



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116249716 A

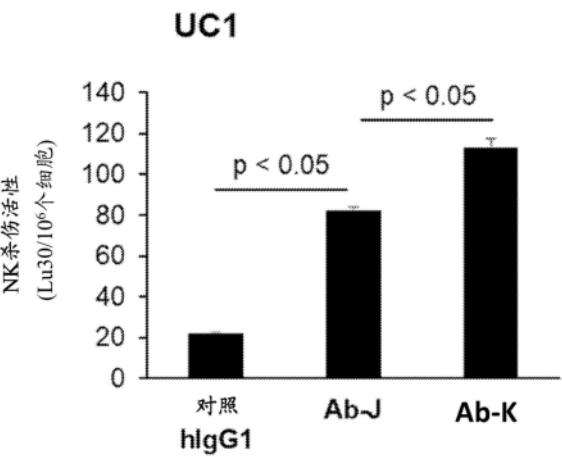
(43) 申请公布日 2023. 06. 09

(21) 申请号 202180047612.4
(22) 申请日 2021.07.06
(30) 优先权数据
63/049,012 2020.07.07 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.01.03
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/040445 2021.07.06
(87) PCT国际申请的公布数据
W02022/010847 EN 2022.01.13
(71) 申请人 康愈有限责任公司
地址 美国华盛顿州
(72) 发明人 J·D·吴
(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书4页 说明书42页
序列表22页 附图6页

(54) 发明名称
MIC抗体和结合剂及其使用方法

(57) 摘要
本发明提供了用于治疗癌症的MIC抗体、其抗原结合部分及其MIC结合剂。



1. 一种结合剂,其包含:(i)重链可变(VH)区,所述VH区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变(VL)区,所述VL区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中所述重链和轻链框架区任选地在所述框架区中用1至8个氨基酸取代、缺失或插入进行修饰。

2. 一种结合剂,其包含:(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列。

3. 一种结合剂,其包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区包含具有SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列的互补决定区HCDR1序列、具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列的HCDR3;并且其中所述VL区包含具有SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的LCDR1序列、具有SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的LCDR3,并且其中所述VH区和VL区各自包含人源化框架区序列。

4. 如权利要求3所述的结合剂,其中所述人源化VH框架区来源于具有IMGT IGHV4-59*11、IGHV4-30-4*01或IGHV4-30-4*08中列出的氨基酸序列的人种系基因。

5. 如权利要求3或4所述的结合剂,其中所述人源化VL框架区来源于具有IMGT IGKV1-5*01、IGKV1-5*02或IGKV1-5*03中列出的氨基酸序列的人种系基因。

6. 一种结合剂,其包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区包含具有SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列的互补决定区HCDR1序列、具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列的HCDR3;并且其中所述VL区包含具有SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的LCDR1序列、具有SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的LCDR3,其中所述VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少85%、至少87%、至少90%、至少92%或至少95%同一的氨基酸序列,并且所述VL区包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少85%、至少87%、至少90%、至少92%或至少95%同一的氨基酸序列。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合MIC。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合部分。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是结合MIC的抗体或其抗原结合部分。

10. 如权利要求8或权利要求9所述的结合剂,其中所述结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫键连接的Fc、scFv、单结构域抗体、双抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

11. 如前述权利要求中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂包含重链,所述重链包含所述VH区和重链恒定区。

12. 如权利要求11所述的结合剂,其中重链恒定区是IgG同种型。

13. 如权利要求12所述的结合剂,其中所述重链恒定区是IgG1恒定区。

14. 如权利要求12所述的结合剂,其中所述重链恒定区是IgG4恒定区。

15. 如权利要求11至14中任一项所述的结合剂,其中所述重链恒定区包含至少增加与人Fc γ RIII结合亲和力的氨基酸修饰。

16. 如权利要求11至15中任一项所述的结合剂,其中所述重链恒定区包含至少一种增

加CDC活性的氨基酸修饰。

17. 如权利要求11至16中任一项所述的结合剂,其中所述重链恒定区包含至少一种减少与一种或多种Fc γ 受体结合的氨基酸修饰。

18. 如权利要求11所述的结合剂,其中所述重链包含SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列。

19. 如前述权利要求中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂包含轻链,所述轻链包含所述VL区和轻链恒定区。

20. 如权利要求19所述的结合剂,其中所述轻链恒定区是 κ 同种型。

21. 如权利要求19所述的结合剂,其中所述轻链包含SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列。

22. 如前述权利要求中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是单特异性的。

23. 如权利要求1至22中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是二价的。

24. 如权利要求23所述的结合剂,其中所述结合剂包含第二结合结构域并且所述结合剂是双特异性的。

25. 一种结合MIC的结合剂,其中所述结合剂是抗体,所述抗体包含有包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链。

26. 如权利要求1至25中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合可溶性MIC。

27. 如权利要求1至26中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC,所述抗体B10G5包含有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH区和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VL区。

28. 一种药物组合物,其包含如前述权利要求中任一项所述的结合剂和药学上可接受的载剂。

29. 一种编码具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的重链可变区的核酸。

30. 如权利要求29所述的核酸,其包含SEQ ID NO:21中列出的核酸序列。

31. 一种编码具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的轻链可变区的核酸。

32. 如权利要求31所述的核酸,其包含SEQ ID NO:22中列出的核酸序列。

33. 一种编码如权利要求1至24中任一项所述的结合剂的核酸。

34. 如权利要求33所述的核酸,其包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中列出的核酸序列。

35. 一种载体,其包含如权利要求29至34中任一项所述的核酸。

36. 一种细胞系,其包含如权利要求29至34中任一项所述的核酸或如权利要求35所述的载体。

37. 一种细胞系,其表达如权利要求1至22中任一项所述的结合剂。

38. 一种产生结合剂的方法,其包括在适合表达所述结合剂的条件下培养如权利要求36或权利要求37所述的细胞系。

39. 如权利要求38所述的方法,其还包括从所述培养回收所述结合剂。

40. 一种治疗MIC+癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如权利要求1至27中任一项所述的结合剂或如权利要求28所述的药物组合物。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述癌症是癌、肉瘤、神经内分泌肿瘤或血液恶性

肿瘤。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述癌症是癌。

43. 如权利要求42所述的方法,其中所述癌是实体瘤,任选地选自黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌和头颈癌。

44. 如权利要求41所述的方法,其中所述癌症是血液恶性肿瘤。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是淋巴瘤或多发性骨髓瘤。

46. 如权利要求40至45中任一项所述的方法,其还包括向所述受试者施用免疫疗法。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述免疫疗法包括过继细胞疗法或检查点抑制剂。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述免疫疗法包括过继细胞疗法。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述过继细胞疗法选自自体NK细胞、同种异体NK细胞、自体T细胞、CAR修饰的T细胞和CAR修饰的NK细胞。

50. 如权利要求46所述的方法,其中所述免疫疗法包括检查点抑制剂。

51. 如权利要求50所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自特异性结合人PD-1、人PD-L1或人CTLA4的抗体。

52. 如权利要求51所述的方法,其中所述检查点抑制剂是帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、西米普利单抗或伊匹木单抗。

53. 如权利要求40至52中任一项所述的方法,其中在施用所述结合剂之前至少四周不向所述受试者施用化学疗法。

54. 如权利要求40至53中任一项所述的方法,其中所述结合剂是静脉内施用的。

55. 如权利要求40至54中任一项所述的方法,其中所述结合剂以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用。

56. 一种降低患有癌症的受试者中循环sMIC水平的方法,其包括施用治疗有效量的如权利要求1至27中任一项所述的结合剂或如权利要求28所述的药物组合物。

57. 如权利要求56所述的方法,其中所述癌症是癌、肉瘤、神经内分泌肿瘤或血液恶性肿瘤。

58. 如权利要求57所述的方法,其中所述癌症是癌。

59. 如权利要求58所述的方法,其中所述癌是实体瘤,任选地选自黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌和头颈癌。

60. 如权利要求57所述的方法,其中所述癌症是血液恶性肿瘤。

61. 如权利要求60所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是淋巴瘤或多发性骨髓瘤。

62. 一种改善接受用于MIC+癌症的免疫疗法的受试者的治疗结果的方法,其包括:

a) 向所述患有癌症的受试者施用有效量的免疫疗法;以及

b) 向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求1至27中任一项所述的结合剂或如权利要求28所述的药物组合物;

其中与单独施用所述免疫疗法相比,所述受试者的至少一种治疗结果得以改善。

63. 如权利要求62所述的方法,其中至少一种改善的治疗结果是选自疾病稳定、部分应答或完全应答的客观应答。

64. 如权利要求62或63所述的方法,其中至少一种改善的治疗结果是肿瘤负荷减少。

65. 如权利要求62-64中任一项所述的方法,其中至少一种改善的治疗结果是无进展生

存期或无病生存期。

66. 如权利要求62-65中任一项所述的方法, 其中所述免疫疗法是过继细胞疗法或检查点抑制剂。

67. 如权利要求66所述的方法, 其中所述免疫疗法是过继细胞疗法。

68. 如权利要求67所述的方法, 其中所述过继细胞疗法包括自体NK细胞、同种异体NK细胞、自体T细胞、CAR修饰的T细胞和CAR修饰的NK细胞。

69. 如权利要求66所述的方法, 其中所述免疫疗法是检查点抑制剂。

70. 如权利要求69所述的方法, 其中所述检查点抑制剂包含特异性结合人PD-1、人PD-L1或CTLA4的抗体。

71. 如权利要求70所述的方法, 其中所述检查点抑制剂是帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、西米普利单抗或伊匹木单抗。

72. 如权利要求62至71中任一项所述的方法, 其中在施用所述结合剂之前至少四周不向所述受试者施用化学疗法。

73. 如权利要求62至72中任一项所述的方法, 其中所述结合剂是静脉内施用的。

74. 如权利要求62至73中任一项所述的方法, 其中所述结合剂以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用。

75. 如权利要求1至27中任一项所述的结合剂或如权利要求28所述的药物组合物用于治疗受试者的MIC+癌症的用途。

76. 如权利要求1至27中任一项所述的结合剂或如权利要求28所述的药物组合物用于治疗接受免疫疗法的受试者的sMIC+癌症的用途。

MIC抗体和结合剂及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年7月7日提交的美国临时申请号63/049,012的优先权权益,所述美国临时申请出于任何目的以引用的方式整体并入本文。

[0003] 关于赞助资金的声明

[0004] 本发明是在美国小企业管理局授予的小企业技术转让基金1R41CA206688-01A1的政府支持下完成的。政府对本发明具有一定权利。

背景技术

[0005] 主要组织相容性复合物I类链相关分子A和B(分别为MICA和MICB,通常称为MIC)是与NKG2D结合的蛋白质家族。NKG2D是一种激活免疫受体,由自然杀伤(NK)细胞、NKT细胞、 γ - δ T细胞亚群和人CD8⁺T细胞表达。MIC与NK细胞或T细胞上的NKG2D结合导致在体外激活NK细胞和共同刺激CD8和 γ - δ T细胞等作用。

[0006] 据报道,MIC家族分子在肿瘤细胞上表达,并被认为是涉及抑制对肿瘤细胞的免疫反应。MICA在肿瘤细胞表面上的表达比MICB更频繁且更丰富。MIC蛋白以膜结合形式和可溶性形式sMIC存在,后者从肿瘤细胞脱落。sMIC血清水平的升高与许多类型的癌症有关,包括癌,诸如实体瘤,例如黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、胃肠道(GI)癌和头颈癌;和造血系统癌症,诸如淋巴瘤和多发性骨髓瘤;以及源自骨和软组织的癌症,诸如肉瘤。据报道,膜限制形式的MIC(B)在小鼠中维持NKG2D介导的保护性抗肿瘤免疫,而可溶性形式与通过降低NK细胞和CD8⁺T细胞上的NKG2D表达以及NK细胞外周维持受损介导的肿瘤进展相关。因此,与sMIC结合的剂代表了一种潜在的用于患者的治疗方法。然而,仍然需要被优化以用于治疗人MIC+癌症的剂。

发明内容

[0007] 本文所公开的发明部分基于特异性结合可溶性MIC(sMIC)和/或细胞膜结合MIC(也称为膜结合MIC)并表现出改善的治疗特性的MIC结合抗体、其抗原结合部分和相关结合剂。MIC,并且特别是sMIC,是用于治疗某些癌症的重要且有利的治疗靶标。这些MIC结合抗体、其抗原结合部分和结合剂提供了基于此类抗体、抗原结合部分和相关结合剂在治疗MIC+癌症中的用途的组合物和方法。因此,本发明提供了与MIC结合剂相关的方法、组合物、药盒和制品。

[0008] 在一些实施方案中,提供了一种结合剂,其包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链框架区任选地在框架区中用1至8个氨基酸取代、缺失或插入进行修饰。结合剂特异性结合MIC。在一些实施方案中,结合剂以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。在一些实施方案中,结合剂包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列。结合剂特异性结合MIC。在一些实施方案中,结合剂以

大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。

[0009] 在一些实施方案中,提供了一种结合剂,其包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中VH区包含具有SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列的互补决定区HCDR1、具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列的HCDR3;并且VL区包含具有SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的LCDR3,并且其中VH和VL区各自包含人源化框架区。在一些实施方案中,人源化VH框架区来源于具有IMGT IGHV4-59*11 (SEQ ID NO:29)和IGHJ4*01 (SEQ ID NO:30)或者IGHV4-30-4*01 (SEQ ID NO:31)和IGHJ4*01 (SEQ ID NO:30)中列出的氨基酸序列的人种系基因。在一些实施方案中,人源化VL框架区来源于具有IMGT IGKV1-NL1*01 (SEQ ID NO:32)和IMGT IGKJ1*01 (SEQ ID NO:33)、IMGT IGKV1-33*01 (SEQ ID NO:34)和IMGT IGKJ1*01 (SEQ ID NO:33)或者IMGT IGKV1-5*01 (SEQ ID NO:35)和IMGT IGKJ1*01 (SEQ ID NO:33)中列出的氨基酸序列的人种系基因。结合剂特异性结合MIC。在一些实施方案中,结合剂以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。

[0010] 在一些实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫键连接的Fc、scFv、单结构域抗体、双抗体(diabody)、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0011] 在一些实施方案中,结合剂具有附接至重链恒定区的重链可变区。在一些实施方案中,重链恒定区是IgG同种型。在一些实施方案中,重链恒定区是IgG1恒定区。在一些实施方案中,重链恒定区是IgG4恒定区。在一些实施方案中,重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,结合剂具有附接至轻链恒定区的轻链可变区。在一些实施方案中,轻链恒定区是κ同种型。在一些实施方案中,轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链恒定区还包含至少增加与人FcγRIII结合亲和力的氨基酸修饰。在一些实施方案中,重链恒定区还包含至少增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性的氨基酸修饰。在一些实施方案中,重链恒定区还包含至少一种增加CDC活性的氨基酸修饰。

[0012] 在一些实施方案中,结合剂是单特异性的。在一些实施方案中,结合剂是单特异性且二价的。在一些实施方案中,结合剂是二价的。在一些实施方案中,结合剂是二价且双特异性的或多价且多特异性的。

[0013] 在一些实施方案中,提供了一种药物组合物,其包含本文所述的实施方案中的任一者的结合剂和药学上可接受的载剂。

[0014] 在一些实施方案中,提供了一种编码结合剂的重链可变区的核酸,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,所述核酸任选地具有SEQ ID NO:21中列出的核酸序列。在一些实施方案中,提供了一种编码结合剂的轻链可变区的核酸,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,所述核酸任选地具有SEQ ID NO:22中列出的核酸序列。在一些实施方案中,提供了一种编码本文所述的实施方案中的任一者的结合剂的核酸,所述核酸任选地具有SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中列出的核酸序列。在一些实施方案中,提供了一种载体,所述载体包含编码如本文所述的MIC结合剂多肽的核酸中的任一者。在一些实施方案中,提供了一种细胞,所述细胞包含编码本文所述的结合剂多肽中的任

一者的核酸或包含此类核酸的载体。

[0015] 在一些实施方案中,提供了一种治疗MIC+癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的结合剂,所述结合剂包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链框架区任选地在框架区中用1至8个氨基酸取代、缺失或插入进行修饰,其中结合剂特异性结合sMIC和/或膜结合MIC。在一些实施方案中,结合剂以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。

[0016] 在一些实施方案中,提供了一种治疗MIC+癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的结合剂,所述结合剂包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中结合剂特异性结合MIC。在一些实施方案中,结合剂以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。

[0017] 在一些实施方案中,提供了一种治疗MIC+癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的结合剂实施方案中的任一者。在一些实施方案中,所述方法包括将结合剂作为药物组合物施用,所述药物组合物包含药学上可接受的载剂。

[0018] 在一些实施方案中,癌症是癌、肉瘤、神经内分泌肿瘤或血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌是实体瘤,任选地选自黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌和头颈癌。在一些实施方案中,血液恶性肿瘤是淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。

[0019] 在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用免疫疗法。在一些实施方案中,免疫疗法是过继细胞疗法或检查点抑制剂。在一些实施方案中,过继细胞疗法选自自体NK细胞、同种异体NK细胞、自体T细胞、CAR修饰的T细胞和CAR修饰的NK细胞。在一些实施方案中,免疫疗法包括检查点抑制剂。在一些实施方案中,检查点抑制剂选自特异性结合人PD-1、人PD-L1或人CTLA4的抗体。在一些实施方案中,检查点抑制剂是帕博利珠单抗(pembrolizumab)、纳武利尤单抗(nivolumab)、西米普利单抗(cemiplimab)或伊匹木单抗(ipilimumab)。

[0020] 在一些实施方案中,所述方法包括在施用结合剂之前至少四周、至少六周或至少八周不向受试者施用化学疗法的步骤。在一些实施方案中,结合剂是静脉内施用的。在一些实施方案中,结合剂以约0.1mg/kg至约100mg/kg、或约0.1mg/kg至约25mg/kg、或约0.1mg/kg至约20mg/kg、或约0.1mg/kg至约15mg/kg、或约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用。

[0021] 在一些实施方案中,提供了一种降低患有癌症的受试者中循环sMIC水平的方法,其包括施用治疗有效量的本文所述的实施方案中的任一者的结合剂或本文所述的结合剂实施方案中的任一者的药物组合物,其中结合剂特异性结合循环sMIC。在一些实施方案中,癌症是癌、肉瘤、神经内分泌肿瘤或血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌选自实体瘤,包括但不限于黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌和头颈癌。在一些实施方案中,血液恶性肿瘤是淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。

[0022] 在一些实施方案中,提供了一种改善接受免疫疗法的受试者的治疗结果的方法,其包括向患有癌症的受试者施用有效量的免疫疗法;以及施用治疗有效量的本文所述的实施方案中的任一者的结合剂或本文所述的结合剂的实施方案中的任一者的药物组合物,其中结合剂特异性结合循环sMIC和/或细胞膜结合MIC;并且其中与单独施用免疫疗法相比,

受试者的治疗结果得以改善。在一些实施方案中,改善的治疗结果是选自疾病稳定、部分应答或完全应答的客观应答。在一些实施方案中,改善的治疗结果是肿瘤负荷减少。在一些实施方案中,改善的治疗结果是无进展生存期或无病生存期。在一些实施方案中,免疫疗法是过继细胞疗法或检查点抑制剂。在一些实施方案中,过继细胞疗法是自体NK细胞、同种异体NK细胞、自体T细胞、CAR修饰的T细胞和CAR修饰的NK细胞。在一些实施方案中,检查点抑制剂包含特异性结合人PD-1、人PD-L1或CTLA4的抗体。在一些实施方案中,检查点抑制剂是帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、西米普利单抗或伊匹木单抗。

[0023] 在一些实施方案中,在施用结合剂之前至少四周、至少六周或至少八周不向受试者施用化学疗法。在一些实施方案中,结合剂是静脉内施用的。在一些实施方案中,结合剂以约0.01mg/kg至约100mg/kg、或约0.01mg/kg至约25mg/kg、或约0.01mg/kg至约20mg/kg、或约0.01mg/kg至约15mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约100mg/kg、或约0.1mg/kg至约25mg/kg、或约0.1mg/kg至约20mg/kg、或约0.1mg/kg至约15mg/kg、或约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用。

[0024] 通过参考以下详细说明、特定实施方案的非限制性实例和附图,可以更充分地理解本发明的这些方面和其他方面。

附图说明

[0025] 图1示出了通过FACS对抗体B10G5的人源化变体(附接至人IgG1 Fc区)的结合亲和力进行的分析。两种人源化变体,抗体G和抗体K,表现出比抗体J(Ab-J;B10G5嵌合抗体,其由鼠B10G5抗体的F(ab)₂和人IgG1 Fc结构域组成)更高的平均荧光强度(MFI)。

[0026] 图2A至图2B表明,抗体B10G5(图2A)具有比抗体K(Ab-K;图2B)更低(更弱)的结合亲和力,Kd分别=12.1nM与7.2nM,如通过使用Octet Red96(ForteBio)的生物层干涉仪确定的。

[0027] 图3A至图3B表明,抗体K(Ab-K)在增强IL-2激活的原代NK细胞杀伤MIC⁺甲状腺嗜酸细胞瘤UC1肿瘤细胞(图3A);和胰腺PL12细胞(图3B)方面表现出比Ab-J(嵌合B10G5)更高的活性。

[0028] 图4A至图4C示出了鼠抗体B10G5(图4A)、嵌合Ab-K抗体(ch-Ab-K、Ab-K可变结构域和鼠IgG1-Fc;图4B)和抗体K(Ab-K;人源化;图4C)的抗体单体和聚集体的水平,如通过动态光散射(DLS)测定确定的。

[0029] 定义

[0030] 为了方便起见,在此定义了说明书、实施例和权利要求中的某些术语。除非另有说明或从上下文中暗示,否则以下术语和短语具有以下提供的含义。提供所述定义是为了帮助描述特定的实施方案,并且不旨在限制要求保护的发明,因为本发明的范围仅由权利要求限制。除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域内的普通技术人员所通常理解的含义相同的含义。

[0031] 如本文所用且除非另有说明,术语“一个/种(a/an)”用于意指“一个/种”、“至少一个/种”或“一个/种或多个/种”。除非上下文另有要求,否则本文所使用的单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。

[0032] 除非上下文另有明确要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包含

(comprise)”、“包括(comprising)”等应被解释为包容性意义,而不是排他性或穷举性意义;也就是说,在“包括但不限于”的意义上。

[0033] 术语“降低(decrease)”、“减少(reduce)”、“减少的”、“减少(reduction)”、“降低(decrease)”和“抑制”在本文中均一般用于表示相对于参考而言降低统计学上显著的量。

[0034] 术语“增加的”、“增加”或“增强”或“激活”在本文中均一般用于表示相对于参考而言增加统计学上显著的量。

[0035] 如本文所用,术语“分离的”或“部分纯化的”在核酸、多肽或蛋白质的情况下是指与至少一种其他组分(例如,核酸或多肽或蛋白质)分离的核酸、多肽或蛋白质,所述至少一种其他组分与在其天然来源中发现的核酸、多肽或蛋白质一起存在和/或当由细胞表达或在分泌的多肽和蛋白质的情况下分泌时将与核酸、多肽或蛋白质一起存在。化学合成的核酸、多肽或蛋白质,或使用体外转录/翻译合成的核酸、多肽或蛋白质被认为是“分离的”。术语“纯化的”或“基本上纯化的”是指分离的核酸、多肽或蛋白质,其按主题核酸、多肽或蛋白质的重量计至少为95%,包括例如至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多。

[0036] 如本文所用,术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用以指定一系列氨基酸残基,每个氨基酸残基通过相邻残基的 α -氨基与羧基之间的肽键相互连接。术语“蛋白质”和“多肽”也指代蛋白质氨基酸的聚合物,所述蛋白质氨基酸包括修饰的氨基酸(例如,磷酸化、糖化(glycated)、糖基化(glycosylated)等)和氨基酸类似物,无论其大小或功能如何。“蛋白质”和“多肽”通常用于指代相对较大的多肽,而术语“肽”通常用于指代较小的多肽,但这些术语在本领域中的使用重叠。当提及编码的基因产物及其片段时,术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。因此,示例性多肽或蛋白质包括基因产物、天然存在的蛋白质、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段和前述的其他等效物、变体、片段和类似物。

[0037] 主要组织相容性复合物I类链相关(MIC)多肽是细胞表面跨膜蛋白。MIC多肽包括但不限于人MICA同工型(例如,同工型1,NCBI参考序列NP_000238.1(SEQ ID NO:9)和001170990)(这些序列以引用的方式并入本文)和其他MICA同工型)和人MICB同工型(例如,同工型1,NCBI参考序列:NP_005922.2(SEQ ID NO:10)(所述序列以引用的方式并入本文)和其他MICB同工型)。在一些实施方案中,MIC多肽是指MICA。在一些实施方案中,MIC多肽是指MICB。在一些实施方案中,MIC多肽是指MICA和MICB的共有结构特征,即MICA和MICB共有的表位。

[0038] 如本文所用,“可溶性MIC”或“sMIC”是指MIC多肽(MICA或MICB)的一部分,其含有 α 1和 α 2结构域和 α 3结构域或 α 3结构域的一部分直至蛋白水解切割位点并且缺乏跨膜结构域(例如,MIC的细胞外部分)。在一些实施方案中,可溶性MICA可包含Genbank登录号CAA77031.1(SEQ ID NO:27)中列出的氨基酸序列或其变体,诸如Genbank登录号AAU95072.1、AA045822.1、AFR69318.1、AFR69319.1或AAH16929.1或参考序列NP_000238.1的氨基酸残基24至297或Genbank登录号CAE45581.1的氨基酸1至274或Genbank登录号AAD52069.1、AAD52070.1或QDW65494.1的氨基酸1至273中列出的氨基酸序列(其公开内容以引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,可溶性MICB可包含Genbank登录号:ARB08539.1(SEQ ID NO:28)、AAB71646.1、AAB71647.1或AAB71644.1中列出的氨基酸序列或其变体,诸如Genbank登录号AB016470.1、ABB51802.1、AAB42011.1、AAB71643.1或Q29980.1或参考序列号NP_005922.2的氨基酸残基24至297或Genbank登录号AAC39848.1

AEK67483.1、AFR7773.1、AXY93666.1、CAB72098.1或AAC39849.1的氨基酸1至273中列出的氨基酸序列(其公开内容以引用的方式并入本文)。除非另有说明,否则术语“MIC”的使用旨在指代细胞膜结合和可溶性形式的MIC。

[0039] 如本文所用,抗体B10G5是指美国专利号9,803,017(其公开内容出于所有目的以引用的方式并入本文)中描述的同名MIC抗体。

[0040] 如本文所用,“表位”是指通常由免疫球蛋白VH/VL对结合的氨基酸,诸如本文所述的抗体和结合剂。表位可以由通过蛋白质的三级折叠并置的连续氨基酸或非连续氨基酸在多肽上形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时被保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常以独特的空间构象包括至少3个,并且更通常至少5个、约9个或约8-10个氨基酸。表位定义了抗体或其他结合剂的最小结合位点,并且因此代表抗体、其抗原结合部分或其他基于免疫球蛋白的结合剂的特异性靶标。在单结构域抗体的情况下,表位代表由分离的可变结构域结合的结构单元。

[0041] 如本文所用,“特异性结合”是指本文所述的结合剂(例如,抗体或其部分)以 10^{-5} M(10000nM)或更少,例如 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或更少的KD与靶标诸如MIC结合的能力。特异性结合可受例如结合剂的亲和力和亲合力以及靶多肽的浓度影响。本领域普通技术人员可使用任何合适的方法,诸如在合适的细胞结合测定中滴定结合剂来确定本文所述的抗体和其他结合剂选择性结合MIC的适当条件。与MIC特异性结合的结合剂不会被不相似的竞争物替代。在某些实施方案中,当MIC抗体或其抗原结合部分在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其靶抗原MIC时,称它特异性结合MIC。

[0042] 在一些实施方案中,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MIC多肽,其中解离常数(KD)为 10^{-5} M(10000nM)或更少,例如 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或更少。在一些实施方案中,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MIC多肽,其中解离常数(KD)为约 10^{-5} M至 10^{-6} M。在一些实施方案中,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MIC多肽,其中解离常数(KD)为约 10^{-6} M至 10^{-7} M。在一些实施方案中,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MIC多肽,其中解离常数(KD)为约 10^{-7} M至 10^{-8} M。在一些实施方案中,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MIC多肽,其中解离常数(KD)为约 10^{-8} M至 10^{-9} M。在一些实施方案中,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MIC多肽,其中解离常数(KD)为约 10^{-9} M至 10^{-10} M。在一些实施方案中,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MIC多肽,其中解离常数(KD)为约 10^{-10} M至 10^{-11} M。在一些实施方案中,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MIC多肽,其中解离常数(KD)为约 10^{-11} M至 10^{-12} M。在一些实施方案中,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MIC多肽,其中解离常数(KD)少于 10^{-12} M。

[0043] 如本文所用,短语“以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC”是指对可溶性MIC的结合亲和力。

[0044] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方案所需的那些元素。所述术语允许存在不会实质影响所述实施方案的基本和新颖或功能特征的元素。

[0045] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法及其各自的组分,它们不包括

在实施方案的描述中未列举的任何元素。

[0046] 除了在实施例或或在另外指明的情况下,本文使用的所有表示分量或反应条件的数字应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。当与百分比结合使用时,术语“约”可意指 $\pm 1\%$ 。

[0047] 术语“统计学上显著的”或“显著”是指统计学显著性,并且通常意指高于或低于参考值的两个标准差(2SD)差异。

[0048] 本文在本发明的各个方面的说明内定义了其术语。

具体实施方式

[0049] 本文提供了特异性结合MIC的MIC结合抗体(也称为MIC抗体或MIC结合抗体)及其抗原结合部分。与抗体B10G5相比,MIC抗体出乎意料地表现出改进的特性。在一些实施方案中,MIC抗体降低受试者循环中的游离sMIC水平。在一些实施方案中,MIC结合抗体或其抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,MIC结合抗体或其抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链可变框架区任选地在框架区中用1至8个、1至6个、1至4个或1至2个保守氨基酸取代进行修饰,其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在一些实施方案中,MIC结合抗体或其抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链可变框架区任选地在框架区中用1至8个、1至6个、1至4个或1至2个氨基酸取代、缺失或插入进行修饰,其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在这些实施方案中的任一个的其他方面,MIC结合抗体或其抗原结合部分以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。

[0050] 在一些实施方案中,本文提供了一种结合剂,其包含:(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中结合剂特异性结合MIC。在一些实施方案中,本文提供了一种结合剂,其包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链可变框架区任选地在框架区中用1至8个、1至6个、1至4个或1至2个保守氨基酸取代进行修饰,并且其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在一些实施方案中,本文提供了一种结合剂,其包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链可变框架区任选地在框架区中用1至8个、1至6个、1至4个或1至2个氨基酸取代、缺失或插入进行修饰,并且其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。如本文所述,结合剂包括MIC抗体或其抗原结合部分,并且可以包括共价附接至MIC抗体或其抗原结合部分的其他肽或多肽。在这些实施方案中的任一个中,结合剂特异性结合MIC。在一些实施方案中,结合剂以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。

[0051] 在一些实施方案中,提供了一种结合剂,其包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)

区,其中VH区包含具有SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列的互补决定区HCDR1,具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列的HCDR3;并且VL区包含具有SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的LCDR1,具有SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的LCDR3,并且其中每个VH和VL均包含人源化框架区。在一些实施方案中,VH框架区来源于具有IMGT IGHV4-59*11 (SEQ ID NO:29) 和IGHJ4*01 (SEQ ID NO:30) 或者IGHV4-30-4*01 (SEQ ID NO:31) 和IGHJ4*01 (SEQ ID NO:30) 中列出的氨基酸序列的人种系基因。在一些实施方案中,VL框架区来源于具有IMGT IGKV1-NL1*01 (SEQ ID NO:32) 和IMGT IGKJ1*01 (SEQ ID NO:33)、IMGT IGKV1-33*01 (SEQ ID NO:34) 和IMGT IGKJ1*01 (SEQ ID NO:33) 或者IMGT IGKV1-5*01 (SEQ ID NO:35) 和IMGT IGKJ1*01 (SEQ ID NO:33) 中列出的氨基酸序列的人种系基因。

[0052] 在一些实施方案中,提供了一种结合剂,其包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,其中VH区包含具有SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列的互补决定区HCDR1,具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列的HCDR3,并且其中VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0053] 在一些实施方案中,提供了一种结合剂,其包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,其中VL区包含具有SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的LCDR1,具有SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的LCDR3,并且其中VL区包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0054] 在一些实施方案中,提供了一种结合剂,其包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,其中VH区包含具有SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列的互补决定区HCDR1,具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列的HCDR3,并且其中VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列;并且其中VL区包含具有SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的LCDR1,具有SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的LCDR3,并且其中VL区包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0055] 在一些实施方案中,提供了一种结合剂,其包含有包含重链可变 (VH) 区的重链和包含轻链可变 (VL) 区的轻链,其中VH区包含具有SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列的互补决定区HCDR1,具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列的HCDR3,并且其中VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;并且其中VL区包含具有SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的LCDR1,具有SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的LCDR3,并且其中VL区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;并且其中重链包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列,并且其中轻链包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少85%、至少90%、

至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供了一种结合剂,其包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在一些此类实施方案中,结合剂是抗体。

[0056] 在一些实施方案中,本文提供的结合剂,诸如MIC抗体,表现出良好的热稳定性和/或低水平的聚集体(诸如高分子量(HMW)聚集体)。MIC抗体的热稳定性可例如通过 T_m 和 T_{agg} 来评估,它们可以分别通过内源蛋白质荧光(IPF)(266nm激发,280-450nm发射扫描)和使用Uncle系统(Unchained Labs)的在473nm处的静态光散射(SLS)获得。MIC抗体的聚集体水平可例如通过使用HPLC-SEC或通过使用动态光散射(DLS)来测量。在一些实施方案中,基于抗体的单体和HMW聚集体的峰面积,MIC抗体的HMW聚集体的水平(作为MIC抗体总量的百分比)可小于10%、9.5%、9%、8.5%、8%、7.5%、7%、6.5%、6%、5.5%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%或0.5%。换句话说,当在溶液中时,至少90%、90.5%、91%、91.5%、92%、92.5%、93%、93.5%、94%、94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%或99.5%的MIC抗体以单体形式存在。在一些实施方案中,MIC抗体的多分散指数(PDI)可小于0.1,如通过DLS确定的。

[0057] 在特定实施方案中,MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂特异性结合MICA和MICB上的位于SEQ ID NO:27或28中列出的氨基酸序列的约氨基酸位置66-77、136-144和247-258内的构象表位。在特定实施方案中,MIC抗体或抗原结合部分或其他结合剂具有(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,并且具有如本文所述的任选取代的框架区,并且与抗体B10G5竞争特异性结合,所述抗体B10G5特异性结合MICA和MICB上的位于SEQ ID NO:27和28中列出的氨基酸序列的约氨基酸66-77、136-144和247-258内的构象表位。

[0058] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法涉及体内MIC抗体、其抗原结合部分或其他结合剂抑制sMIC的免疫抑制作用(例如,降低可用于与细胞受体NKG2D相互作用的sMIC的水平和/或活性)。在一些实施方案中,sMIC的抑制可以是降低未结合MIC的血清水平和恢复NK和CD8⁺ T细胞上的细胞表面NKG2D表达。在一些实施方案中,sMIC的抑制可以是降低MIC水平(例如,循环中sMIC的水平)。

[0059] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即含有特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。所述术语一般是指由两个免疫球蛋白重链可变区和两个免疫球蛋白轻链可变区构成的抗体,包括全长抗体(具有重链和轻链恒定区)及其抗原结合部分;包括例如完整的单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')²、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体(dAb)、双抗体、多特异性抗体、双特异性抗体(dual specific antibody)、双特异性抗体(bispecific antibody)和单链(参见例如,Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,85,5879-5883(1988)和Bird等人,Science 242,423-426(1988),其以引用的方式并入本文)。

[0060] 每条重链由可变区(缩写为VH)和恒定区构成。重链恒定区可包括三个结构域CH1、CH2和CH3以及任选的第四个结构域CH4。每条轻链由可变区(缩写为VL)和恒定区构成。轻链恒定区是CL结构域。VH和VL区可进一步分为称为互补决定区(CDR)的高变区,并散布有称为

框架区 (FR) 的保守区。因此,每个VH和VL区均由三个CDR和四个FR组成,它们从N端到C端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。这种结构对于本领域技术人员来说是众所周知的。

[0061] MIC抗体的VH CDR的氨基酸序列在SEQ ID NO:1中列出,位于氨基酸26-34 (GYSITSDYA,HCDR1,SEQ ID NO:11)、50-58 (GYISYSGST,HCDR2,SEQ ID NO:12) 和97-105 (ARGGTYFDY,HCDR3,SEQ ID NO:13) 处。MIC抗体的VL CDR的氨基酸序列在SEQ ID NO:2中列出,位于氨基酸24-32 (RASAHHNNW,LCDR1,SEQ ID NO:14)、50-56 (DATSLES,LCDR2,SEQ ID NO:15) 和98-107 (QHYWSTPWT,LCDR3,SEQ ID NO:16) 处。短语“其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰”是指不具有氨基酸取代、缺失或插入的这些VH和VL CDR(SEQ ID NO:11-16)。

[0062] 如本文所用,MIC抗体的“抗原结合部分”是指如本文所述的MIC抗体的具有MIC抗体的VH和VL序列的部分(列出于SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中,任选地如本文所述进行修饰)。根据术语抗体的“抗原结合部分”,抗原结合部分的实例包括Fab、Fab'、F(ab')²、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体(dAb)、双抗体和单链。如本文所用,术语Fab、F(ab')²和Fv是指以下:(i) Fab片段,即由VL、VH、CL和CH1结构域构成的单价片段;(ii) F(ab')²片段,即包含两个在铰链区经由二硫桥相互连接的Fab片段的二价片段;和(iii) Fv片段,所述Fv片段由MIC抗体的VL和VH结构域构成。尽管Fv片段的两个结构域,即VL和VH,由单独的编码区编码,但它们可进一步使用合成接头,例如多聚G4S氨基酸序列(ⁿ(G4S)ⁿ,公开为SEQ ID NO:17,其中n=1至5)相互连接,从而可以将它们制备为单个蛋白链,其中VL和VH区组合以便形成单价分子(称为单链Fv(ScFv))。术语抗体的“抗原结合部分”也旨在包括此类单链抗体。此处同样包括其他形式的单链抗体,诸如“双抗体”。双抗体是二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用连接VH和VL结构域的接头太短,两个结构域无法在同一条链上组合,从而迫使VH和VL结构域与不同链(分别为VL和VH)的互补结构域配对,并形成两个抗原结合位点(参见例如,Holliger,R等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J等人(1994)Structure 2:1121-1123)。

[0063] 免疫球蛋白恒定区是指重链或轻链恒定区。人重链和轻链恒定区氨基酸序列是本领域已知的。恒定区可以是任何合适的类型,其可选自以下类别:免疫球蛋白IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。若干免疫球蛋白类别可进一步分为同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgA1和IgA2。对应于免疫球蛋白的不同类别的重链恒定区(Fc)分别可以是 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。轻链可以是 κ 和 λ 之一。

[0064] 在一些实施方案中,恒定区可具有IgG1同种型。在一些实施方案中,恒定区可具有IgG2同种型。在一些实施方案中,恒定区可具有IgG3同种型。在一些实施方案中,恒定区可具有IgG4同种型。在一些实施方案中,Fc结构域可具有包含来自两个或更多个同种型的恒定区的杂合同种型。在一些实施方案中,免疫球蛋白恒定区可以是IgG1或IgG4恒定区。

[0065] 在一些实施方案中,MIC抗体重链是IgG1同种型,并且具有SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,MIC抗体轻链是 κ 同种型,并且具有SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列。

[0066] 此外,MIC抗体或其抗原结合部分可以通过抗体或抗体部分与一种或多种其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合形成的更大结合剂的一部分。与此类结合剂相关的是使用链霉亲和素核心区以制备四聚体scFv分子(Kipriyanov,S.M.,等人(1995)Human

Antibodies and Hybridomas 6:93-101) 以及使用半胱氨酸残基、标志物肽和C末端多聚组氨酸肽,例如六聚组氨酸标签(hexahistidiny1 tag,公开为SEQ ID NO:18)以产生二价和生物素化scFv分子(Kipriyanov,S.M.,等人(1994)Mol.Immunol.31:10471058)。

[0067] 关于VH和VL氨基酸序列,技术人员将认识到,改变编码序列中单个氨基酸或小百分比氨基酸的、对编码VH或VL的核酸或者多肽中的氨基酸的个别取代、缺失或添加(插入)是“保守修饰的变体”,其中所述改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代(保守氨基酸取代),并且改变的多肽保留以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC的能力。

[0068] 在一些实施方案中,MIC抗体或其抗原结合部分的保守修饰的变体可在FR中(即,除了在CDR中之外)具有改变,例如MIC抗体的保守修饰的变体在FR中具有VH和VL CDR的氨基酸序列(列出于SEQ ID NO:11-16中),并且具有至少一个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别为SEQ ID No:1和2)相比,VH和VL氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)在FR中总共具有不超过8个或6个或4个或2个或1个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别列出于SEQ ID No:1和2中)相比,VH和VL氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)在FR中具有8至1个、6至1个、4至1个或2至1个保守氨基酸取代。在这些实施方案中的任一个的其他方面,MIC抗体、其抗原结合部分或其他结合剂的保守修饰的变体对MIC表现出的结合亲和力大于抗体B10G5的结合亲和力。

[0069] 对于保守氨基酸取代,给定氨基酸可被具有相似物理化学特征的残基替换,例如,用一个脂肪族残基取代另一个(诸如将Ile、Val、Leu或Ala相互取代),或用一个极性残基取代另一个(诸如在Lys与Arg之间;Glu与Asp之间;或Gln与Asn之间)。其他此类保守氨基酸取代,例如,具有相似疏水性特征的整个区域的取代,是众所周知的。可在本文所述的测定中的任一种中测试包含保守氨基酸取代的多肽,以确认保留了所需活性,例如天然或参考多肽的抗原结合活性和特异性,所述活性即对MIC(sMIC和/或膜结合MIC)的活性。

[0070] 对于保守取代,氨基酸可根据其侧链特性的相似性进行分组(于A.L.Lehninger,于Biochemistry,第二版,第73-75页,Worth Publishers,New York(1975)): (1) 非极性:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M); (2) 不带电极性:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q); (3) 酸性:Asp(D)、Glu(E); 和(4) 碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

[0071] 替代地,对于保守取代,天然存在的残基可根据共同的侧链特性分为几组: (1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile; (2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln; (3) 酸性:Asp、Glu; (4) 碱性:His、Lys、Arg; (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro; 和(6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe。非保守取代将需要用这些类别之一的成员交换另一个类别的成员。

[0072] 具体的保守取代包括,例如;Ala到Gly或Ser;Arg到Lys;Asn到Gln或His;Asp到Glu;Cys到Ser;Gln到Asn;Glu到Asp;Gly到Ala或Pro;His到Asn或Gln;Ile到Leu或Val;Leu到Ile或Val;Lys到Arg、Gln或Glu;Met到Leu、Tyr或Ile;Phe到Met、Leu或Tyr;Ser到Thr;Thr到Ser;Trp到Tyr;Tyr到Trp;和/或Phe到Val、Ile或Leu。

[0073] 在一些实施方案中,MIC抗体或其抗原结合部分的保守修饰的变体优选地与参考VH或VL序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多同一,其中VH和VL CDR(SEQ ID NO:11-16)未被修饰。参考序列与修饰序列之间的同源性程度(同一性百分比)可例如通过使用在万维网上常用于此

目的免费可用计算机程序(例如,具有默认设置的BLASTp或BLASTn)比较这两个序列来确定。

[0074] 在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)相比,VH和VL氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)在框架区中总共具有不超过8个或6个或4个或2个或1个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)相比,VH和VL氨基酸序列(分别列出于SEQ ID No:1和2中)在框架区中总共具有8至1个、或6至1个、或4至1个或2至1个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)相比,VH和VL氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)在框架区中总共具有不超过8个或6个或4个或2个或1个氨基酸取代、缺失或插入。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)相比,VH和VL氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)在框架区中具有8至1个、6至1个、4至1个或2至1个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)相比,VH和VL氨基酸序列(分别列出于SEQ ID NO:1和2中)总共具有不超过8个或6个或4个或2个或1个氨基酸取代、缺失或插入。

[0075] 天然(或参考)氨基酸序列的修饰可通过本领域技术人员已知的多种技术中的任一种来完成。例如,可通过合成含有所需突变序列的寡核苷酸在特定基因座处引入突变,所述突变序列两侧是限制性位点,从而能够连接到天然序列的片段上。连接后,得到的重建序列编码具有所需氨基酸插入、取代或缺失的变体。替代地,可使用寡核苷酸定向的位点特异性诱变程序来提供改变的核苷酸序列,所述改变的核苷酸序列具有根据需要的取代、缺失或插入而改变的特定密码子。用于进行此类改变的技术非常成熟,并且包括例如由Walder等人(Gene 42:133,1986);Bauer等人(Gene 37:73,1985);Craik(BioTechniques,January 1985,12-19);Smith等人(Genetic Engineering:Principles and Methods,Plenum Press,1981);和美国专利号4,518,584和4,737,462公开的技术,所述文献和美国专利以引用的方式整体并入本文。

[0076] 在一些实施方案中,MIC抗体或其抗原结合部分具有完全人恒定区。在一些实施方案中,MIC抗体或其抗原结合部分具有非人恒定区。在一些实施方案中,MIC抗体重链是IgG1同种型,并且具有SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,MIC抗体轻链是 κ 同种型,并且具有SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列。

[0077] 在一些实施方案中,MIC抗体或其抗原结合部分具有修饰的恒定区(Fc区)或Fc结构域。Fc结构域(例如,CH1、CH2、CH3和任选的CH4)是Fc区的一部分。Fc结构域或区的一部分可与细胞上的Fc受体(FcR)结合。基于FcR识别的抗体类别,将FcR组织成类别(例如, γ 、 α 和 ϵ)。Fc α R类可与IgA结合,并且包括几种同工型,诸如Fc α RI(CD89)。Fc γ R类可与IgG结合,并且包括几种同工型,Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIA(CD32a)、Fc γ RIIB(CD32b)、Fc γ RIIIA(CD16a)和Fc γ RIIIB(CD16b)。Fc γ RIIIA(CD16a)具有两个主要变体,F158或V158。

[0078] 与参考相比,Fc结构域或Fc区与FcR的结合可改变免疫反应。类似地,与参考相比,Fc结构域不与FcR结合可改变免疫反应。

[0079] MIC抗体可具有Fc结构域,所述Fc结构域的序列与野生型或参考序列相比已被修饰,以相对于相应的野生型或参考序列改变至少一种恒定结构域或区介导的生物效应子功能。例如,在一些实施方案中,Fc结构域可被修饰以相对于未修饰的Fc结构域减少或增加至

少一种恒定结构域或区介导的生物效应子功能,例如减少或增加与Fc受体(FcR)的结合。FcR结合可通过例如在涉及FcR相互作用的(例如,FcR相互作用所必需的或影响FcR相互作用的)特定位点处修饰抗体的免疫球蛋白恒定区区段来减少或增加。在一些实施方案中,Fc结构域被修饰以减少与一种或多种Fc γ 受体(例如,Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA、Fc γ RIIIB和/或FcRN中的一种或多种)的结合。

[0080] 在一些实施方案中,抗体恒定区或结构域被修饰以相对于未修饰的Fc结构域获得或改善至少一种恒定区介导的生物效应子功能,例如增强Fc γ R相互作用。例如,抗体恒定区或结构域可被修饰以与Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和/或Fc γ RIIIA以大于相应的野生型Fc结构域或区的亲和力结合。

[0081] 氨基酸序列Fc结构域的修饰可改变Fc结构域或区的FcR识别。然而,此类修饰仍然可允许FcR介导的信号传导。修饰可以是残基处的氨基酸取代所述残基处的不同氨基酸。修饰可允许FcR与Fc结构域或区上FcR原本不会结合的位点结合。相对于参考序列的结合,修饰可增加FcR与Fc结构域或区的结合亲和力。相对于参考序列的结合,修饰可降低FcR与Fc结构域上的位点的结合亲和力。

[0082] 在一些实施方案中,氨基酸序列Fc结构域的修饰可改变Fc结构域或区的一个或多个FcR的识别。此种修饰可改变抗体或抗原结合部分与免疫细胞相互作用的能力。对Fc结构域或区的这种修饰或一系列修饰可允许Fc结构域选择性结合免疫细胞上的FcR,或者可减少或消除具有修饰结构域的抗体或抗原结合部分与免疫细胞的相互作用。例如,对Fc结构域的修饰可减少Fc结构域与Fc γ 受体的结合,但保留Fc结构域与FcRn结合的能力。

[0083] 与野生型Fc区或结构域的序列相比,修饰的Fc区或结构域可具有至少一个氨基酸变化。与野生型或参考Fc区相比,Fc区中的氨基酸变化可允许抗体或其抗原结合部分以更大的亲和力结合至少一种Fc受体。与野生型或参考Fc结构域相比,Fc结构域中的氨基酸变化可允许抗体以更大的亲和力结合至少一种Fc受体。与野生型或参考Fc区相比,Fc区中的氨基酸变化可允许抗体以降低的亲和力结合至少一种Fc受体。与野生型或参考Fc结构域相比,Fc结构域中的氨基酸变化可允许抗体以降低的亲和力结合至少一种Fc受体。

[0084] 在一些实施方案中,MIC抗体或其抗原结合部分可具有包含已从野生型IgG1序列修饰的IgG1同工型序列的Fc结构域或Fc区。修饰可包括在Fc结构域的一个或多个氨基酸残基处,诸如在5个不同的氨基酸残基,包括根据Kabat的EU索引的L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L(IgG1VLPLL)处的取代。修饰可包括在Fc结构域的一个或多个氨基酸残基处,诸如在2个不同的氨基酸残基,包括根据Kabat的EU索引的S239D/I332E(IgG1DE)处的取代。修饰可包括在Fc结构域的一个或多个氨基酸残基处,诸如在3个不同的氨基酸残基,包括根据Kabat的EU索引的S298A/E333A/K334A(IgG1 AAA)处的取代。

[0085] 在一些实施方案中,MIC抗体或其抗原结合部分的Fc结构域或区可表现出对一种或多种Fc受体的降低的结合亲和力。在一些实施方案中,Fc结构域或区可表现出对一种或多种Fc γ 受体的降低的结合亲和力。在一些实施方案中,Fc结构域或区可表现出对FcRn受体的降低的结合亲和力。在一些实施方案中,Fc结构域或区可表现出对Fc γ 和FcRn受体的降低的结合亲和力。在一些实施方案中,Fc结构域是Fc null结构域或区。如本文所用,“Fc null”是指表现出与任何Fc γ 受体弱结合至不结合的结构域。在一些实施方案中,Fc null结构域或区表现出对Fc γ 受体的结合亲和力降低(例如,Kd增加)至少1000倍。

[0086] 在一些实施方案中,MIC抗体的Fc结构域或区是包含柔性序列诸如GGGS的Fc null结构域或区。在一些实施方案中,MIC抗体是IgG1同工型,并且柔性序列插入人IgG1重链的G237与G238之间。在一些实施方案中,在MIC抗体中包含柔性序列对抗体的结合亲和力几乎不产生影响。在一些实施方案中,在MIC抗体中包含柔性序列会降低抗体的ADCC活性。在一些实施方案中,在MIC抗体中包含柔性序列几乎不导致抗体糖基化损失和/或会导致抗体聚糖谱的显著变化。抗体的糖基化和/或聚糖谱可通过例如使抗体经受PNGase F消化,并使用具有荧光检测器的亲水相互作用色谱法(HILIC)分析酶产物来测量。

[0087] 在某些实施方案中,Fc结构域对FcγRI (CD64)、FcγRIIA (CD32)、FcγRIIIA (CD16a)、FcγRIIIB (CD 16b)或其任何组合中的一种或多种具有降低的结合亲和力。为了降低Fc结构域或区与Fc受体的结合亲和力,Fc结构域或区可包括一个或多个氨基酸取代,所述取代降低Fc结构域或区与Fc受体的结合亲和力。

[0088] 在一些实施方案中,根据Kabat编号的EU索引,一个或多个取代包括对应于E233P、L234V、L234A、L235A、L235E、AG236、G237A、E318A、K320A、K322A、A327G、A330S和/或P331S的IgG1重链取代中的任一个或多个。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是E233、L234和L235的取代,诸如E233P/L234V/L235A或E233P/L234V/L235A/AG236。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是P238的取代,诸如P238A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是D265的取代,诸如D265A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是N297的取代,诸如N297A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是A327的取代,诸如A327Q。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是P329的取代,诸如P329A。

[0089] 在一些实施方案中,与野生型或参考IgG Fc结构域相比,IgG Fc结构域或区包含至少一个降低其对FcγR1的结合亲和力的氨基酸取代。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在F241处的取代,诸如F241A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在F243处的取代,诸如F243A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在V264处的取代,诸如V264A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在D265处的取代,诸如D265A。

[0090] 在一些实施方案中,与野生型或参考IgG Fc结构域相比,IgG Fc结构域或区包含至少一个增加其对FcγR1的结合亲和力的氨基酸取代。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在A327和P329处的取代,诸如A327Q/P329A。

[0091] 在一些实施方案中,IgG Fc修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代降低IgG Fc结构域或区对FcγRII和FcγRIIIA受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是D270的取代,诸如D270A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是Q295的取代,诸如Q295A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是A327的取代,诸如A237S。

[0092] 在一些实施方案中,修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代增加IgG Fc结构域或区对FcγRII和FcγRIIIA受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是T256的取代,诸如T256A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是K290的取代,诸如K290A。

[0093] 在一些实施方案中,修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代增加IgG Fc结

构域或区对FcγRII受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是R255的取代,诸如R255A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是E258的取代,诸如E258A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是S267的取代,诸如S267A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是E272的取代,诸如E272A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是N276的取代,诸如N276A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是D280的取代,诸如D280A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是H285的取代,诸如H285A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是N286的取代,诸如N286A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是T307的取代,诸如T307A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是L309的取代,诸如L309A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是N315的取代,诸如N315A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是K326的取代,诸如K326A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是P331的取代,诸如P331A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是S337的取代,诸如S337A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是A378的取代,诸如A378A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是E430的取代,诸如E430。

[0094] 在一些实施方案中,修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代增加IgG Fc结构域或区对FcγRII受体的结合亲和力并降低对FcγRIIIA受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是H268的取代,诸如H268A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是R301的取代,诸如R301A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是K322的取代,诸如K322A。

[0095] 在一些实施方案中,修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代降低IgG Fc结构域或区对FcγRII受体的结合亲和力但不会显著影响对FcγRIIIA受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是R292的取代,诸如R292A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是K414的取代,诸如K414A。

[0096] 在一些实施方案中,修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代降低IgG Fc结构域或区对FcγRII受体的结合亲和力并增加对FcγRIIIA受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是S298的取代,诸如S298A。在一些实施方案中,修饰可以是S239、I332和A330的取代,诸如S239D/I332E/A330L。在一些实施方案中,修饰可以是S239和I332的取代,诸如S239D/I332E。

[0097] 在一些实施方案中,修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代降低IgG Fc结构域或区对FcγRIIIA受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是F241和F243的取代,诸如F241 S/F243S或F241I/F243I。

[0098] 在一些实施方案中,修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代降低IgG Fc结构域或区对FcγRIIIA受体的结合亲和力并且不会显著影响对FcγRII受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是S239的取代,诸如S239A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是E269的取代,诸如E269A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是E293的取代,诸如E293A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是Y296的取代,诸如Y296F。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是V303的取代,诸如V303A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是A327的取

代,诸如A327G。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是K338的取代,诸如K338A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是D376的取代,诸如D376A。

[0099] 在一些实施方案中,修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代增加IgG Fc结构域或区对FcγRIIIA受体的结合亲和力并且不会影响对FcγRII受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是E333的取代,诸如E333A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是K334的取代,诸如K334A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是A339的取代,诸如A339T。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是S239和I332的取代,诸如S239D/I332E。

[0100] 在一些实施方案中,修饰包括一个或多个氨基酸的取代,所述取代增加IgG Fc结构域或区对FcγRIIIA受体的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是L235、F243、R292、Y300和P396的取代,诸如L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L (IgG1 VLPLL)。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是S298、E333和K334的取代,诸如S298A/E333 A/K334A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可以是K246的取代,诸如K246F。

[0101] IgG Fc结构域中影响IgG Fc结构域与一种或多种Fcγ受体相互作用的其他取代公开于美国专利号7,317,091和8,969,526(其公开内容以引用的方式并入本文)中。

[0102] 在一些实施方案中,与野生型或参考IgG Fc结构域相比,IgG Fc结构域或区包含至少一个降低对FcRn的结合亲和力的氨基酸取代。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在H435处的取代,诸如H435A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在I253处的取代,诸如I253A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在H310处的取代,诸如H310A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在I253、H310和H435处的取代,诸如I253A/H310A/H435A。

[0103] 在一些实施方案中,相对于野生型或参考IgG Fc结构域,修饰可包括一个氨基酸残基的取代,所述取代增加IgG Fc结构域对FcRn的结合亲和力。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在V308处的取代,诸如V308P。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在M428处的取代,诸如M428L。在一些实施方案中,修饰可包括在N434处的取代,诸如根据Kabat的EU索引的N434A或根据Kabat的EU索引的N434H。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在T250和M428处的取代,诸如T250Q和M428L。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在M428和N434处的取代,诸如M428L和N434S、N434A或N434H。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,修饰可包括在M252、S254和T256处的取代,诸如M252Y/S254T/T256E。在一些实施方案中,修饰可以是选自以下的一个或多个氨基酸的取代:P257L、P257N、P257I、V279E、V279Q、V279Y、A281 S、E283F、V284E、L306Y、T307V、V308F、Q31 IV、D376V和N434H。IgG Fc结构域中影响IgG Fc结构域与FcRn相互作用的其他取代公开于美国专利号9,803,023(其公开内容以引用的方式并入本文)中。

[0104] 在一些实施方案中,MIC抗体或其抗原结合部分具有修改补体依赖性细胞毒性(CDC)活性的修饰的恒定区(Fc区)或Fc结构域。CDC是一种可由抗体指导的细胞杀伤方法。IgM是补体激活最有效的同种型。IgG1和IgG3在经由经典补体激活途径指导CDC方面也都非常有效。

[0105] 在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,Fc区在IgG1的氨基酸位置E318、K320、

K322、P329和/或P331中的一个或多个处具有降低CDC活性的修饰,诸如E318A、K320A、K322A、P329A和/或P331A。在一些实施方案中,根据Kabat的EU索引,Fc区在IgG1的氨基酸位置E430、E345和S440中的一个或多个处具有增加CDC活性的修饰,诸如E430G、E345K、E430S、E430F、E430T、E345Q、E345R、E345Y、S440Y和/或S440W中的一个或多个。

[0106] 在各种实施方案中,MIC抗体、其抗原结合部分和其他结合剂可在人、鼠或其他动物来源的细胞系中产生。重组DNA表达可用于产生MIC抗体、其抗原结合部分和其他结合剂。这允许在选择的主物种中产生MIC抗体以及一系列MIC抗原结合部分和其他结合剂(包括融合蛋白)。在细菌、酵母、转基因动物和鸡蛋中产生MIC抗体、其抗原结合部分和其他结合剂也是基于细胞的生产系统的替代方案。转基因动物的主要优势是可再生资源的潜在高产。

[0107] 在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的MIC VH多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的MIC VL多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的MIC VH多肽由具有SEQ ID NO:21中列出的序列的核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的MIC VL多肽由具有SEQ ID NO:22中列出的序列的核酸编码。

[0108] 如本文所用,术语“核酸”或“核酸序列”或“多核苷酸序列”或“核苷酸”是指包含核糖核酸、脱氧核糖核酸或其类似物的单元的聚合分子。核酸可以是单链的或双链的。单链核酸可以是变性双链DNA的一条链核酸。在一些实施方案中,核酸可以是cDNA,例如缺乏内含子的核酸。

[0109] 编码MIC抗体、其抗原结合部分以及其他结合剂的氨基酸序列的核酸分子可通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于制备编码MIC抗体、抗原结合部分或其他结合剂的合成核苷酸序列。此外,寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR介导的诱变和盒式诱变可用于制备编码MIC抗体或抗原结合部分以及其他结合剂的核苷酸序列。如本文所述,可根据常规技术将编码至少MIC抗体、其抗原结合部分、结合剂或其多肽的核酸序列与载体DNA重组,所述常规技术例如像平末端或交错末端以供连接、限制酶消化以提供适当的末端、适当填充粘性末端、碱性磷酸酶处理以避免不希望的接合,以及使用适当连接酶的连接。用于此类操纵的技术例如由Maniatis等人,Molecular Cloning,Lab.Manual (Cold Spring Harbor Lab.Press,NY,1982和1989)和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley&Sons),1987-1993公开,并且可用于构建编码MIC抗体或其抗原结合部分或其VH或VL多肽的核酸序列和载体。

[0110] 如果核酸分子诸如DNA包含含有转录和翻译调节信息的核苷酸序列并且此类序列与编码多肽的核苷酸序列“可操作地连接”,则称其“能够表达”多肽。可操作的连接是这样的连接,其中调节DNA序列和寻求表达的DNA序列(例如,MIC抗体或其抗原结合部分)以允许多肽或抗原结合部分以可恢复的量基因表达的方式连接。基因表达所需的调节区的精确性质可因生物体而异,这在类似领域中是众所周知的。参见例如,Sambrook等人,1989; Ausubel等人,1987-1993。

[0111] 因此,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分的表达可在原核或真核细胞中发生。合适的宿主包括细菌或真核宿主,包括体内或原位的酵母、昆虫、真菌、鸟类和哺乳动物细胞,或哺乳动物、昆虫、鸟类或酵母来源的宿主细胞。哺乳动物细胞或组织可以是人、灵长

类动物、仓鼠、兔、啮齿动物、牛、猪、绵羊、马、山羊、狗或猫来源的,但可使用任何其他哺乳动物细胞。此外,通过使用例如酵母泛素水解酶系统,可完成泛素-跨膜多肽融合蛋白的体内合成。如此产生的融合蛋白可在体内加工或在体外纯化和加工,从而允许合成如本文所述的具有特定氨基末端序列的MIC抗体或其抗原结合部分。此外,可避免与在直接酵母(或细菌)表达中保留起始密码子衍生的甲硫氨酸残基相关的问题。(参见,例如,Sabin等人,7Bio/Technol.705(1989);Miller等人,7Bio/Technol.698(1989))。当酵母在富含葡萄糖的培养基中生长时,包含来自编码大量产生的糖酵解酶的活性表达基因的启动子和终止元件的一系列酵母基因表达系统中的任一种都可用于获得重组MIC抗体或其抗原结合部分。已知的糖酵解基因也可提供非常有效的转录控制信号。例如,可利用磷酸甘油酸激酶基因的启动子和终止子信号。

[0112] 例如,可通过本领域普通技术人员已知的方法用被工程改造以表达多肽的杆状病毒感染昆虫宿主,从而实现在昆虫中产生MIC抗体或其抗原结合部分。参见Ausubel等人,1987-1993。

[0113] 在一些实施方案中,将引入的核酸序列(编码MIC抗体或其抗原结合部分或其多肽)并入能够在受体宿主细胞中自主复制的质粒或病毒载体中。多种载体中的任一种都可用于此目的,并且是本领域普通技术人员已知且可获得的。参见例如,Ausubel等人,1987-1993。选择特定质粒或病毒载体的重要因素包括:含有载体的受体细胞可被识别并从不含载体的那些受体细胞中选择的难易程度;特定宿主中所需的载体拷贝数;以及是否需要能够在不同物种的宿主细胞之间“穿梭”载体。

[0114] 本领域已知的示例性原核载体包括质粒,诸如能够在大肠杆菌(E.coli)中复制的质粒。可用于表达编码MIC抗体或其抗原结合部分的DNA的其他基因表达元件包括但不限于(a)病毒转录启动子及其增强子元件,诸如SV40早期启动子。(Okayama等人,3Mol.Cell.Biol.280(1983))、劳斯肉瘤病毒LTR(Gorman等人,79PNAS 6777(1982))和莫洛尼鼠白血病毒(Moloney murine leukemia virus)LTR(Grosschedl等人,41Cell 885(1985));(b)剪接区和多腺苷酸化位点,诸如来源于SV40晚期区的位点(Okayama等人,1983);和(c)多腺苷酸化位点,诸如SV40中(Okayama等人,1983)。编码免疫球蛋白的DNA基因可如Liu等人,infra和Weidle等人,51Gene 21(1987)所描述的那样表达,使用以下作为表达元件:SV40早期启动子及其增强子、小鼠免疫球蛋白H链启动子增强子、SV40晚期区mRNA剪接、兔S-珠蛋白插入序列、免疫球蛋白和兔S-珠蛋白多腺苷酸化位点和SV40多腺苷酸化元件。

[0115] 对于编码免疫球蛋白的核苷酸序列,转录启动子可以是例如人巨细胞病毒,启动子增强子可以是巨细胞病毒和小鼠/人免疫球蛋白。

[0116] 在一些实施方案中,对于啮齿动物细胞中DNA编码区的表达,转录启动子可以是病毒LTR序列,转录启动子增强子可以是小鼠免疫球蛋白重链增强子和病毒LTR增强子中的一种或两种,以及多腺苷酸化和转录终止区。在其他实施方案中,将编码其他蛋白质的DNA序列与上述表达元件组合以实现蛋白质在哺乳动物细胞中的表达。

[0117] 每个编码区或基因融合被组装或插入到表达载体中。然后将能够表达MIC可变区或其抗原结合部分的受体细胞(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的VL或其变体)用编码MIC抗体或抗体多

肽或其抗原结合部分的核苷酸单独转染,或用编码VH和VL链编码区的多核苷酸共转染。在允许并入的编码区表达的条件下培养转染的受体细胞,并从培养物中回收表达的抗体链或完整抗体或抗原结合部分。

[0118] 在一些实施方案中,将含有编码MIC抗体或其抗原结合部分的编码区的核酸(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的VL或其变体)组装在单独的表达载体中,然后将其用于共转染受体宿主细胞。每个载体可含有一个或多个可选择的基因。例如,在一些实施方案中,使用两个可选择基因,第一可选择基因被设计用于在细菌系统中选择,并且第二可选择基因被设计用于在真核系统中选择,其中每个载体具有一组编码区。这种策略产生的载体首先指导细菌系统中核苷酸序列的产生并允许扩增。在细菌宿主中如此产生和扩增的DNA载体随后用于共转染真核细胞,并允许选择携带所需转染核酸(例如,含有MIC抗体重链和轻链)的共转染细胞。用于细菌系统的可选择基因的非限制性实例是赋予氨苄青霉素抗性的基因和赋予氯霉素抗性的基因。用于真核转染子的可选择基因包括黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因(命名为gpt)和来自Tn5的磷酸转移酶基因(命名为neo)。替代地,可将编码VH和VL链的融合核苷酸序列组装在相同的表达载体上。

[0119] 对于表达载体的转染和MIC抗体或其抗原结合部分的产生,受体细胞系可以是中國仓鼠卵巢细胞系(例如,DG44)或骨髓瘤细胞。骨髓瘤细胞可合成、组装和分泌由转染免疫球蛋白基因编码的免疫球蛋白,并且具有免疫球蛋白糖基化的机制。例如,在一些实施方案中,受体细胞是产生重组Ig的骨髓瘤细胞SP2/0(ATCC#CRL 8287)。SP2/0细胞只产生由转染基因编码的免疫球蛋白。骨髓瘤细胞可在培养物或小鼠腹腔中生长,在腹腔中,可从腹水中获得分泌的免疫球蛋白。

[0120] 可通过各种合适的手段中的任一种将编码MIC抗体或其抗原结合部分的表达载体(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的VL或其变体)引入适当的宿主细胞,所述手段包括生化手段诸如转化、转染、原生质体融合、磷酸钙沉淀,和聚阳离子应用诸如二乙氨基乙基(DEAE)葡聚糖,以及机械手段诸如电穿孔、直接显微注射和微粒轰击基因枪(microprojectile bombardment)。Johnston等人,240Science 1538(1988),如本领域普通技术人员所知。

[0121] 酵母在产生免疫球蛋白重链和轻链方面提供了优于细菌的某些优势。酵母进行翻译后肽修饰,包括糖基化。存在许多利用强启动子序列和高拷贝数质粒的重组DNA策略,可用于在酵母中产生所需蛋白质。酵母识别克隆哺乳动物基因产物的前导序列,并分泌带有前导序列的多肽(即前多肽)。参见例如,Hitzman等人,11th Intl.Conf.Yeast,Genetics&Molec.Biol.(Montpellier,France,1982)。

[0122] 酵母基因表达系统可常规评估抗体和组装的MIC抗体及其抗原结合部分的产生水平、分泌水平和稳定性水平。可利用各种酵母基因表达系统,其包含来自编码当酵母在富含葡萄糖的培养基中生长时大量产生的糖酵解酶的活性表达基因的启动子和终止元件。已知的糖酵解基因也可提供非常有效的转录控制信号。例如,可利用磷酸甘油酸激酶(PGK)基因的启动子和终止子信号。另一个实例是翻译延伸因子1 α 启动子。可采用多种方法来评价用于在酵母中表达免疫球蛋白的最佳表达质粒。参见II DNA Cloning 45,(Glover编,IRL Press,1985)和例如美国公开号US 2006/0270045 A1。

[0123] 细菌菌株也可用作产生本文所述的抗体分子或其抗原结合部分的宿主,可使用大肠杆菌K12菌株诸如大肠杆菌W3110(ATCC 27325)、芽孢杆菌属、肠杆菌诸如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)或粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)和各种假单胞菌属。来源于与宿主细胞相容的物种的含有复制子和控制序列的质粒载体与这些细菌宿主结合使用。所述载体携带复制位点以及能够在转化细胞中提供表型选择的特定基因。可采用多种方法来评价用于在细菌中产生MIC抗体及其抗原结合部分的表达质粒(参见Glover, 1985; Ausubel, 1987, 1993; Sambrook, 1989; Colligan, 1992-1996)。

[0124] 宿主哺乳动物细胞可在体外或体内生长。哺乳动物细胞为免疫球蛋白分子提供翻译后修饰,包括前导肽的去除、VH和VL链的折叠和组装、抗体分子的糖基化以及功能性抗体和/或其抗原结合部分的分泌。

[0125] 除了上述淋巴来源的细胞外,可用作产生抗体蛋白的宿主的哺乳动物细胞还包括成纤维细胞来源的细胞,诸如Vero(ATCC CRL 81)或CHO-K1(ATCC CRL 61)细胞。可用于表达免疫球蛋白多肽的示例性真核细胞包括但不限于COS细胞,包括COS 7细胞;293细胞,包括293-6E细胞;CHO细胞,包括CHO-S和DG44细胞;PERC6TM细胞(Crucell);和NS0细胞。在一些实施方案中,特定的真核宿主细胞是基于其对重链和/或轻链进行所需翻译后修饰的能力来选择的。例如,在一些实施方案中,CHO细胞产生的多肽具有比293细胞中产生的相同多肽更高的唾液酸化水平。

[0126] 在一些实施方案中,可根据任何合适的方法,在用一种或多种编码多肽的核酸分子工程改造或转染的动物体内产生一种或多种MIC抗体或其抗原结合部分(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的VL或其变体)。

[0127] 在一些实施方案中,在无细胞系统中产生抗体或其抗原结合部分(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的VL或其变体)。非限制性示例性无细胞系统描述于例如Sitaraman等人,Methods Mol.Biol.498:229-44(2009);Spirin,Trends Biotechnol.22:538-45(2004);Endo等人,Biotechnol.Adv.21:695-713(2003)中。

[0128] 许多载体系统可用于哺乳动物细胞中VH和VL链(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的VL或其变体)的表达(参见Glover, 1985)。可遵循各种方法来获得完整抗体。如上所述,可以在同一细胞中共表达VH和VL链以及任选的相关恒定区,以实现VH和VL链的细胞内缔合和连接,从而成为完整的四聚体H₂L₂抗体或其抗原结合部分。可通过在同一宿主中使用相同或不同的质粒来进行共表达。可将编码VH和VL链或其抗原结合部分(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的VL或其变体)的核酸置于相同的质粒中,然后将其转染到细胞中,从而直接选择表达这两条链的细胞。替代地,可首先用编码一条链(例如VL链)的质粒转染细胞,然后用含有第二种可选择标志物的VH链质粒转染所得细胞系。可用编码肽、VH、VL或VH加VL链(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的VL或其变体)的另外拷贝的质粒与另外的可选择标志物结合转染经由任一途径产生抗体、其抗原结合部分的细胞系,以产生具有增强特性的细胞系,所述增强特性诸如更高产量的组装MIC抗体或其

抗原结合部分或增强的转染细胞系的稳定性。

[0129] 此外,植物已成为一种方便、安全且经济的重组抗体生产替代表达系统,其基于微生物或动物细胞的大规模培养。MIC结合抗体或抗原结合部分可在植物细胞培养物或常规生长的植物中表达。植物中的表达可以是系统性的,限于亚细胞质体,或限于种子(胚乳)。参见例如,美国专利公开号2003/0167531;美国专利号6,080,560;美国专利号6,512,162;WO 0129242。几种植物来源的抗体已达到开发后期,包括临床试验(参见例如,Biolex, N.C.)。

[0130] 对于完整抗体,MIC抗体的可变区(VH和VL)(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的VL或其变体)通常与免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分连接。人恒定区DNA序列可根据众所周知的程序从多种人细胞诸如永生化B细胞中分离(WO 87/02671;所述文献以引用的方式整体并入本文)。MIC结合抗体可含有轻链和重链恒定区。重链恒定区可包括CH1、铰链、CH2、CH3区,并且有时还包括CH4区。在一些实施方案中,可缺失或省略CH2结构域。

[0131] 替代地,针对产生单链抗体描述的技术(参见例如,美国专利号4,946,778;Bird, Science 242:423-42(1988);Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988);和Ward等人,Nature 334:544-54(1989);所述专利和文献以引用的方式整体并入本文)可适于产生特异性结合MIC的单链抗体。单链抗体是通过经由氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链可变区(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1和2中列出的氨基酸序列的重链和轻链或其变体(例如,任选地用1至8个氨基酸取代、缺失和/或插入进行修饰)),从而产生单链多肽而形成的。也可使用在大肠杆菌中组装功能性Fv片段的技术(参见例如,Skerra等人,Science 242:1038-1041(1988);所述文献以引用的方式整体并入本文)。

[0132] 完整(例如,全)抗体、它们的二聚体、单个轻链和重链或者其抗原结合部分可通过已知技术回收和纯化,所述技术例如免疫吸附或免疫亲和色谱、色谱方法诸如HPLC(高效液相色谱)、硫酸铵沉淀、凝胶电泳或这些的任何组合。一般参见,Scopes,Protein Purification(Springer-Verlag,N.Y.,1982)。具有至少约90%至95%同质性的基本上纯的MIC结合抗体或其抗原结合部分是有利的,具有98%至99%或更高同质性的MIC结合抗体或其抗原结合部分也是有利的,特别是对于药物用途。一旦根据需要部分纯化或纯化至同质,完整MIC抗体或其抗原结合部分就可接着用于治疗或用于开发和执行测定程序、免疫荧光染色等。一般参见,第I和II卷Immunol.Meth.(Lefkovits&Pernis编,Acad.Press,NY,1979和1981)。

[0133] 此外,并且如本文所述,可进一步优化MIC抗体或其抗原结合部分以降低潜在的免疫原性,同时保持功能活性,以用于人类治疗。在一些实施方案中,优化的MIC结合抗体或其抗原结合部分来源于MIC抗体,所述MIC抗体包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链可变框架区任选地在框架区中用1至8个、1至6个、1至4个或1至2个保守氨基酸取代进行修饰,其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在一些实施方案中,优化的MIC结合抗体或其抗原结合部分来源于MIC结合抗体,所述MIC结合抗体包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变

区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链可变框架区任选地在框架区中用1至8个、1至6个、1至4个或1至2个氨基酸取代、缺失或插入进行修饰,其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在这方面,功能活性意指MIC抗体或其抗原结合部分能够展示与MIC结合抗体或其抗原结合部分相关的一种或多种已知功能活性,所述MIC结合抗体或其抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列。在这些实施方案中的任一个中,MIC结合抗体或其抗原结合部分的功能活性包括以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。另外的功能活性包括抑制MIC和/或抗癌活性。此外,具有功能活性的MIC抗体或其抗原结合部分意指多肽表现出与如本文所述的参考抗体或其抗原结合部分(例如,包含(i)具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的重链可变区;和(ii)具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的轻链可变区的MIC结合抗体或其抗原结合部分或其变体,如本文所述)的活性相似或更好的活性,如在特定测定例如像生物测定中测量的,具有或不具有剂量依赖性。在确实存在剂量依赖性的情况下,所述剂量依赖性不需要与参考抗体或其抗原结合部分的剂量依赖性相同,而是与如本文所述的参考抗体或其抗原结合部分相比基本上类似于或优于给定活性的剂量依赖性(即,候选多肽将表现出相对于参考抗体更大的活性)。

[0134] MIC抗体及其抗原结合部分或其他结合剂的其他方面涉及包含活性成分的组合(即,包括如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或者编码如本文所述的抗体或其抗原结合部分或其他结合剂的核酸)。在一些实施方案中,所述组合物是药物组合物。如本文所用,术语“药物组合物”是指活性剂与被接受用于制药工业的药学上可接受的载剂组合。本文中使用短语“药学上可接受的”是指在合理医学判断范围内适用于与人类和动物的组织接触地使用而没有过量毒性、刺激性、过敏反应、或其他问题或并发症、与合理的利益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0135] 含有溶解或分散于其中的活性成分的药理学组合物的制备在本领域中是众所周知的,并且不需要基于任何特定制剂进行限制。通常将此类组合物制备成可注射的液体溶液或悬浮液;然而,也可制备适用于在使用前在液体中再水合或悬浮的固体形式。制剂也可乳化或呈现为脂质体组合物。MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂可与药学上可接受的且与活性成分相容的赋形剂混合,并且赋形剂的量适合用于本文所述的治疗方法。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、丙三醇(glycerol)、乙醇等及其组合。此外,如果需要,药物组合物可含有少量辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂等,其增强或维持活性成分(例如,MIC抗体或其抗原结合部分)的有效性。如本文所述的药物组合物可包括其中的组分的药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括与例如像氢氯酸或磷酸的无机酸或诸如乙酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸形成的酸加成盐(与多肽的游离氨基形成的)。与游离羧基形成的盐也可来源于例如像氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁的无机碱和诸如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的有机碱。生理上可耐受的载剂在本领域中是众所周知的。示例性液体载剂是含有活性成分(例如,MIC抗体和/或其抗原结合部分)和水的无菌水溶液,并且可含有缓冲液,诸如生理pH值的磷酸钠、生理盐水或两者,诸如磷酸盐缓冲盐水。更进一步,水性载剂可含有多于一种缓冲盐,以及盐(诸如氯化钠和氯化钾)、右旋糖、聚乙二醇和其他溶质。除了水或不含水,液体组合物还可含有液相。此类

另外的液相的实例是甘油、植物油诸如棉籽油和水-油乳液。有效治疗特定病症或病状的活性剂的量将取决于病症或病状的性质,并且可通过标准临床技术确定。

[0136] 在一些实施方案中,包含如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或者编码如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分的核酸的药物组合物可以是冻干物。

[0137] 在一些实施方案中,提供了包含治疗有效量的本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或药物组合物的注射器。

[0138] 癌症治疗

[0139] 在一些方面,如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂可用于一种或多种方法,所述方法包括向有需要的受试者施用如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂。在一些实施方案中,MIC结合抗体或其抗原结合部分包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,MIC结合抗体或其抗原结合部分包含:(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链可变框架区任选地在框架区中用1至8个、1至6个、1至4个或1至2个保守氨基酸取代进行修饰,其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在一些实施方案中,MIC结合抗体或其抗原结合部分包含:(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链可变框架区任选地在框架区中用1至8个、1至6个、1至4个或1至2个氨基酸取代、缺失或插入进行修饰,其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在这些实施方案中的任一个中,MIC结合抗体以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。

[0140] 在一些实施方案中,受试者需要治疗癌症和/或恶性肿瘤。在一些实施方案中,受试者需要治疗MIC+癌症或MIC+恶性肿瘤,例如像上皮细胞癌、MIC+实体瘤或MIC+造血恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述方法用于治疗患有MIC+癌症或恶性肿瘤的受试者。在一些实施方案中,所述方法用于治疗受试者的上皮细胞癌或造血恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述方法用于治疗受试者的MIC+上皮细胞癌或MIC+造血恶性肿瘤。如本文所用,“上皮细胞癌”是指从上皮细胞发展而来的癌症。

[0141] 本文所述的方法包括施用治疗有效量的MIC结合抗体或其抗原结合部分或其他结合剂。如本文所用,短语“治疗有效量”、“有效量”或“有效剂量”是指在治疗、管理或预防肿瘤或恶性肿瘤复发中提供治疗益处的如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂的量,例如提供肿瘤或恶性肿瘤的至少一种症状、体征或标志物的统计学上显著降低的量。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。通常,治疗有效量可随受试者的病史、年龄、状况、性别以及受试者的医学病状的严重性和类型以及其他药物活性剂的施用而变化。

[0142] 术语“癌症”和“恶性肿瘤”是指细胞不受控制的生长,从而干扰身体器官和系统的正常功能。癌症或恶性肿瘤可以是原发性或转移性的,即它已经成为侵袭性的,在远离原始肿瘤部位的组织中播种肿瘤生长。“肿瘤”是指细胞不受控制的生长,从而干扰身体器官和系统的正常功能。患有癌症的受试者是受试者体内存在客观可测量的癌细胞的受试者。此定义包括良性肿瘤和恶性癌,以及潜在的休眠肿瘤和微转移。从其原始位置迁移并播种其

他重要器官的癌症最终可通过受影响器官的功能恶化导致受试者死亡。血液恶性肿瘤(造血癌),诸如白血病和淋巴瘤,能够例如在受试者中竞争过正常造血区室,从而导致造血衰竭(以贫血、血小板减少症和中性粒细胞减少症的形式),最终导致死亡。

[0143] 癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体实例包括但不限于基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和CNS癌、乳腺癌、腹膜癌、宫颈癌;绒毛膜癌、结肠癌和直肠癌(结直肠癌)、结缔组织癌、消化系统癌、子宫内膜癌、食道癌、眼癌、头颈癌、胃癌(gastric cancer)(包括胃肠道癌和胃癌(stomach cancer))、胶质母细胞瘤(GBM)、肝癌(hepatic carcinoma)、肝细胞瘤、上皮内肿瘤、肾癌(kidney/renal cancer)、喉癌、白血病、肝癌(liver cancer)、肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、口腔癌(例如,唇、舌、口和咽)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、呼吸系统癌、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、鳞状细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫或子宫内膜癌、泌尿系统癌、外阴癌;以及其他癌和肉瘤,以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级成免疫细胞性NHL、高级成淋巴细胞性NHL、高级小非分裂细胞NHL、巨大肿块疾病NHL(bulky disease NHL)、套细胞淋巴瘤、AIDS相关的淋巴瘤和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia));慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病、慢性成骨髓细胞性白血病和移植后淋巴细胞增殖性疾病(PTLD)以及与癰疽病、水肿(诸如与脑肿瘤相关的水肿)和梅格斯氏综合征(Meigs'syndrome)相关的异常血管增生。

[0144] 在一些实施方案中,癌选自实体瘤,包括但不限于黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌和头颈癌。

[0145] 在一些实施方案中,癌症或恶性肿瘤是MIC阳性(MIC+)。如本文所用,术语“MIC阳性”或“sMIC+”用于描述在细胞表面表达MIC(膜结合MIC)和/或产生从癌细胞释放的sMIC蛋白的癌细胞、癌细胞簇、肿瘤块或转移细胞。这些术语旨在涵盖将MIC蛋白的全部或部分细胞外结构域脱落到肿瘤内空间或循环或淋巴系统中的所有癌细胞和/或肿瘤块;因此,这些细胞可能仅在其表面展示MIC蛋白很短的一段时间,也就是说,所述术语涵盖通过外泌体或其他机制脱落sMIC蛋白或分泌sMIC的癌细胞和肿瘤细胞,无论其细胞表面上是否存在可检测的MIC蛋白。然而,任何能够通过脱落MIC来逃避先天免疫排斥的癌细胞或肿瘤都被认为是如本文所用的术语“MIC阳性癌症”。MIC阳性癌症的一些非限制性实例包括上皮细胞癌和造血恶性肿瘤。在一些实施方案中,MIC阳性癌症或恶性肿瘤可以是MIC阳性前列腺癌和/或其转移。

[0146] 如本文所用,“受试者”是指人或动物。通常,动物是脊椎动物,诸如灵长类动物、啮齿动物、家养动物或狩猎动物。灵长类动物包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿动物包括小鼠、大鼠、土拨鼠、雪貂、兔和仓鼠。家养动物和狩猎动物包括牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科动物例如家猫、犬科动物例如狗、狐狸、狼、禽类例如鸡、鹌鹑、鸵鸟和鱼,例如鳟鱼、鲑鱼和鲑鱼。在某些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物,例如人。术语“患者”、“个体”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0147] 优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、

猫、马或牛,但不限于这些实例。可以有利地使用除人以外的哺乳动物,例如,作为代表例如各种癌症的动物模型的受试者。此外,本文所述的方法可用于治疗家养动物和/或宠物。受试者可以是雌性或雄性。在某些实施方案中,受试者是人。

[0148] 受试者可以是先前已被诊断患有或鉴定为患有sMIC+或MIC+癌症并且需要治疗的受试者,但不需要已经经历sMIC+或MIC+癌症治疗。替代地,受试者也可以是先前未被诊断为患有需要治疗的sMIC+或MIC+癌症的受试者。受试者可以是表现出一种或多种与sMIC+或MIC+癌症相关的病状或一种或多种并发症的风险因素的受试者或不表现出风险因素的受试者。特别是“需要治疗sMIC+癌症的受试者”可以是患有所述病状或被诊断为患有所述病状的受试者。在其他实施方案中,“处于发展病状的风险下”的受试者是指被诊断为正处于发展所述病状(例如,sMIC+或MIC+癌症)的风险下的受试者。

[0149] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”或“改善”在用于提及疾病、病症或医学病状时,是指针对病状的治疗性处理,其中目标是逆转、减轻、改善、抑制、减缓或停止症状或病状的进展或严重程度。术语“治疗”包括减少或减轻病状的至少一种不良反应或症状。如果一种或多种症状或临床标志物减少,则治疗通常是“有效的”。替代地,如果病状的进展减少或停止,则治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,还包括在未进行治疗的情况下预期的症状的进展或恶化停止或至少减缓。与在未进行治疗的情况下预期的相比,有益的或期望的临床结果包括但不限于受试者中游离sMIC水平的降低、一种或多种症状的缓解、缺陷程度的减少、癌症或恶性肿瘤的稳定(即,不恶化)状态、肿瘤生长和/或转移的延迟或减缓以及寿命的延长。如本文所用,术语“施用”是指通过导致MIC结合抗体或其抗原结合部分或其他结合剂与MIC结合的方法或途径向受试者提供如本文所述的MIC结合抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或者编码如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂的核酸。类似地,本文公开的包含如本文所述的MIC结合抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或者编码如本文所述的MIC抗体或其抗原结合部分或其他结合剂的核酸的药物组合物可通过在受试者中产生有效治疗的任何适当途径施用。

[0150] MIC结合抗体或其抗原结合部分的剂量范围取决于效力,并且涵盖足够大以产生所需效果(例如,降低MIC水平、减缓肿瘤生长或减小肿瘤大小)的量。剂量不应大到引起不可接受的不良反应。通常,剂量将随着受试者的年龄、状况和性别而变化,并且可由本领域技术人员确定。如果出现任何并发症,个体医生也可以调整剂量。在一些实施方案中,剂量范围为0.01mg/kg体重至10mg/kg体重。在一些实施方案中,剂量范围为0.05mg/kg体重至5mg/kg体重。在一些实施方案中,剂量范围为0.01mg/kg体重至10mg/kg体重。在一些实施方案中,剂量范围为0.05mg/kg体重至5mg/kg体重。替代地,可滴定剂量范围以将血清水平维持在1pg/mL与1000ug/mL之间。对于全身施用,可向受试者施用治疗量,例如像0.01mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg或更多。

[0151] 可重复施用上述剂量。事实上,就清除游离或未结合的MIC可促进对肿瘤、癌细胞或恶性细胞的免疫攻击而言,考虑长期施用,例如首先治疗肿瘤、癌症或恶性肿瘤本身,然后针对获得脱落MIC能力的肿瘤细胞的发育提供持续监测。在一个优选的实施方案中,每周、每两周、每三周或每月施用上述剂量,持续数周或数月。治疗的持续时间取决于受试者

的临床进展和对治疗的反应性。

[0152] 在一些实施方案中,剂量可为约0.01mg/kg至约100mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约0.01mg/kg至约25mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约0.01mg/kg至约20mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约0.01mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约0.01mg/kg至约100mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约0.01mg/kg至约25mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约0.01mg/kg至约20mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约0.01mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约0.1mg/kg至约10mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约1mg/kg至约100mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约1mg/kg至约25mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约1mg/kg至约20mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约1mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约2mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约4mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约5mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约6mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约8mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约10mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约15mg/kg。在一些实施方案中,剂量可为约100mg/m²至约700mg/m²。在一些实施方案中,剂量可为约250mg/m²。在一些实施方案中,剂量可为约375mg/m²。在一些实施方案中,剂量可为约400mg/m²。在一些实施方案中,剂量可为约500mg/m²。

[0153] 在一些实施方案中,剂量可以是静脉内施用的。在一些实施方案中,静脉内施用可以是在约10分钟至约4小时的时间段内进行的输注。在一些实施方案中,静脉内施用可以是在约30分钟至约90分钟的时间段内进行的输注。

[0154] 在一些实施方案中,可以每周施用一次剂量。在一些实施方案中,可以每两周施用一次剂量。在一些实施方案中,可以约每2周施用一次剂量。在一些实施方案中,可以约每3周施用一次剂量。在一些实施方案中,可以每三周施用一次剂量。在一些实施方案中,可以每四周施用一次剂量。

[0155] 在一些实施方案中,总共向受试者施用约2至约10个剂量。在一些实施方案中,总共施用4个剂量。在一些实施方案中,总共施用5个剂量。在一些实施方案中,总共施用6个剂量。在一些实施方案中,总共施用7个剂量。在一些实施方案中,总共施用8个剂量。在一些实施方案中,总共施用9个剂量。在一些实施方案中,总共施用10个剂量。在一些实施方案中,总共施用大于10个剂量。

[0156] 可以单位剂量施用含有MIC结合抗体或其抗原结合部分或其他MIC结合剂的药物组合物。术语“单位剂量”在用于提及药物组合物时是指适合作为受试者的单位剂量的物理离散单位,每个单位含有预定量的活性物质(例如,MIC结合抗体或其抗原结合部分),经计算与所需生理上可接受的稀释剂(即载剂或媒介物)结合产生所需治疗效果。

[0157] 在一些实施方案中,MIC结合抗体或其抗原结合部分,或这些之一或两者的药物组合物与免疫疗法一起施用。如本文所用,“免疫疗法”是指被设计诱导或增强受试者自身免疫系统以对抗癌症或恶性肿瘤的治疗策略。免疫疗法的实例包括但不限于过继细胞疗法(例如,自体NK细胞、同种异体NK细胞、自体T细胞、CAR修饰的T细胞和CAR修饰的NK细胞)、抗体诸如检查点抑制剂和干扰代谢信号传导的抗体、免疫细胞因子(诸如 γ 链家族细胞因子IL-2、IL15及其变体)、化学毒素、放射疗法和表观遗传修饰剂。参见例如,Rohaen等人, *Virchows Archiv* 474:449-461 (2019); Magalhaes等人, *Expert Opinion on Biological Therapy* 19:8,811-827 (2019) 和 Ott 等人, 2019 ASCO Educational Book, Developmental

Immunotherapy and Tumor Immunobiology, e70-78 (2020), 所述文献的公开内容以引用的方式并入本文。

[0158] 在一些实施方案中,过继细胞疗法是T细胞疗法,诸如CAR T细胞疗法,其中从受试者血液中去掉T细胞,对其进行基因修饰以表达针对癌细胞上合适靶标的嵌合抗原受体,然后重新施用于受试者。参见例如,W02019/018603;W02019/090003;W02020/033927;W02019089969;W02015/164675;W02016064929;W02019/032929;W02016/115559;W02016/033570;W02014/130657;W02016028896;W02015/090230;和W02014/153270。

[0159] 在一些实施方案中,过继细胞疗法是一种细胞疗法,其中从受试者血液中去掉PBMC,使其对特定抗原产生反应,然后重新施用于受试者(例如,Sipuleucel-T)。(参见例如,W02001/039594;W02001/074855;和W01999/063050)。

[0160] 在一些实施方案中,过继细胞疗法是NK细胞疗法。NK细胞可被工程改造以表达针对癌细胞上合适靶标的嵌合抗原受体,然后将工程化NK细胞施用于受试者。(参见例如,W02006/103569;W02018/165291;W02016/201304;W02017/100709;W02019/028337;W02016/176651和W02018/183385)

[0161] 在一些实施方案中,免疫疗法涉及检查点抑制剂的施用。在一些实施方案中,检查点抑制剂选自抑制剂或CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、BMA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、LILRB1、LILRB2、CD47、CD137、CD70、2B4、CD160、TIGIT、CGEN-15049、CHK1、CHK2、SIGLEC-15、NKG2A、CD39、CD73、A2AR和A2BR。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂包括抑制CTLA-4、PD-1、PD-L1等的剂。合适的抗CTLA-4治疗剂包括例如,抗CTLA-4抗体、人抗CTLA-4抗体、小鼠抗CTLA-4抗体、哺乳动物抗CTLA-4抗体、人源化抗CTLA-4抗体、单克隆抗CTLA-4抗体、多克隆抗CTLA-4抗体、嵌合抗CTLA-4抗体、伊匹木单抗、曲美木单抗(tremelimumab)、抗CTLA-4adnectin、抗CTLA-4结构域抗体、单链抗CTLA-4mAb、重链抗CTLA-4mAb、轻链抗CTLA-4mAb、激动共刺激途径的CTLA-4抑制剂、公开于PCT公开号W0 2001/014424中的抗体、公开于PCT公开号W0 2004/035607中的抗体、公开于美国公开号2005/0201994中的抗体和公开于授予的欧洲专利号EP1212422B 1中的抗体。另外的抗CTLA-4抗体描述于美国专利号5,811,097、5,855,887、6,051,227和6,984,720;PCT公开号W0 01/14424和W0 00/37504;以及美国公开号2002/0039581和2002/086014中。可用于本发明方法的其他抗CTLA-4抗体包括例如公开于以下中的那些:W0 98/42752;美国专利号6,682,736和6,207,156;Hurwitz等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95(17):10067-10071(1998);Camacho等人,J.Clin.Oncology,22(145):摘要号2505(2004)(抗体CP-675206);Mokyr等人,Cancer Res,58:5301-5304(1998),美国专利号5,977,318、6,682,736、7,109,003和7,132,281。

[0162] 合适的抗PD-1和抗PD-L1治疗剂包括例如,抗PD-1和抗PD-L1抗体、人抗PD-1和抗PD-L1抗体、小鼠抗PD-1和抗PD-L1抗体、哺乳动物抗PD-1和抗PD-L1抗体、人源化抗PD-1和抗PD-L1抗体、单克隆抗PD-1和抗PD-L1抗体、多克隆抗PD-1和抗PD-L1抗体、嵌合抗PD-1和抗PD-L1抗体、抗PD-1adnectin和抗PD-L1 adnectin、抗PD-1结构域抗体和抗PD-L1结构域抗体、单链抗PD-1mAb和单链抗PD-L1 mAb、重链抗PD-1mAb和重链抗PD-L1 mAb以及轻链抗PD-1mAb和轻链抗PD-L1 mAb。在特定实施方案中,抗PD-1治疗剂包括纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹迪珠单抗(pidilizumab)、MEDI0680及其组合。在其他特定实施方案中,抗PD-L1

治疗剂包括阿替利珠单抗(atezolizumab)、BMS-936559、MEDI4736、MSB0010718C及其组合。

[0163] 合适的抗PD-1和抗PD-L1抗体也描述于Topalian等人,Immune Checkpoint Blockade:A Common Denominator Approach to Cancer Therapy,Cancer Cell 27:450-61(2015年4月13日),所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0164] 在一些实施方案中,检查点抑制剂是伊匹木单抗(Yervoy)、纳武利尤单抗(Opdivo)、帕博利珠单抗(Keytruda)、阿替利珠单抗(Tecentriq)、阿维利尤单抗(Avelumab)(Bavencio)或度伐利尤单抗(Durvalumab)(Imfinzi)。

[0165] 在一些实施方案中,提供了一种改善接受免疫疗法的受试者的治疗结果的方法。所述方法通常包括向患有癌症的受试者施用有效量的免疫疗法;以及向受试者施用治疗有效量的结合剂或其药物组合物,其中所述结合剂特异性结合循环MIC;其中与单独施用免疫疗法相比,受试者的治疗结果得以改善。在一些实施方案中,结合剂包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中重链和轻链框架区任选地在框架区中用1至8个氨基酸取代、缺失或插入进行修饰,其中结合剂以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。在一些实施方案中,结合剂包含(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中结合剂特异性结合MIC。在一些实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫键连接的Fc、scFv、单结构域抗体、双抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0166] 在一些实施方案中,改善的治疗结果是选自疾病稳定、部分应答或完全应答的客观应答,如通过所治疗的癌症的标准医学准则确定的。在一些实施方案中,改善的治疗结果是肿瘤负荷减少。在一些实施方案中,改善的治疗结果是无进展生存期或无病生存期。

[0167] 在一些实施方案中,所述方法在施用化学疗法或通过消耗内源性NK细胞或T细胞或其前体损害免疫系统的其他治疗后至少四周、至少六周或至少8周进一步施用MIC抗体或其抗原结合部分。在一些此类实施方案中,化学疗法或治疗选自自由以下组成的组:放射疗法或化学疗法。化疗剂的非限制性实例可包括烷化剂诸如塞替派(thiotepa)和CYTOXANTM环磷酰胺;烷基磺酸酯类诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺(ethylenimine)和甲基蜜胺(methylamelamine)类包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(acetogenin)(特别是布拉他辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物托泊替康(topotecan));苔藓抑素(bryostatin);海洋抑素(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);隐藻素类(cryptophycin)(特别为隐藻素1和隐藻素8);多拉司他汀(dolastatin);多米卡星(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);五加苷素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥类诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮

芥(estrarnustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxidehydrochloride)、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀(uracil mustard);硝基脲(nitrosurea)类,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,诸如烯二炔类抗生素(例如,加利车霉素(calicheamicin),特别是加利车霉素 γ 11和加利车霉素 ω 11(参见例如,Agnew, Chem.Intl.编Engl.,33:183-186(1994)));达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;双膦酸盐,诸如氯膦酸盐;埃斯波霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博莱霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉霉素(carabycin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN.RTM.多柔比星(包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin);丝裂霉素类诸如丝裂霉素C、酶酚酸(mycophenolicacid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培来霉素(peplomycin)、博地霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链脲酶素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercindin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物类,诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘧啶、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素类,诸如卡普睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitioastanol)、美雄烷(mepitioastane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺类,诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸(frolinicacid);醋葡醛内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷;氨基酮戊酸;恩尿嘧啶(eniluracil);安吖啶(amsacrine);阿莫司汀(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吖醌(diaziquone);依洛尼塞(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱类(maytansinoids),诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidanmol);二胺硝吖啶(nitraerine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);

洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼(procabazine);PSKTM多糖复合物(JHS天然产物,Eugene,Oreg.);雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofuran);锗螺胺(spirogermanium);西交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯(trichothecene)类(特别为T-2毒素、疣孢菌素(verracurin)A、杆孢菌素(roridin)A和蛇形菌素(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛;达卡巴嗪(dacarbazine);甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);加西托新(gacytosine);阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类,例如TAXOLTM紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANE.RTM.不含克列莫佛(Cremophor)、紫杉醇的白蛋白-工程改造的纳米微粒制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumburg,Ill.)和TAXOTERETM多西他赛(doxetaxel)(Rhone-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥(chloranbucil);GEMZARTM吉西他滨(gemcitabine);6-硫代鸟嘌呤;疏嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物诸如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱;NAVELBINETM长春瑞滨(vinorelbine);米托蒽醌(novantrone);替尼泊甙(teniposide);依达曲沙(edatrexate);柔红霉素(daunomycin);氨基蝶呤;希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);伊立替康(irinotecan)(Camptosar,CPT-11)(包括伊立替康联合5-FU和醛氢叶酸的治疗方案);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(difluoromethylornithine)(DMFO);类维A酸诸如视黄酸;卡培他滨;康普瑞汀(combretastatin);醛氢叶酸(LV);奥沙利铂,包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX);拉帕替尼(lapatinib)(TykerbTM);减少细胞增殖的PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR(例如,厄洛替尼(erlotinib)(TarcevaTM))和VEGF-A的抑制剂以及上述中的任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0168] “放射疗法”意指使用定向 γ 射线或 β 射线来诱导对细胞的足够损伤,从而限制细胞正常运作的能力或完全破坏细胞。

[0169] 本公开的实施方案的描述并非旨在是详尽的或将本公开限制为所公开的精确形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施方案和实施例,但是如相关领域的技术人员将认识到的,在本公开的范围内可进行各种等效修改。本文所提供的本公开的教导可适当地应用于其他程序或方法。本文所述的各种实施方案可组合以提供另外的实施方案。如有必要,可修改本公开的各方面,以采用上述参考文献和申请的组成、功能和概念来提供本公开的更进一步的实施方案。可根据详细描述对本公开进行这些和其他改变。

[0170] 前述实施方案中的任一个的特定元素可组合或取代其他实施方案中的元素。此外,虽然已经在这些实施方案的上下文中描述了与本公开的某些实施方案相关联的优点,但其他实施方案也可表现出此类优点,并且并非所有实施方案都必须表现出此类优点才能落入本公开的范围内。

[0171] 为了描述和公开例如在此类出版物中描述的可与本发明结合使用的方法,所有鉴别的专利和其他出版物都明确地以引用的方式并入本文。这些出版物仅为其在本申请的申请日之前的公开而提供。这方面的任何内容都不应解释为承认本发明人由于先前的发明或任何其他原因而无权早于所述公开。关于这些文件的日期的所有声明或关于这些文件的内

容的所有陈述均基于申请人可获得的信息,并且不构成对这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0172] 非限制性示例性实施方案

[0173] 通过以下实施方案进一步说明本发明,所述实施方案不应被解释为限制性的。

[0174] 1.一种结合剂,其包含:(i)重链可变(VH)区,所述VH区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变(VL)区,所述VL区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,其中所述重链和轻链框架区任选地在所述框架区中用1至8个氨基酸取代、缺失或插入进行修饰。

[0175] 2.一种结合剂,其包含:(i)重链可变区,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列;和(ii)轻链可变区,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列。

[0176] 3.一种结合剂,其包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区包含具有SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列的互补决定区HCDR1,具有SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列的HCDR3;并且其中所述VL区包含具有SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的LCDR1,具有SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的LCDR3,并且其中所述VH区和VL区各自包含人源化框架区。

[0177] 4.如实施方案3所述的结合剂,其中所述人源化VH框架区来源于具有IMGT IGHV4-59*11 (SEQ ID NO:29)和IGHJ4*01 (SEQ ID NO:30)或者IGHV4-30-4*01 (SEQ ID NO:31)和IGHJ4*01 (SEQ ID NO:30)中列出的氨基酸序列的人种系基因。

[0178] 5.如实施方案3或4所述的结合剂,其中所述人源化VL框架区来源于具有IMGT IGKV1-NL1*01 (SEQ ID NO:32)和IMGT IGKJ1*01 (SEQ ID NO:33)、IMGT IGKV1-33*01 (SEQ ID NO:34)和IMGT IGKJ1*01 (SEQ ID NO:33)或者IMGT IGKV1-5*01 (SEQ ID NO:35)和IMGT IGKJ1*01 (SEQ ID NO:33)中列出的氨基酸序列的人种系基因。

[0179] 6.如实施方案1至5中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合MIC。

[0180] 7.如实施方案1至6中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合部分。

[0181] 8.如实施方案7所述的结合剂,其中所述结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫键连接的Fc、scFv、单结构域抗体、双抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0182] 9.如前述实施方案中任一项所述的结合剂,其中所述重链可变区还包含重链恒定区。

[0183] 10.如实施方案9所述的结合剂,其中重链恒定区是IgG同种型。

[0184] 11.如实施方案10所述的结合剂,其中所述重链恒定区是IgG1恒定区。

[0185] 12.如实施方案10所述的结合剂,其中所述重链恒定区是IgG4恒定区。

[0186] 13.如实施方案11所述的结合剂,其中所述重链可变区和重链恒定区具有SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列。

[0187] 14.如前述实施方案中任一项所述的结合剂,其中所述轻链可变区还包含轻链恒定区。

[0188] 15.如实施方案14所述的结合剂,其中所述轻链恒定区是κ同种型。

- [0189] 16.如实施方案15所述的结合剂,其中所述轻链可变区和轻链恒定区具有SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列。
- [0190] 17.如实施方案9至16中任一项所述的结合剂,其中所述重链恒定区还包含至少增加与人Fc γ RIII结合亲和力的氨基酸修饰。
- [0191] 18.如实施方案9至17中任一项所述的结合剂,其中所述重链恒定区还包含至少一种减少与一种或多种Fc γ 受体结合的氨基酸修饰。
- [0192] 19.如实施方案9至17中任一项所述的结合剂,其中所述重链恒定区还包含至少一种增加CDC活性的氨基酸修饰。
- [0193] 20.如实施方案中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是单特异性的。
- [0194] 21.如实施方案1至20中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是二价的。
- [0195] 22.如实施方案21所述的结合剂,其中所述结合剂包含第二结合结构域并且所述结合剂是双特异性的。
- [0196] 23.如实施方案1至22中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合可溶性MIC(sMIC)。
- [0197] 24.如实施方案1至23中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂以大于抗体B10G5的结合亲和力特异性结合MIC。
- [0198] 25.一种药物组合物,其包含如前述实施方案中任一项所述的结合剂和药学上可接受的载剂。
- [0199] 26.一种编码重链可变区的核酸,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列,所述核酸任选地具有SEQ ID NO:21中列出的核酸序列。
- [0200] 27.一种编码轻链可变区的核酸,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列,所述核酸任选地具有SEQ ID NO:22中列出的核酸序列。
- [0201] 28.一种编码如实施方案1至24中任一项所述的结合剂的核酸,其任选地具有SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中列出的核酸序列。
- [0202] 29.一种载体,其包含如实施方案26至28中任一项所述的核酸。
- [0203] 30.一种细胞系,其包含如实施方案26至28中任一项所述的核酸或如实施方案29所述的载体。
- [0204] 31.一种治疗MIC+癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如实施方案1至24中任一项所述的结合剂或如实施方案25所述的药物组合物。
- [0205] 32.如实施方案31所述的方法,其中所述癌症是癌、肉瘤、神经内分泌肿瘤或血液恶性肿瘤。
- [0206] 33.如实施方案33所述的方法,其中所述癌症是癌。
- [0207] 34.如实施方案33所述的方法,其中所述癌选自前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌和头颈癌。
- [0208] 35.如实施方案32所述的方法,其中所述癌症是血液恶性肿瘤。
- [0209] 36.如实施方案33所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是淋巴瘤或多发性骨髓瘤。
- [0210] 37.如实施方案31至36中任一项所述的方法,其还包括向所述受试者施用免疫疗法。
- [0211] 38.如实施方案37所述的方法,其中所述免疫疗法包括过继细胞疗法或检查点抑

制剂。

[0212] 39.如实施方案38所述的方法,其中所述免疫疗法包括过继细胞疗法。

[0213] 40.如实施方案39所述的方法,其中所述过继细胞疗法选自自体NK细胞、同种异体NK细胞、自体T细胞、CAR修饰的T细胞和CAR修饰的NK细胞。

[0214] 41.如实施方案38所述的方法,其中所述免疫疗法包括检查点抑制剂。

[0215] 42.如实施方案41所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自特异性结合人PD-1、人PD-L1或人CTLA4的抗体。

[0216] 43.如实施方案42所述的方法,其中所述检查点抑制剂是帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、西米普利单抗或伊匹木单抗。

[0217] 44.如实施方案31至43中任一项所述的方法,其中在施用所述结合剂之前至少四周不向所述受试者施用化学疗法。

[0218] 45.如实施方案31至44中任一项所述的方法,其中所述结合剂是静脉内施用的。

[0219] 46.如实施方案31至45中任一项所述的方法,其中所述结合剂以约0.1mg/kg至约100mg/kg的剂量施用。

[0220] 47.一种降低患有癌症的受试者中循环sMIC水平的方法,其包括施用治疗有效量的如实施方案1至24中任一项所述的结合剂或如实施方案25所述的药物组合物。

[0221] 48.如实施方案47所述的方法,其中所述癌症是癌、肉瘤、神经内分泌肿瘤或血液恶性肿瘤。

[0222] 49.如实施方案48所述的方法,其中所述癌症是癌。

[0223] 50.如实施方案49所述的方法,其中所述癌选自前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌和头颈癌。

[0224] 51.如实施方案48所述的方法,其中所述癌症是血液恶性肿瘤。

[0225] 52.如实施方案51所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是淋巴瘤或多发性骨髓瘤。

[0226] 53.一种改善接受免疫疗法的受试者的治疗结果的方法,其包括:

[0227] a.向所述患有癌症的受试者施用有效量的免疫疗法;以及

[0228] b.向所述受试者施用治疗有效量的如实施方案1至24中任一项所述的结合剂或如实施方案25所述的药物组合物,其中所述结合剂特异性结合MIC;

[0229] 其中与单独施用所述免疫疗法相比,所述受试者的所述治疗结果得以改善。

[0230] 54.如实施方案53所述的方法,其中所述改善的治疗结果是选自疾病稳定、部分应答或完全应答的客观应答。

[0231] 55.如实施方案53所述的方法,其中所述改善的治疗结果是肿瘤负荷减少。

[0232] 56.如实施方案53所述的方法,其中所述改善的治疗结果是无进展生存期或无病生存期。

[0233] 57.如实施方案53所述的方法,其中所述免疫疗法是过继细胞疗法或检查点抑制剂。

[0234] 58.如实施方案57所述的方法,其中所述免疫疗法是过继细胞疗法。

[0235] 59.如实施方案58所述的方法,其中所述过继细胞疗法包括自体NK细胞、同种异体NK细胞、自体T细胞、CAR修饰的T细胞和CAR修饰的NK细胞。

[0236] 60.如实施方案57所述的方法,其中所述免疫疗法是检查点抑制剂。

[0237] 61.如实施方案60所述的方法,其中所述检查点抑制剂包含特异性结合人PD-1、人PD-L1或CTLA4的抗体。

[0238] 62.如实施方案61所述的方法,其中所述检查点抑制剂是帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、西米普利单抗或伊匹木单抗。

[0239] 63.如实施方案53至62中任一项所述的方法,其中在施用所述结合剂之前至少四周不向所述受试者施用化学疗法。

[0240] 64.如实施方案53至63中任一项所述的方法,其中所述结合剂是静脉内施用的。

[0241] 65.如实施方案53至64中任一项所述的方法,其中所述结合剂以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用。

[0242] 66.如实施方案1至24中任一项所述的结合剂或如实施方案25所述的药物组合物用于治疗受试者的MIC+癌症的用途。

[0243] 67.如实施方案1至24中任一项所述的结合剂或如实施方案25所述的药物组合物用于治疗接受免疫疗法的受试者的MIC+癌症的用途。

[0244] 68.如实施方案1和3至24中任一项所述的结合剂,其中所述VH选自具有SEQ ID NO:1、23和24中列出的氨基酸序列的重链可变区;并且所述VL选自具有SEQ ID NO:2、25和26中列出的氨基酸序列的轻链可变区。

[0245] 69.如实施方案68所述的结合剂,其中所述VH具有SEQ ID NO:24中列出的氨基酸序列,并且所述VL具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列。

[0246] 实施例

[0247] 实施例1:人源化抗体的产生

[0248] 以下实施例描述了抗体B10G5的人源化版本的制备。基于两种不同的重链和轻链人受体框架设计了三条人源化轻链和三条人源化重链。每个亲本链的第一人源化链利用第一框架,并含有具有最少亲本抗体框架序列的最人序列(命名为人源化HC 1,LC 1)。每个亲本链的第二人源化链使用与之前相同的框架,但含有另外的亲本序列(命名为人源化HC 2,LC 2)。每个亲本链的第三人源化链利用第二种对应框架,并且类似于HC 2/LC 2,还含有与人框架融合的另外的亲本序列(命名为人源化HC 3,LC 3)。

[0249] 然后,轻和重人源化链准备组合,以产生变体完全人源化抗体。如以下实施例中所述,测试了人源化轻链和重链的所有可能组合的表达水平和结合亲和力测试。

[0250] 通过首先合成可变区序列来构建全长抗体基因。优化这些序列以在哺乳动物细胞中进行表达。然后将这些可变区序列克隆到已经含有人Fc结构域的表达载体中;对于重链,根据要求使用IgG1恒定区。此外,为了比较,亲本抗体的重链和轻链使用相同的主链Fc序列构建为全长嵌合链。抗体的鉴定如下表1所阐述。

[0251] 表1.人源化抗体组合

[0252]

抗体链	亲本HC	人源化HC1	人源化HC2	人源化HC3
亲本LC	Ab-J			
人源化LC1		Ab-A	Ab-D	Ab-B
人源化LC2		Ab-H	Ab-C	Ab-E
人源化LC3		Ab-I	Ab-K	Ab-G

[0253] 实施例2:小规模生产中人源化抗体的评价

[0254] 对所有9种人源化抗体进行了0.01升小规模生产。B10G5抗体也被扩大生产以进行直接比较。在没有血清的情况下,使用化学成分限定培养基(chemically defined media)将所示重链和轻链的质粒转染到悬浮培养的HEK293细胞中。转染后五天,收集每次生产运行的条件培养基并使其澄清。使用MabSelect SuRe™蛋白A培养基(GE Healthcare)纯化条件培养基中的抗体。下面提供了最终产量(表2)。

[0255] 表2. 小规模生产中的抗体产量(mg)

抗体链	亲本HC	人源化HC1	人源化HC2	人源化HC3
亲本LC	0.99 (Ab-J)			
人源化LC1		1.95 (Ab-A)	2.5 (Ab-D)	2.25 (Ab-B)
人源化LC2		2.97 (Ab-H)	3.19 (Ab-C)	2.47 (Ab-E)
人源化LC3		2.88 (Ab-I)	3.11 (Ab-K)	3.45 (Ab-G)

[0257] 使用LabChip GXII(Perkin Elmer)在还原条件下对抗体进行CE-SDS分析,并分析所得电泳图谱。对于纯化的人源化抗体,观察到重链和轻链的离散峰;重链和轻链的峰高[或曲线下面积]相似。抗体C(HC2/LC2)和K(HC2/LC3)产生的抗体产量最大。

[0258] 实施例3:人源化抗体的结合亲和力测试

[0259] 通过FACS分析来自实施例2的纯化抗体对人前列腺肿瘤细胞系M12的结合亲和力。测试了三种不同的抗体浓度(0.1 μ g/mL、0.05 μ g/mL和0.01 μ g/mL)。为了比较结合亲和力,测定了每种浓度下每种抗体的MFI,并且如图1所示绘制结果。在0.1 μ g/mL浓度下,抗体从上到下为Ab-G、Ab-K、Ab-E、Ab-J、Ab-I和Ab-H(重叠)、Ab-D、Ab-B、Ab-A和Ab-C。出乎意料的是,两种抗体Ab-G和Ab-K的MFI高于抗体J(具有人IgG1 Fc区的嵌合B10G5)。

[0260] 实施例4:BLI对抗体K的BLI分析

[0261] 使用Octet Red96(ForteBio)进行生物层干涉测量(BLI),一般如Kamat和Rafique,Analytical Biochemistry 536:16-31(2017)所述。在动力学级生物传感器上捕获抗体样品Ab-K和Ab-J(嵌合B10G5)。然后将加载的生物传感器浸入含有抗原的连续稀释样品(MICB)中,所述样品在含有0.1%BSA、0.02%Tween-20,pH 7.2的PBS缓冲液中连续稀释。观察到缔合150秒,然后解离200秒。相同抗原浓度的重复注射显示出良好的重叠。使用1:1结合模型和利用Scrubber软件的具有传质限制的全局拟合进行动力学分析。参考图2A至图2B,Ab-K(图2B)具有比嵌合抗体B10G5(Ab-J,K_d=12.1nM)更高的亲和力(K_d=7.2nM)(图2A)。

[0262] 实施例5:NK细胞细胞毒性测定

[0263] 确定了抗体K刺激NK细胞细胞毒性的能力。使用来自Stem Cell Technologies(Vancouver,BC,Canada)的分离试剂盒从健康供体PBMC中阴性选择NK细胞。用IL-2(1000U/mL)激活纯化的NK细胞18h,然后将其用于针对在37°C下与10 μ g/ml对照IgG、抗体Ab-J(具有人IgG1 Fc区的嵌合B10G5)或抗体K(Ab-K)一起预孵育30min的UC1肿瘤细胞或PL-12细胞的细胞毒性测定。使用标准4h⁵¹Cr释放测定来确定NK细胞介导的细胞毒性(Jewett A等人, Hum. Immunol. 2003;64:505-520)。特别地,将NK细胞与⁵¹Cr标记的UC1或PL12细胞以10:1比率在细胞培养孵育箱中共孵育4h。4h孵育后,从每个样品中收获上清液并在 γ 计数器上进行计数。使用以下公式计算特异性细胞毒性百分比:%细胞毒性=(实验cpm-自发cpm)/(总cpm-自发cpm)。NK细胞杀伤活性以裂解单位30/10⁶个细胞表示,这是使用裂解30%靶细胞

所需的NK细胞的倒数 $\times 100$ 确定的。实验中包括每种条件的五个重复。

[0264] 参考图3A至图3B, 抗体K (Ab-K) 在增强IL-2激活的原代NK细胞杀伤MIC⁺甲状腺嗜酸细胞瘤UC1肿瘤细胞(图3A); 和胰腺PL12细胞(也称为Panc 10.05; 图3B) 方面表现出比嵌合抗体B10G5更高的活性。

[0265] 实施例6: 聚集测定

[0266] 使用动态光散射(DLS)使用准弹性光散射仪测定鼠抗体B10G5、嵌合Ab-K抗体(ch-Ab-K、人源化可变区和鼠Fc) 和抗体K (Ab-K, 人源化) 的样品。分别将B10G5、ch-Ab-K或Ab-K在PBS缓冲液中稀释至1.0mg/mL的浓度, 体积为50 μ L。通过自旋过滤(SpinX[®] 目录号8160) 来过滤所有样品, 以去除不需要的大颗粒并在测定前脱气。使用Unchained Lab nanoDLS pUNK机器, 使用5 μ L样品加载相应的一次性比色皿进行DLS测定。测定的细节描述于例如Berne等人, Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics, Courier Dover Publications, ISBN 0-486-41155-9 (2000) 中。在此测定中, DLS测量由于扩散粒子引起的散射光强度波动。粒子随着时间的推移而聚集, 表现为流体动力学直径(x轴) 的增加。峰面积表示不同抗体种类(例如, 抗体单体或聚集体) 的各自水平, 以占抗体总量的百分比计。

[0267] 图4A至图4C分别示出了鼠抗体B10G5(鼠IgG1, 图4A)、嵌合Ab-K抗体(ch-Ab-K, 由具有鼠IgG1-Fc的Ab-K人源化可变区构成)(图4B) 和Ab-K(人源化)(图4C) 的抗体单体和聚集体的水平。嵌合抗体ch-Ab-K和完全人源化抗体Ab-K在溶液中比鼠抗体B10G5更稳定, 如抗体嵌合Ab-K(图4B, 99.5%) 和完全人源化抗体Ab-K(图4C, 99.95%) 的更高单体水平所示。

[0268] 实施例7: 免疫疗法临床试验

[0269] I期临床试验在患有MIC⁺肿瘤的癌症患者的样品中或在血清sMIC⁺的癌症患者的样品中进行。MIC抗体的安全性和最大耐受剂量(MTD) 和主要疗效是使用适应性剂量递增3+3设计或事件时间贝叶斯最优区间设计确定的。患者群体包括那些未能通过标准护理但未接受过化疗(chemo-naïve) 的人。MIC抗体的试验剂量范围可为0.01mg/Kg至100mg/Kg, 每2-4周静脉输注一次, 持续长达90天的时间段, 并进行长达1年的随访, 以确定MTD或推荐的2期剂量(RP2D)。对于没有出现明显不良反应的患者, 将延长输注时间段, 并进行长达2年的临床随访, 以确定主要疗效。

[0270] 本发明不限于本文所述的特定实施方案的范围。事实上, 根据上文的描述和附图, 除本文所述之外的对本发明的各种修改对于本领域的技术人员将是显而易见的。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0271] 本文引用了各种出版物, 包括专利、专利申请出版物和科学文献, 其公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入。

序列表

[0272]

SEQ ID NO: 1 – HC2 的 VH 氨基酸序列

EVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGYSIT SDYAWNWIRO PPGKGLEWIG YISYSGSTNY NPSLKSRVTI
SRDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARGG TYFDYWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 2 – LC3 的 VL 氨基酸序列

DVVMQSPST LSASVGDRVT ITCRASAHIN NWLAWYQQKP GKAPKLLISD ATSLESQVPS RFGSGSGSKE
YTTLTISSLQP DDFATYYCQH YWSTPWTFGQ GTKVEIK

SEQ ID NO: 3 – VH-IgG1 氨基酸序列

EVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGYSIT SDYAWNWIRO PPGKGLEWIG YISYSGSTNY NPSLKSRVTI
SRDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARGG TYFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA
LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVTVFPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV
DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSTIAVEW ESNQGPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPG

SEQ ID NO: 4 – VL-Igκ 氨基酸序列

DVVMQSPST LSASVGDRVT ITCRASAHIN NWLAWYQQKP GKAPKLLISD ATSLESQVPS RFGSGSGSKE
YTTLTISSLQP DDFATYYCQH YWSTPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY
PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
RGEK

[0273]

SEQ ID NO: 5 信号序列

MDPKGSLSWR ILLFLSLAFE LSYG

SEQ ID NO: 6 信号序列

METDTLLLWV LLLWVPGSTG

SEQ ID NO: 7 具有信号序列的 VH-IgG1 氨基酸序列

MDPKGSLSWR ILLFLSLAFE LSYGEVQLQE SGPGLVKPSQ TSLTCTVSG YSITSDYAWN WIRQPPGKGL
EWIGYISYSG STNYPNPSLKS RVTISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC ARGGTYFDYW GQGT LVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRT
EVTCTVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCL LVKGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

SEQ ID NO: 8 具有信号序列的 VL-Igκ 氨基酸序列

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DVVMTQSPST LSASVGDRVIT ITCRASAHIN NWLAWYQQKP GKAPKLLISD
ATSLESGVPS RFSGSGSGKE YTLTISSLQP DDFATYYCQH YWSTPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK
VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

SEQ ID NO: 9 人 MICA, 同工型 1₁

MGLGPFVLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLTEVH LDGQPFLRCD RQKCRAPQG
QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL AHKDKQKEGL HSLQEIRVCE IHEDNSTRSS QHFYYDGELF
LSQNLETKEW TMPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY HAMHADCLQE LRRYLKSGVV LRRTVPPMVN
VTRSEASEGN ITVTCRASGF YPWNITLSWR QDGVSLSHDT QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICQGEEQRF
TCYMEHSGNH STHPVPSPGV LVLQSHWQTF HVSAAAAAI FVIIIFYVRC CKKTSAAEG PELVSLQVLD
QHPVGTSDHR DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

SEQ ID NO: 10 人 MICB, 同工型 1

MGLGRVLLFL AVAFPFAPPA AAAEPHSLRY NLMVLSQDGS VQSGFLAEGH LDGQPFLRYD RQKRRAPQG
QWAENVLGAK TWDTEEDLT ENGQDLRRTL THIKDQKGL HSLQEIRVCE IHEDSSTRGS RHFYYDGELF
LSQNLETQES TVPQSSRAQT LAMNVTNFWK EDAMKTKTHY RAMQADCLQK LQRYLKSGVA IRRTVPPMVN
VTCSEVSEGN ITVTCRASSF YPRNITLTWR QDGVSLSHNT QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RIRQGEEQRF
TCYMEHSGNH GTHPVPSPGKA LVLQSQRDTE PYVSAAMPCE VIIILCVPC CKKTSAAEG PELVSLQVLD
QHPVGTGDHR DAAQLGFQPL MSATGSTGST EGT

[0274] SEQ ID NO: 11 VH CDR1

GYSITSDYA

SEQ ID NO: 12 VH CDR2

GYISYSGST

SEQ ID NO: 13 VH CDR3

ARGGTYFDY

SEQ ID NO: 14 VL CDR1

RASAHINNW

SEQ ID NO: 15 VL CDR2

DATSLES

SEQ ID NO: 16 VL CDR3

QHYWSTPWT

SEQ ID NO: 17

(Gly Gly Gly Gly Ser) n, 其中 n = 1 至 5

SEQ ID NO: 18

His His His His His His

SEQ ID NO: 19 HC2 的编码序列

[0275]

```
ATG GAC CCC AAG GGC AGC CTG AGC TGG AGA ATC CTG CTG TTC CTG AGC CTG GCC TTC
GAG CTG AGC TAC GGC GAA GTG CAG CTG CAG GAA TCT GGC CCT GGC CTC GTG AAG CCT
TCC CAG ACC CTG TCT CTG ACC TGC ACC GTG TCC GGC TAC TCC ATC ACC TCC GAC TAC
GCC TGG AAC TGG ATC CGG CAG CCT CCT GGC AAG GGA CTG GAA TGG ATC GGC TAC ATC
TCC TAC TCC GGC TCC ACC AAC TAC AAC CCC AGC CTG AAG TCC AGA GTG ACC ATC TCC
CGG GAC ACC TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG TCC TCC GTG ACC GCC GCT GAT
ACC GCC GTG TAC TAC TGT GCT AGA GGC GGC ACC TAC TTC GAC TAC TGG GGC CAG GGC
ACC CTC GTG ACC GTG TCA TCT GCT AGC ACC AAG GGC CCC AGC GTG TTC CCT CTG GCC
CCC AGC AGC AAG AGC ACC AGC GGC GGA ACC GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTG AAG GAC
TAC TTC CCC GAG CCC GTG ACC GTG TCC TGG AAC AGC GGC GCT CTG ACC AGC GGA GTG
CAC ACC TTC CCT GCC GTG CTG CAG AGC AGC GGC CTG TAC TCC CTG AGC AGC GTG GTG
ACC GTG CCC AGC AGC AGC CTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAC CAC AAG
CCC TCC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAG GTG GAG CCT AAG AGC TGC GAC AAG ACC CAC
ACC TGC CCT CCC TGC CCC GCC CCC GAG CTG CTG GGC GGA CCC AGC GTG TTC CTG TTC
CCT CCC AAG CCC AAG GAC ACC CTG ATG ATC AGC CGC ACC CCC GAG GTG ACC TGC GTG
GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAG GAC CCC GAG GTG AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC
GTG GAG GTG CAC AAC GCC AAG ACC AAG CCT CGG GAG GAG CAG TAC AAC TCC ACC TAC
CGC GTG GTG AGC GTG CTG ACC GTG CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC
AAG TGC AAG GTG AGC AAC AAG GCC CTG CCC GCT CCC ATC GAG AAG ACC ATC AGC AAG
GCC AAG GGC CAG CCC CGG GAG CCT CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCC AGC CGC GAC GAG
CTG ACC AAG AAC CAG GTG AGC CTG ACC TGC CTG GTG AAG GGC TTC TAC CCC TCC GAC
ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAC GGC CAG CCT GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACC CCT
CCC GTG CTG GAC AGC GAC GGC AGC TTC TTC CTG TAC AGC AAG CTG ACC GTG GAC AAG
TCC CGG TGG CAG CAG GGC AAC GTG TTC AGC TGC AGC GTG ATG CAC GAG GCC CTG CAC
AAC CAC TAC ACC CAG AAG AGC CTG AGC CTG AGC CCC GGA TAG TAA
```

SEQ ID NO: 20 LC3 的编码序列

ATG GAG ACC GAC ACC CTG CTG CTC TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTG CCC GGC TCC ACC
GGA GAC GTC GTG ATG ACC CAG TCC CCC TCC ACA CTG TCT GCC TCT GTG GGC GAC AGA
GTG ACC ATC ACC TGT CGG GCC TCC GCC CAC ATC AAC AAC TGG CTG GCC TGG TAT CAG
CAG AAG CCC GGC AAG GCC CCT AAG CTG CTG ATC TCT GAT GCC ACC TCC CTG GAA TCC
GGC GTG CCC TCC AGA TTC TCC GGC TCT GGC TCT GGC AAG GAG TAT ACC CTG ACC ATC
AGC TCC CTG CAG CCC GAT GAC TTC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAC TAC TGG TCC ACC
CCC TGG ACC TTT GGC CAA GGC ACC AAG GTG GAA ATC AAG CGG ACC GTG GCC GCC CCC
AGC GTG TTC ATC TTC CCT CCC AGC GAC GAG CAG CTG AAG TCT GGC ACC GCC AGC GTG
GTG TGC CTG CTG AAC AAC TTC TAC CCC CGC GAG GCC AAG GTG CAG TGG AAG GTG GAC
AAC GCC CTG CAG AGC GGC AAC AGC CAG GAG AGC GTG ACC GAG CAG GAC TCC AAG GAC
AGC ACC TAC AGC CTG AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC AAG GCC GAC TAC GAG AAG CAC
AAG GTG TAC GCC TGC GAG GTG ACC CAC CAG GGA CTG TCT AGC CCC GTG ACC AAG AGC
TTC AAC CGG GGC GAG TGC TAA

SEQ ID NO: 21 VH 编码区

GAA GTG CAG CTG CAG GAA TCT GGC CCT GGC CTC GTG AAG CCT TCC CAG ACC CTG TCT
CTG ACC TGC ACC GTG TCC GGC TAC TCC ATC ACC TCC GAC TAC GCC TGG AAC TGG ATC
CGG CAG CCT CCT GGC AAG GGA CTG GAA TGG ATC GGC TAC ATC TCC TAC TCC GGC TCC
ACC AAC TAC AAC CCC AGC CTG AAG TCC AGA GTG ACC ATC TCC CGG GAC ACC TCC AAG
AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG TCC TCC GTG ACC GCC GCT GAT ACC GCC GTG TAC TAC
TGT GCT AGA GGC GGC ACC TAC TTC GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTC GTG ACC GTG
TCA TCT

[0276]

SEQ ID NO: 22 VL 编码区

GAC GTC GTG ATG ACC CAG TCC CCC TCC ACA CTG TCT GCC TCT GTG GGC GAC AGA GTG
ACC ATC ACC TGT CGG GCC TCC GCC CAC ATC AAC AAC TGG CTG GCC TGG TAT CAG CAG
AAG CCC GGC AAG GCC CCT AAG CTG CTG ATC TCT GAT GCC ACC TCC CTG GAA TCC GGC
GTG CCC TCC AGA TTC TCC GGC TCT GGC TCT GGC AAG GAG TAT ACC CTG ACC ATC AGC
TCC CTG CAG CCC GAT GAC TTC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAC TAC TGG TCC ACC CCC
TGG ACC TTT GGC CAA GGC ACC AAG GTG GAA ATC AAG

SEQ ID NO: 23 HC1 的 VH 氨基酸序列

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGYSIT SDYAWNWIHQ PPGKGLEWIG YISYSGSTNY NPSLKSRVTI
SVDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARGG TYFDYWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 24 HC3 的 VH 氨基酸序列

EVQLVESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSIT SDYAWNWIHQ PPGKGLEWIG YISYSGSTNY NPSLKSRVTI
SRDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARGG TYFDYWGQGT TTVTVSS

SEQ ID NO: 25 LC1 的 VL 氨基酸序列

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRAAHIN NWLAWYQQKP GKAPKLLSD ATSLESQVPS RFGSGSGSTD
YTLTISSLQP EDFATYYCQH YWSTPWTFTGG GTKVEIK

SEQ ID NO: 26 LC2 的 VL 氨基酸序列

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRAAHIN NWLAWYQQKP GKAPKLLLSLSD ATSLESGVPS RFSGSGSGKD
YTLTISSLQP EDFATYYCQH YWSTPWTFGG GTKVEIK

SEQ ID NO: 27 可溶性 MICA

EPHSLRYNLT VLSWDGVSQS GFLAEVHLDG QPFLRCDRQK CRAKPQGQWA EDVLGNKTWD RETRDLTGNG
KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFLSQ NLETEEWTMP QSSRAQTLAM
NIRNFLKEDA MKTKTHYHAM HADCLQELRR YLKSGVVLRR TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW
NITLSWRQDG VLSLSDTQQW GDVLPDNGT YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS

SEQ ID NO:28 可溶性 MICB

EPHSLRYNLM VLSQDGSVSQS GFLAEGHLDG QPFLRYDRQK RRAKPQGQWA EDVLGAKTWD TETEDLTENG
QDLRRTLTHI KDQKGGLHSL QEIRVCEIHE DSSTRGSRHF YYDGELFLSQ NLETQESTVP QSSRAQTLAM
NVTNFWKEDA MKTKTHYRAM QADCLQKLQR YLKSGVAIRR TVPPMVNVTC SEVSEGNITV TCRASSFYPR
NITLTWRQDG VLSLHNTQQW GDVLPDNGT YQTWVATRIR QGEEQRFTCY MEHSGNHGTH PVPS

SEQ ID NO:29 IGHV4-59*11 (MK471385)

QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSIS SHYWSWIRQP PGKGLEWIGY IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS
VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCAR

[0277]

SEQ ID NO:30 IGHJ4*01

YFDYWGQGTL VTVSS

SEQ ID NO:31 IGHV4-30-4*01 (Z14238)

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGGSIS SGDIYWSWIR QPPGKLEWI GYIYYSGSTYY NPSLKSRVTI
VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCAR

SEQ ID NO:32 IGKV1-NL1-4*01 (Y14865)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NSLAWYQQKP GKAPKLLLYA ASRLESGVPS RFSGSGSGTD
YTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTP

SEQ ID NO:33 IGKJ1*01 (J00242)

WTFGQGTKVE IK

SEQ ID NO:34 IGKV1-33*01 (M64856)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLETGVPS RFSGSGSGTD
FTFTISSLPQ EDIATYYCQQ YDNLP

SEQ ID NO:35 IGKV1-5*01 (Z00001)

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCRASQDIS SWLAWYQQKP GKAPKLLIYD ASSLESGVPS RFSGSGSGTE
FTLTISSLPQ DDFATYYCQQ YNSYS

[0278] SEQ ID NO:36 B10G5 VH

EVQLEESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT SDYAWNWIQK FPGNKLEWMG YISYSGSTNY NPSLKSRI
TRDTSKNQFF LQLNSVITED TATYYCARGG TYFDYWGQGT TLTVSS

SEQ ID NO:37 B10G5 VL

DIVLTQTTSY LSVSLGGRVT IACKASAHIN NWLAWYQQKP GNAPRLISD ATSLETGVPS RFSGSGSGKD
YTLSITSLQT EDVATYYCQH YWSTPWTFGG GTKLEIK

序列表

<110> 康愈有限责任公司

<120> MIC抗体和结合剂及其使用方法

<130> 01301-0001-00PCT

<150> US 63/049,012

<151> 2020-07-07

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> HC2的VH氨基酸序列

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Gly Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> LC3的VL氨基酸序列

<400> 2

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ala His Ile Asn Asn Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Asp Ala Thr Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Lys Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Trp Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> VH-IgG1氨基酸序列

<400> 3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170					175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				180					185					190	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
				195			200					205			
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
						215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
225					230					235					240
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				245					250					255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
				260					265					270	
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
				275			280					285			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
						295					300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
305					310					315					320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325					330					335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
				340					345					350	
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
				355				360					365		
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
				370			375				380				
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
385					390					395					400
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				405					410					415	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				420					425				430		
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly			
				435			440					445			

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> VL-Igκ氨基酸序列

<400> 4

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ala His Ile Asn Asn Trp
           20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Ser Asp Ala Thr Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Lys Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Trp Ser Thr Pro Trp
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
           100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
           115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
           130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
           165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
           180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
           195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           210

```

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 信号序列

<400> 5

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser
1 5 10 15
Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly
20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 信号序列

<400> 6

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly
20

<210> 7

<211> 469

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 具有信号序列的VH-IgG1氨基酸序列

<400> 7

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser
1 5 10 15
Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
20 25 30
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
35 40 45
Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln
50 55 60
Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly
65 70 75 80
Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg
85 90 95
Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
100 105 110
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Thr Tyr Phe Asp

115	120	125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
130	135	140
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
145	150	155
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
165	170	175
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
180	185	190
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
195	200	205
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
210	215	220
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
225	230	235
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
245	250	255
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
260	265	270
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
275	280	285
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
290	295	300
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
305	310	315
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
325	330	335
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
340	345	350
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
355	360	365
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
370	375	380
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
385	390	395
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
405	410	415
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
420	425	430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly
 465
 <210> 8
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 具有信号序列的VL-Igκ氨基酸序列
 <400> 8
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ala His
 35 40 45
 Ile Asn Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Ser Asp Ala Thr Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Trp
 100 105 110
 Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 9
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 9
 Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe
 1 5 10 15
 Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
 20 25 30
 Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu
 35 40 45
 Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys
 50 55 60
 Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys
 65 70 75 80
 Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu
 85 90 95
 Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser
 100 105 110
 Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg
 115 120 125
 Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn
 130 135 140
 Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr
 165 170 175
 Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg
 180 185 190
 Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met
 195 200 205
 Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr
 210 215 220
 Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg
 225 230 235 240

Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val		
245	250	255
Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile		
260	265	270
Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly		
275	280	285
Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln		
290	295	300
Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ile		
305	310	315
Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser		
325	330	335
Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His		
340	345	350
Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln		
355	360	365
Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala		
370	375	380
<210> 10		
<211> 383		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 10		
Met Gly Leu Gly Arg Val Leu Leu Phe Leu Ala Val Ala Phe Pro Phe		
1	5	10
Ala Pro Pro Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu		
20	25	30
Met Val Leu Ser Gln Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu		
35	40	45
Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg		
50	55	60
Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asn Val Leu Gly Ala Lys		
65	70	75
Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu		
85	90	95
Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser		
100	105	110
Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg		
115	120	125

Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn		
130	135	140
Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr		
145	150	155
Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr		
	165	170
Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln		
	180	185
Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Ala Ile Arg Arg Thr Val Pro Pro Met		
	195	200
Val Asn Val Thr Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr		
	210	215
Cys Arg Ala Ser Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg		
225	230	235
Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val		
	245	250
Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile		
	260	265
Arg Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly		
	275	280
Asn His Gly Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Ala Leu Val Leu Gln		
	290	295
Ser Gln Arg Thr Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe		
305	310	315
Val Ile Ile Ile Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser		
	325	330
Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His		
	340	345
Pro Val Gly Thr Gly Asp His Arg Asp Ala Ala Gln Leu Gly Phe Gln		
	355	360
Pro Leu Met Ser Ala Thr Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Thr		
	370	375
		380

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> VH CDR1
 <400> 11

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> VH CDR2

<400> 12

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> VH CDR3

<400> 13

Ala Arg Gly Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> VL CDR1

<400> 14

Arg Ala Ser Ala His Ile Asn Asn Trp

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> VL CDR2

<400> 15

Asp Ala Thr Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 16

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> VL CDR3
 <400> 16
 Gln His Tyr Trp Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 17
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成接头
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (25)
 <223> (G4S)_n接头,其中n = 1至5
 <400> 17
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25
 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 六聚组氨酸标签
 <400> 18
 His His His His His His
 1 5
 <210> 19
 <211> 1413
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> HC2的编码序列
 <400> 19

atggacccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag 60
 ctgagctacg gcgaagtga gctgcaggaa tctggccctg gcctcgtgaa gccttcccag 120
 accctgtctc tgacctgcac cgtgtccggc tactccatca cctccgacta cgcctggaac 180
 tggatccggc agcctcctgg caagggactg gaatggatcg gctacatctc ctactccggc 240
 tccaccaact acaaccccag cctgaagtcc agagtgaaca tctcccggga cacctccaag 300
 aaccagttct ccctgaagct gtcctccgtg accgccgctg ataccgccgt gtactactgt 360
 gctagaggcg gcacctactt cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 420
 gctagcacca agggccccag cgtgttccct ctggcccccgc gcagcaagag caccagcggc 480
 ggaaccgccg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 540
 tggaaacagcg gcgctctgac cagcggagtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagagcagc 600
 ggctgtact ccctgagcag cgtgggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 660
 tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagcct 720
 aagagctgcg acaagaccca cactgccct ccctgccccg ccccgagct gctgggcgga 780
 cccagcgtgt tcctgttccc tcccagccc aaggacacc tgatgatcag ccgcaccccc 840
 gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgagc cagaggacc ccgaggtgaa gttcaactgg 900
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ctcgggagga gcagtacaac 960
 tccacctacc gcgtgggtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 1020
 gagtacaagt gcaaggtgag caacaaggcc ctgcccgtc ccatcgagaa gaccatcagc 1080
 aaggccaagg gccagccccg ggagcctcag gtgtacacce tgccccccag ccgcgacgag 1140
 ctgaccaaga accaggtgag cctgacctgc ctgggtgaagg gcttctaccc ctccgacatc 1200
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260
 ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtcccgtgg 1320
 cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccaactacacc 1380
 cagaagagcc tgagcctgag ccccgatag taa 1413

<210> 20

<211> 705

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> LC3的编码序列

<400> 20

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct ggggtgcccg ctccaccgga 60
 gacgtcgtga tgaccagtc cccctccaca ctgtctgctt ctgtgggcga cagagtgacc 120
 atcacctgtc gggcctccgc ccacatcaac aactggtgg cctggtatca gcagaagccc 180
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctctgat gccacctccc tggaatccgg cgtgccctcc 240
 agattctccg gctctggctc tggcaaggag tataacctga ccatcagctc cctgcagccc 300
 gatgacttcg ccacctacta ctgccagcac tactggtcca cccctggac ctttgccaa 360
 ggcaccaagg tggaaatcaa gcggaccgtg gccgccccca gcgtgttcat cttccctccc 420
 agcgacgagc agctgaagtc tggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caattctac 480

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 540
 gagagcgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggga 660
 ctgtctagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gctaa 705

<210> 21

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> VH编码区

<400> 21

gaagtgcagc tgcaggaatc tggccctggc ctctgaagc cttcccagac cctgtctctg 60
 acctgcaccg tgtccggcta ctccatcacc tccgactacg cctggaactg gatccggcag 120
 cctcctggca agggactgga atggatcggc tacatctcct actccggctc caccaactac 180
 aacccagcc tgaagtccag agtgaccatc tcccgggaca cctccaagaa ccagttctcc 240
 ctgaagctgt cctccgtgac cgccgtgat accgccgtgt actactgtgc tagaggcggc 300
 acctacttcg actactgggg ccagggcacc ctctgaccg tgtcatct 348

<210> 22

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> VL编码区

<400> 22

gacgtcgtga tgaccagtc cccctccaca ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60
 atcacctgtc gggcctccgc ccacatcaac aactggctgg cctggtatca gcagaagccc 120
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctctgat gccacctccc tggaatccgg cgtgccctcc 180
 agattctccg gctctggctc tggcaaggag tataacctga ccatcagctc cctgcagccc 240
 gatgacttcg ccacctacta ctgccagcac tactggtcca cccctggac ctttgccaa 300
 ggcaccaagg tggaaatcaa g 321

<210> 23

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> HC1的VH氨基酸序列

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> HC3的VH氨基酸序列

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> LC1的VL氨基酸序列

<400> 25

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ala	His	Ile	Asn	Asn	Trp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Leu
			35				40					45			
Ser	Asp	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Trp	Ser	Thr	Pro	Trp
				85						90				95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
				100						105					

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> LC2的VL氨基酸序列

<400> 26

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ala	His	Ile	Asn	Asn	Trp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Leu
			35				40					45			
Ser	Asp	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Trp	Ser	Thr	Pro	Trp
				85						90				95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					

100	105
<210> 27	
<211> 274	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 27	
Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly	
1 5 10 15	
Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Val His Leu Asp Gly Gln Pro	
20 25 30	
Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln	
35 40 45	
Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg	
50 55 60	
Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu Arg Met Thr Leu Ala His Ile	
65 70 75 80	
Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys	
85 90 95	
Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr	
100 105 110	
Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Glu Glu Trp Thr	
115 120 125	
Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Ile Arg Asn	
130 135 140	
Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr His Ala Met	
145 150 155 160	
His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val	
165 170 175	
Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Arg Ser Glu	
180 185 190	
Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr	
195 200 205	
Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser	
210 215 220	
His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr	
225 230 235 240	
Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg	
245 250 255	
Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Ser Thr His Pro Val	

260	265	270
Pro Ser		
<210> 28		
<211> 274		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 28		
Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Gly		
1 5 10 15		
Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro		
20 25 30		
Phe Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln		
35 40 45		
Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu		
50 55 60		
Asp Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile		
65 70 75 80		
Lys Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys		
85 90 95		
Glu Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr		
100 105 110		
Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr		
115 120 125		
Val Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn		
130 135 140		
Phe Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met		
145 150 155 160		
Gln Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val		
165 170 175		
Ala Ile Arg Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Cys Ser Glu		
180 185 190		
Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Ser Phe Tyr		
195 200 205		
Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser		
210 215 220		
His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr		
225 230 235 240		
Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu Glu Gln Arg		
245 250 255		

Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr His Pro Val
 260 265 270

Pro Ser

<210> 29

<211> 97

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 29

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser His
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 30

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 31

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 32

<211> 95

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 33

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 34

<211> 95

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

	20		25		30										
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35						40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65						70				75					80
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asp	Asn	Leu	Pro	
				85					90					95	

<210> 35

<211> 95

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 35

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Trp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35						40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65						70				75					80
Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Ser	
				85					90					95	

<210> 36

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> B10G5 VH

<400> 36

Glu	Val	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp
			20					25					30		
Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp
	35						40						45		

Met	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
50							55					60			
Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe
65					70					75					80
Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Ile	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Thr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu
			100						105					110	
Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> B10G5 VL

<400> 37

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Val	Ser	Leu	Gly
1			5						10					15	
Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ala	Cys	Lys	Ala	Ser	Ala	His	Ile	Asn	Asn	Trp
			20						25					30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Asn	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35						40					45	
Ser	Asp	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50						55					60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr
65					70					75					80
Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Trp	Ser	Thr	Pro	Trp
					85					90					95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100						105						

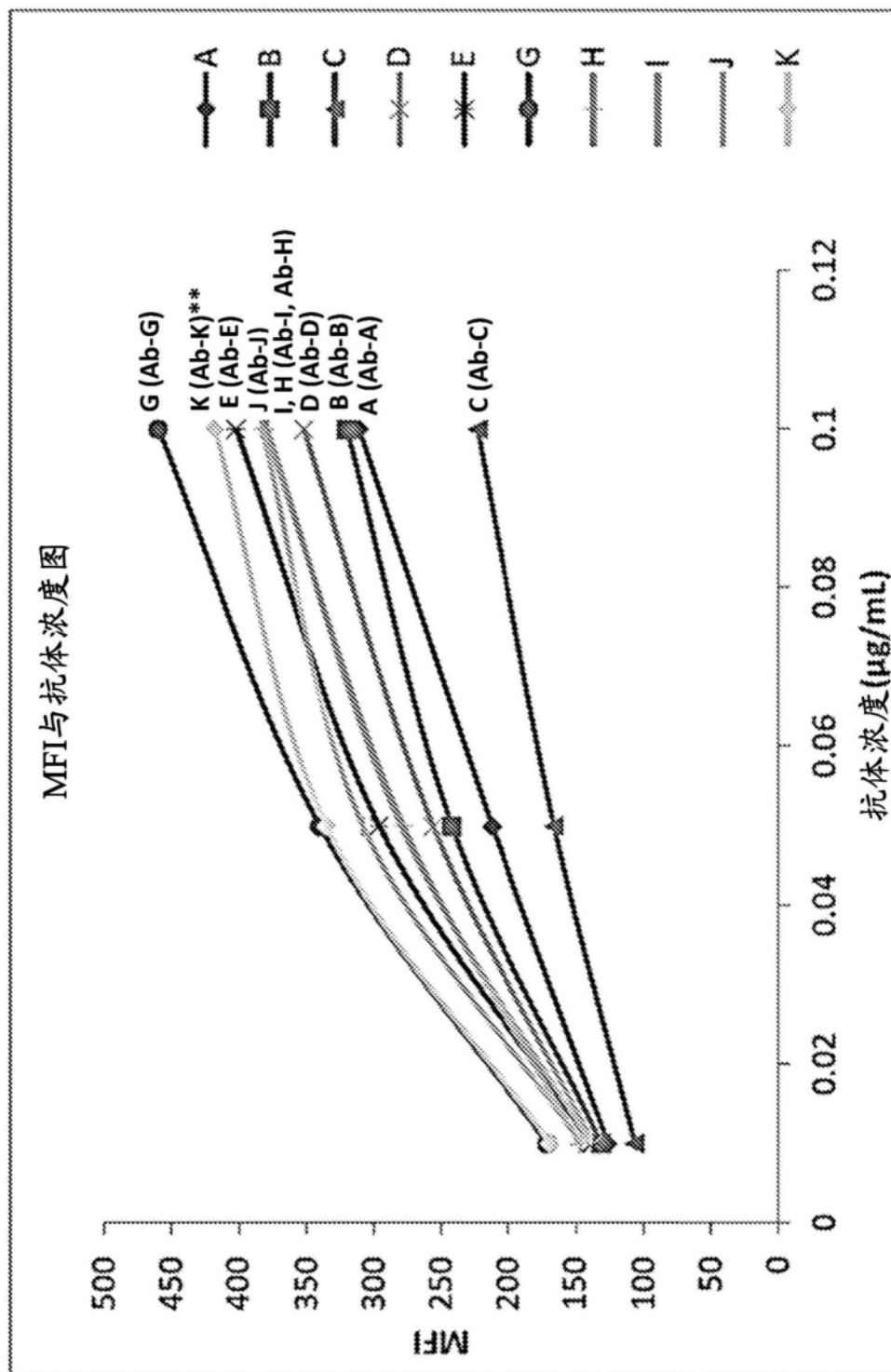


图1

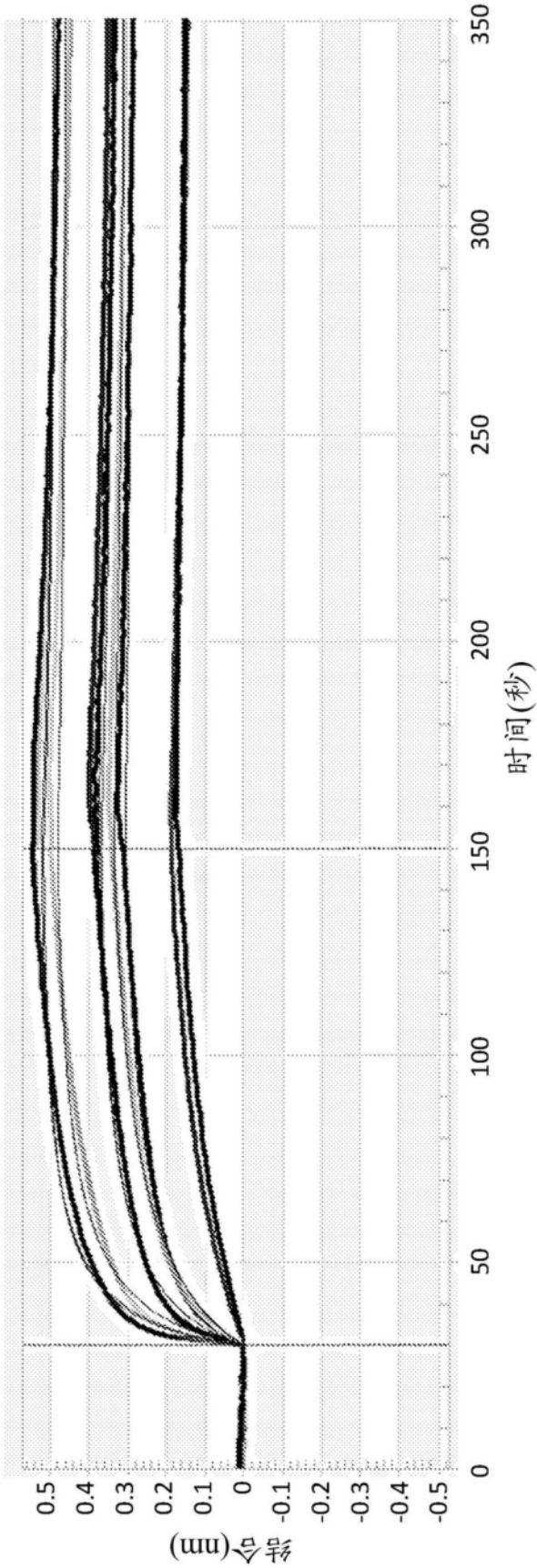


图2A

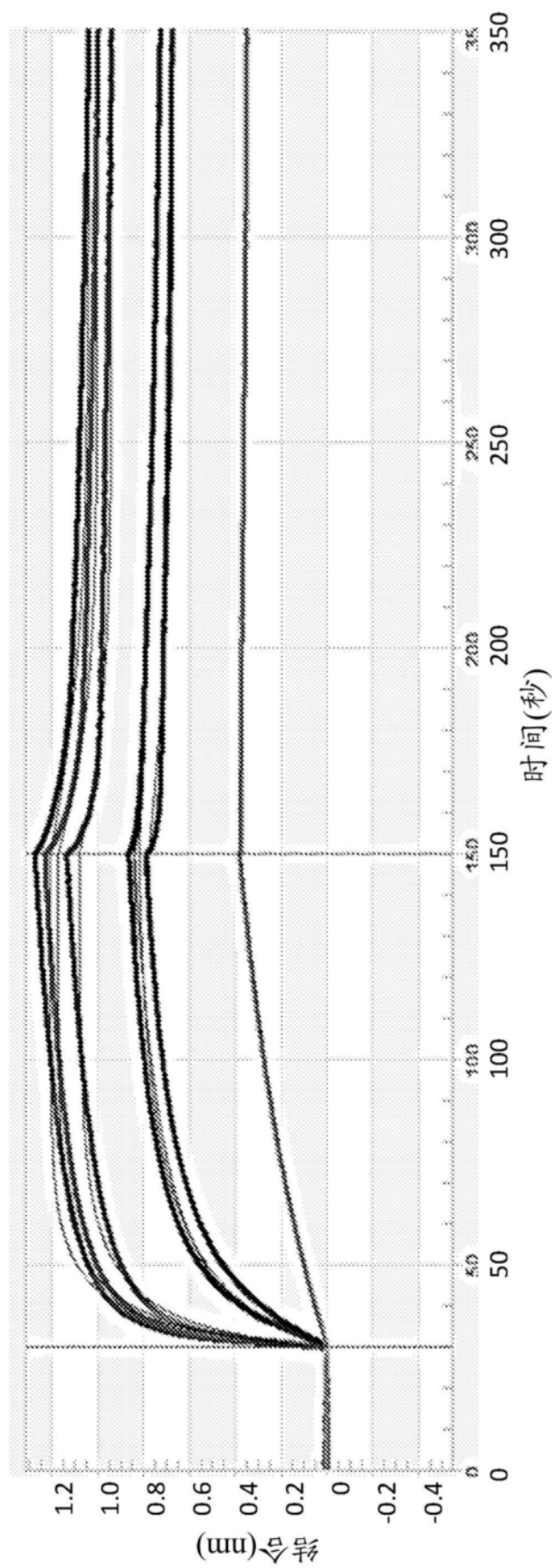


图2B

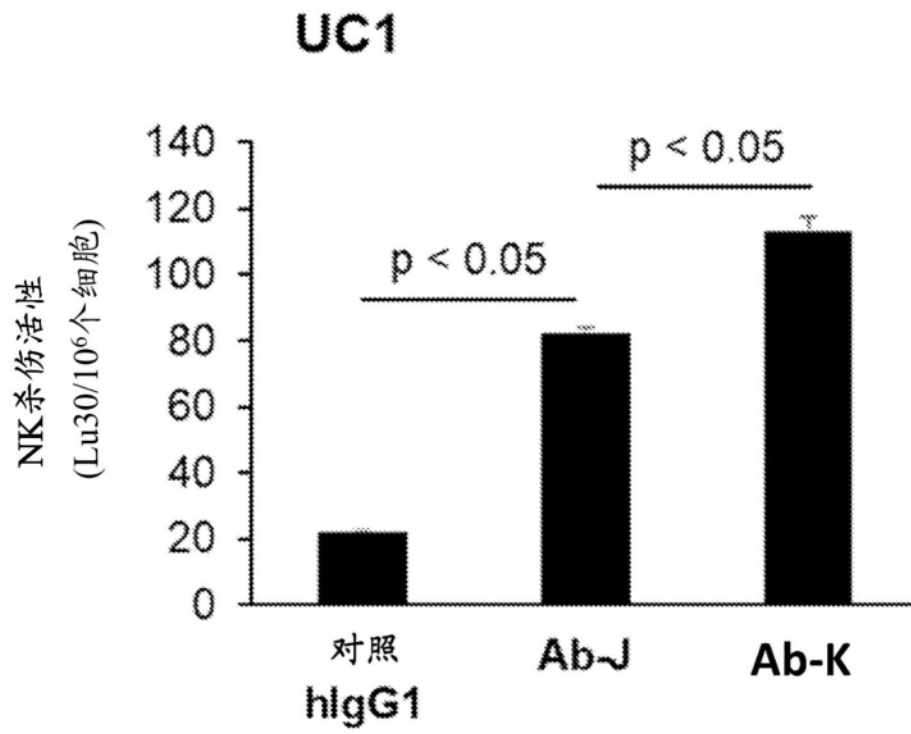


图3A

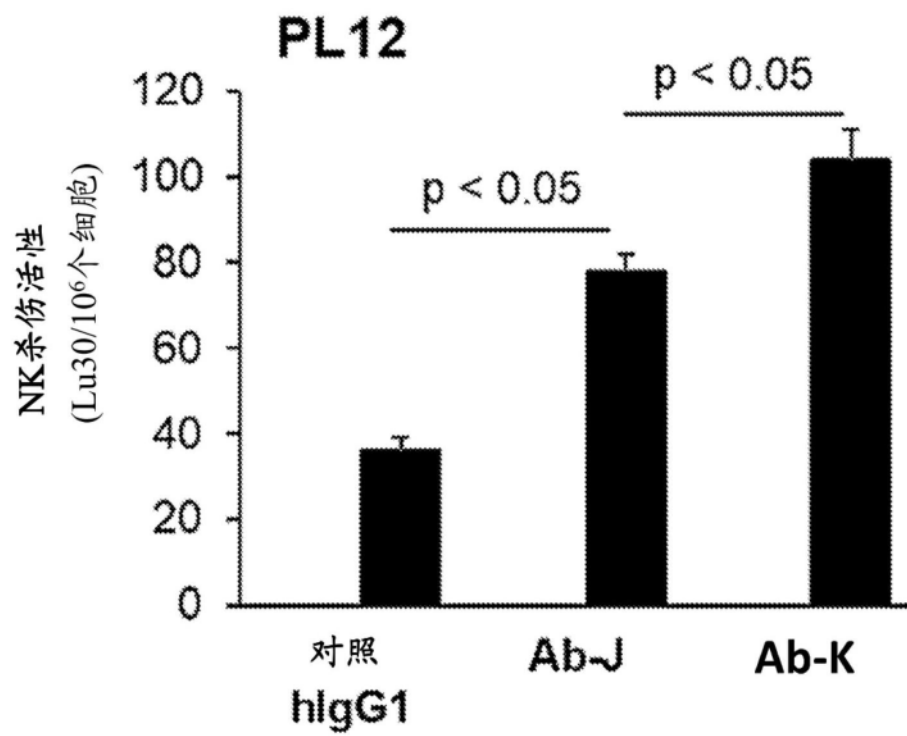


图3B

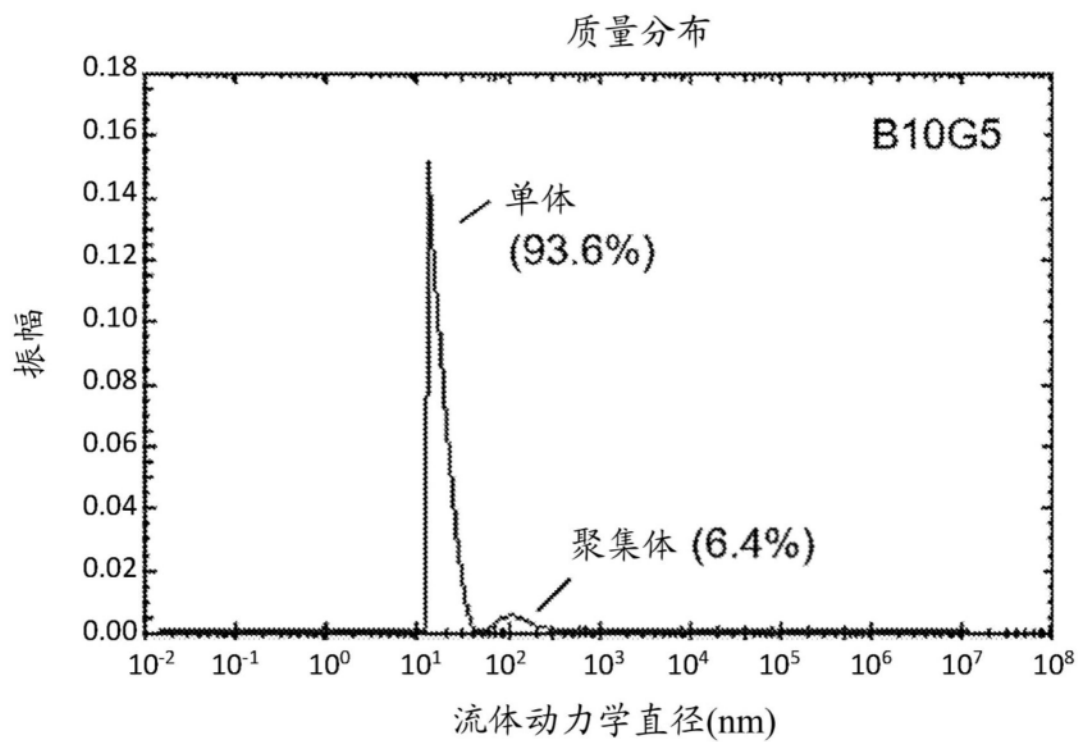


图4A

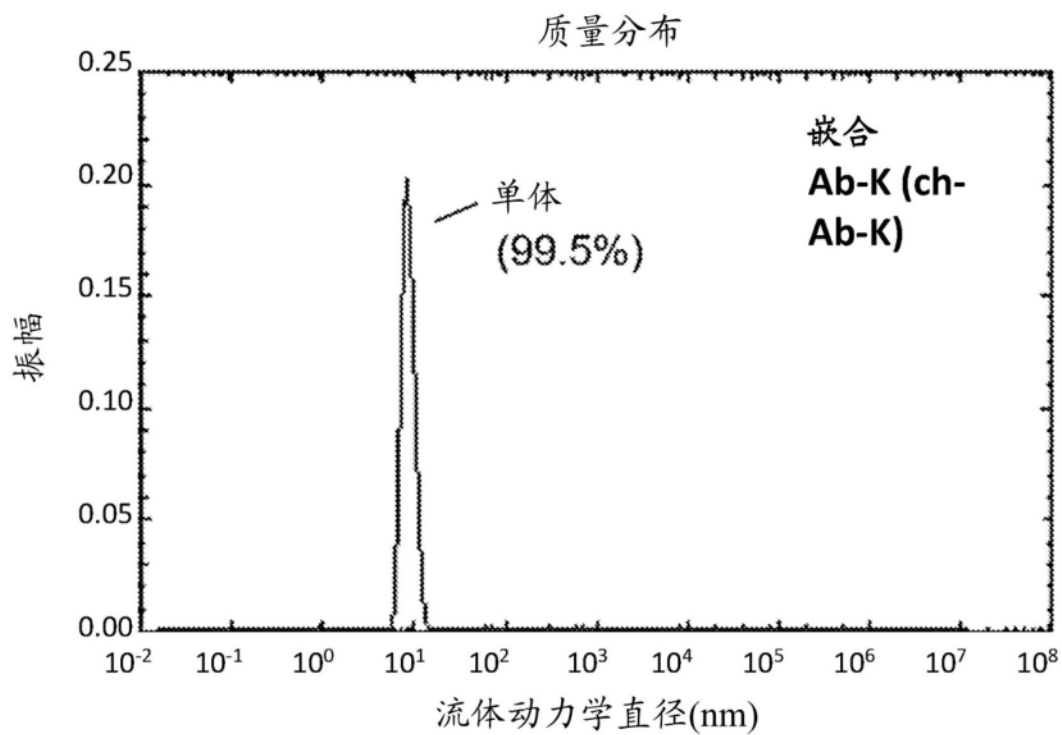


图4B

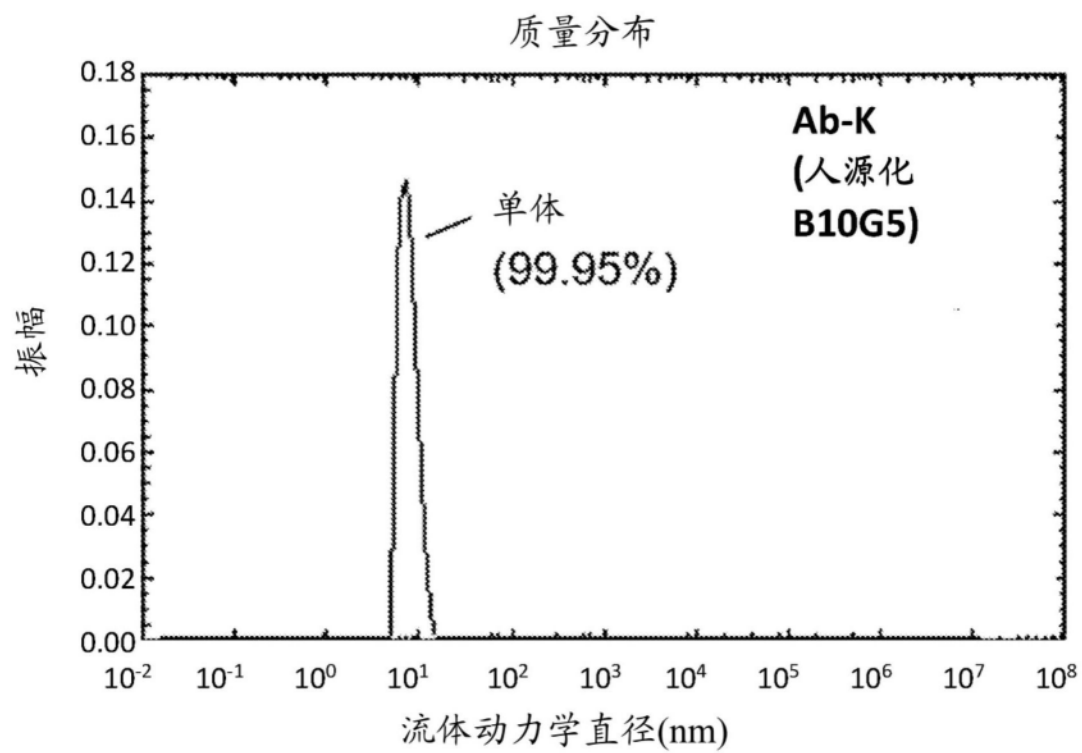


图4C