以是任何原核或真核细胞。

[0202] 如本文所用的术语“重组的”应意指“通过基因工程制备的”或“基因工程的结果”,例如具体使用掺入重组载体或重组宿主细胞中的异源序列。

[0203] 本发明的抗体可以使用任何已知的和已建立的表达系统和重组细胞培养技术来产生,例如,通过在细菌宿主(原核系统)或真核系统(例如酵母、真菌、昆虫细胞或哺乳动物细胞)中表达。本发明的抗体分子可以在转基因生物体中产生,所述转基因生物体例如山羊、植物或转基因小鼠,即具有人免疫球蛋白基因座的大片段并且在小鼠抗体产生方面存在缺陷的工程化小鼠品系。抗体也可以通过化学合成产生。

[0204] 根据一个具体实施方案,宿主细胞是选自CHO、PerC6、CAP、HEK、HeLa、NS0、SP2/0、

杂交瘤和Jurkat的细胞的生产细胞系。更具体地,宿主细胞是从CHO细胞获得的。

[0205] 本发明的宿主细胞具体地在无血清培养物中培养或维持,所述无血清培养物例如包含其他组分,例如血浆蛋白、激素和生长因子,作为血清的替代物。

[0206] 当在无血清条件下并且任选地在不含任何动物源蛋白质/肽的培养基中建立、适应和完全培养时,宿主细胞是最优选的。

[0207] 使用标准蛋白质纯化方法,可以从培养基中回收本发明的抗oxMIF抗体。

[0208] 术语“药物配制品”所指的制剂,其形式允许其中所含活性成分的生物活性是有效的,并且其不含对将施用配制品的受试者具有不可接受的毒性的额外组分。

[0209] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体的一些例子是水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、氨基酸例如甘氨酸或组氨酸、右旋糖、甘油、乙醇等以及其组合。在许多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨醇或氯化钠。药学上可接受的物质的另外例子是湿润剂或少量辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增强抗体的保存期或有效性。

[0210] 如本文所用,“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”或“治疗(treating)”是指试图改变被治疗个体的自然病程的临床干预,并且可以是为了预防或在临床病理学过程中而进行的。希望的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或缓和疾病状态以及缓解或改善预后。在一些实施方案中,本发明的抗体用于延缓疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0211] 本发明的抗oxMIF抗体和包含它的药物组合物可以与一种或多种其他治疗剂、诊断剂或预防剂组合施用。根据待治疗的疾病,另外的治疗剂包括其他抗赘生物剂、抗肿瘤剂、抗血管生成剂、化疗剂、类固醇或检查点抑制剂。

[0212] 本发明的药物组合物可以呈多种形式,例如,液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如,可注射溶液和可输注溶液)、分散体或悬浮液、片剂、丸剂、散剂、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预期的施用方式和治疗应用。典型的优选组合物呈可注射溶液或可输注溶液的形式,例如类似于用于人被动免疫的组合物的那些组合物。优选的施用方式是肠胃外(例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌内)。在一个优选的实施方案中,抗体通过静脉内输注或注射施用。在另一个优选的实施方案中,抗体通过肌内或皮下注射施用。如本领域技术人员将理解,施用的途径和/或方式将根据所希望的结果而变化。

[0213] 由于本发明抗体的优化且有利的特性,可以施用高剂量的抗体组合物。具体地,所述组合物包含约10至250mg/ml,具体是25至100mg/ml,具体是≥50mg/ml的抗体。

[0214] 抗oxMIF抗体可以施用一次,但更优选施用多次。例如,可以从每天三次到每六个月或更长时间一次来施用抗体。施用可以按时间表进行,例如每天三次、每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次和每六个月一次。

[0215] 本发明还涉及包含抗oxMIF抗体或其抗原结合部分的组合物,用于治疗需要治疗MIF相关病症(特别是免疫疾病,例如炎性疾病和过度增殖性障碍)的受试者。在一些实施方案中,需要治疗的受试者是人。

[0216] 如本文所用的术语“癌症”是指增殖性疾病,特别是指实体癌,例如结肠直肠癌、卵巢癌、胰腺癌、肺癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌(SCC)(例如,头颈癌、食道癌和口腔癌)、肝细胞

癌、大肠腺癌、肾癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、星形细胞瘤、成神经细胞瘤、尤文氏肉瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、乳腺癌、前列腺癌和恶性精原细胞瘤，包括上述任一种癌症的难治形式或上述一种或多种癌症的组合。

[0217] 可以用本发明抗oxMIF抗体治疗的过度增殖性障碍，例如癌性疾病或癌症，可以涉及任何组织或器官，包括但不限于脑癌、肺癌、鳞状细胞癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌、头癌、颈癌、肝癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、结直肠癌、食道癌、妇科癌、鼻咽癌、或甲状腺癌；黑色素瘤、淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。特别地，本发明的抗oxMIF抗体可用于治疗卵巢癌、胰腺癌、结肠癌和肺癌。

[0218] 在一个具体实施方案中，聚集潜在性降低和疏水性降低的重组抗oxMIF抗体或其抗原结合片段是非常适合于治疗癌性疾病，特别是治疗实体瘤的抗体，其包括以下可变结构域：

[0219] (a1)包含SEQ ID NO:9和氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域，或

[0220] (a2)包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:9，进一步包含位置36的保守酪氨酸以及氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域；以及以下中的一种：

[0221] (b1)包含SEQ ID NO:6的重链可变结构域；或

[0222] (b2)包含SEQ ID NO:6和氨基酸取代L5Q和/或W97Y的重链可变结构域，或

[0223] (b3)包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6和氨基酸取代L5Q和/或W97Y的重链可变结构域。其中氨基酸位置根据Kabat编号，其中与包含缺乏所述氨基酸取代的SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:9的抗体相比，聚集潜在性和疏水性降低。

[0224] 可替代地，可以用重组抗oxMIF抗体进行实体瘤的治疗，所述重组抗oxMIF抗体包含：包含SEQ ID NO:9的轻链可变结构域，或与SEQ ID NO:9具有至少95％序列同一性的包含位置36的酪氨酸的轻链可变结构域；以及包含SEQ ID NO:6和氨基酸取代W97Y和/或L5Q的重链可变结构域，或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6并且进一步包含氨基酸取代W97Y和/或L5Q的重链可变结构域。

[0225] 在又一个具体实施方案中，本文所述效应子功能增强的重组抗oxMIF抗体是非常适合于治疗癌性疾病，特别是治疗实体瘤的抗体，其重链恒定区包含：

[0226] (a)SEQ ID NO:2，或与SEQ ID NO:2具有至少95％序列同一性并且包含氨基酸239D和332E的功能变体；或

[0227] (b)SEQ ID NO:3，或与SEQ ID NO:3具有至少95％序列同一性并且包含氨基酸239D、268F、324T和332E的功能变体；或

[0228] (c)SEQ ID NO:4，或与SEQ ID NO:4具有至少95％序列同一性并且包含氨基酸239D和332E的功能变体；或

[0229] (d)SEQ ID NO:5，或与SEQ ID NO:5具有至少95％序列同一性并且包含氨基酸235V、243L、292P、300L和396L的功能变体。

[0230] 本发明还包括治疗受试者(包括人)的炎性疾病的方法，所述炎性疾病例如血管炎、关节炎、脓毒症、脓毒性休克、内毒素性休克、中毒性休克综合征、获得性呼吸窘迫综合征、肾小球性肾炎、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、腹膜炎、肾炎、特应性皮炎、哮喘、结

膜炎、发热、疟疾、NASH(非酒精性脂肪性肝炎)、多发性硬化、急性和慢性胰腺炎、1型糖尿病、IgA肾病、间质性膀胱炎、COVID后综合征、银屑病、肾小球性肾炎、炎性肠病、肾炎和腹膜炎、系统性红斑狼疮(SLE-包括狼疮肾炎)、哮喘、类风湿性关节炎(RA)和炎性肠病(IBD),所述方法包括以下步骤:向所述有需要的受试者施用治疗有效量的抗oxMIF抗体或其抗原结合部分。

[0231] 在一个具体实施方案中,聚集潜在性降低和疏水性降低的重组抗oxMIF抗体或其抗原结合片段是非常适合于治疗炎性或感染性疾病的抗体,其包括以下可变结构域:

[0232] (a1)包含SEQ ID NO:9和氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域,或

[0233] (a2)包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:9,进一步包含位置36的保守酪氨酸以及氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域;以及以下中的一种:

[0234] (b1)包含SEQ ID NO:6的重链可变结构域;或

[0235] (b2)包含SEQ ID NO:6和氨基酸取代L5Q和/或W97Y的重链可变结构域,或

[0236] (b3)包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6和氨基酸取代L5Q和/或W97Y的重链可变结构域;其中氨基酸位置根据Kabat编号,其中与包含缺乏所述氨基酸取代的SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:9的抗体相比,聚集潜在性和疏水性降低。

[0237] 可替代地,可以用重组抗oxMIF抗体进行炎性或感染性疾病的治疗,所述重组抗oxMIF抗体包含:包含SEQ ID NO:9的轻链可变结构域,或与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的包含位置36的酪氨酸的轻链可变结构域;以及包含SEQ ID NO:6和氨基酸取代W97Y和/或L5Q的重链可变结构域,或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6并且进一步包含氨基酸取代W97Y和/或L5Q的重链可变结构域。

[0238] 在又一个具体实施方案中,本文所述非常适合于治疗炎性或感染性疾病的重组抗oxMIF抗体具有对抑制受体FcγRIIB增加的优先结合性或具有高α2,6-N-连接的唾液酸化。

[0239] 本发明进一步包括以下项目:

[0240] 1.一种聚集潜在性降低和疏水性降低的重组抗oxMIF抗体或其抗原结合片段,其包括

[0241] i)以下可变结构域:

[0242] (a)包含SEQ ID NO:9以及氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域;或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:9,进一步包含在位置36的保守酪氨酸并且进一步包含氨基酸取代M30L、F49Y、A51G、P80S、W93F中至少一种的轻链可变结构域;以及以下中的一种:

[0243] (b)包含SEQ ID NO:6的重链可变结构域;或

[0244] (c)包含SEQ ID NO:6和氨基酸取代L5Q或W97Y中至少一种的重链可变结构域;或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6并且进一步包含氨基酸取代L5Q或W97Y中至少一种的重链可变结构域;

[0245] 或

[0246] ii)以下可变结构域

[0247] (a)包含SEQ ID NO:9的轻链可变结构域;或与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同

一性的包含位置36的酪氨酸的轻链可变结构域,和

[0248] (b)包含SEQ ID NO:6和氨基酸取代W97Y的重链可变结构域;或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6并且进一步包含氨基酸取代W97Y的重链可变结构域。

[0249] 2.根据项目1所述的重组抗oxMIF抗体,其具有增强的效应子功能,所述重组抗oxMIF抗体包含重链恒定区,所述重链恒定区包括

[0250] (a)SEQ ID NO:2,或与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸239D和332E的重链恒定区;或

[0251] (b)SEQ ID NO:3,或与SEQ ID NO:3具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸239D、268F、324T和332E的重链恒定区;或

[0252] (c)SEQ ID NO:4,或与SEQ ID NO:4具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸239D和332E的重链恒定区;或

[0253] (d)SEQ ID NO:5,或与SEQ ID NO:5具有至少95%序列同一性并且包含氨基酸235V、243L、292P、300L和396L的重链恒定区。

[0254] 3.根据项目1或2所述的抗oxMIF抗体,其包含选自SEQ ID NO:8、10、11、12和13的氨基酸序列。

[0255] 4.根据项目1或2所述的抗oxMIF抗体,其包含SEQ ID NO:6、11以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个。

[0256] 5.根据项目1或2所述的抗oxMIF抗体,其包含SEQ ID NO:7、10以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个。

[0257] 6.根据项目1或2所述的抗oxMIF抗体,其包含SEQ ID NO:7、11以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个。

[0258] 7.根据项目1或2所述的抗oxMIF抗体,其包含SEQ ID NO:8、11以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个,或SEQ ID NO:39,或SEQ ID NO:40。

[0259] 8.根据项目1或2所述的抗oxMIF抗体,其包含SEQ ID NO:8、13以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个或者SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42。

[0260] 9.根据项目1或2所述的抗oxMIF抗体,其包含SEQ ID NO:8、9以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个。

[0261] 10.根据项目1或2所述的抗oxMIF抗体,其包含SEQ ID NO:8、10以及SEQ ID NO:1、2、3、4或5中的任一个。

[0262] 11.根据项目1至10中任一项所述的抗oxMIF抗体,其选自双特异性抗体、scFv、(scFv)2、scFvFc、Fab、Fab'、和F(ab')2、Fab'-SH、Fab-scFv融合体、Fab-(scFv)2-融合体、Fab-scFv-Fc、Fab-(scFv)2-Fc、不同抗体的两个单链可变片段(scFv)的融合蛋白(例如,BiTE)、微抗体、TandAb®、DutaMab™、DART、和CrossMab®。

[0263] 12.根据项目1至11中任一项所述的抗体,其用于制备药物。

[0264] 13.一种药物组合物,其包含项目1至11中任一项所述的抗体,任选地还包含药物载体或佐剂。

[0265] 14.根据项目13所述的药物组合物,其中所述组合物包含约10至250mg/ml,特别是包含>50mg/ml的根据项目1至11中任一项所述的抗体。

[0266] 15.根据项目13或14所述的药物组合物,其中所述药物组合物经配制用于皮下施

用。

[0267] 16.根据项目13至15中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物作为单独的物质施用,或其中将治疗与包含一种或多种活性物质的另一种药物组合物组合,优选地所述一种或多种活性物质选自抗病毒、抗炎、抗癌、抗血管生成和抗生素物质。

[0268] 17.根据项目13至16中任一项所述的药物组合物,其用于治疗患有炎性疾病、过度增殖性障碍、感染性疾病或癌症的患者,特别是用于治疗哮喘、血管炎、关节炎、脓毒症、脓毒性休克、内毒素性休克、中毒性休克综合征、获得性呼吸窘迫综合征、肾小球性肾炎、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、腹膜炎、肾炎和银屑病、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌和肺癌。

[0269] 18.一种分离的核酸,其编码根据项目1至11中任一项所述的抗体。

[0270] 19.一种表达载体,其包含一种或多种根据项目18所述的核酸分子。

[0271] 20.一种宿主细胞,其包含根据项目18所述的核酸或根据项目19所述的表达载体。

[0272] 21.一种生产根据项目1至11中任一项所述的抗体的方法,其包括培养根据项目20所述的宿主细胞并且从细胞培养物中回收所述抗体。

[0273] 22.一种生产根据项目1至11中任一项所述的抗体的方法,其包括在宿主细胞中表达编码所述抗体的核酸。

[0274] 实施例

[0275] 本文所述的实施例是对本发明的示例说明,并且不旨在对本发明构成限制。在不脱离本发明的范围的情况下,可以对本文所述和本文示出的技术进行许多修改和变化。因此,应当理解,这些实施例仅仅是说明性的,并且不限制本发明的范围。

[0276] 实施例1:新设计抗体的聚集倾向降低和疏水性降低。

[0277] 表1:实施例中新设计抗体的变体ID和分子序列组合

[0278]

变体 ID（样品）	VH	VL	CH	CL
C0064	Wt (SEQ ID NO: 6)	Wt (SEQ ID NO: 9)	S239D/I332E (SEQ ID NO: 2)	SEQ ID NO: 38
C0065	Wt (SEQ ID NO: 6)	Wt (SEQ ID NO: 9)	S239D/I332E/H268F/S324T (SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO: 38
C0067	Wt (SEQ ID NO: 6)	Wt (SEQ ID NO: 9)	L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L/E356D/M358L (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO: 38
C0097	Wt (SEQ ID NO: 6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO: 11)	S239D/I332E (SEQ ID NO: 2)	SEQ ID NO: 38
C0098	Wt (SEQ ID NO: 6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO: 11)	S239D/I332E/H268F/S324T (SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO: 38
C0099	Wt (SEQ ID NO: 6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO: 11)	R214K/S239D/K274Q/Y296F/Y300F/L309V/I332E/A339T/V397M (SEQ ID NO: 4)	SEQ ID NO: 38
C0100	Wt (SEQ ID NO: 6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO: 11)	L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L/E356D/M358L (SEQ ID NO: 5)	SEQ ID NO: 38
C0108	L5Q/W97Y (SEQ ID NO: 8)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO: 11)	R214K/S239D/K274Q/Y296F/Y300F/L309V/I332E/A339T/V397M (SEQ ID NO: 4)	SEQ ID NO: 38
C0109	L5Q/W97Y (SEQ ID NO: 8)	F49Y/A51G/M30L/W93F/P80S (SEQ ID NO: 13)	R214K/S239D/K274Q/Y296F/Y300F/L309V/I332E/A339T/V397M (SEQ ID NO: 4)	SEQ ID NO: 38
C0008（对照抗体）	Wt (SEQ ID NO: 6)	Wt (SEQ ID NO: 9)	Wt (SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO: 38
C0070	L5Q/W97Y (SEQ ID NO: 8)	Wt (SEQ ID NO: 9)	Wt (SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO: 38

[0279]

C0073	Wt (SEQ ID NO: 6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO: 11)	Wt (SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO: 38
C0076	L5Q (SEQ ID NO: 7)	F49Y/A51G (SEQ ID NO: 10)	Wt (SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO: 38
C0077	L5Q (SEQ ID NO: 7)	Y36F/F49Y/A51G (SEQ ID NO: 37)	Wt (SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO: 38
C0078	L5Q (SEQ ID NO: 7)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO: 11)	Wt (SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO: 38
C0081	L5Q/W97Y (SEQ ID NO: 8)	F49Y/A51G (SEQ ID NO: 10)	Wt (SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO: 38
C0083	L5Q/W97Y (SEQ ID NO: 8)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO: 11)	Wt (SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO: 38
C0090	L5Q/W97Y (SEQ ID NO: 8)	F49Y/A51G/M30L/W93F/P80S (SEQ ID NO: 13)	Wt (SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO: 38

[0280] 为了评价疏水性和聚集性,通过凝胶过滤(SEC)使用两种不同SEC柱和运行缓冲液条件以及通过疏水相互作用色谱法(HIC)分析新设计抗体,并且与抗oxMIF抗体C0008进行比较。

[0281] 对于SEC,将样品在包含0.02％Tween的5x磷酸盐缓冲盐水(5x PBST)中稀释至0.1mg/ml,将50μl样品施加到Superdex 200increase 10/300GL(GE Healthcare)凝胶过滤柱上,流速为0.75ml/min。在22℃下在5x PBST中进行分离和平衡。使用214nm处吸光度监测蛋白质峰,使用Unicorn emulation软件包(GE Healthcare)分析光谱。另外,将样品在1x磷酸盐缓冲盐水(1x PBS)中稀释至0.2mg/ml,将100μl样品施加到Enrich 650(Bio-Rad)凝胶过滤柱上,流速为1ml/min。在22℃下在1x PBS中进行分离和平衡。使用280nm处吸光度监测蛋白质峰,使用ChromLab软件包(Bio-Rad)分析光谱。结果以主峰的保留体积(Vr,ml)报告,并且对存在的聚集体进行手动排序。

[0282] 对于HIC分析,使用50mM磷酸盐和0.75M硫酸铵(pH 6.9)将所有样品稀释至0.2mg/ml的最终浓度。将高度纯化的抗体样品独立装载到1ml HiTrap Butyl HP柱上。注入50μl样品,在22℃下,将柱流速维持在1ml/min。在20柱体积(CV)的0-100％B的梯度上(缓冲液B:50mM磷酸盐,20％异丙醇;pH 7.0)进行峰分离。使用280nm处吸光度监测蛋白质峰,使用Unicorn emulation软件包(GE healthcare)分析光谱。对于每个峰,在峰最大值处以Vr(ml)报告结果。

[0283] 结果:对照抗体(C0008)证明了接近尺寸排阻柱的床体积(约24ml Superdex 200,约18ml Enrich 650)的保留体积,这对应于远小于针对人IgG预期的分子量(图2A和B)。不寻常的长保留主要是由于与固定相表面的疏水相互作用。另外,对于C0008,除了高保留体积外,还存在显著量的IgG二聚体和聚集体。所有新设计抗体都显示出减少的保留体积(Vr),证明了与柱的相互作用减少以及因此分子的疏水性降低(表2,图2A和B)。当与分子量标准比较时,C0083和C0090显示出最低的保留体积(表2,图2B),并且Vr对应于单体人IgG的分子量。另外,在新设计抗体C0073、C0078、C0083和C0090的样品中,抗体二聚体和聚集显著减少(图2A和B)。尤其是C0083和C0090显示出单一的单体峰。

[0284] 使用HIC柱保留体积,抗体从最小到最大(最低到最高保留体积)疏水IgG进行排序(图2C,表3),结果证实了SEC分析的数据。新设计抗体C0083(保留体积12.37)的疏水性最低,而C0008(保留体积14.92ml)显示出最高的疏水性。

[0285] 表2:尺寸排阻色谱法

[0286]

样品	运行缓冲液	柱	Vr(ml)	聚集体
C0008	5x PBS	Superdex 200	24.20	++
C0070	5x PBS	Superdex 200	16.43	+
C0073	5x PBS	Superdex 200	14.00	(+)
C0076	5x PBS	Superdex 200	21.10	+
C0077	5x PBS	Superdex 200	15.77	+
C0078	5x PBS	Superdex 200	14.02	(+)
C0081	5x PBS	Superdex 200	16.03	+
C0083	5x PBS	Superdex 200	13.01	-
C0008	1x PBS	Enrich 650	18.06	+

C0083	1x PBS	Enrich 650	12.39	-
C0090	1x PBS	Enrich 650	12.38	-

[0287] 表3:疏水相互作用色谱法

[0288]

样品	Vr(ml)
C0008	14.92
C0070	13.67
C0073	13.37
C0076	14.84
C0077	14.05
C0078	13.41
C0081	13.48
C0083	12.37

[0289] 图2示出了证明了新设计抗oxMIF抗体的聚集性和疏水性降低的色谱特征曲线。(A)在Superdex 200increase 10/300GL凝胶过滤柱上使用5x PBST作为流动相,C0008(对照抗体,灰色区域)和新设计抗体的洗脱特征曲线的比较。(B)在Enrich 650凝胶过滤柱上使用1x PBS作为流动相的C0008(对照抗体,灰色区域)和新设计抗体的洗脱特征曲线的比较;(C)在HiTrap Butyl HP HIC柱上C0008(对照抗体,灰色区域)和新设计抗体的洗脱特征曲线的比较。

[0290] 实施例2:新设计抗oxMIF抗体与固定化MIF的结合(K_D确定)

[0291] 将在PBS中以1μg/ml稀释的重组人MIF固定在ELISA板中在4℃下过夜(根据Thiele等,2015,将MIF转化为oxMIF)。封闭后,将抗oxMIF抗体的连续稀释液添加到板中。最后,使用蛋白L-HRP缀合物和作为底物的四甲基联苯胺(TMB)检测结合的抗体。用3M H_2SO_4终止显色反应,在450nm处测量OD。将来自不同实验的数据相对于相应实验的抗oxMIF抗体C0008的最大OD(=100%)归一化,并且使用GraphPad Prism通过4参数拟合确定EC_{50}值(示出了两个实验的平均值)。

[0292] 结果:在较宽的浓度范围内测量新设计抗体与固定化MIF(oxMIF)的结合,所得结合曲线如图3所示。使用抗oxMIF抗体(C0008)作为oxMIF结合的参考。结合曲线和计算EC_{50}值(代表K_D)清楚地显示,与C0008(EC50 0.7nM)相比,新设计抗体C0073、C0076、C0078、C0083和C0090保留了其对oxMIF的亲和力(EC50范围0.5-1.6nM,在测定变异性范围内)(图3A)。令人惊讶地,与C0076相比,C0077通过VL中仅一个另外的VL点突变(Y36F)显示出对oxMIF的亲和力降低5倍(图3A),尽管C0077的疏水性显著降低(图2A)。

[0293] 在另一组实验中,Fc部分中含有增强效应子功能的突变的新设计抗体显示出在0.4-0.8nM范围内的EC_{50}值,这再次与对照抗体C0008的表观亲和力完全匹配(图3B)。

[0294] 图3示出了新设计抗oxMIF抗体与固定化MIF的结合(K_D确定)。(A)具有野生型Fc部分的新设计抗体的结合曲线。(B)Fc部分中含有增强效应子功能的突变的新设计抗体的结合曲线。C0008用作参考抗体。

[0295] 表4:抗oxMIF抗体的K_D值

[0296]

样品	K_D(nM)
C0008	0.7

C0073	1.0
C0076	1.1
C0077	5.2
C0078	1.6
C0083	0.5
C0090	0.5
C0097	0.8
C0098	0.7
C0099	0.4
C0100	0.5

[0297] 实施例3:新设计抗oxMIF抗体与oxMIF和redMIF的差异性结合。

[0298] 将抗oxMIF抗体以15nM的浓度固定在微板中在4℃下过夜。封闭后,将孔与50ng/ml的redMIF或oxMIF替代物NTB-MIF一起孵育(Schinagl等,2018)。用生物素化多克隆兔抗MIF抗体和链霉亲和素-HRP缀合物检测捕获的oxMIF。用四甲基联苯胺(TMB)对板进行染色,并且通过添加30％H_2SO_4终止显色反应。在450nm处测量OD。将来自不同实验的数据相对于相应实验的抗oxMIF抗体C0008的最大OD(＝100％)归一化,并且示出了两至三个实验的平均值。

[0299] 结果:新设计抗体与可溶性oxMIF和redMIF的结合描绘在图4中。结果清楚地显示,新设计抗体C0073、C0076、C0078、C0083和C0090展示了与oxMIF的强结合,但不与redMIF结合,因此疏水性和聚集性降低的抗体保留了其区分oxMIF与redMIF的能力。与对照抗体C0008相比,新设计抗体显示出相似的OD(图4A),所述对照抗体C0008已被描述为能够区分oxMIF与redMIF(Thiele等,2015)。令人惊讶地,C0077显示,与C0076相比,通过VL中仅一个另外的点突变(Y36F)显著减少了与oxMIF的结合(图4A)。C0077显示出明显降低的疏水性(图2A),但未能维持结合特性。

[0300] 在另一组实验中,Fc部分中含有增强效应子功能的突变的新设计抗体(C0097-C0100)也保留了其区分oxMIF与redMIF的能力,并且与抗体C0008相比显示出相似的OD(图4B)。

[0301] 图4示出了新设计抗体与oxMIF和redMIF的差异性结合。(A)具有野生型Fc部分的新设计抗体的差异性结合。(B)Fc部分中含有增强效应子功能的突变的新设计抗体的差异性结合。C0008用作参考抗体。

[0302] 实施例4:Fc突变的新设计抗oxMIF抗体的效应子功能增强。

[0303] 如上所述,可以通过Fc部分中的突变来试图增加抗体的ADCC潜力。Fc受体介导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)是一种重要的作用机制,抗体通过所述机制靶向患病细胞以进行清除。当靶结合的抗体的Fc效应子部分也结合效应细胞的细胞表面上的Fcγ RIIIA受体时,两种细胞类型发生多重交联,导致ADCC通路激活。使用稳定表达Fcγ RIIIA受体、V158(高亲和力)变体和驱动萤火虫萤光素酶表达的NFAT反应元件的工程化Jurkat细胞作为效应细胞来确定抗体的ADCC活性,所述活性通过作为NFAT通路激活结果而产生的萤光素酶进行量化。

[0304] 基本上如通过制造商(Promega#G7010)的建议(其中有一些修改)进行ADCC报告物测定。简而言之,将在PBS中以1μg/ml稀释的重组人MIF固定在ELISA板中在4℃下过夜(根据

Thiele等,2015,将MIF转化为oxMIF)。封闭后,本文所述的新设计抗体(C0097-C0100)的连续稀释液与Jurkat效应细胞一起添加,并将板在37℃/5%CO_2的加湿培养箱中孵育6h。最后,添加Bio-Glo萤光素酶试剂,并且在Tecan多板读取器上测量发光(RLU)(0.5s积分时间)。C0008用作参考抗体。

[0305] 结果:含有Fc突变的所有新设计变体(C0097-C0100)均显示出,随着新设计抗体浓度增加的显著剂量反应,而抗体C0008不诱导Fcγ RIIIA介导的Jurkat报告细胞激活(图5)。

[0306] 图5示出了在改良的ADCC报告物生物测定(Promega#G7010)中新设计抗oxMIF抗体的效应子功能增强。与C0008相反,所有新设计抗oxMIF抗体均诱导Fcγ RIIIA介导的Jurkat报告细胞激活(n=2)。

[0307] 实施例5:新设计抗oxMIF抗体的生物分布

[0308] 在携带同基因结肠癌模型CT26的皮下肿瘤的雌性Balb/c小鼠中研究新设计抗oxMIF抗体C0083与C0008相比的生物分布。雌性Balb/c小鼠接受在PBS中的$3x10^5$个CT26细胞的单侧皮下注射(100μl/只动物)。当个体肿瘤体积达到150-300mm^3时,将小鼠分配到治疗组,并且接受5mg/kg/d IRDye 800CW标记的C0008或IRDye 800CW标记的C0083的单次静脉内剂量。两只小鼠用作未处理的"无信号"对照。

[0309] 使用来自LI-COR Biosciences的IRDye 800CW蛋白质标记试剂盒(高MW)按照制造商的说明将C0008和C0083用IRDye 800CW标记。在标记处理之后并且在将标记抗体注射到小鼠中之前,使用Nanodrop技术确定IRDye 800CW标记的抗体的蛋白质浓度和标记效率,并且基于标记后的蛋白质浓度向小鼠给药。在以下时间点:给药后1h、6-8h、24h、48h、72h、96h、168h施用标记抗体后,在LI-COR Pearl® Trilogy成像装置中进行体内成像。执行图像分析以量化肿瘤中抗体的相对荧光单位(RFU)(RFU=RFU肿瘤面积-RFU背景)。

[0310] 结果:测定了静脉内施用的800CW标记的C0008(图6A)和C0083(图6B)的显著肿瘤内分布,其中峰在24h时出现,并且肿瘤保留长达7天。这清楚地证明,与对照抗oxMIF抗体C0008相比,C0083的肿瘤穿透特性保留或甚至改善。在单独的实验中测试两种抗体,并且针对相应的实验优化图像的缩放比例。然而,两个实验使用相同的缩放比例,与C0008相比,C0083(图6D)的肿瘤穿透和保留的改善变得更加明显得多。如果对肿瘤区域的像素强度进行数字评价,C0083的肿瘤穿透和保留的改善再次更加明显得多(图6E)。在未处理对照小鼠中未检测到信号(图6C)。

[0311] 图6通过对携带皮下CT26肿瘤的小鼠的红外体内成像示出了新设计抗oxMIF抗体C0083的肿瘤穿透。在注射IRDye 800CW标记的抗体后1h、6h、24h、48h、72h、96h和168h拍摄照片。A:接受IRDye 800CW标记的C0008(5mg/kg)的小鼠;B:接受IRDye 800CW标记的C0083(5mg/kg/d)的小鼠;C:未处理对照小鼠;D:接受IRDye 800CW标记的C0083(5mg/kg/D)的小鼠,并且使用与A中相同的缩放比例展示图像;E:通过数字图像分析量化C0083和C0008的肿瘤穿透和保留。

[0312] 实施例6:新设计抗体C0083改善的产生。

[0313] 与C0008相比,通过在ExpiCHO细胞(Thermo Fisher)中瞬时表达产生新设计抗oxMIF抗体C0083。简而言之,使用ExpiFectamine CHO试剂盒(Thermo Scientific)瞬时转染50-200ml指数生长的ExpiCHO细胞,并且根据制造商的说明"标准方案"(Thermo Scientific)在加湿培养箱中在37℃下培养8天。通过离心除去细胞,并且将上清液用40mM

磷酸钠、300mM氯化钠(pH 7.2)进行1:1稀释。将稀释的上清液经0.2μm过滤,并且在室温下施加于使用NGC QUEST 10色谱系统(Bio-Rad)的Mab Select Prism A柱(Cytiva)。将柱用10柱体积的20mM磷酸钠、150mM氯化钠(pH 7.2)洗涤,并且用10柱体积的100mM甘氨酸(pH 3.5)洗脱抗体。将抗体立即中和至pH 5,并且通过Bio-Scale P-6脱盐筒柱在1x PBS pH7.2中配制,并且使用Amicon Ultra-15离心装置(Merck Millipore)浓缩至约1mg/ml。使用NanoDrop技术以及其相应的消光系数确定蛋白质浓度。将经Mab Select Prism A和中和后纯化抗体的量(相应抗体的最终产率)除以细胞培养体积,所得值在本文中称为抗体滴度(mg/L)。

[0314] 结果:与C0008相比,C0083的3次单独产生清楚地显示,新设计抗体C0083的产生显著(非配对t检验,p=0.03)更好。与C0008(93mg/L)相比,获得了更高的抗体滴度(117mg/L)(图7)。

[0315] 图7示出了新设计抗oxMIF抗体C0083改善的产生。

[0316] 实施例7:ADCC活性增强的新设计抗oxMIF抗体的产生改善。

[0317] 通过在ExpiCHO细胞(Thermo Fisher)中瞬时表达产生抗oxMIF抗体(C0097、C0098和C0100),其含有降低疏水性和聚集倾向的突变而且还含有改善ADCC活性的Fc突变。简而言之,使用ExpiFectamine CHO试剂盒(Thermo Scientific)瞬时转染50ml指数生长的ExpiCHO细胞,并且根据制造商的说明"标准方案"(Thermo Scientific)在加湿培养箱中在37℃下培养8天。通过离心除去细胞,并且将1/10体积的200mM磷酸钠、1500mM氯化钠(pH 7.2)添加到上清液中。将稀释的上清液经0.2μm过滤,并且在室温下施加于使用NGC QUEST 10色谱系统(Bio-Rad)的HiTrap Fibro PrismA柱(Cytiva)。将柱用10柱体积的20mM磷酸钠、150mM氯化钠(pH 7.2)洗涤,并且用10柱体积的100mM甘氨酸(pH 3.5)洗脱抗体。用甘氨酸将抗体立即中和至pH 5,最终浓度为250mM甘氨酸。使用NanoDrop技术以及其相应的消光系数确定蛋白质浓度。将经HiTrap Fibro Prism A和中和后纯化抗体的量(相应抗体的最终产率)除以细胞培养体积,所得值在本文中称为抗体滴度(mg/L)。对于比较,通过相同程序产生抗oxMIF抗体(C0064、C0065和C0067),其在疏水性/聚集方面没有经VH/VL优化但含有改善ADCC活性的相同Fc突变。

[0318] 结果:疏水性/聚集倾向改善的抗oxMIF抗体(C0097、C0098和C0100)的产生导致,与包含C0008的VH和VL结构域的其相应对应物(C0064、C0065和C0067)相比,显著更高的滴度(图8)。

[0319] 图8示出了与效应子功能增强但包含C0008的VH和VL结构域的对应物相比(C0097与C0064、C0098与C0065和C0100与C0067比较),效应子功能增强以及疏水性和聚集倾向降低的新设计抗oxMIF抗体的产生改善。

[0320] 实施例8:效应子功能增强的新设计抗oxMIF抗体的聚集倾向降低和疏水性降低

[0321] 为了评价疏水性和聚集性,通过凝胶过滤(SEC)和通过疏水相互作用色谱法(HIC)分析新设计抗体,并且与抗oxMIF抗体C0008进行比较。

[0322] 对于SEC,将样品在1x磷酸盐缓冲盐水(1x PBS)中稀释至1mg/ml,并且将100μl样品以1.25ml/min的流速施加到Enrich 650(Bio-Rad)凝胶过滤柱上。在室温下在1x PBS中进行分离和平衡。使用280nm处吸光度监测蛋白质峰,使用ChromLab软件包(Bio-Rad)分析光谱。结果以主峰的保留体积(Vr,ml)报告,并且对存在的聚集体进行手动排序。

[0323] 对于HIC分析,使用50mM磷酸盐和0.75M硫酸铵(pH 6.8)将所有样品稀释至1mg/ml的最终浓度。将高度纯化的抗体样品(约100μg)独立装载到1ml HiTrap Butyl HP柱上。注入100μl样品,在室温下将柱流速维持在1ml/min。在20柱体积(CV)的0-100%B的梯度(缓冲液B:50mM磷酸盐,20%异丙醇;pH 7.0)上进行峰分离。使用280nm处的吸光度监测蛋白质峰,并且使用Unicorn emulation软件包(GE healthcare)分析光谱。对于每个峰,在峰最大值处以Vr(ml)报告结果。

[0324] 结果:对照抗体C0008证明了接近尺寸排阻柱的空隙体积(约16mL)的保留体积,这对应于远小于针对人IgG预期的分子量(图9A)。不寻常的长保留主要是由于与固定相表面的疏水相互作用。另外,对于C0008,除了高保留体积外,还存在显著量的IgG二聚体和聚集体。新设计抗体C0108和C0109显示出显著减少的保留体积(Vr),证明了与柱的相互作用减少以及因此分子的疏水性降低(图9A,表5)。当与分子量标准比较时,Vr对应于单体人IgG的分子量。另外,新设计抗体C0108和C0109的样品中不存在抗体二聚体和聚集(图9A)。

[0325] 使用HIC,Vr与所分析抗体的疏水性成正比,即Vr越高,分子越疏水。对新设计抗体(C0083、C0090、C0108和C0109)的HIC分析证实了与对照抗体C0008(图9B,保留体积为20.8ml,表6)相比,它们的疏水性显著更低(图9B,保留体积15.2-16.2ml,表6)。

[0326] 结论:从SEC和HIC分析中可以明显看出,新设计抗体具有改善的生物化学特性,特别是降低的疏水性和聚集倾向。

[0327] 表5:尺寸排阻色谱法

[0328]

样品	运行缓冲液	柱	Vr（ml）	聚集体
C0008	1x PBS	Enrich 650	14.5	++
C0108	1x PBS	Enrich 650	11.9	-
C0109	1x PBS	Enrich 650	11.9	-

[0329] 表6:疏水相互作用色谱法

[0330]

样品	Vr（ml）
C0008	20.8
C0083	15.4
C0090	16.2
C0108	15.2
C0109	16.0

[0331] 图9示出了证明了新设计抗oxMIF抗体的聚集性和疏水性降低的色谱特征曲线。(A)在Enrich 650凝胶过滤柱上使用1x PBS作为流动相,C0008(对照抗体,灰色区域)以及效应子功能增强的新设计抗体C0108和C0109的洗脱特征曲线的比较;(B)在HiTrap Butyl HP HIC柱上C0008(对照抗体,灰色区域)以及新设计抗体C0083、C0090、C0108和C0109的洗脱特征曲线的比较。

[0332] 实施例9:新设计抗oxMIF抗体C0083和C0090与A2780MIF$^{-/-}$细胞的非特异性结合减少。

[0333] 通过CRISPR/Cas9基因编辑A2780卵巢癌细胞系中的人MIF基因,产生A2780MIF$^{-/-}$

细胞系。通过Sanger测序和通过蛋白免疫印迹使用多克隆抗人MIF抗体证实,在A2780 $MIF^{-/-}$细胞系中不存在内源性人MIF蛋白。

[0334] 将A2780$MIF^{-/-}$细胞用细胞剥离器(Corning,Cat#25-056-Cl)脱离,用染色缓冲液(PBS+5%BSA)洗涤,并且以每孔2x10^5个细胞铺板到96孔U形底板中。将细胞用可固定活力染料eFluo780(在PBS中以1:2000稀释)在4℃下染色20min,并且用染色缓冲液洗涤。将细胞重悬于50μl染色缓冲液中,并且添加50μl新设计抗oxMIF抗体C0083、C0090、C0108、C0109、对照抗oxMIF抗体C0008或同种型IgG的连续稀释液(最终浓度37nM-9.4nM)。在4℃下孵育40min后,将细胞用染色缓冲液洗涤,并且重悬于100μl二级抗体(山羊抗人IgG(H+L)-AlexaFluor 488,1:100稀释)中。在4℃下孵育30min后,将细胞用染色缓冲液洗涤,重悬于PBS+2%BSA中,并且在Cytoflex-S流式细胞仪上进行采集。用FlowJo分析数据,并且在GraphPad Prism中相对于抗体浓度绘制活细胞的几何平均值(AF488的平均荧光强度)。

[0335] 结果和结论:从图10中可以明显看出,新设计抗oxMIF抗体C0083、C0090、C0108和C0109不会结合至A2780 $MIF^{-/-}$细胞,因为它们的几何平均值非常接近同种型IgG阴性对照的几何平均值。相比之下,参考抗oxMIF抗体C0008显示出与A2780 $MIF^{-/-}$细胞的显著结合,尽管它们不表达MIF。因此,疏水性的降低导致新设计抗oxMIF抗体C0083、C0090、C0108和C0109与A2780 $MIF^{-/-}$的非特异性结合显著减少或消除,而抗oxMIF对照抗体C0008由于其疏水特性而非特异性结合至细胞表面。

[0336] 图10示出了通过FACS确定,新设计抗oxMIF抗体在A2780$MIF^{-/-}$细胞上的非特异性结合减少。将A2780 $MIF^{-/-}$细胞用新设计抗oxMIF抗体C0090、C0109(A);C0083、C0108(B)或对照抗体C0008以及作为阴性对照的同种型IgG染色。相对于抗体浓度绘制活细胞的几何平均值(GeoMean)(AF488的平均荧光强度)。

[0337] 实施例10:效应子功能增强的新设计抗oxMIF抗体与固定化MIF的结合(K_D评估)

[0338] 将在PBS中以1μg/ml稀释的重组人MIF固定在ELISA板中在4℃下过夜(根据Thiele等,2015,将MIF转化为oxMIF)。封闭后,将抗oxMIF抗体的连续稀释液添加到板中。最后,用山羊抗人IgG(Fc)-HRP缀合物和作为底物的四甲基联苯胺(TMB)检测结合的抗体。用3MH_2SO_4终止显色反应,在450nm处测量OD。将来自不同实验的数据相对于相应实验的抗oxMIF抗体C0008的最大OD(=100%)归一化,并且使用GraphPad Prism通过4参数拟合确定EC_{50}值(示出了两个实验的平均+/-SEM)。

[0339] 结果和结论:在较宽的浓度范围内测量效应子功能增强的新设计抗体与固定化MIF(oxMIF)的结合,所得结合曲线如图11所示。使用抗oxMIF抗体C0008作为oxMIF结合的参考。结合曲线和计算EC_{50}值(代表K_D)清楚地显示,与C0008相比,新设计抗体C0108和C0109保留了其对oxMIF的低纳摩尔亲和力(图11,表7)。

[0340] 图11示出了效应子功能增强的新设计抗oxMIF抗体与固定化oxMIF的结合曲线(K_D评估);将抗oxMIF抗体C0008用作参考抗体。

[0341] 表7:抗oxMIF抗体的亲和力估计(ELISA)

[0342]

样品	K_D（nM）
C0008	0.2
C0108	0.3
C0109	0.3

[0343] 实施例11:效应子功能增强的新设计抗oxMIF抗体与oxMIF和redMIF的差异性结合。

[0344] 将抗oxMIF抗体和不相关的人IgG1对照以15nM的浓度固定在微板中在4℃下过夜。封闭后,将孔与50ng/ml的redMIF或oxMIF替代物NTB-MIF一起孵育(Schinagl等,2018)。用多克隆兔抗MIF抗体和山羊抗兔IgG HRP检测捕获的oxMIF。用四甲基联苯胺(TMB)对板进行染色,并且通过添加30％H_2SO_4终止显色反应。在450nm处测量OD。将来自两个实验的数据相对于相应实验的抗oxMIF抗体C0008的最大OD(＝100％)归一化,并且示出了两至三个实验的平均值+/-SEM。

[0345] 结果和结论:效应子功能增强的新设计抗体与可溶性oxMIF和redMIF的结合如图12所示。结果清楚地显示,新设计抗体C0108和C0109展示了与oxMIF的强结合,但没有检测到与redMIF的结合。新设计抗体显示出与参考抗体C0008相比非常相当的OD,所述参考抗体C0008已被描述为能够区分oxMIF与redMIF(Thiele等,2015)。对于不相关的IgG1对照,没有观察到特异性结合。因此,效应子功能增强以及疏水性和聚集性降低的新设计抗体保留了其区分oxMIF与redMIF的能力。

[0346] 图12示出了新设计抗体与oxMIF和redMIF的差异性结合。将C0008用作参考抗体,并且将同种型IgG用作阴性对照。

[0347] 实施例12:使用SPR确定新设计抗体与人和小鼠oxMIF的亲和力

[0348] 使用标准胺偶联条件将新设计抗体C0108和C0109以及对照抗oxMIF抗体C0008固定到Biacore CM5光学传感器芯片(GE Healthcare)上至在流动池FC2、FC3和FC4上分别约2500、1500或100RU的密度。FC1用作参考细胞,并且仅与缓冲液反应。在0.2％Proclin300(活性组分5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮;Sigma)的存在下,将小鼠或人重组MIF在HBS-EP缓冲液(GE Healthcare)中稀释至50、75、100或150nM的浓度,以在室温下在3h内将MIF转化为oxMIF替代物(Thiele M等,2015)。使用Biacore™3000仪器(GE Healthcare)将Proclin300处理的MIF以30μl/min的流速施加于固定化抗oxMIF抗体持续3min。解离时间为300秒,并且使用10mM HCl使芯片再生3分钟。使用由BiaEvaluation 4.1软件(GE Healthcare)提供的具有传质补偿的迭代Langmuir 1:1相互作用模型,通过从参考细胞(FC1)中减去背景后每个结合曲线的局部同时缔合/解离拟合来分析浓度系列的动力学。数据表示为流动池2-4的计算K_D值的平均值+/-SD(标准偏差)。

[0349] 结果和结论:通过SPR确定的效应子功能增强的新设计抗体与可溶性人和小鼠oxMIF的结合示出在表8中。结果清楚地显示,新设计抗体具有约3nM的纳摩尔亲和力,这在与对照抗oxMIF抗体C0008相同的范围内。对于所有抗oxMIF抗体,对小鼠oxMIF的亲和力比对人oxMIF低约5-8倍。因此,效应子功能增强以及疏水性和聚集性降低的新设计抗体保留了其与人和小鼠oxMIF的亲和力。

[0350] 表8:抗oxMIF抗体的亲和力(SPR)

[0351]

分析物	样品	K_D（nM）	SD（nM）
人 oxMIF	C0008	3.49	+/- 0.38
	C0108	6.06	+/- 2.30
	C0109	3.69	+/- 0.83
小鼠 oxMIF	C0008	26.9	+/- 3.01
	C0108	31.6	+/- 2.67
	C0109	28.6	+/- 0.21

[0352] 实施例13:在BALB/c裸小鼠中新设计抗oxMIF抗体C0083和C0090与对照抗oxMIF抗体C0008相比的药代动力学

[0353] 将新设计抗oxMIF抗体C0083和C0090以及对照抗oxMIF抗体C0008以10mg/kg的剂量静脉内注射到雌性BALB/c裸小鼠中。在注射后4、10、24、48和96h通过尾静脉穿刺使用K_2-EDTA包被的毛细管收集20μl血液,并且转移到含有60μl PBS的K_2-EDTA包被的小瓶中。离心后,通过定量抗oxMIF ELISA分析上清液(=1:4稀释的血浆)。

[0354] 简而言之,将在PBS中以1μg/ml稀释的重组人MIF(OncoOne)固定到ELISA板(MaxiSorp,Nunc)中在4℃下过夜。用稀释缓冲液(DB,2%鱼胶/TBST)封闭后,将稀释的血浆样品(最终稀释度1:100-1:100,000)添加到板中。使用山羊抗人IgG(Fc)-HRP缀合物(在TBST中1:40,000,Thermo Scientific#32420)检测结合的抗体。添加四甲基联苯胺(TMB,Thermo Scientific#34029)作为底物,并且用50μl 30%H_2SO_4终止显色反应,在450nm处测量OD。使用GraphPad Prism中的双曲线回归分析,使用C0008、C0083和C0090的连续稀释液生成标准曲线,并且计算抗体的血浆浓度。相对于收集时间绘制每个时间点的抗体平均浓度,并且通过GraphPad Prism中的单相衰变模型计算半衰期。

[0355] 结果:图13示出了遵循单指数衰减函数的抗oxMIF抗体的药代动力学。对照抗oxMIF抗体C0008的计算半衰期为11h,新设计抗oxMIF抗体C0083和C0090的计算半衰期分别为15h。另外,计算单指数衰减函数下方的曲线下面积(AUC),以估计总抗体暴露量和生物利用度。C0008、C0083和C0090的AUC分别计算为1600、3784和3266。

[0356] 示出了在BALB/c裸小鼠中新设计抗oxMIF抗体C0083和C0090与对照抗oxMIF抗体C0008相比的药代动力学。在单次静脉内注射10mg/kg的抗oxMIF抗体后4、10、24、48和96h通过定量抗oxMIF ELISA确定抗体的血浆浓度,并且通过GraphPad Prism中的单相衰变模型计算半衰期。

[0357] 结论:新设计抗oxMIF抗体C0083和C0090的可变区中的取代导致与对照抗oxMIF抗体C0008相比,1.4倍更长的半衰期和大于2倍更高的生物利用度(AUC)。

[0358] 实施例14:通过报告物测定确定的新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109的效应子功能增强。

[0359] 使用稳定表达人Fcγ RIIIa受体、V158(高亲和力同种异型)或F158(低亲和力同种异型)的工程化Jurkat细胞(用于阐明ADCC)(或者使用稳定表达人Fcγ RIIa H131同种异型受体(用于阐明ADCP))和驱动萤火虫萤光素酶表达的NFAT反应元件的工程化Jurkat细胞作为效应细胞,通过作为NFAT通路激活结果而产生的萤光素酶量化抗体生物活性。

[0360] 为了产生高度响应的靶细胞,将HCT116和A2780细胞用huMIF-pDisplay质粒(Invitrogen)转染,用遗传霉素筛选,并且通过FACS分选以产生稳定表达膜锚定的单体人MIF(HCT116-pMIF或A2780-pMIF)的细胞系,即MIF展示为单体蛋白,其中oxMIF表位可接近抗oxMIF抗体(Schinagl等,Biochemistry 2018)。这些细胞系显示出oxMIF在细胞表面的呈递增加,并且因此是用于体外分析的灵敏工具。

[0361] ADCC或ADCP报告物测定基本上根据制造商的建议(Promega#G7010和#G9991)进行。简而言之,将在100μl培养基(补充有Pen/Strept/L-谷氨酰胺和5%低IgG FBS的RPMI 1640培养基)中的$1x10^4$个细胞/孔的HCT116-pMIF(图14A和C)或A2780-pMIF(图14B)细胞接种到96孔板中,并且在加湿培养箱中在37℃/5%CO_2下孵育过夜以进行附着。之后,将效应子功能增强的新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109或具有wt Fc的对照抗体C0008的连续稀释液(最终浓度0.01-100nM)和Jurkat效应细胞(图14A-B,Fcγ RIIIa效应细胞;图14C,Fcγ RIIa效应细胞)以效应子与靶细胞约为6:1的比率在加湿培养箱中在37℃/5%CO_2下孵育6h。最后,将测定板平衡至室温,并且添加Bio-Glo萤光素酶试剂。使用Tecan多板读取器(0.5s积分时间),在10-20min孵育后测量发光(RLU)。

[0362] 结果:从图14A-C中可明显看到,当与HCT116-pMIF(图14A、C)或A2780-pMIF(图14B)细胞共孵育时,Fc部分中含有增强ADCC/ADCP的突变的新设计抗体C0108和C0109显示出ADCC(图14A-B)或ADCP(图14C)报告细胞的强激活,而对照抗体C0008未诱导或仅诱导少量的FcyRIIIa(ADCC,图14A-B)或FcyRIIa(ADCP,图14C)介导的Jurkat报告细胞激活。

[0363] 结论:与携带wt Fc的对照抗体C0008相比,Fc部分中含有增强ADCC/ADCP的突变的新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109在报告物生物测定中显示出高度增强的ADCC和ADCP活性。

[0364] 图14示出了通过报告物测定确定的新设计抗体C0108和C0109的效应子功能增强。(A-B)与具有wt Fc的抗oxMIF对照抗体C0008相比,用效应子功能增强的新设计抗体C0108和C0109使用稳定表达FcyRIIIa(V高反应者同种异型,F低反应者同种异型)的工程化Jurkat效应细胞和HCT116-pMIF(A)或A2780-pMIF(B)靶细胞进行ADCC报告物生物测定;(C)与具有wt Fc的抗oxMIF对照抗体C0008相比,用效应子功能增强的新设计抗体C0108和C0109使用稳定表达FcyRIIa的工程化Jurkat效应细胞和HCT116-pMIF靶细胞进行ADCP报告物生物测定。示出了平均值和SEM(n=2-4)。

[0365] 实施例15:通过PBMC细胞裂解生物测定确定新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109的ADCC功能增强。

[0366] 进行此测定以确定由新设计抗oxMIF抗体诱导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)引起的细胞裂解。通过HiBiT检测测定(Promega)测量细胞毒性,所述测定使用含有LgBit(LargeBiT)和Furimazine(咪唑并吡嗪酮类发光底物)的非裂解检测试剂量化从靶细胞中释放的HiBiT标记蛋白质。HiBiT和LgBiT自发组装成功能性NanoBiT®酶,并且在底物的存在下发出可量化的发光信号。

[0367] 为了产生高度响应的报告靶细胞,将HCT116细胞用HaloTag-HiBiT质粒(Promega#CS1956B17)转染,用杀稻瘟菌素筛选并且通过FACS分选作为细胞池。然后将稳定的表达HiBiT的细胞池用huMIF-pDisplay质粒(Invitrogen)转染,用遗传霉素筛选,并且通过FACS分选以产生稳定表达细胞内HiBiT和膜锚定的单体人oxMIF(HCT116-HiBiT-pMIF)的细胞

池,即MIF展示为单体蛋白,其中oxMIF表位可接近抗oxMIF抗体(Schinagl等,Biochemistry 2018)。这些细胞系显示出oxMIF在细胞表面的呈递增加,并且因此是用于体外分析的灵敏工具。

[0368] 简而言之,将在50μl培养基(补充有Pen/Strept/L-谷氨酰胺和5%超低IgG FBS的RPMI1640培养基)中的1x10^4个细胞/孔的HCT116-HiBiT-pMIF靶细胞接种到96孔板中,并且在加湿培养箱中在37℃/5%CO_2下孵育过夜以进行附着。此后,将50μl的新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109或具有wt Fc的对照抗oxMIF抗体C0008在培养基中的连续稀释液(最终浓度0.01-100nM)和50μl的来自两个单独健康供体的人PBMC效应细胞(4x10^5个细胞/孔;效应子与靶细胞的比率:40:1)添加到板中。通过FACS分析对两个不同供体的PBMC进行表征以评价其NK细胞含量,NK细胞是用于此测定的相关细胞类型。在添加抗体和PBMC后,将板在加湿培养箱中在37℃和5%CO_2下孵育过夜。第二天,添加10μl的Nano-Glo HiBiT细胞外检测试剂(Promega#N2421),并且在Tecan板读取器上测量发光信号(RLU,积分时间0.1s)。进行的测定包括一式两份或一式三份的分析样品和供体。

[0369] 结果:从图15中可明显看出,与对照抗oxMIF抗体C0008相比,Fc部分中含有增强ADCC/ADCP的突变的新设计抗体C0108和C0109显示出与来自两个供体的PBMC的ADCC活性大幅增加(图15A,22%NK细胞;图15B,7%NK细胞)。

[0370] 结论:与携带wt Fc的对照抗oxMIF抗体相比,Fc部分中含有增强ADCC/ADCP的突变的新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109在PBMC介导的细胞杀伤测定中确实显示出高度增加的ADCC活性。

[0371] 图15示出了通过PBMC介导的细胞毒性生物测定确定的在Fc部分中含有增强ADCC/ADCP的突变的新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109的ADCC活性增强。与具有wt Fc的抗oxMIF对照抗体C0008相比,用新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109以及PBMC作为效应细胞(A:22%NK细胞,B:7%NK细胞)和HCT116-pMIF作为靶细胞的ADCC生物测定。示出了使用来自两个健康供体的PBMC的两个或三个重复的平均值和SEM。

[0372] 实施例16:新设计抗oxMIF抗体显示从人PBMC释放的非特异性细胞因子显著减少。

[0373] 细胞因子释放综合征(CRS)是一种全身炎症反应综合征(SIRS)形式,其可能由多种因素例如感染触发。已知CRS也是一些单克隆抗体药物的不良反应。当包括B细胞、T细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突细胞和单核细胞在内的大量白细胞被激活,并且释放炎症细胞因子(如IL-6、IFN-γ、IL-8、MCP-1等)时,发生CRS,这些细胞因子在致病性炎症的正反馈环中激活更多白细胞。当此过程失调时,由于全身过度炎症、低血压性休克和多器官衰竭,可能危及生命。因此,在体外测定中评估新设计抗oxMIF抗体从PMBC释放炎症细胞因子的潜力。

[0374] 简而言之,在96孔板中,在150μl补充有5%超低IgG血清的RPMI1640培养基中,将新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109(均为70nM)和抗oxMIF对照抗体C0008(70nM)与来自三个健康供体的新鲜解冻的PBMC(4-5x10^5个细胞/孔)孵育。在加湿培养箱中在37℃/5%CO_2下孵育过夜后,将板以300x g离心5min以沉淀细胞,将上清液转移至96孔V形底板。根据制造商的方案,通过BioLegend LegendPlex cytometric bead细胞计数珠测定对澄清的上清液进行人IL-6和人MCP-1分析。在具有96孔板装载器(Beckman-Colter)的CytoFlex-S血细胞计数器上进行测量。微珠分类通道是APC(激光638nm激发,带通滤波器660/10nm),而报告物通

道是PE(黄色激光561nm激发,带通滤波器585/42nm)。使用LegendPlex分析软件(BioLegend)分析数据,在GraphPad Prism中生成图。示出了来自3个不同PMBC供体的平均值+/-SEM。

[0375] 结果和结论:从图16中可明显看出,与C0008相比,Fc部分中含有增强ADCC/ADCP的突变的新设计抗体C0108和C0109令人惊讶地显示出在高达70nM的浓度下,从PBMC中没有释放或仅释放可忽略不计的IL-6和MCP-1。可以预期,与含有wt Fc部分的参考抗oxMIF抗体C0008相比,C0108和C0109由于其对Fcγ受体的高亲和力而诱导更高水平的细胞因子释放。尽管如此,C0008在相同浓度(70nM)下诱导了IL-6和MCP-1的显著释放,这显然是由于其更高的聚集倾向和由其疏水性导致的非特异性结合。已知抗体治疗剂的聚集,即使少量聚集,也会强烈增强从免疫细胞中的细胞因子释放。

[0376] 图16示出了,新设计抗oxMIF抗体显示从人PBMC释放的非特异性细胞因子显著减少。将在Fc部分中含有增强ADCC/ADCP的突变的新设计抗oxMIF抗体C0108和C0109(70nM)和对照抗oxMIF抗体C0008(70nM)与人PBMC一起孵育过夜,并且在LegendPlex细胞计数珠测定(BioLegend)中分析上清液的人IL-6(A)和人MCP-1(B)。示出了来自3个不同PMBC供体的细胞因子浓度的平均值+/-SEM。

[0377] 参考文献

[0378] Bloom B.R.and Bennet,B.,1966,Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity,Science 153,80-82.

[0379] Brinkmann U.and Kontermann R.E.,2017,The making of bispecific antibodies,MABS,9,2,182-212.

[0380] David,J.R.,1966,Delayed hypersensitivity in vitro:its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.56,72-77.

[0381] Estep P.et al.,2015,An alternative assay to hydrophobic interaction chromatography for high-throughput characterization of monoclonal antibodies,MAbs,7(3),553-561.

[0382] Ewert S.et al.,2003,Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach,Biochemistry,18,42(6),1517-28.

[0383] Hong,P.,et al.(2012).A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates.In Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies(Vol.35,Issue 20,pp.2923-2950).Taylor&Francis.https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724.

[0384] Hussain F.et al.,2013,Human anti-macrophage migration inhibitory factor antibodies inhibit growth of human prostate cancer cells in vitro and in vivo,Mol Cancer Ther.Jul;12(7):1223-34.

[0385] Ianello A.and Ahmad A.,2005,Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies,Cancer and Metastasis Review,24,487-499.

[0386] Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),vols.1-3.

[0387] Mahalingam D.et al.,2015,ASCO Abstract ID2518.

[0388] Mahalingam et al.2020,Phase I study of Imalumab(BAX69),a fully human recombinant antioxidized macrophage migration inhibitory factor antibody in advanced solid tumours,Br J Clin Pharmacol.86(9):1836-1848.

[0389] Morrison,S.L.,et al.,1984,Chimeric human antibody molecules:mouse antigen-binding domains with human constant region domains, Proc.Natl.Acad.Sci.81,6851-6855.

[0390] Natsume A.et al.,2009,“Improving effector functions of antibodies for cancer treatment:Enhancing ADCC and CDC”,Drug,Design,development and Therapy, 3,7-16.

[0391] Sambrook et al,"Molecular Cloning:ALaboratory Manual"(4th Ed.),Vols.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory Press(2012).

[0392] Schinagl,A.,et al.,2018,Role of the Cysteine 81 Residue of Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Molecular Redox Switch.Biochemistry,57(9), 1523-1532.https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01156.

[0393] Schinagl.A.et al.,2016,Oxidized macrophage migration inhibitory factor is a potential new tissue marker and drug target in cancer, Oncotarget.Nov 8;7(45):73486-73496.

[0394] Spiess C.et al.,2015,Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies,Mol.Immunol.,67,95-106.

[0395] Tang J.,et al.,2018,Comprehensive analysis of the clinical immuno-oncology landscape,Ann Oncol.;29(1):84-91.

[0396] Thiele,M.et al.,(2015).Selective Targeting of a Disease-Related Conformational Isoform of Macrophage Migration Inhibitory Factor Ameliorates Inflammatory Conditions.Journal of Immunology,195(5),2343-2352.https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500572.

[0397] Van der Kant,R.et al.,2017,Prediction and Reduction of the Aggregation of Monoclonal Antibodies,J.Mol.Biol.,429(8),1244-1261.

[0398] Wei Li et al.,2016,Antibody Aggregation:Insights from Sequence and Structure,Antibodies,5(3),19.

[0399] Willuda J.et al.,1999,High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments:engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2(epithelial cell adhesion molecule)single-chain Fv fragment, Cancer Res.,15;59(22),5758-67.

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 翁科奥内研发有限责任公司

[0003] <120> 聚集潜在性降低和疏水性降低的改良抗oxMIF抗体

[0004] <130> P23JM1WN00205AT

[0005] <150> EP20199829.1

[0006] <151> 2020 - 10 - 02

[0007] <160> 45

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 329

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0013] <220>

[0014] <223> 抗oxMIF恒定重链(CH), CH1-CH3

[0015] <400> 1

[0016] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

[0017] 1 5 10 15

[0018] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

[0019] 20 25 30

[0020] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0021] 35 40 45

[0022] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

[0023] 50 55 60

[0024] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0025] 65 70 75 80

[0026] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0027] 85 90 95

[0028] Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

[0029] 100 105 110

[0030] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0031] 115 120 125

[0032] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0033] 130 135 140

[0034] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

[0035] 145 150 155 160

[0036] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0037] 165 170 175

[0038] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

[0039] 180 185 190

[0040] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

[0041] 195 200 205

[0042] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

[0043] 210 215 220

[0044] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

[0045] 225 230 235 240

[0046] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

[0047] 245 250 255

[0048] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

[0049] 260 265 270

[0050] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

[0051] 275 280 285

[0052] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

[0053] 290 295 300

[0054] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

[0055] 305 310 315 320

[0056] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0057] 325

[0058] <210> 2

[0059] <211> 329

[0060] <212> PRT

[0061] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0062] <220>

[0063] <223> 抗oxMIF恒定重链(CH), CH1-CH3

[0064] <400> 2

[0065] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

[0066] 1 5 10 15

[0067] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

[0068] 20 25 30

[0069] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0070] 35 40 45

[0071] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

[0072] 50 55 60

[0073] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0074] 65 70 75 80

[0075] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0076] 85 90 95

[0077] Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

[0078] 100 105 110

[0079] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0080] 115 120 125

[0081] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0082] 130 135 140

[0083] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

[0084] 145 150 155 160

[0085] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0086] 165 170 175

[0087] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

[0088] 180 185 190

[0089] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

[0090] 195 200 205

[0091] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

[0092] 210 215 220

[0093] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

[0094] 225 230 235 240

[0095] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

[0096] 245 250 255

[0097] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

[0098] 260 265 270

[0099] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

[0100] 275 280 285

[0101] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

[0102] 290 295 300

[0103] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

[0104] 305 310 315 320

[0105] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0106] 325

[0107] <210> 3

[0108] <211> 329

[0109] <212> PRT

[0110] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0111] <220>

[0112] <223> 抗oxMIF恒定重链(CH), CH1-CH3

[0113] <400> 3

[0114] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

[0115] 1 5 10 15

[0116] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

[0117] 20 25 30

[0118] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0119] 35 40 45

[0120] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

[0121] 50 55 60

[0122] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0123] 65 70 75 80

[0124] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0125] 85 90 95

[0126] Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

[0127] 100 105 110

[0128] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0129] 115 120 125

[0130] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0131] 130 135 140

[0132] Val Val Val Asp Val Ser Phe Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

[0133] 145 150 155 160

[0134] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0135] 165 170 175

[0136] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

[0137] 180 185 190

[0138] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Thr Asn

[0139] 195 200 205

[0140] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

[0141] 210 215 220

[0142] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

[0143] 225 230 235 240

[0144] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

[0145] 245 250 255

[0146] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

[0147] 260 265 270

[0148] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

[0149] 275 280 285

[0150] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

[0151] 290 295 300

[0152] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

[0153] 305 310 315 320

[0154] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0155] 325

[0156] <210> 4

[0157] <211> 329

[0158] <212> PRT

[0159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0160] <220>

[0161] <223> 抗oxMIF恒定重链(CH), CH1-CH3

[0162] <400> 4

[0163] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

[0164] 1 5 10 15

[0165] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

[0166] 20 25 30

[0167] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0168] 35 40 45

[0169] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

[0170] 50 55 60

[0171] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0172] 65 70 75 80

[0173] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0174] 85 90 95

[0175] Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

[0176] 100 105 110

[0177] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro

[0178] 115 120 125

[0179] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

[0180] 130 135 140

[0181] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

[0182] 145 150 155 160

[0183] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0184] 165 170 175

[0185] Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val

[0186] 180 185 190

[0187] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

[0188] 195 200 205

[0189] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly

[0190] 210 215 220

[0191] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

[0192] 225 230 235 240

[0193] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

[0194] 245 250 255

[0195] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0196] 260 265 270
[0197] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0198] 275 280 285
[0199] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0200] 290 295 300
[0201] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0202] 305 310 315 320
[0203] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0204] 325
[0205] <210> 5
[0206] <211> 329
[0207] <212> PRT
[0208] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0209] <220>
[0210] <223> 抗oxMIF恒定重链(CH), CH1-CH3
[0211] <400> 5
[0212] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[0213] 1 5 10 15
[0214] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0215] 20 25 30
[0216] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0217] 35 40 45
[0218] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0219] 50 55 60
[0220] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[0221] 65 70 75 80
[0222] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0223] 85 90 95
[0224] Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[0225] 100 105 110
[0226] Pro Ala Pro Glu Leu Val Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Leu Pro Pro
[0227] 115 120 125
[0228] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0229] 130 135 140
[0230] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[0231] 145 150 155 160
[0232] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Pro Glu
[0233] 165 170 175

[0234] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0235] 180 185 190
[0236] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0237] 195 200 205
[0238] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0239] 210 215 220
[0240] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
[0241] 225 230 235 240
[0242] Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0243] 245 250 255
[0244] Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0245] 260 265 270
[0246] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0247] 275 280 285
[0248] Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0249] 290 295 300
[0250] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0251] 305 310 315 320
[0252] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0253] 325
[0254] <210> 6
[0255] <211> 118
[0256] <212> PRT
[0257] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0258] <220>
[0259] <223> 抗oxMIF VH
[0260] <400> 6
[0261] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0262] 1 5 10 15
[0263] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
[0264] 20 25 30
[0265] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0266] 35 40 45
[0267] Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0268] 50 55 60
[0269] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0270] 65 70 75 80
[0271] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0272] 85 90 95

[0273] Ala Gly Ser Gln Trp Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
[0274] 100 105 110
[0275] Thr Val Thr Val Ser Ser
[0276] 115
[0277] <210> 7
[0278] <211> 118
[0279] <212> PRT
[0280] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0281] <220>
[0282] <223> 抗oxMIF VH
[0283] <400> 7
[0284] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0285] 1 5 10 15
[0286] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
[0287] 20 25 30
[0288] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0289] 35 40 45
[0290] Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0291] 50 55 60
[0292] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0293] 65 70 75 80
[0294] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0295] 85 90 95
[0296] Ala Gly Ser Gln Trp Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
[0297] 100 105 110
[0298] Thr Val Thr Val Ser Ser
[0299] 115
[0300] <210> 8
[0301] <211> 118
[0302] <212> PRT
[0303] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0304] <220>
[0305] <223> 抗oxMIF VH
[0306] <400> 8
[0307] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0308] 1 5 10 15
[0309] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
[0310] 20 25 30
[0311] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0312] 35 40 45

[0313] Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0314] 50 55 60

[0315] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0316] 65 70 75 80

[0317] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0318] 85 90 95

[0319] Ala Gly Ser Gln Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

[0320] 100 105 110

[0321] Thr Val Thr Val Ser Ser

[0322] 115

[0323] <210> 9

[0324] <211> 107

[0325] <212> PRT

[0326] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0327] <220>

[0328] <223> 抗oxMIF VL

[0329] <400> 9

[0330] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0331] 1 5 10 15

[0332] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Met Thr Tyr

[0333] 20 25 30

[0334] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0335] 35 40 45

[0336] Phe Val Ala Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly

[0337] 50 55 60

[0338] Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

[0339] 65 70 75 80

[0340] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Trp Thr Pro Leu

[0341] 85 90 95

[0342] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0343] 100 105

[0344] <210> 10

[0345] <211> 107

[0346] <212> PRT

[0347] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0348] <220>

[0349] <223> 抗oxMIF VL

[0350] <400> 10

[0351] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0352] 1 5 10 15
[0353] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Met Thr Tyr
[0354] 20 25 30
[0355] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0356] 35 40 45
[0357] Tyr Val Gly Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
[0358] 50 55 60
[0359] Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
[0360] 65 70 75 80
[0361] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Trp Thr Pro Leu
[0362] 85 90 95
[0363] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0364] 100 105
[0365] <210> 11
[0366] <211> 107
[0367] <212> PRT
[0368] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0369] <220>
[0370] <223> 抗oxMIF VL
[0371] <400> 11
[0372] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0373] 1 5 10 15
[0374] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Met Thr Tyr
[0375] 20 25 30
[0376] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0377] 35 40 45
[0378] Tyr Val Gly Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
[0379] 50 55 60
[0380] Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
[0381] 65 70 75 80
[0382] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Phe Thr Pro Leu
[0383] 85 90 95
[0384] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0385] 100 105
[0386] <210> 12
[0387] <211> 107
[0388] <212> PRT
[0389] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0390] <220>

[0391] <223> 抗oxMIF VL

[0392] <400> 12

[0393] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0394] 1 5 10 15

[0395] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Leu Thr Tyr

[0396] 20 25 30

[0397] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0398] 35 40 45

[0399] Tyr Val Gly Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly

[0400] 50 55 60

[0401] Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

[0402] 65 70 75 80

[0403] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Phe Thr Pro Leu

[0404] 85 90 95

[0405] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0406] 100 105

[0407] <210> 13

[0408] <211> 107

[0409] <212> PRT

[0410] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0411] <220>

[0412] <223> 抗oxMIF VL

[0413] <400> 13

[0414] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0415] 1 5 10 15

[0416] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Leu Thr Tyr

[0417] 20 25 30

[0418] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0419] 35 40 45

[0420] Tyr Val Gly Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly

[0421] 50 55 60

[0422] Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ser

[0423] 65 70 75 80

[0424] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Phe Thr Pro Leu

[0425] 85 90 95

[0426] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0427] 100 105

[0428] <210> 14

[0429] <211> 5
[0430] <212> PRT
[0431] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0432] <220>
[0433] <223> 抗oxMIF CDR1-H2
[0434] <400> 14
[0435] Arg Tyr Thr Met His
[0436] 1 5
[0437] <210> 15
[0438] <211> 5
[0439] <212> PRT
[0440] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0441] <220>
[0442] <223> 抗oxMIF CDR1-H2
[0443] <400> 15
[0444] Gly Tyr Gly Met His
[0445] 1 5
[0446] <210> 16
[0447] <211> 5
[0448] <212> PRT
[0449] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0450] <220>
[0451] <223> 抗oxMIF CDR1-H2
[0452] <400> 16
[0453] Ser Phe Pro Met Ala
[0454] 1 5
[0455] <210> 17
[0456] <211> 17
[0457] <212> PRT
[0458] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0459] <220>
[0460] <223> 抗oxMIF CDR2-H2
[0461] <400> 17
[0462] Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0463] 1 5 10 15
[0464] Asp
[0465] <210> 18
[0466] <211> 17
[0467] <212> PRT

[0468] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0469] <220>

[0470] <223> 抗oxMIF CDR2-H2

[0471] <400> 18

[0472] Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

[0473] 1 5 10 15

[0474] Gly

[0475] <210> 19

[0476] <211> 17

[0477] <212> PRT

[0478] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0479] <220>

[0480] <223> 抗oxMIF CDR2-H2

[0481] <400> 19

[0482] Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys

[0483] 1 5 10 15

[0484] Gly

[0485] <210> 20

[0486] <211> 10

[0487] <212> PRT

[0488] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0489] <220>

[0490] <223> 抗oxMIF CDR3-H2

[0491] <400> 20

[0492] Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

[0493] 1 5 10

[0494] <210> 21

[0495] <211> 9

[0496] <212> PRT

[0497] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0498] <220>

[0499] <223> 抗oxMIF CDR3-H2

[0500] <400> 21

[0501] Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Asp Leu

[0502] 1 5

[0503] <210> 22

[0504] <211> 10

[0505] <212> PRT

[0506] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0507] <220>

[0508] <223> 抗oxMIF CDR3-H2

[0509] <400> 22

[0510] Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr

[0511] 1 5 10

[0512] <210> 23

[0513] <211> 10

[0514] <212> PRT

[0515] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0516] <220>

[0517] <223> 抗oxMIF CDR3-H2

[0518] <400> 23

[0519] Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr

[0520] 1 5 10

[0521] <210> 24

[0522] <211> 10

[0523] <212> PRT

[0524] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0525] <220>

[0526] <223> 抗oxMIF CDR1-L2

[0527] <400> 24

[0528] Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn

[0529] 1 5 10

[0530] <210> 25

[0531] <211> 10

[0532] <212> PRT

[0533] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0534] <220>

[0535] <223> 抗oxMIF CDR1-L2

[0536] <400> 25

[0537] Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn

[0538] 1 5 10

[0539] <210> 26

[0540] <211> 11

[0541] <212> PRT

[0542] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0543] <220>

[0544] <223> 抗oxMIF CDR1-L2

[0545] <400> 26

[0546] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
[0547] 1 5 10
[0548] <210> 27
[0549] <211> 13
[0550] <212> PRT
[0551] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0552] <220>
[0553] <223> 抗oxMIF CDR1-L2
[0554] <400> 27
[0555] Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ile Glu Asn Asn Tyr Val His
[0556] 1 5 10
[0557] <210> 28
[0558] <211> 7
[0559] <212> PRT
[0560] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0561] <220>
[0562] <223> 抗oxMIF CDR2-L2
[0563] <400> 28
[0564] Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
[0565] 1 5
[0566] <210> 29
[0567] <211> 7
[0568] <212> PRT
[0569] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0570] <220>
[0571] <223> 抗oxMIF CDR2-L2
[0572] <400> 29
[0573] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
[0574] 1 5
[0575] <210> 30
[0576] <211> 7
[0577] <212> PRT
[0578] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0579] <220>
[0580] <223> 抗oxMIF CDR2-L2
[0581] <400> 30
[0582] Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
[0583] 1 5
[0584] <210> 31

[0585] <211> 7
[0586] <212> PRT
[0587] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0588] <220>
[0589] <223> 抗oxMIF CDR2-L2
[0590] <400> 31
[0591] Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp
[0592] 1 5
[0593] <210> 32
[0594] <211> 9
[0595] <212> PRT
[0596] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0597] <220>
[0598] <223> 抗oxMIF CDR3-L2
[0599] <400> 32
[0600] Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
[0601] 1 5
[0602] <210> 33
[0603] <211> 9
[0604] <212> PRT
[0605] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0606] <220>
[0607] <223> 抗oxMIF CDR3-L2
[0608] <400> 33
[0609] Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
[0610] 1 5
[0611] <210> 34
[0612] <211> 10
[0613] <212> PRT
[0614] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0615] <220>
[0616] <223> 抗oxMIF CDR3-L2
[0617] <400> 34
[0618] Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
[0619] 1 5 10
[0620] <210> 35
[0621] <211> 9
[0622] <212> PRT
[0623] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0624] <220>

[0625] <223> 抗oxMIF CDR3-L2

[0626] <400> 35

[0627] Ser Gln Trp Leu Tyr Gly Met Asp Val

[0628] 1 5

[0629] <210> 36

[0630] <211> 7

[0631] <212> PRT

[0632] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0633] <220>

[0634] <223> 抗oxMIF CDR3-L2

[0635] <400> 36

[0636] Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro

[0637] 1 5

[0638] <210> 37

[0639] <211> 107

[0640] <212> PRT

[0641] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0642] <220>

[0643] <223> 抗oxMIF VL

[0644] <400> 37

[0645] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0646] 1 5 10 15

[0647] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Met Thr Tyr

[0648] 20 25 30

[0649] Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0650] 35 40 45

[0651] Tyr Val Gly Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly

[0652] 50 55 60

[0653] Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

[0654] 65 70 75 80

[0655] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Trp Thr Pro Leu

[0656] 85 90 95

[0657] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0658] 100 105

[0659] <210> 38

[0660] <211> 107

[0661] <212> PRT

[0662] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0663] <220>

[0664] <223> 抗oxMIF CL

[0665] <400> 38

[0666] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

[0667] 1 5 10 15

[0668] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

[0669] 20 25 30

[0670] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

[0671] 35 40 45

[0672] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

[0673] 50 55 60

[0674] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

[0675] 65 70 75 80

[0676] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

[0677] 85 90 95

[0678] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0679] 100 105

[0680] <210> 39

[0681] <211> 214

[0682] <212> PRT

[0683] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0684] <220>

[0685] <223> 抗oxMIF C0083轻链

[0686] <400> 39

[0687] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0688] 1 5 10 15

[0689] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Met Thr Tyr

[0690] 20 25 30

[0691] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0692] 35 40 45

[0693] Tyr Val Gly Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly

[0694] 50 55 60

[0695] Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

[0696] 65 70 75 80

[0697] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Phe Thr Pro Leu

[0698] 85 90 95

[0699] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

[0700] 100 105 110

[0701] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

[0702] 115 120 125

[0703] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

[0704] 130 135 140

[0705] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

[0706] 145 150 155 160

[0707] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

[0708] 165 170 175

[0709] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

[0710] 180 185 190

[0711] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

[0712] 195 200 205

[0713] Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0714] 210

[0715] <210> 40

[0716] <211> 447

[0717] <212> PRT

[0718] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0719] <220>

[0720] <223> 抗oxMIF C0083重链

[0721] <400> 40

[0722] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0723] 1 5 10 15

[0724] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr

[0725] 20 25 30

[0726] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0727] 35 40 45

[0728] Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0729] 50 55 60

[0730] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0731] 65 70 75 80

[0732] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0733] 85 90 95

[0734] Ala Gly Ser Gln Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

[0735] 100 105 110

[0736] Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

[0737] 115 120 125

[0738] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

[0739] 130 135 140

[0740] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

[0741] 145 150 155 160
[0742] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[0743] 165 170 175
[0744] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[0745] 180 185 190
[0746] Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
[0747] 195 200 205
[0748] Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
[0749] 210 215 220
[0750] His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
[0751] 225 230 235 240
[0752] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0753] 245 250 255
[0754] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[0755] 260 265 270
[0756] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0757] 275 280 285
[0758] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0759] 290 295 300
[0760] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0761] 305 310 315 320
[0762] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[0763] 325 330 335
[0764] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0765] 340 345 350
[0766] Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0767] 355 360 365
[0768] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0769] 370 375 380
[0770] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0771] 385 390 395 400
[0772] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0773] 405 410 415
[0774] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0775] 420 425 430
[0776] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0777] 435 440 445
[0778] <210> 41
[0779] <211> 214

[0780] <212> PRT

[0781] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0782] <220>

[0783] <223> 抗oxMIF C0090轻链

[0784] <400> 41

[0785] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0786] 1 5 10 15

[0787] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Arg Ile Leu Thr Tyr

[0788] 20 25 30

[0789] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0790] 35 40 45

[0791] Tyr Val Gly Ser His Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly

[0792] 50 55 60

[0793] Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ser

[0794] 65 70 75 80

[0795] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Phe Thr Pro Leu

[0796] 85 90 95

[0797] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

[0798] 100 105 110

[0799] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

[0800] 115 120 125

[0801] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

[0802] 130 135 140

[0803] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

[0804] 145 150 155 160

[0805] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

[0806] 165 170 175

[0807] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

[0808] 180 185 190

[0809] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

[0810] 195 200 205

[0811] Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0812] 210

[0813] <210> 42

[0814] <211> 447

[0815] <212> PRT

[0816] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0817] <220>

[0818] <223> 抗oxMIF C0090

[0819] <400> 42

[0820] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0821] 1 5 10 15

[0822] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr

[0823] 20 25 30

[0824] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0825] 35 40 45

[0826] Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0827] 50 55 60

[0828] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0829] 65 70 75 80

[0830] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0831] 85 90 95

[0832] Ala Gly Ser Gln Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

[0833] 100 105 110

[0834] Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

[0835] 115 120 125

[0836] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

[0837] 130 135 140

[0838] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

[0839] 145 150 155 160

[0840] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

[0841] 165 170 175

[0842] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

[0843] 180 185 190

[0844] Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

[0845] 195 200 205

[0846] Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

[0847] 210 215 220

[0848] His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

[0849] 225 230 235 240

[0850] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

[0851] 245 250 255

[0852] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

[0853] 260 265 270

[0854] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

[0855] 275 280 285

[0856] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

[0857] 290 295 300

[0858] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0859] 305 310 315 320
[0860] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[0861] 325 330 335
[0862] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0863] 340 345 350
[0864] Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0865] 355 360 365
[0866] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0867] 370 375 380
[0868] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0869] 385 390 395 400
[0870] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0871] 405 410 415
[0872] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0873] 420 425 430
[0874] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0875] 435 440 445
[0876] <210> 43
[0877] <211> 7
[0878] <212> PRT
[0879] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0880] <220>
[0881] <223> oxMIF表位
[0882] <400> 43
[0883] Glu Pro Cys Ala Leu Cys Ser
[0884] 1 5
[0885] <210> 44
[0886] <211> 447
[0887] <212> PRT
[0888] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0889] <220>
[0890] <223> C0108重链
[0891] <400> 44
[0892] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0893] 1 5 10 15
[0894] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
[0895] 20 25 30
[0896] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0897] 35 40 45

[0898] Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0899] 50 55 60

[0900] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0901] 65 70 75 80

[0902] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0903] 85 90 95

[0904] Ala Gly Ser Gln Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

[0905] 100 105 110

[0906] Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

[0907] 115 120 125

[0908] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

[0909] 130 135 140

[0910] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

[0911] 145 150 155 160

[0912] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

[0913] 165 170 175

[0914] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

[0915] 180 185 190

[0916] Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

[0917] 195 200 205

[0918] Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

[0919] 210 215 220

[0920] His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp

[0921] 225 230 235 240

[0922] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

[0923] 245 250 255

[0924] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

[0925] 260 265 270

[0926] Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

[0927] 275 280 285

[0928] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val

[0929] 290 295 300

[0930] Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

[0931] 305 310 315 320

[0932] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr

[0933] 325 330 335

[0934] Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

[0935] 340 345 350

[0936] Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0937] 355 360 365
[0938] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0939] 370 375 380
[0940] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
[0941] 385 390 395 400
[0942] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0943] 405 410 415
[0944] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0945] 420 425 430
[0946] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0947] 435 440 445
[0948] <210> 45
[0949] <211> 447
[0950] <212> PRT
[0951] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0952] <220>
[0953] <223> C0109重链
[0954] <400> 45
[0955] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0956] 1 5 10 15
[0957] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
[0958] 20 25 30
[0959] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0960] 35 40 45
[0961] Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0962] 50 55 60
[0963] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0964] 65 70 75 80
[0965] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0966] 85 90 95
[0967] Ala Gly Ser Gln Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
[0968] 100 105 110
[0969] Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
[0970] 115 120 125
[0971] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
[0972] 130 135 140
[0973] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
[0974] 145 150 155 160

[0975] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[0976] 165 170 175
[0977] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[0978] 180 185 190
[0979] Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
[0980] 195 200 205
[0981] Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
[0982] 210 215 220
[0983] His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp
[0984] 225 230 235 240
[0985] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0986] 245 250 255
[0987] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[0988] 260 265 270
[0989] Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0990] 275 280 285
[0991] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
[0992] 290 295 300
[0993] Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0994] 305 310 315 320
[0995] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr
[0996] 325 330 335
[0997] Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0998] 340 345 350
[0999] Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[1000] 355 360 365
[1001] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[1002] 370 375 380
[1003] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
[1004] 385 390 395 400
[1005] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[1006] 405 410 415
[1007] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[1008] 420 425 430
[1009] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1010] 435 440 445

序列 恒定重链(CH), CH1-CH3

- wt

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:1)

- S239D/I332E

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP**E**EKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:2)

- S239D/I332E/H268F/S324T

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS**F**EDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV**T**NKALPAP**E**EKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:3)

- R214K/S239D/K274Q/Y296F/Y300F/L309V/I332E/A339T/V397M

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<u>K</u>VEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV

HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP**E**EKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:4)

- L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L/E356D/M358L

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY**I**CNVNHKPSNTKVDK**R**VEPKSCDKTHTC PPCPAPEL**V**GGPSVFL**L**PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKP**P**EEQYNST**L**RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP**L**VL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:5)

序列 VH

- wt

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIG SSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQWLYGMDVW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:6)

- L5Q

EVQL**Q**ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI GSSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQWLYGMDV WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:7)

- L5Q/W97Y

EVQL**Q**ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI GSSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQ**Y**LYGMDV WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:8)

序列 VL

- wt

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNWYQQKPGKAPKLLIFVASH SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSFWTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)

- F49Y/A51G

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNWYQQKPGKAPKLLI**Y**V**G**SH SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSFWTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:10)

- F49Y/A51G/W93F

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNWYQQKPGKAPKLLI**Y**V**G**SH SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSF**F**TPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:11)

- M30L/F49Y/A51G/W93F

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRI**L**TYLNWYQQKPGKAPKLLI**Y**V**G**SHS QSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSF**F**TPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:12)

- M30L/F49Y/A51G/P80S/W93F

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRI**L**TYLNWYQQKPGKAPKLLI**Y**V**G**SHS QSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQ**S**EDSATYYCQQSF**F**TPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:13)

- Y36F/F49Y/A51G

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNW**F**QQKPGKAPKLLI**Y**V**G**SH SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSFWTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:37)

序列 CL

- wt

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:38)

C0083 VH-L5Q/W97Y/ VL-F49Y A51G W93F:

- C0083 轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNWYQQKPGKAPKLLI**Y**V**G**SH SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSF**F**TPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:39)

- C0083 重链

EVQL**Q**ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI
GSSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQ**Y**LYGMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:40)

C0090 VH- L5Q W97Y/ VL -F49Y A51G M30L W93F P80S:

- C0090 轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRI**L**TYLNWYQQKPGKAPKLLI**Y**V**G**SHS
QSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQ**S**EDSATYYCQQSF**F**TPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

- C0090 重链

EVQL**Q**ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI
GSSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQ**Y**LYGMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:42)

- C0108 重链

EVQL**Q**ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI
GSSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQ**Y**LYGMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP**E**E
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:44)

- C0109 重链

EVQL**Q**ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI
GSSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQ**Y**LYGMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP**E**E
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:45)

图1

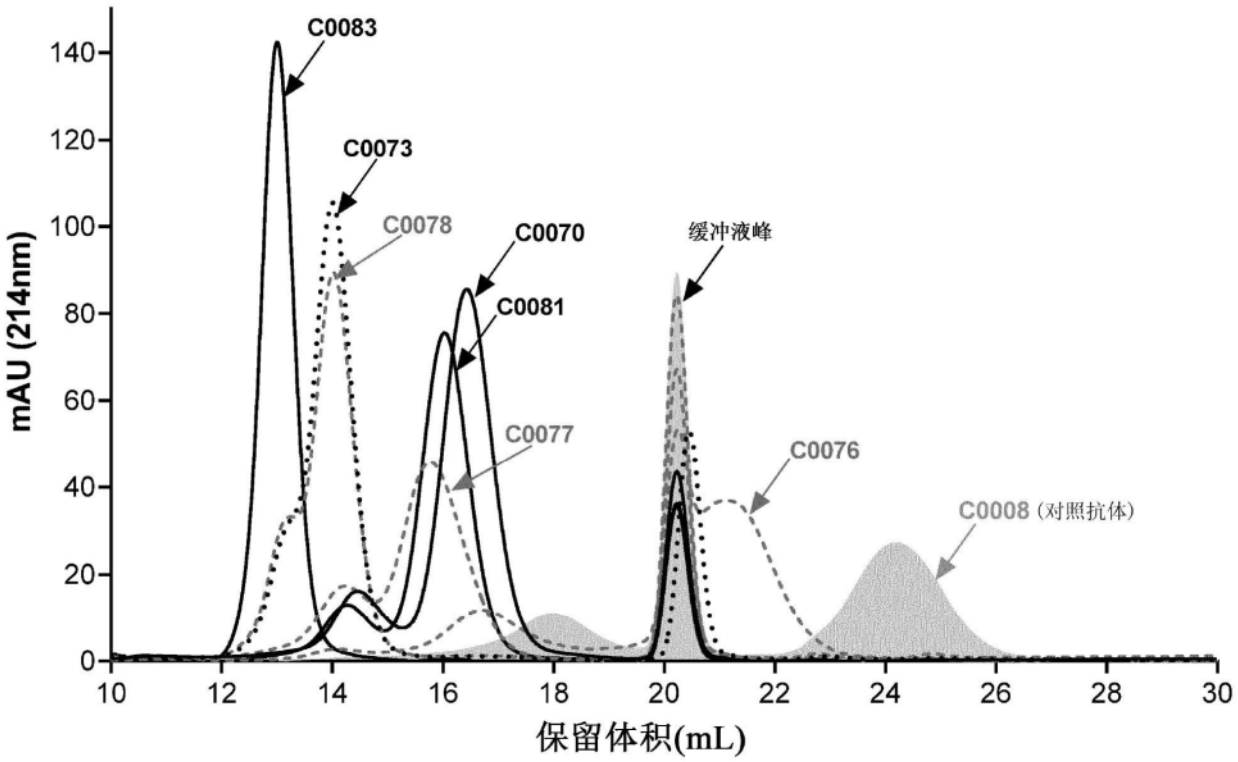

C0083
C0073
C0078
C0070
C0081
缓冲液峰
C0077
C0076
C0008（对照抗体）
mAU (214nm)
保留体积(mL)

图2A

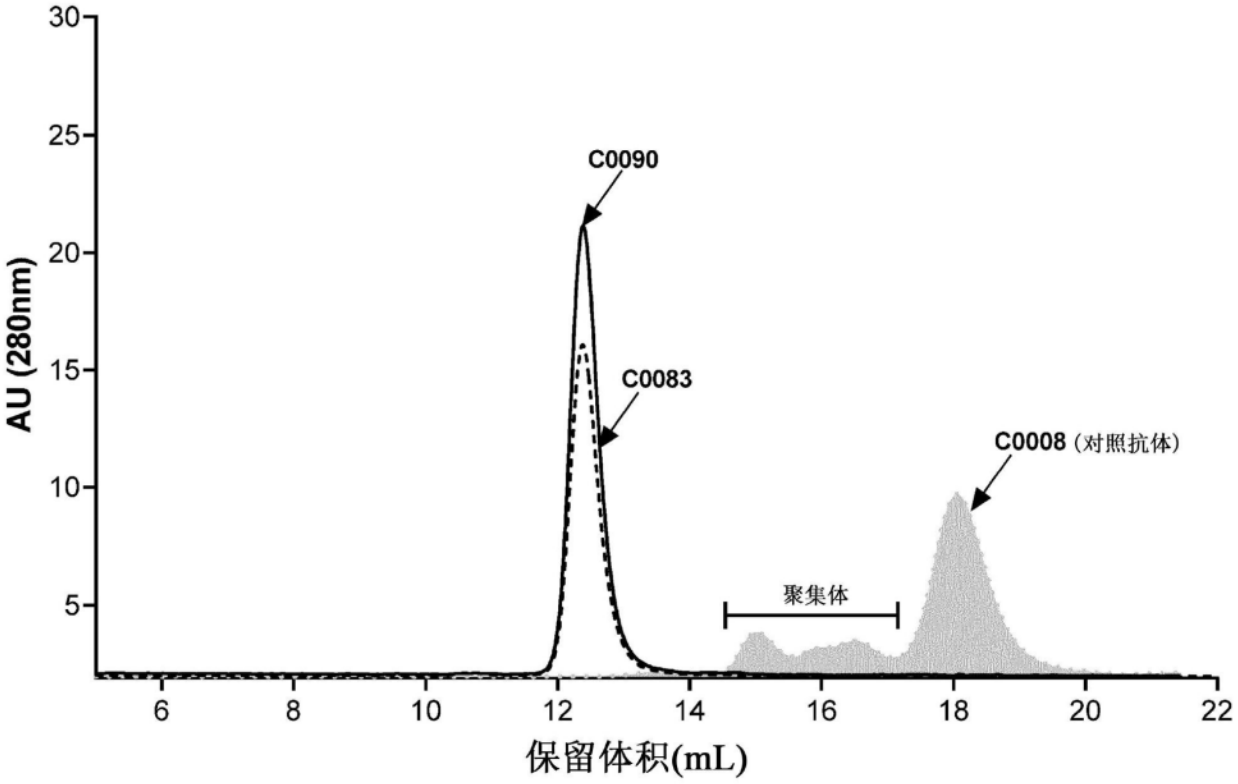

C0090
C0083
C0008（对照抗体）
聚集体
AU (280nm)
保留体积(mL)

图2B

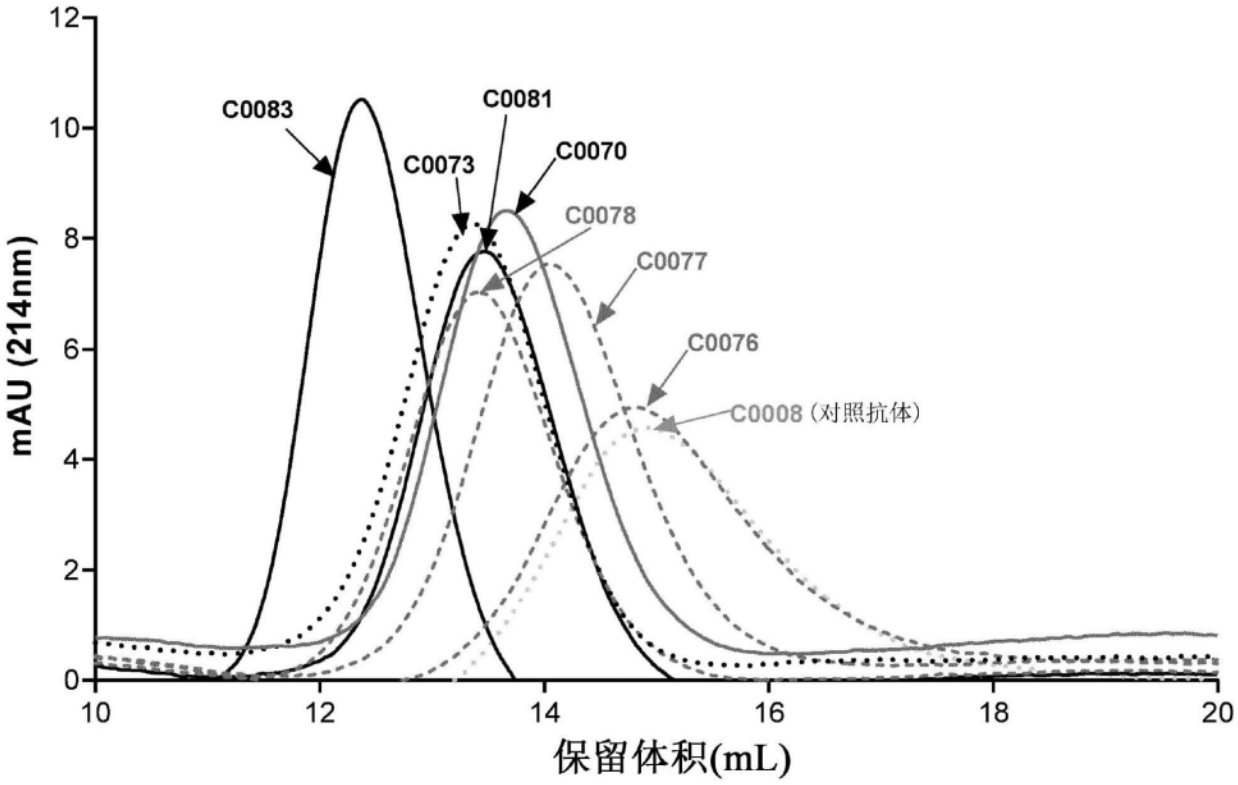

C0083
C0081
C0073
C0070
C0078
C0077
C0076
C0008（对照抗体）
mAU (214nm)
保留体积(mL)

图2C

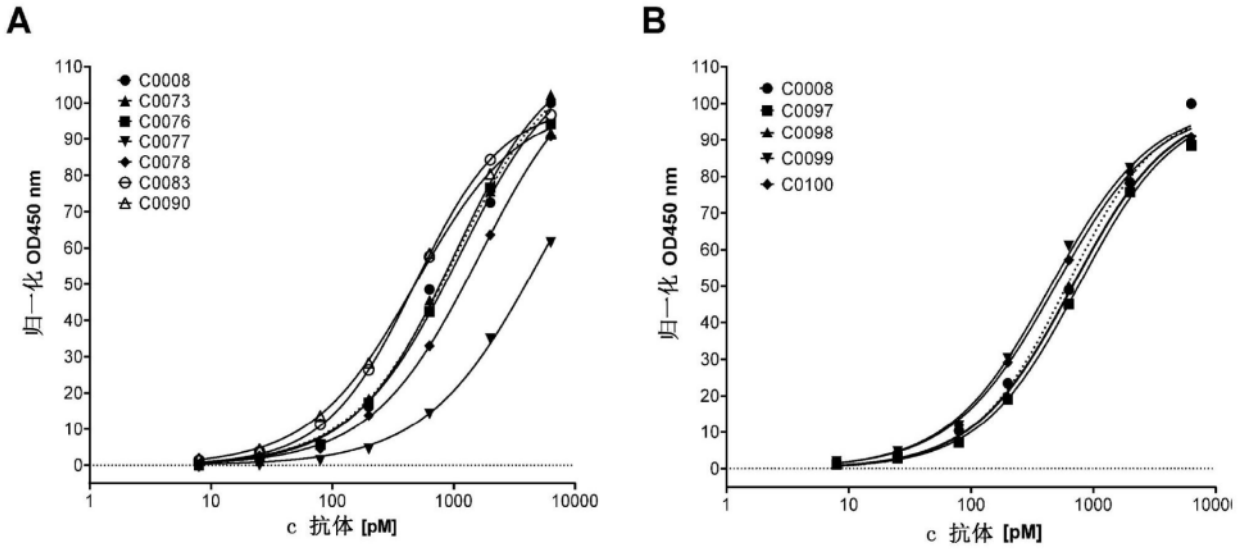

A
C0008
C0073
C0076
C0077
C0078
C0083
C0090
归一化 OD450 nm
c 抗体 [pM]
B
C0008
C0097
C0098
C0099
C0100
归一化 OD450 nm
c 抗体 [pM]

图3

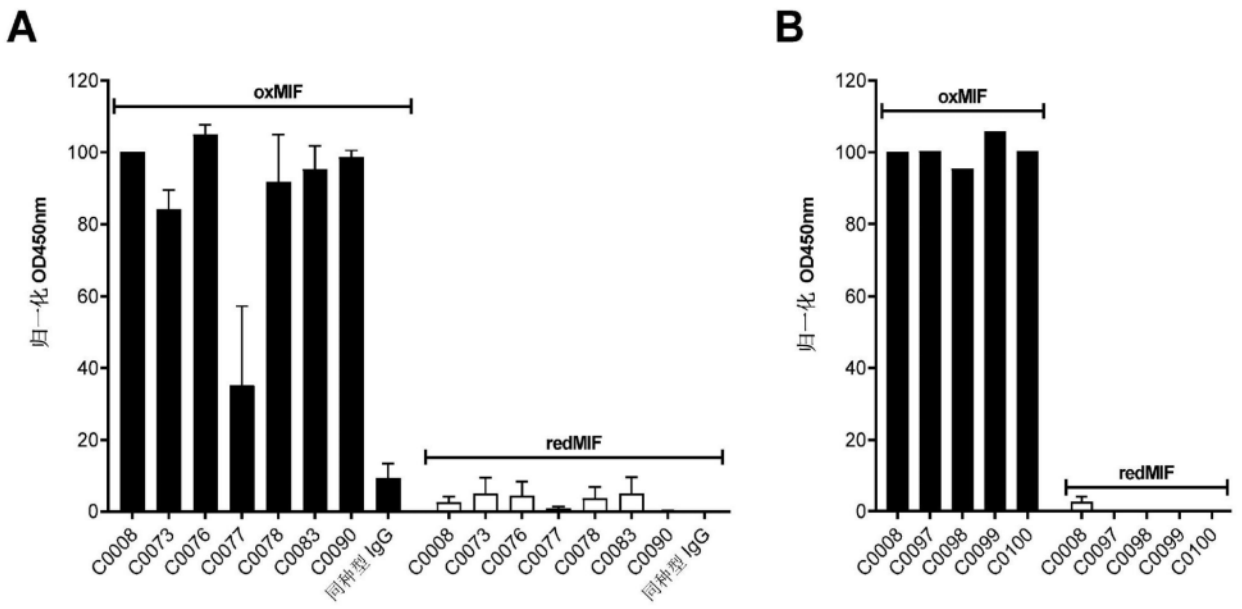

A
B
oxMIF
redMIF
归一化 OD450nm
120
100
80
60
40
20
0
C0008
C0073
C0076
C0077
C0078
C0083
C0090
同种型 IgG
C0097
C0098
C0099
C0100

图4

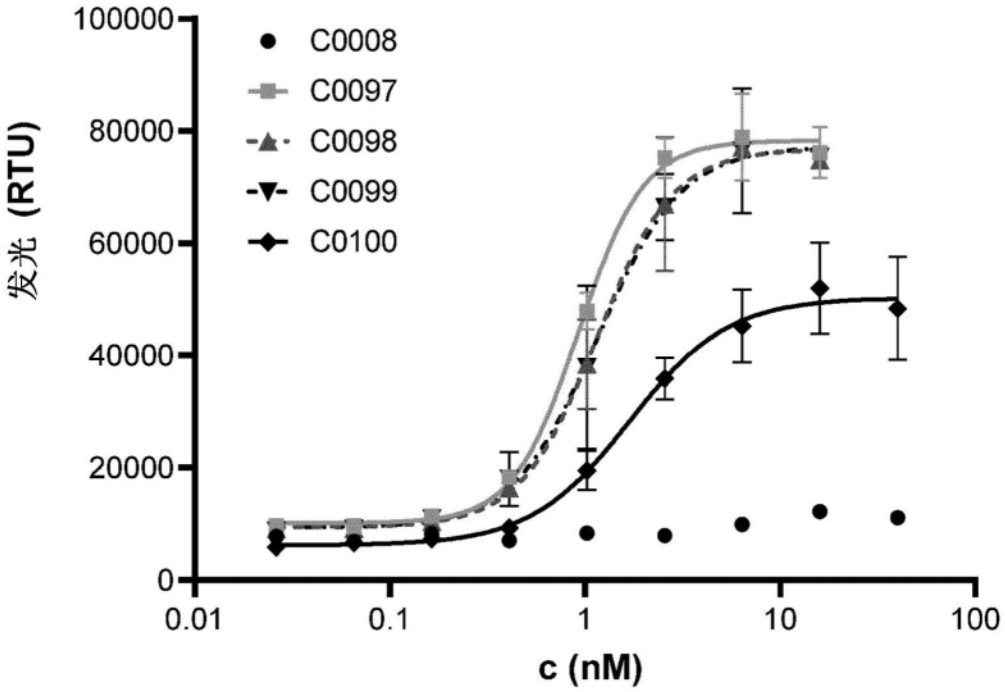

100000
80000
60000
40000
20000
0
发光 (RTU)
C0008
C0097
C0098
C0099
C0100
0.01
0.1
1
10
100
c (nM)

图5

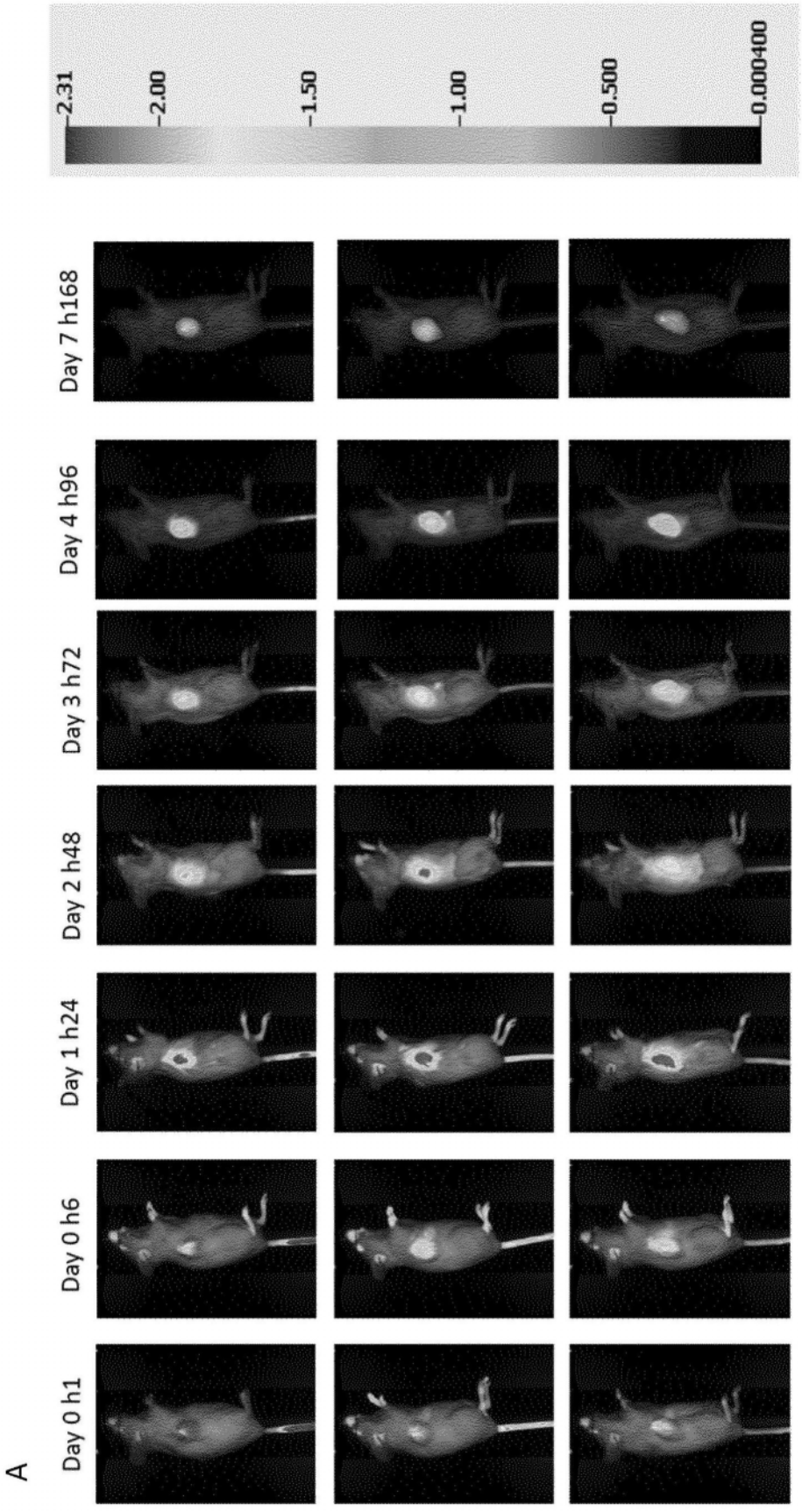

A
Day 0 h1
Day 0 h6
Day 1 h24
Day 2 h48
Day 3 h72
Day 4 h96
Day 7 h168
2.31
2.00
1.50
1.00
0.500
0.000400

图6

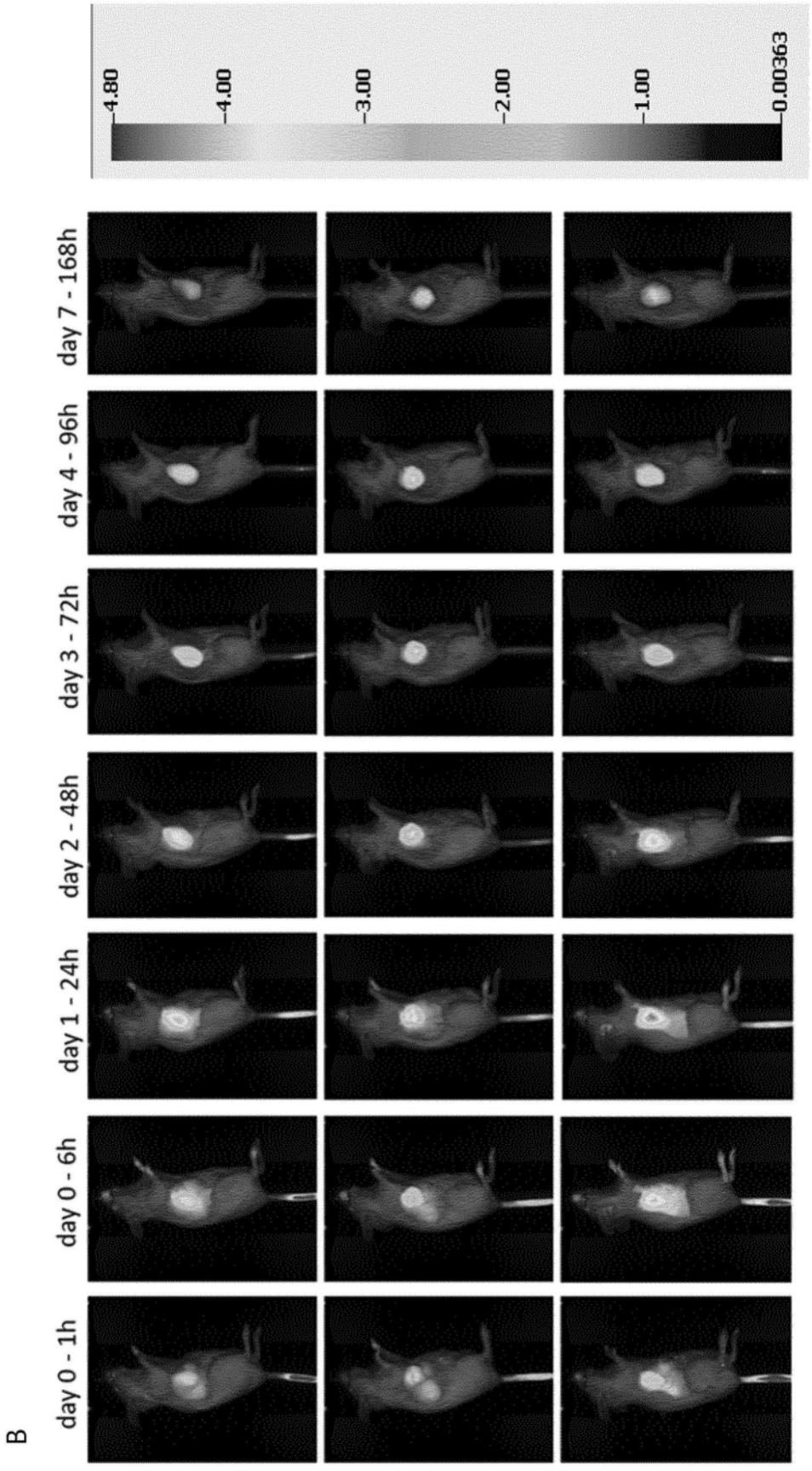

B
day 0 - 1h
day 0 - 6h
day 1 - 24h
day 2 - 48h
day 3 - 72h
day 4 - 96h
day 7 - 168h
4.80
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00363

图6(续)

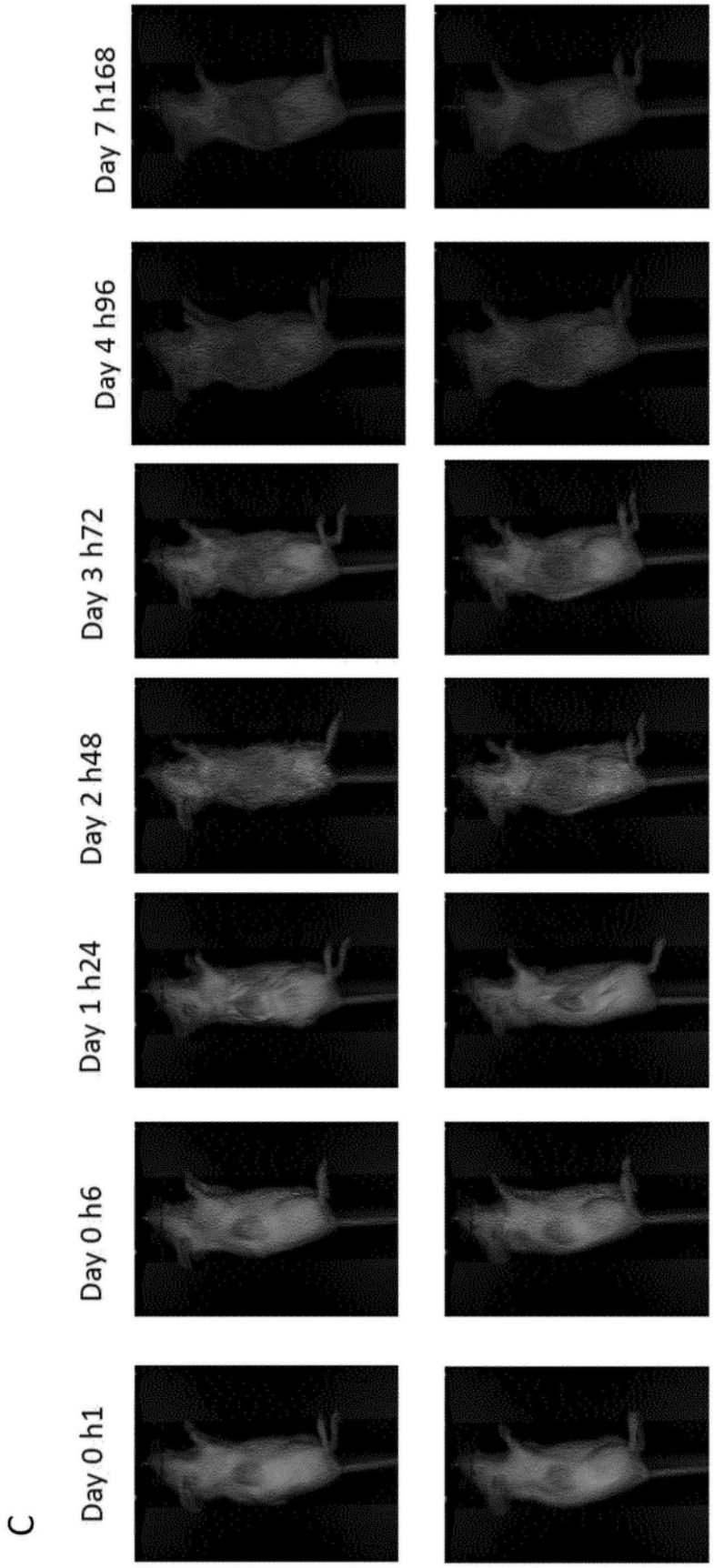


图6(续)

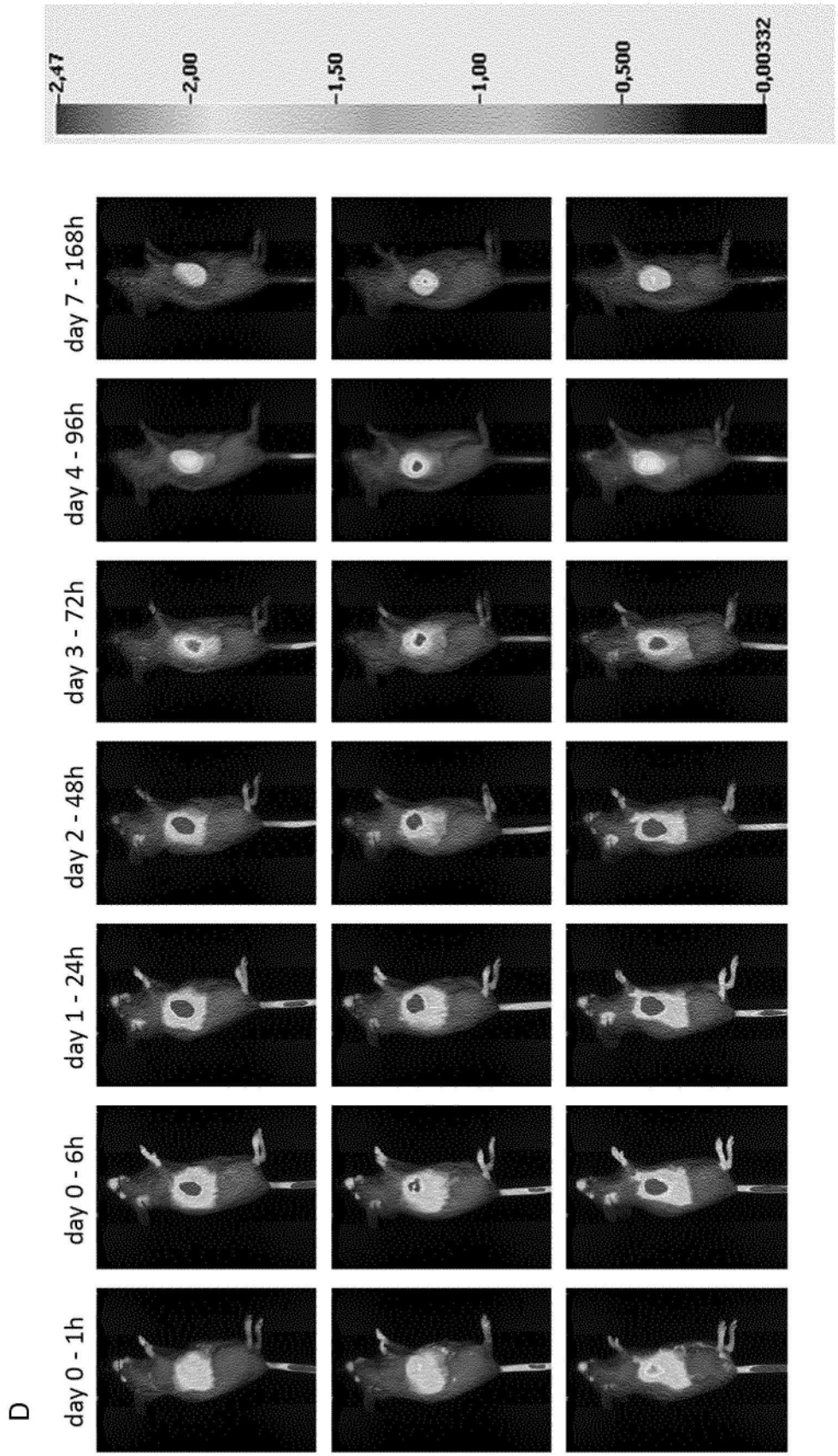

D
day 0 - 1h
day 0 - 6h
day 1 - 24h
day 2 - 48h
day 3 - 72h
day 4 - 96h
day 7 - 168h
2,47
2,00
1,50
1,00
0,500
0,00332

图6(续)

E

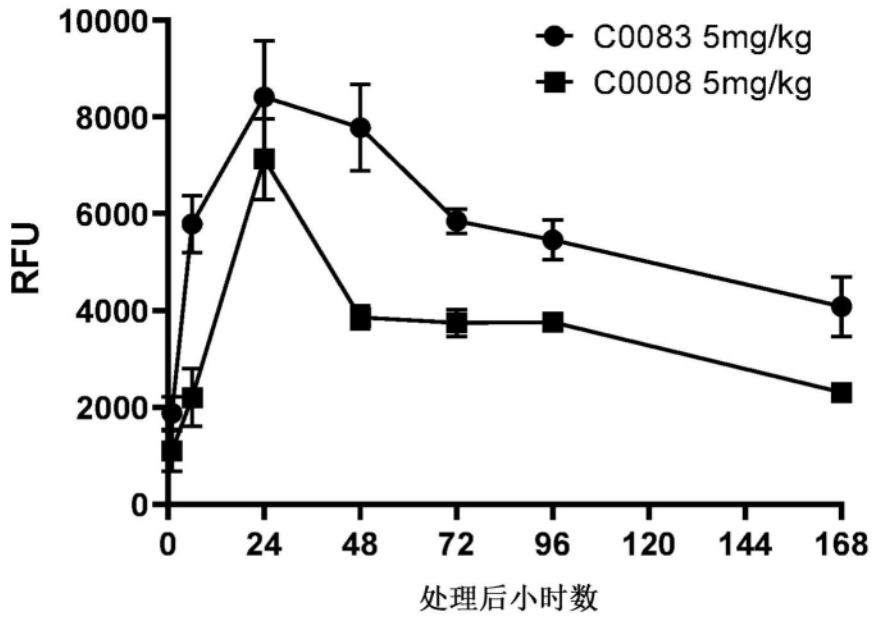

C0083 5mg/kg
C0008 5mg/kg
RFU
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
24
48
72
96
120
144
168
处理后小时数

图6(续)

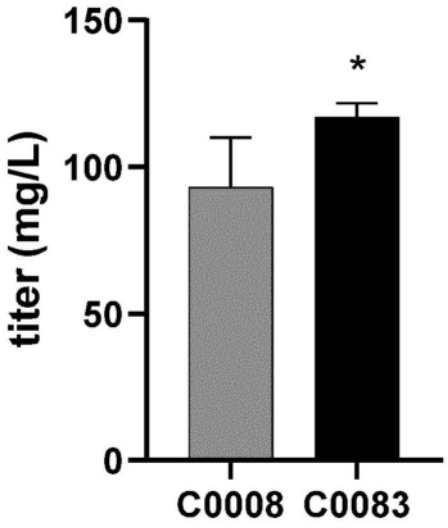

titer (mg/L)
150
100
50
0
*
C0008
C0083

图7

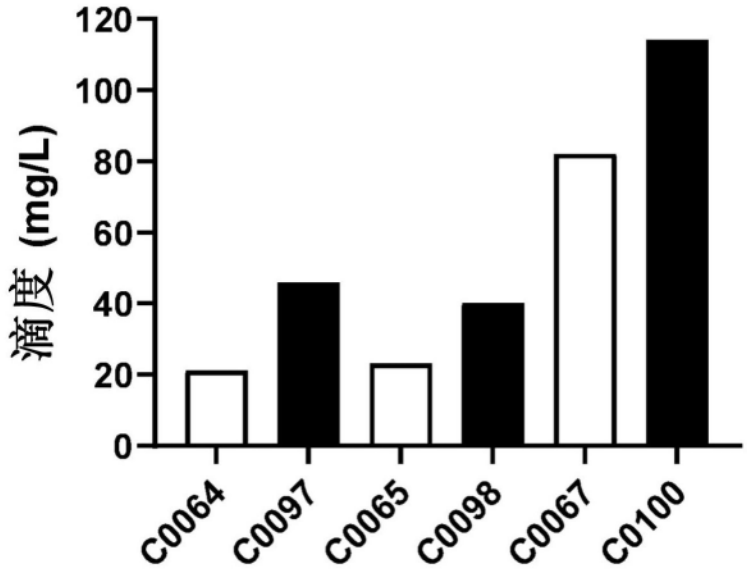

滴度 (mg/L)
120
100
80
60
40
20
0
C0064
C0097
C0065
C0098
C0067
C0100

图8

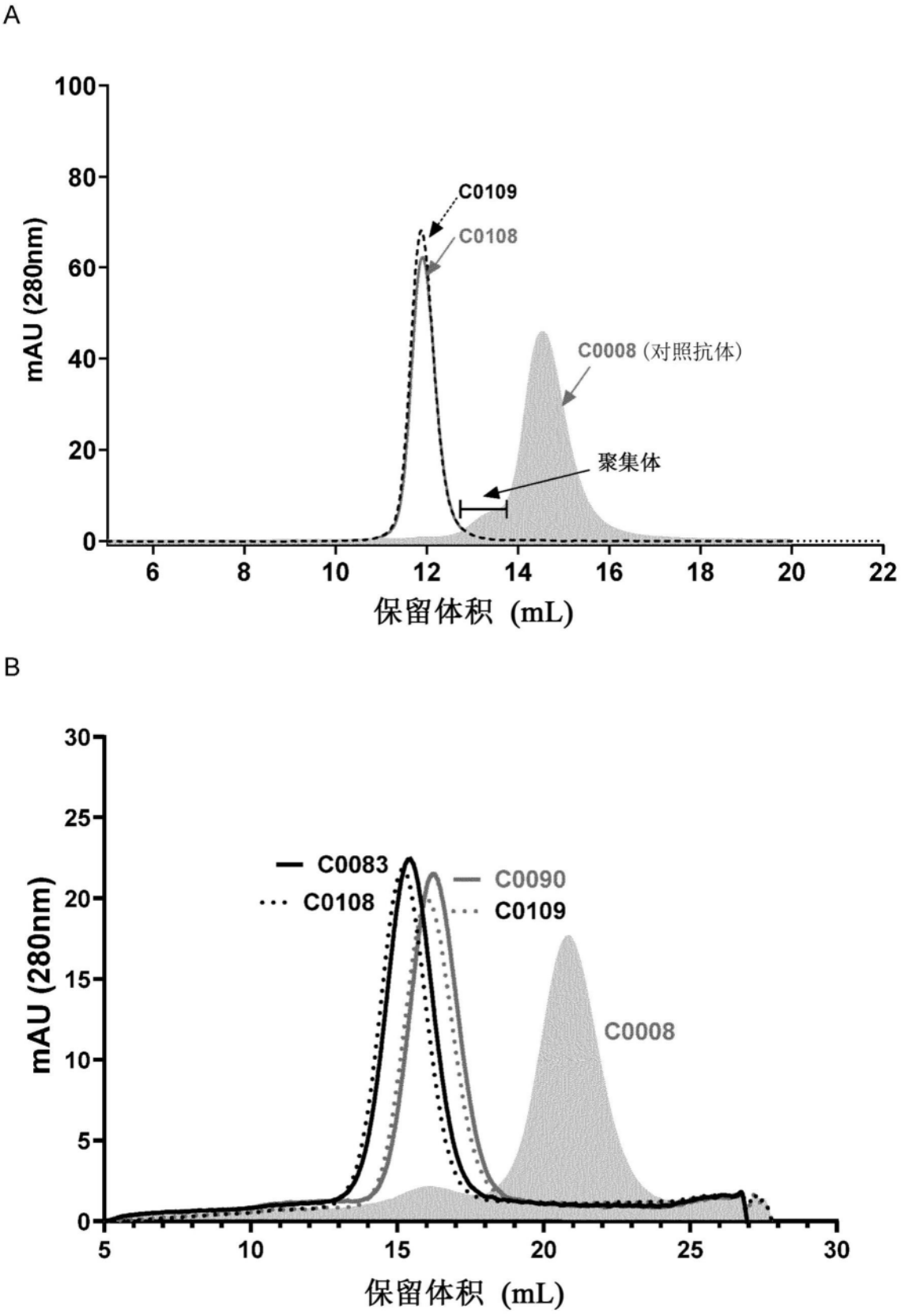

A
100
80
60
40
20
0
mAU (280nm)
C0109
C0108
C0008 (对照抗体)
聚集体
6
8
10
12
14
16
18
20
22
保留体积 (mL)
B
30
25
20
15
10
5
0
mAU (280nm)
C0083
C0108
C0090
C0109
C0008
5
10
15
20
25
30
保留体积 (mL)

图9

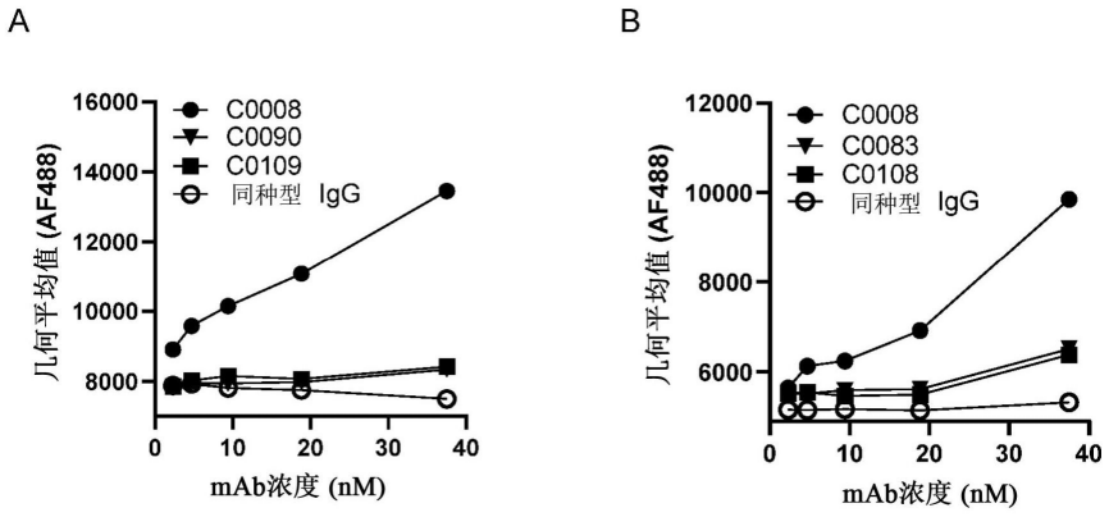

A
B
几何平均值 (AF488)
C0008
C0090
C0109
同种型 IgG
mAb浓度 (nM)
C0008
C0083
C0108
同种型 IgG
mAb浓度 (nM)

图10

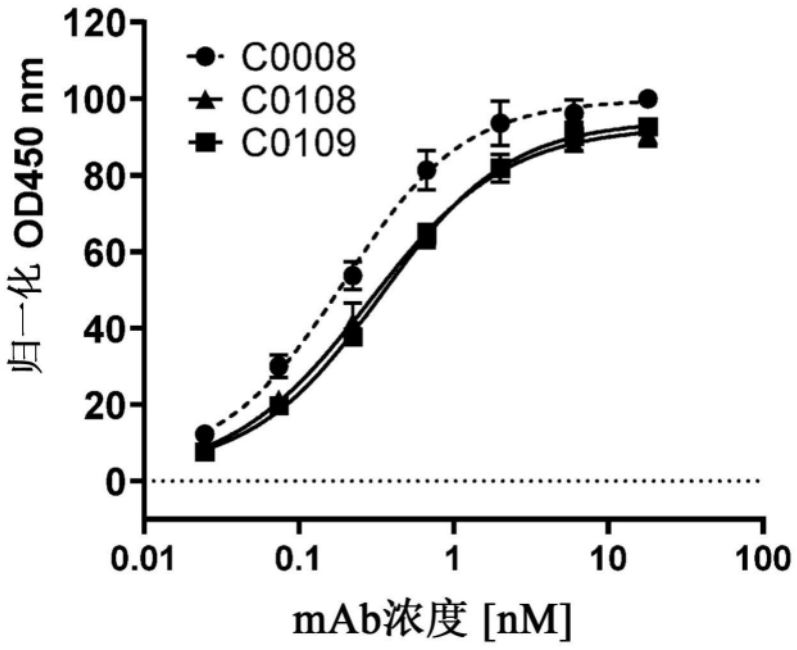

归一化 OD450 nm
C0008
C0108
C0109
mAb浓度 [nM]

图11

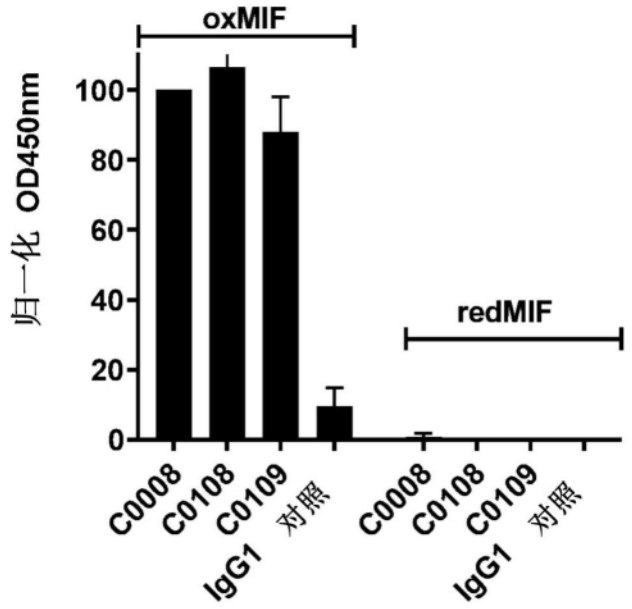

oxMIF
redMIF
归一化 OD450nm
100
80
60
40
20
0
C0008
C0108
C0109
对照
IgG1
C0008
C0108
C0109
对照
IgG1

图12

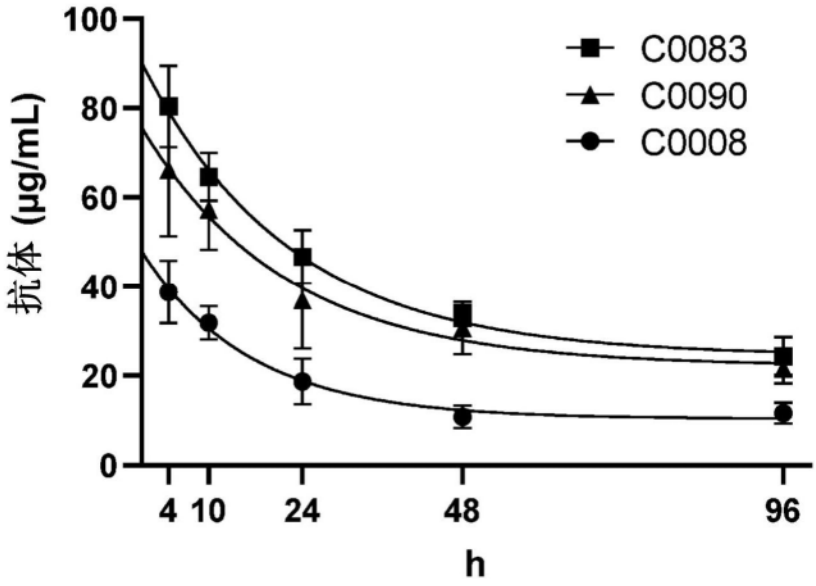
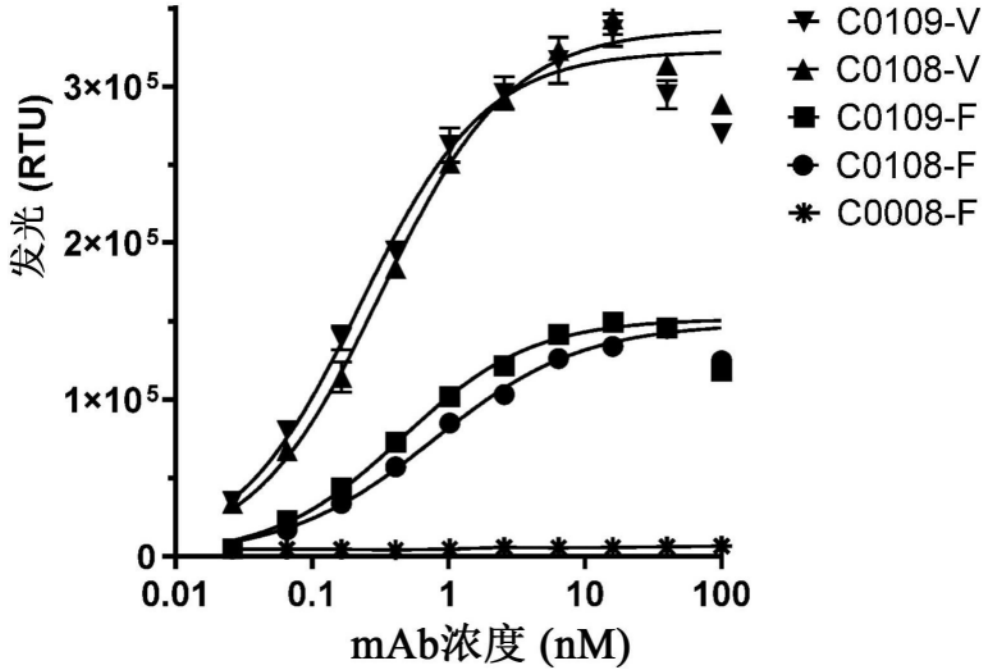

C0083
C0090
C0008
抗体 (μg/mL)
100
80
60
40
20
0
4
10
24
48
96
h

图13

A


C0109-V
C0108-V
C0109-F
C0108-F
C0008-F
发光 (RTU)
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
0.01
0.1
1
10
100
mAb浓度 (nM)

B

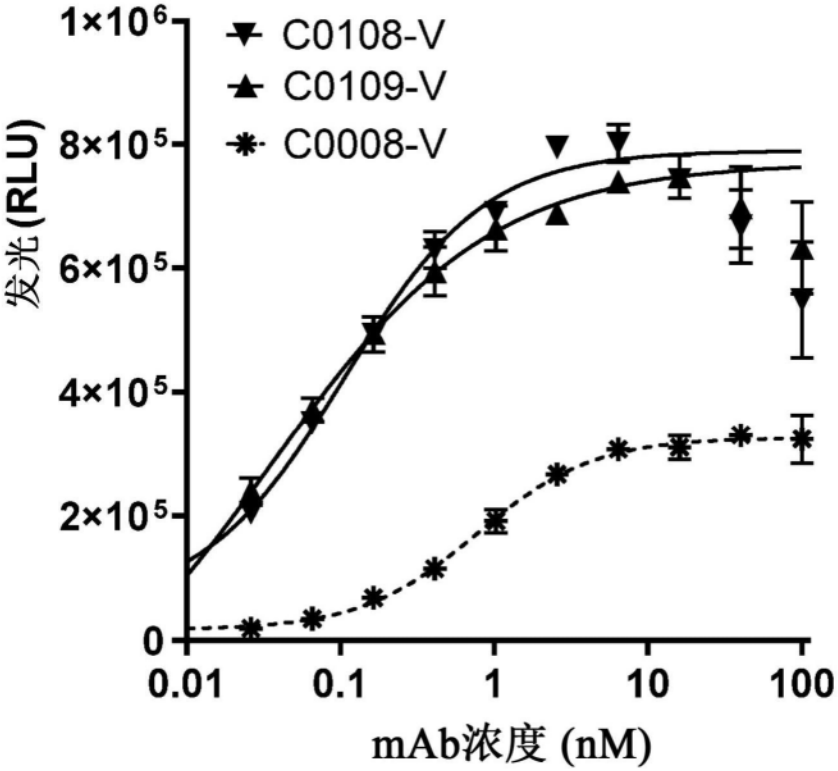

C0108-V
C0109-V
C0008-V
发光(RLU)
1×10⁶
8×10⁵
6×10⁵
4×10⁵
2×10⁵
0
0.01
0.1
1
10
100
mAb浓度 (nM)

图14

C

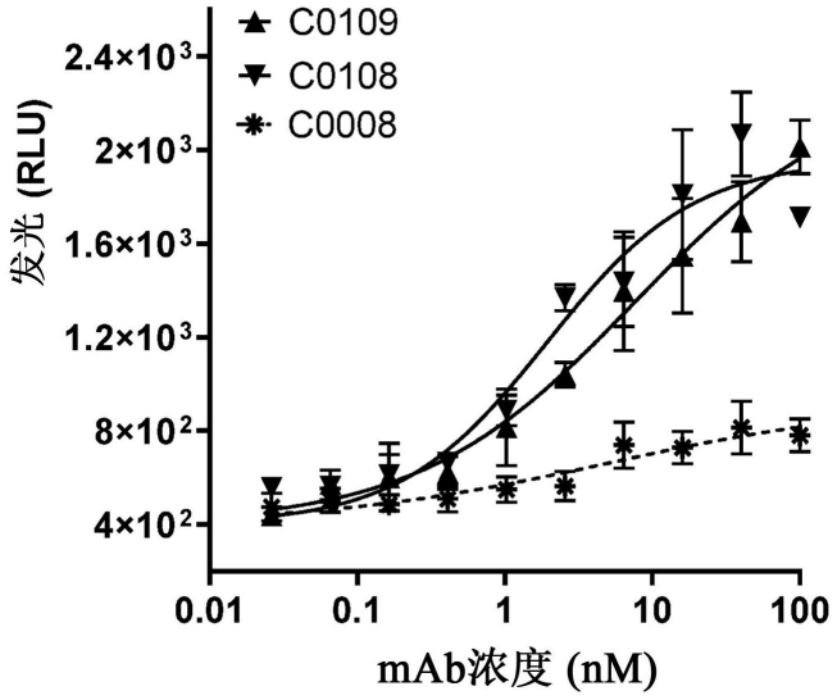
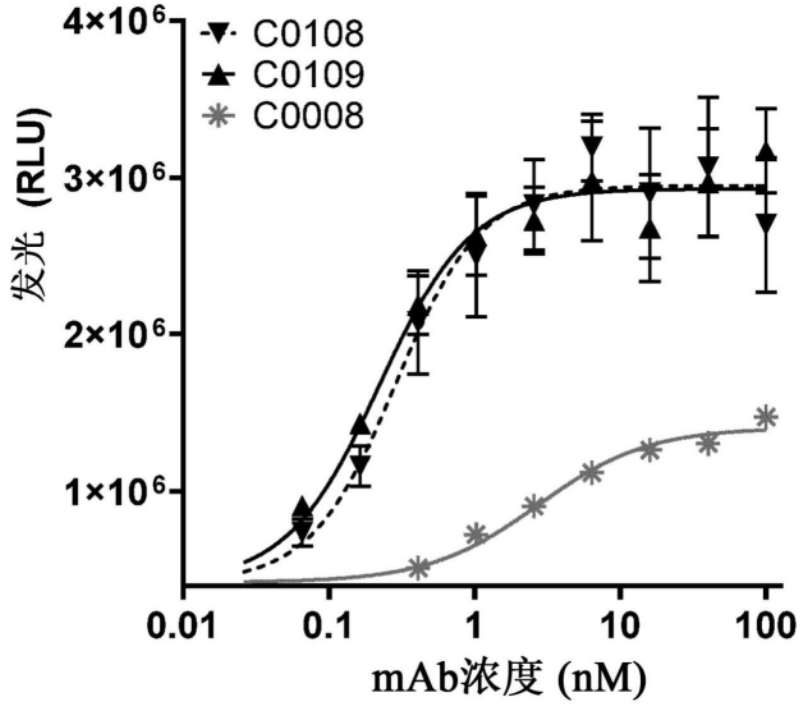

C0109
C0108
C0008
发光 (RLU)
2.4×10³
2×10³
1.6×10³
1.2×10³
8×10²
4×10²
0.01
0.1
1
10
100
mAb浓度 (nM)

图14(续)

A


4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
发光 (RLU)
C0108
C0109
C0008
0.01
0.1
1
10
100
mAb浓度 (nM)

B

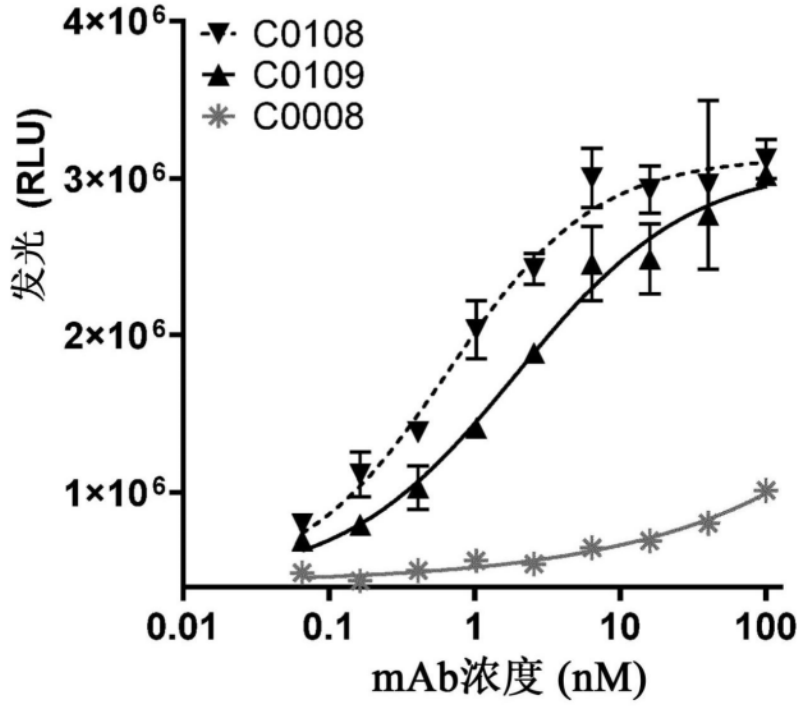

4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
发光 (RLU)
C0108
C0109
C0008
0.01
0.1
1
10
100
mAb浓度 (nM)

图15

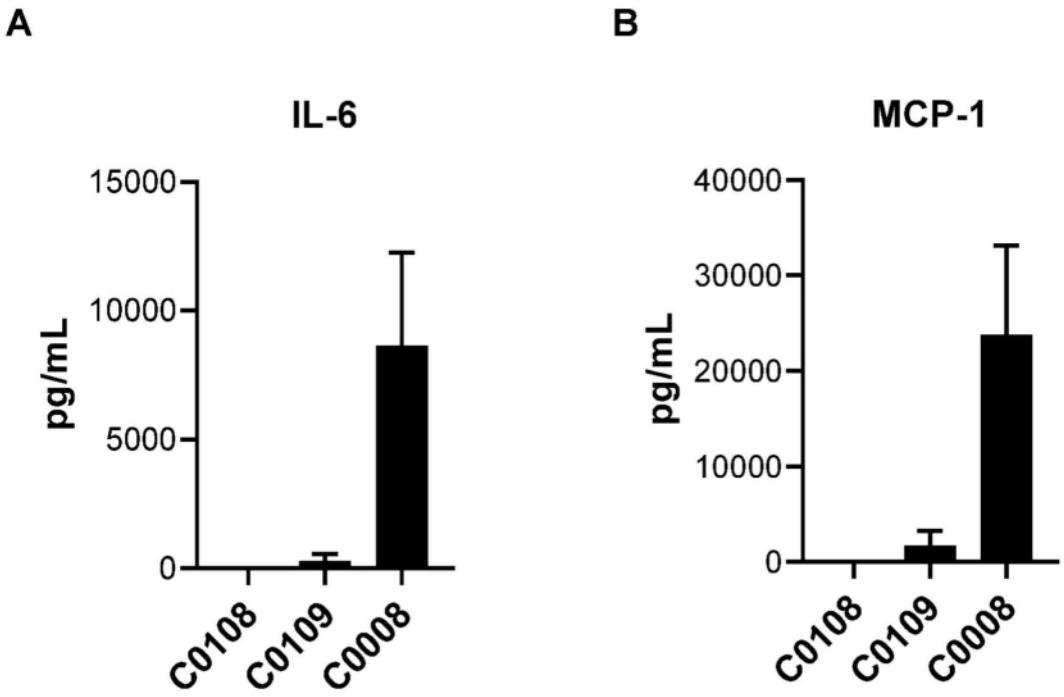

A
IL-6
15000
10000
5000
0
pg/mL
C0108
C0109
C0008
B
MCP-1
40000
30000
20000
10000
0
pg/mL
C0108
C0109
C0008

图16