Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE P/

INVENCI(

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-085781- -00000-0000
Fecha: 2014-04-22 16:54:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 56

TITULO: PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS

SOLICITANTE: DANA – FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

DIRECCIÓN: 44 Binney Street Boston MA 02115, Estados Unidos de América

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 22 de abril de 2014

P2014/000050

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & AS(

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-085781- -00000-0000
Fecha: 2014-04-22 16:54:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

1
2

PETITORIO - FORMULARIO
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2014/000050**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
Dirección: 44 Binney Street Boston MA 02115
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/057839 Fecha Septiembre 28, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/049517 Fecha Abril 04, 2013

(6) **Título (54)** **PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

Prioridad **SI** [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Septiembre 30, 2011	61/541,921

(9) **Comprobante de pago No.** 14- **Fecha** _____

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/057839

Kai W. WUCHERPFENNIG
67 Highland Road Brookline,
Massachusetts 02445
Estados Unidos de America

Bettina FRANZ
80 Pleasant Street
#32 Brookline,
Massachusetts 02446
Estados Unidos de America

Jr., Kenneth MAY
106 Village Downtown
Blvd Bozeman,
Montana 59715
Estados Unidos de América

Glenn DRANOFF
28 Outlook Drive Lexington,
Massachusetts 02421
Estados Unidos de América

F. Stephen HODI
15Vaillencourt Drive
Framingham,
Massachusetts 02115
Estados Unidos de América

Christopher HARVEY
450 Brookline Avenue Boston,
Massachusetts 02215
Estados Unidos de América

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0041765

Bogotá D.C., Abril 21 de 2014 - 14:02:17

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	609953610	16/04/2014	9.497.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	515.000.00	515.000.00
				$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-085781- -00000-0000
Fecha: 2014-04-22 16:54:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5 6

5

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: 2014 / 04 / 22 (AAAA / MM / DD)	Recorrido:
2020		4

Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-85781	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	***Soporte Documental***
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 7 ARCHIVOS:

7 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS.

EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO (5)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

ADMISI(

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-085781- -00000-0000

Fecha: 2014-04-22 16:54:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5 6

6

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ Art 30 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2014/000050**

SOLICITUD DE:

1

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.**
Dirección: 44 Binney Street Boston MA 02115
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/057839 Fecha Septiembre 28, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/049517 Fecha Abril 04, 2013

6

Título (54) **PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

Prioridad

SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Septiembre 30, 2011	61/541,921

9

Comprobante de pago No. 14- **Fecha** _____

ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [x] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA: _____

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/057839

Kai W. WUCHERPFENNIG
67 Highland Road Brookline,
Massachusetts 02445
Estados Unidos de America

Bettina FRANZ
80 Pleasant Street
#32 Brookline,
Massachusetts 02446
Estados Unidos de America

Jr., Kenneth MAY
106 Village Downtown
Blvd Bozeman,
Montana 59715
Estados Unidos de América

Glenn DRANOFF
28 Outlook Drive Lexington,
Massachusetts 02421
Estados Unidos de América

F. Stephen HODI
15Vaillencourt Drive
Framingham,
Massachusetts 02115
Estados Unidos de América

Christopher HARVEY
450 Brookline Avenue Boston,
Massachusetts 02215
Estados Unidos de América

Attorney Docket No.: 00530-0521P01

ASSIGNMENT

For valuable consideration, we, Kai W. Wucherpfennig, of Brookline, MA; Bettina Franz, of Brookline, MA; Kenneth F. May, Jr., of Brookline, MA; Glenn Dranoff, Lexington, MA, and Stephen Hodi, Framingham, MA; hereby assign to DANA FARBER CANCER INSTITUTE, INC., a corporation of Massachusetts, having a place of business at 44 Binney Street, Boston, MA 02115, and its successors and assigns (collectively hereinafter called "the Assignee"), the entire right, title and interest throughout the world in the inventions and improvements which are subject of an application for United States Patent signed by us, entitled THERAPEUTIC PEPTIDES, filed September 30, 2011, and assigned U.S. Serial Number 61/541,921, this assignment including said application, any and all United States and foreign patents, utility models, and design registrations granted for any of said inventions or improvements, and the right to claim priority based on the filing date of said application under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the Patent Cooperation Treaty, the European Patent Convention, and all other treaties of like purposes; and we authorize the Assignee to apply in all countries in our name or in its own name for patents, utility models, design registrations and like rights of exclusion and for inventors' certificates for said inventions and improvements; and we agree for ourselves and our respective heirs, legal representatives and assigns, without further compensation to perform such lawful acts and to sign such further applications, assignments, Preliminary Statements and other lawful documents as the Assignee may reasonably request to effectuate fully this assignment.

Attorney Docket No.: 00530-0521P01

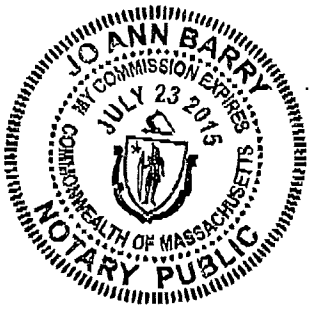
DATE: 11/4/11

KAI W. WUCHERPFENNIG

STATE OF MA)
) SS.
COUNTY OF Suffolk)

On 11-04-11, before me, the undersigned, a notary public for the State of Massachusetts, there personally appeared KAI W. WUCHERPFENNIG personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his or her authorized capacity and that by his or her signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he or she acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.



Notary Public

Attorney Docket No.: 00530-0521P01

DATE: 11-7-11

BETTINA FRANZ

STATE OF MA)
) SS.
COUNTY OF Suffolk)

On 11-7-11, before me, the undersigned, a notary public for the State of Massachusetts, there personally appeared BETTINA FRANZ personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his or her authorized capacity and that by his or her signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he or she acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.

JO ANN BARRY
MY COMMISSION EXPIRES
JULY 23 2015
COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS
NOTARY PUBLIC

Notary Public

DATE: 11/2/11

KENNETH F. MAY, JR.

STATE OF MA)
) SS.
COUNTY OF Suffolk)

On 11-2-11, before me, the undersigned, a notary public for the State of Massachusetts, there personally appeared KENNETH F. MAY, JR. personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his or her authorized capacity and that by his or her signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he or she acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.

JO ANN BARRY
NOTARY PUBLIC
COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS
MY COMMISSION EXPIRES JULY 23 2015

Notary Public

DATE: 10/26/11

GLENN DRANOFF

STATE OF MA)
) SS.
COUNTY OF Suffolk)

On 10-26-11, before me, the undersigned, a notary public for the State of Massachusetts, there personally appeared GLENN DRANOFF personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his or her authorized capacity and that by his or her signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he or she acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.

Notary Public

JO ANN BARRY
MY COMMISSION EXPIRES
JULY 23 2015
COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS
NOTARY PUBLIC

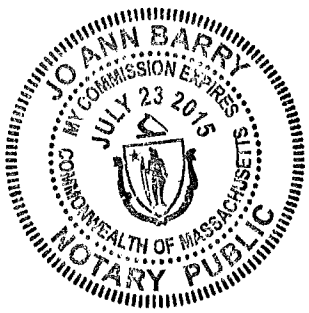
DATE: 11-17-11

STEPHEN HODI

STATE OF MA)
) SS.
COUNTY OF Suffolk)

On 11-17-11, before me, the undersigned, a notary public for the State of Massachusetts, there personally appeared STEPHEN HODI personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his or her authorized capacity and that by his or her signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he or she acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.



Notary Public

22715633.doc

ASSIGNMENT

For valuable consideration, we, Kai W. Wucherpfennig, of 67 Highland Road, Brookline, MA 02445; Bettina Franz, of 9 Sherman House, Rustat Avenue, CB1 3RF Cambridge, United Kingdom; Kenneth F. May, Jr., of 106 Village Downtown Blvd., Bozeman, MT 59715; Glenn Dranoff, of 150 Concord Road, Sudbury, MA 01776; F. Stephen Hodi, of 15 Vaillencourt Drive, Framingham, MA 02115; and Christopher Harvey, of 8 Conway Street; Boston, MA 02131; hereby assign to DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC., a corporation of Massachusetts, having a place of business at 450 Brookline Avenue, Boston, MA 02215-5450, and its successors and assigns (collectively hereinafter called "the Assignee"), the entire right, title and interest throughout the world in the inventions and improvements which are subject of an application for United States Patent signed by us, entitled THERAPEUTIC PEPTIDES, filed September 12, 2013, and assigned U.S. Serial Number 14/025,573, and we authorize and request the attorneys appointed in said application to hereafter complete this assignment by inserting above the filing date and serial number of said application when known this assignment including said application, any and all United States and foreign patents, utility models, and design registrations granted for any of said inventions or improvements, and the right to claim priority based on the filing date of said application under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the Patent Cooperation Treaty, the European Patent Convention, and all other treaties of like purposes; and we authorize the Assignee to apply in all countries in our name or in its own name for patents, utility models, design registrations and like rights of exclusion and for inventors' certificates for said inventions and improvements; and we agree for ourselves and our respective heirs, legal representatives and assigns, without further compensation to perform such lawful acts and to sign such further applications, assignments, Preliminary Statements and other lawful documents as the Assignee may reasonably request to effectuate fully this assignment.

DATE: 8/30/13

KAI W. WUCHERPFENNIG

STATE OF MA)
) SS.
COUNTY OF Suffolk)

On Kai Wucherpfennig, before me, the undersigned, a notary public, there personally appeared KAI W. WUCHERPFENNIG personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his authorized capacity and that by his signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.

Notary Public

VERONIQUE A. CORRDIN
Notary Public
COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS
My Commission Expires
May 18, 2018

DATE: 09.12.2013

BETTINA FRANZ

WITNESS:

LUKE BAYLISS

Name:

09.12.2013

Date

WITNESS:

ROCCO SCIARRILLO

Name:

09.12.2013

Date

DATE: 8/26/13

KENNETH F. MAY, JR.

STATE OF Montana)
) SS.
COUNTY OF Gallatin)

On August 26, 2013, before me, the undersigned, a notary public, there personally appeared KENNETH F. MAY, JR. personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his authorized capacity and that by his signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.

WENDY GWINNER
NOTARY PUBLIC for the
State of Montana
Residing at
Bozeman, Montana
My Commission Expires
July 25, 2017

Notary Public

DATE: 8/27/13

GLENN DRANOFF

STATE OF MA)
) SS.
COUNTY OF Suffolk)

On 8-27-13, before me, the undersigned, a notary public, there personally appeared GLENN DRANOFF personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his authorized capacity and that by his signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.

JO ANN BARRY
MY COMMISSION EXPIRES
JULY 23 2015
COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS
NOTARY PUBLIC

Notary Public

DATE: 9/5/13

F. STEPHEN HODI

STATE OF MASSACHUSETTS)
) SS.
COUNTY OF SUFFOLK)

On September 5th, 2013, before me, the undersigned, a notary public, there personally appeared F. STEPHEN HODI personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his authorized capacity and that by his signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.

MARJORIE MERISIER
Notary Public
COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS
My Commission Expires
January 4, 2019

Notary Public

DATE: 8/29/2013

CHRISTOPHER HARVEY

STATE OF Massachusetts)
) SS.
COUNTY OF Suffolk)

On August 29, 2013, before me, the undersigned, a notary public, there personally appeared CHRISTOPHER HARVEY personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his authorized capacity and that by his signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.

Notary Public

MARJORIE MERISIER
Notary Public
COMMONWEALTH OF MASSACHUSETTS
My Commission Expires
January 4, 2019

30783852.doc

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
4 April 2013 (04.04.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/049517 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/057839

(22) International Filing Date:
28 September 2012 (28.09.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/541,921 30 September 2011 (30.09.2011) US

(71) Applicant: **DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.** [US/US]; 450 Brookline Avenue, Boston, Massachusetts 02215-5450 (US).

(72) Inventors: **WUCHERPFENNIG, Kai W.**; 67 Highland Road, Brookline, Massachusetts 02445 (US). **FRANZ, Bettina**; 80 Pleasant Street, #32, Brookline, Massachusetts 02446 (US). **MAY, Jr., Kenneth**; 106 Village Downtown Blvd, Bozeman, Montana 59715 (US). **DRANOFF, Glenn**; 28 Outlook Drive, Lexington, Massachusetts 02421 (US). **HODI, F. Stephen**; 15 Vaillencourt Drive, Framingham, Massachusetts 02115 (US). **HARVEY, Christopher**; 450 Brookline Avenue, Boston, Massachusetts 02215 (US).

(74) Agents: **MEIKLEJOHN, Anita L.** et al.; Fish & Richardson P.C., P.O. Box 1022, Minneapolis, Minnesota 55440-1022 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: THERAPEUTIC PEPTIDES

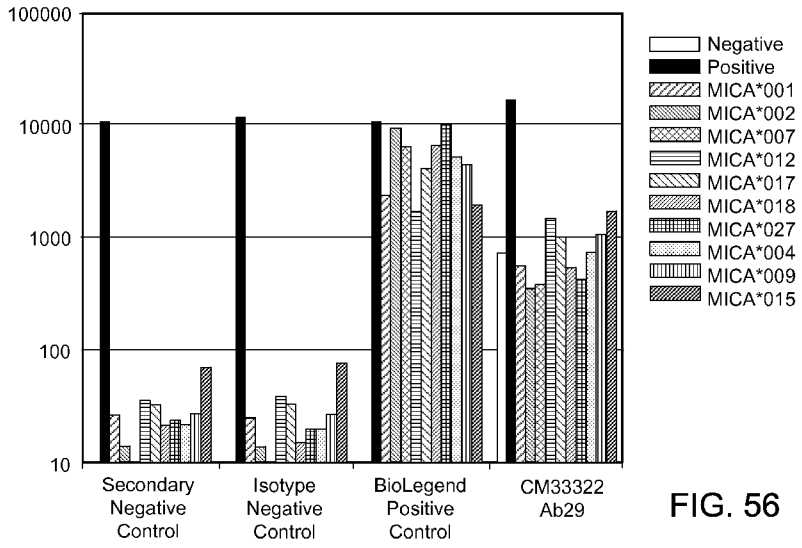


FIG. 56

(57) Abstract: The present disclosure provides, in part, compositions comprising peptides immunospecifically binds to defined binding partners, wherein the peptides comprise at least complementarity determining regions relating to the complementarity regions shown in Table 1.

WO 2013/049517 A2

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

THERAPEUTIC PEPTIDES

CLAIM OF PRIORITY

This application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application Serial No. 61/541,921, filed on September 30, 2011, the entire contents of which are hereby incorporated by reference.

GOVERNMENT SUPPORT

This invention was made with Government support under Grant No. PO1 AI045757, awarded by the National Institutes of Health. The Government has certain rights in the invention.

SEQUENCE LISTING

The instant application contains a Sequence Listing which has been submitted in ASCII format via EFS-Web and is hereby incorporated by reference in its entirety. Said ASCII copy, created on September 27, 2012, is named 53293WO1.txt and is 90,411 bytes in size.

TECHNICAL FIELD

This invention relates to therapeutic compositions (e.g., peptides) related to human subjects.

BACKGROUND

Human subjects exposed to a condition or disease offer a source of antibodies with therapeutic potential and general methods for obtaining such antibodies are known in the art. However, methods for specifically obtaining antibodies with therapeutic potential are generally limited by the low frequency, slow proliferation rate, and low antibody secretion levels of B cells that express such antibodies. For example, memory B cells with defined specificity typically account for only one cell per million peripheral blood mononuclear cells or approximately one milliliter of blood (Lanzavecchia et al., Curr. Opin. Immunol., 21:298-304 (2009): Yoshida et al., Immunol. Rev., 237:117-139 (2010)). The frequency of antibodies with therapeutic potential is likely to be even lower

in cancer patients, necessitating the development of novel approaches that enable isolation of such cells with high sensitivity and efficiency.

Conventional methods generally rely on conversion of memory B cells into antibody secreting cells by in vitro culture and/or use of immunized animal models (e.g., mice) (Crotty et al., J. Immunol., 171:4969-4973 (2003): Fecteau et al., Immunology, 128:e353-e365 (2009): Buisman et al., Vaccine, 28:179-186 (2009): Corti et al., PLoS One, 5:e8805 (2010)). For example, following in vitro culture for up to one week, antibodies can be measured in culture supernatants and frequencies of antibody secreting cells assessing using enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay. Limitations of such methods are reported (Henn et al., J. Immunol., 183:31777-3187 (2009): Cao et al., J. Immunol., Methods, 358:56-65 (2010)). For instances, in vitro culture of memory B cells alters the memory B cell phenotype to resemble plasma cells with distinct functional properties (Jiang et al., Eur. J. Immunol., 37:2205-2213 (2007): Huggins et al., Blood, 109:1611-1619 (2007): Jourdan et al., Blood, 114:5173-5181 (2009)). Limitations for fluorescent antigen-based methods are also reported (Hofer et al., Immunol. Rev., 211:295-302 (2006): Odendahl et al., Blood, 105:1614-1621 (2005); Kunkel et al., Nat. Rev. Immunol., 3:822-829 (2003): Scheid et al., Nature, 458:636-640 (2009): Wu et al., Science, 329:856-861 (2010)).

Improved methods for specifically obtaining or targeting antibodies with therapeutic potential are required.

MICA is a ligand for NKG2D, a C-type lectin-like, type II transmembrane receptor expressed on most human NK cells, γδ T cells, and CD8+ T cells. Upon ligation, NKG2D signals through the adaptor protein DAP10 to evoke perforin dependent cytolysis and to provide co-stimulation. In humans, the NKG2D ligands include MHC class I chain-related protein A (MICA), the closely related MICB, UL-16 binding proteins (ULBP) 1-4, and RAE-1G. While NKG2D ligands are not usually found on healthy tissues, various forms of cellular stress, including DNA damage, may upregulate ligand expression, resulting in their frequent detection in multiple solid and hematologic malignancies, including melanoma. NKG2D activation through ligand positive transformed cells contributes to extrinsic tumor suppression, since NKG2D deficient and

wild type mice treated with anti-NKG2D blocking antibodies manifest enhanced tumor susceptibility. Immune escape may be achieved in patients, however, by the shedding of NKG2D ligands from tumor cells, which triggers internalization of surface NKG2D and impaired function of cytotoxic lymphocytes. Soluble NKG2D ligands may also stimulate the expansion of regulatory NKG2D+CD4+Foxp3- T cells that may antagonize anti-tumor cytotoxicity through Fas ligand, IL-10, and TGF-β. MICA is a NKG2D ligand shed from tumor cells, i.e., released from the cell surface into the surrounding medium, and sera from cancer patients typically contain elevated levels of the soluble form (sMICA). MICA shedding is accomplished in part through interactions with the protein disulfide isomerase ERp5, which forms a disulfide bond with a critical cysteine that results in unfolding of the α3 domain, rendering it susceptible to proteolysis by ADAM-10/17 and MMP14.

Angiogenesis is the process of forming new capillaries from preexisting blood vessels and has been implicated as a critical part of tumor growth and dissemination. Tumors stimulate angiogenesis to meet increasing oxygen and nutrient requirements that exceed those that can be met by diffusion alone. Consequently, tumors recruit, remodel and expand existing vascular to meet their metabolic demand. The dependence of growing tumors on new blood vessel formation has made angiogenesis an appealing target for anti-cancer therapies. Many cytokines have been are believed to play a role in the regulation of angiogenesis, including vascular endothelial growth factor (VEGF) family members and the angiopoietins. The angiopioetins were discovered as ligands for the Ties, a family of tyrosine kinases that is selectively expressed in the vascular endothelium. There are four know angiopoietins: angiopoietin-1 ("Ang-1") through angiopoietin-4 ("Ang-4"). Studies have suggested that angiopoietins (e.g., Ang-1 and Ang-2) may be involved and tumor angiogenesis. With this information, angiopoietins have been identified as potential targets of immune-based cancer therapy.

There is a need to identify new agents that specifically recognize and bind targets of immune-based cancer therapy, such as MICA and angiopoietins. Such agents would be useful for diagnostic screening and therapeutic intervention in disease states that are associated with tumor development.

SUMMARY

The present disclosure provides compositions and methods related to antibodies with therapeutic potential.

In some embodiments, the disclosure provides compositions comprising peptides that immunospecifically bind to MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA), or an epitope thereon. In some aspects, peptides of the compositions include complementarity determining region (CDR) 3 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and CDR3 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions. In some aspects, such peptides include complementarity determining region (CDR) 3 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, and CDR3 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1. In some aspects, peptides further include CDR2 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or CDR2 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or both. In some aspects, such peptides include complementarity determining region CDR2 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, or CDR2 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, or both. In some aspects, peptides further include CDR1 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or CDR1 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or both. In some aspects, such peptides include complementarity determining region CDR1 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, or CDR1 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, or both.

In some aspects, peptides are antibody or antibody fragment that include: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:2, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 1 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and regions within SEQ ID NO:2 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3,

FR4 of the V_H of antibody ID 1 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:11, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 1 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and regions within SEQ ID NO:11 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 1 shown in table 1. In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:2 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:11. In some aspects, in addition the peptides, compositions further include one or more (e.g., 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or less than 20) anti-cancer therapeutics. In some aspects, compositions are formulated as pharmaceutical compositions (e.g., for administration to a subject).

In some aspects, peptides are antibody or antibody fragment that include: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:149, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 6 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:149 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 6 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:151, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 6 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:151 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 6 shown in table 1. In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:149 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:151. In some aspects, in addition the peptides, compositions further include one or more (e.g., 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or less than 20) anti-cancer

therapeutics. In some aspects, compositions are formulated as pharmaceutical compositions (e.g., for administration to a subject).

In some aspects, peptides are antibody or antibody fragment that include: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:168, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 7 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:168 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 7 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:170, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 7 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:170 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 7 shown in table 1. In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:168 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:170. In some aspects, in addition the peptides, compositions further include one or more (e.g., 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or less than 20) anti-cancer therapeutics. In some aspects, compositions are formulated as pharmaceutical compositions (e.g., for administration to a subject).

In some aspects, peptides are antibody or antibody fragment that include: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:186, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 8 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:186 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 8 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:188, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 8

shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:188 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 8 shown in table 1. In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:186 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:188. In some aspects, in addition the peptides, compositions further include one or more (e.g., 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or less than 20) anti-cancer therapeutics. In some aspects, compositions are formulated as pharmaceutical compositions (e.g., for administration to a subject).

In some aspects, peptides are antibody or antibody fragment that include: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:204, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 9 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:204 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 9 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:206, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 9 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:206 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 9 shown in table 1. In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:204 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:206. In some aspects, in addition the peptides, compositions further include one or more (e.g., 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or less than 20) anti-cancer therapeutics. In some aspects, compositions are formulated as pharmaceutical compositions (e.g., for administration to a subject).

In some embodiments, the disclosure provides compositions that include one or more peptides that bind to angiopoietin or an epitope thereon. In some aspects, peptides of the compositions include complementarity determining region (CDR) 3 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and CDR3 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions. In some aspects, peptides can include complementarity determining region (CDR) 3 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1, and CDR3 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1. In some aspects, peptides can further include CDR2 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or CDR2 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or both. In some aspects, such peptides can include complementarity determining region CDR2 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1, or CDR2 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1, or both. In some aspects, peptides can further include CDR1 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or CDR1 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4, or 5 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or both. In some aspects, such peptides can include complementarity determining region CDR1 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1, or CDR1 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1, or both.

In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:20, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 2 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:20 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 2 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:29, wherein regions

corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 2 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:29 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 2 shown in table 1. In some aspects, the peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:20 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:29.

In some aspects, the peptides an antibody or antibody fragment comprising: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:38, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 3 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:38 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 3 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:47, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 3 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:47 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 3 shown in table 1. In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:38 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:47.

In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:56, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 4 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:56 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 4 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:65, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 4 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:65 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 4 shown in table 1. In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:56 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:65.

In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:74, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 5 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:74 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 5 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:83, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 5 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:83 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 5 shown in table 1. In some aspects, the peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:74 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:83. In some aspects, the peptides immunospecifically bind to at least angiopoietin-2. In some aspects, the compositions further include one or more anti-cancer therapeutics. In some aspects, the compositions are formulated as a pharmaceutical composition.

In some aspects, peptides include an antibody or antibody fragment comprising: a V_H chain with identity to SEQ ID NO:222, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 10 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:222 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 10 shown in table 1; and a V_L chain with identity to SEQ ID NO:224, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 10 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:224 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 10 shown in table 1. In some aspects, the peptides include an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:222 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:224. In some aspects, the peptides immunospecifically bind to at least angiopoietin-2. In some aspects, the compositions further include one or more anti-cancer therapeutics. In some aspects, the compositions are formulated as a pharmaceutical composition.

In some embodiments, the disclosure includes methods of treating cancer in a subject. In some aspects, methods include administering to a subject a composition of any one of claims 1-27.

The present disclosure also provides provides methods of isolating human antibodies from cancer patients following immunotherapy.

In some embodiments, the disclosure includes method of obtaining immune cells directed against a self antigen from a subject, the method comprising identifying a subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen, providing a multimeric form of the self antigen, contacting the multimeric form of the self antigen with a sample from the subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen, and obtaining immune cells bound to the multimeric form of the self antigen.

In some embodiments, the disclosure includes method of obtaining immune cells from a cancer patient directed against a self antigen, the method comprising identifying a subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen; providing a multimeric form of the self antigen; contacting the multimeric form of the self antigen with a sample from the subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen; and obtaining immune cells bound to the multimeric form of the self antigen.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Methods and materials are described herein for use in the present invention; other, suitable methods and materials known in the art can also be used. The materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting. All publications, patent applications, patents, sequences, database entries, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and figures, and from the claims.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

FIG. 1 | Nucleic acid sequence of the variable heavy (V_H) chain of antibody ID 1 (anti-MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) antibody) (SEQ ID NO:1).

FIG. 2 | Amino acid sequence of V_H chain of antibody ID 1 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:2).

FIG. 3 | Nucleic acid sequence of the variable light (V_L) chain of antibody ID 1 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:10).

FIG. 4 | Amino acid sequence of V_L chain of antibody ID 1 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:11).

FIG. 5 | Nucleic acid sequence of the V_H chain of antibody ID 2 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:19).

FIG. 6 | Amino acid sequence of V_H chain of antibody ID 2 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:20).

FIG. 7 | Nucleic acid sequence of the V_L chain of antibody ID 2 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:28).

FIG. 8 | Amino acid sequence of V_L chain of antibody ID 2 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:29).

FIG. 9 | Nucleic acid sequence of the V_H chain of antibody ID 3 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:37).

FIG. 10 | Amino acid sequence of V_H chain of antibody ID 3 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:38).

FIG. 11 | Nucleic acid sequence of the V_L chain of antibody ID 3 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:46).

FIG. 12 | Amino acid sequence of V_L chain of antibody ID 3 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:47).

FIG. 13 | Nucleic acid sequence of the V_H chain of antibody ID 4 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:55).

FIG. 14 | Amino acid sequence of V_H chain of antibody ID 4 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:56).

FIG. 15 | Nucleic acid sequence of the V_L chain of antibody ID 4 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:64).

FIG. 16 | Amino acid sequence of V_L chain of antibody ID 4 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:65).

FIG. 17 | Nucleic acid sequence of the V_H chain of antibody ID 5 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:73).

FIG. 18 | Amino acid sequence of V_H chain of antibody ID 5 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:74).

FIG. 19 | Nucleic acid sequence of the V_L chain of antibody ID 5 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:82).

FIG. 20 | Amino acid sequence of V_L chain of antibody ID 5 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:83).

FIG. 21A-21F | Illustrates exemplary methods for making antibodies from B-cells. (A) Antigen is expressed with a BirA tag for site-specific biotinylation and

tetramerization with fluorescently-labeled streptavidin. (B) B cells are stained with tetramer and a panel of monoclonal antibodies. Tetramer$^+$, class-switched memory B cells are single-cell sorted into PCR strips. (C) mRNA amplification is performed with T7 RNA polymerase. (D) Sequencing of PCR products is carried out using 300-400bp PCR products. (E) Overlap PCR is used for construction of full-length IgG1 heavy chain and kappa/lambda light sequences which are cloned into separate vectors. Vectors are transiently transfected into CHO-S cells for expression of fully human recombinant antibodies. (F) Antibodies are tested for antigen binding and assessed for potential therapeutic properties.

FIGs. 22A-22B | Graphs showing comparison of monomeric and tetrameric antigen for identification of memory B cells. (A) Mono-biotinylated TTCF or CD80 antigens were directly labeled with Alexa-488 fluorophore; tetramers were generated with unlabeled streptavidin. Enriched B cells from each donor were split into three fractions and stained with control CD80 tetramer, TTCF monomer, or TTCF tetramer at the same total antigen concentration of 0.125 μg/mL. FACS plots depict $CD19^+$ $CD27^+$ IgM^- class-switched memory B cells; numbers adjacent to the gate represent the percentage of the parental gate. (B) Frequencies of tetramer$^+$ memory B cells detected in three different donors. Numbers are calculated as tetramer$^+$ cells per $1x10^6$ $CD19^+$ memory B cells.

FIGs. 23A-23B | Line graphs showing high affinity binding of TTCF by antibodies generated from plasmablasts and memory B cells. Saturation binding experiments were carried out to determine the affinities of recombinant antibodies. TTCF antigen was labeled with europium, which emits a strong fluorescent signal at 615nm upon incubation with a chelating reagent. Antibodies were immobilized in a 96-well plate and incubated with TTCF-europium (100nM to 4pM) for two hours at 37°C. Fluorescent counts at 615nm were recorded and K_D calculated using non-linear regression analysis. Control antibody (clone 8.18.C5) that was also produced in CHO-S cells was included in all experiments. (A) Recombinant TTCF Abs 1 and 2 were generated from TTCF tetramer$^+$ plasmablasts (donor 1). (B) TTCF antibodies 3, 4, and 5 originated from TTCF tetramer$^+$ memory B cells of three different donors.

FIG. 24 | Bar chart showing binding of anti-MICA antibodies to MICA-coated luminex beads.

FIGs. 25A-25O | Line graphs showing binding of anti-MICA antibodies to MICA-coated beads.

FIGs 26A-26D | Bar graphs showing binding of four human angiopoietin 2 specific antibodies as well as a control antibody to three human angiopoietins (angiopoietin-1, 2 and 4) and ang-like-3. Recombinant angiopoietins were immobilized in an ELISA plate and binding of human recombinant antibodies was detected with europium-labeled streptavidin.

FIGs. 27A-27C | Show graphs and a gel relating to isolation of angiopoietin-specific antibodies from a lung cancer patient. (A) Angiopoietin-2 reactivity of lung cancer patient (L19) serum (diluted 1:1000) determined by ELISA. (B) FACS plot showing PBMC sample (timepoint- 10/98) gated on $CD19^+$, $CD27^+$ IgM-B cells with CD19 on the X-axis and fluorescently-tagged angiopoietin-2 on the Y-axis. (C) Heavy, light chain, and hinge region PCR products from 10 angiopoietin-2 reactive memory B-cells isolated from patient L19. The 500 base pair marker is indicated on the left.

FIG. 28 | Nucleic acid sequence of the variable heavy (V_H) chain of antibody ID 6 (anti-MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) antibody) (SEQ ID NO:148).

FIG. 29 | Amino acid sequence of V_H chain of antibody 6 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:149).

FIG. 30 | Nucleic acid sequence of the variable light (V_L) chain of antibody ID 6 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:150).

FIG. 31 | Amino acid sequence of V_L chain of antibody ID 6 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO: 151).

FIG. 32 | Nucleic acid sequence of the variable heavy (V_H) chain of antibody ID 7 (anti-MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) antibody) (SEQ ID NO:167).

FIG. 33 | Amino acid sequence of V_H chain of antibody ID 7 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:168).

FIG. 34 | Nucleic acid sequence of the variable light (V_L) chain of antibody ID 7 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:169).

FIG. 35 | Amino acid sequence of V_L chain of antibody ID 7 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO: 170).

FIG. 36 | Nucleic acid sequence of the variable heavy (VH) chain of antibody ID 8 (anti-MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) antibody) (SEQ ID NO:185).

FIG. 37 | Amino acid sequence of VH chain of antibody ID 8 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:186).

FIG. 38 | Nucleic acid sequence of the variable light (VL) chain of antibody ID 8 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:187).

FIG. 39 | Amino acid sequence of VL chain of antibody ID 8 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO: 188).

FIG. 40 | Nucleic acid sequence of the variable heavy (V_H) chain of antibody ID 9 (anti-MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) antibody) (SEQ ID NO:203).

FIG. 41 | Amino acid sequence of V_H chain of antibody ID 9 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:204).

FIG. 42 | Nucleic acid sequence of the variable light (V_L) chain of antibody ID 9 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO:205).

FIG. 43 | Amino acid sequence of V_L chain of antibody ID 9 (anti-MICA antibody) (SEQ ID NO: 206).

FIG. 44 | Nucleic acid sequence of the V_H chain of antibody ID 10 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:221).

FIG. 45 | Amino acid sequence of V_H chain of antibody ID 10 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:222).

FIG. 46 | Nucleic acid sequence of the V_L chain of antibody ID 10 (anti-angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:223).

FIG. 47 | Amino acid sequence of V_L chain of antibody ID 10 (anti- angiopoietin-2 antibody) (SEQ ID NO:224).

FIGs. 48A-G | Line graphs showing assessment of MICA allele-specific binding by recombinant anti-MICA antibodies.

FIG. 49 | Line graph showing labeling of autologous tumor cells by anti-MICA antibody CM24002 Ab2.

FIG. 50 | A series of FACS plot showing regulation of NKG2D by serum MICA. Human NK cells were incubated with control serum from patient CM24002 and a 1:10 dilution for 48 hours. Indicated antibodies were added at the start of the incubation at a concentration of 10 μg/ml. NKG2D expression was assessed on CD56+ NK cells by flow cytometry.

FIG. 51 | A series of FACS plot showing regulation of NKG2D by recombinant MICA. Human NK cells were incubated with recombinant MICA at a concentration of 2 ng/ml for 48 hours. Indicated antibodies were added at the start of the incubation at a concentration of 10 μg/ml. After 48 hours, NKG2D expression was assessed on CD56+ NK cells by flow cytometry.

FIG. 52 | Line graph demonstrating enhancement of cell-mediated toxicity by anti-MICA antibody CM24002 Ab2. Human NK cells were incubated with recombinant MICA (2ng/ml) for 48 hours in the presence of indicated antibodies at 10 μg/ml. The ability of NK cells (effectors) to kill K562 target cells was assessed by measuring LDH release following 4 hour incubation at the indicated ratios.

FIG. 53 | Bar graph demonstration cell-mediated toxicity by anti-MICA antibodies CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29. Human NK cells were incubated with recombinant MICA (2ng/ml) for 48 hours in the presence of indicated antibodies at 10 μg/ml. The ability of NK cells (effectors) to kill K562 target cells was assessed by measuring LDH release following 4 hour incubation. NKG2D blocking antibody or Fc blocking antibody was added during the 4 hr incubation of effector and target cells to assess the contribution of Fc receptor and NKG2D to cell-mediated toxicity.

FIG. 54 | A series of line graphs showing binding of MICA alpha 3 domain by recombinant anti-MICA antibodies. Recombinant MICA alpha 3 domains were biotinylated and captured on the surface of streptavidin-coated beads. Indicated antibodies were incubated at 10μg/ml with the beads coated with the individual recombinant protein for 1hr. Beads were subsequently washed and incubated with FITC-conjugated anti-human IgG secondary antibody. FITC fluorescence was quantified by flow cytometry.

FIG. 55 | Line graphs demonstrating labeling of tumor cells by anti-MICA antibodies CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29. Fluorescence was determined by flow cytometry.

FIG. 56 | Bar graph demonstrating MICA allelic specificity of anti-MICA antibodies CM33322 Ab29 as determined by Luminex assay.

FIG. 57 | Bar graphs showing binding of anti-angiopoietin 2 specific antibody anti-Ang6 Ab2 as well as a control antibody to three human angiopoietins (angiopoietin-1, 2 and 4) and ang-like-3. Recombinant angiopoietins were immobilized in an ELISA plate and binding of human recombinant antibodies was detected with europium-labeled streptavidin.

DETAILED DESCRIPTION

The present disclosure is based, in part, on the observation that antibodies directed against therapeutic targets important in a disease can be obtained from human subjects exposed to the disease by labeling of B cells with a tetrameric form of the antigen of interest. As described in the background section above, prior methods are limited at least in that they are inefficient at identifying appropriate B cells in human subjects and/or because they induce any captured B cells to undergo phenotypic changes, thus reducing their value. In contrast, methods are described herein that allow capture of rare memory B cells directed against specific disease-related antigens. As described below, the methods require tetramerization of the disease-related antigen, which process, as demonstrated in the Examples below, enhances the identification of appropriate memory B cells. Specifically, methods herein permit more efficient capture of appropriate memory B cells for increased periods of time following initial exposure of a subject to the antigen. Methods herein also include antibodies (and peptides generated from the sequences of such antibodies) generated using genetic material obtained from memory B cells captured using the methods disclosed herein.

Described herein are human antibodies against MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) and human antibodies targeted against angiopoietin-2. Both types of human antibodies were identified from patients who had received a cell-based cancer

vaccine (GM-CSF transduced autologous tumor cells) by methods that entail the use of tetrameric antigens.

In some instances, the disclosure provides methods for specifically obtaining or targeting antibodies with therapeutic potential from select human subjects and therapeutic compositions resulting therefrom. These methods can include: obtaining or targeting immune cells in a human subject, wherein immune cells include but are not limited to, for example, B cells and/or memory B cells, isolating or purifying genetic material (e.g., DNA and/or mRNA) from the obtained or targeted immune cells, and using the isolated or purified genetic material to produce therapeutic compositions, e.g., therapeutic compositions disclosed herein. Further description of the methods is provided under the section entitled "Methods," below.

In some instances, the disclosure provides therapeutic compositions (e.g., including therapeutic peptides, including antibodies, antibody fragments, antibody derivatives, and/or antibody conjugates) related to antibodies present in subjects that have or had a condition or disease and that exhibited a positive immune response towards the condition or disease.

Therapeutic Compositions

In some instances, therapeutic compositions herein can interact with (e.g., bind, bind specifically and/or bind immunospecifically) binding partners (e.g., an immunogen(s), antigen(s), and/or epitope(s)) related to a disease or condition, wherein interaction between the therapeutic composition and the binding partners results in a positive immune response towards the condition or disease (e.g., a decrease in the level of disease or symptoms thereof in a subject).

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include (e.g., comprise, consist essentially of, or consist of) at least one (e.g., one, two, three, four, five, and/or six) complementarity determining region (CDR) of the variable heavy chain (V_H) and/or variable light chain (V_L) of antibody ID 1, 2, 3, 4, or 5, 6, 7, 8, 9 or 10, shown in Table 1.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include (e.g., comprise, consist essentially of, or consist of) at least one (e.g., one, two, three, four, five, and/or six) complementarity determining region (CDR) of the variable heavy chain (VH) and/or variable light chain (VL) of antibody ID 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10, shown in Table 1, and that interact with (e.g., bind, bind specifically and/or bind immunospecifically) to MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA (e.g., UniGene Hs.130838)) (e.g., soluble MICA (sMICA)) and/or angiopoietin-2 (e.g., UniGene Hs.583870), including epitopes thereof.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 and/or 9 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, peptides can include at least two CDRs, wherein the at least two CDRs are CDRs shown in Table 1 for different antibodies. . In other words, CDRs (and FRs and/or AA sequences) shown in Table 1 for antibodies IDs 1, 6, 7, 8 and 9 are interchangeable and can be combined to generate peptides, so long as the peptides bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 and/or 9 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 and/or 9 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 and/or 9 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 and/or 9. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 and/or 9 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 and/or 9, shown in Table 1. In some instances, such peptides include one of SEQ ID NO:2, 149, 168, 186 or 204 and/or one of SEQ ID NO:11, 151, 170, 188, or 206. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, the affinity of binding between the peptides and MICA can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 6 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 6 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 6 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 6 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 6. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 6 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 6, shown in Table 1. In some instances, such peptides include SEQ ID NO:149 and/or SEQ ID NO:151. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, the affinity of binding between the peptides and MICA can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 7 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 7 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 7 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 7 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 7. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 7 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 7, shown in Table 1. In some instances, such peptides include SEQ ID NO:168 and/or SEQ ID NO:170. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, the affinity of binding between the peptides and MICA can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 8 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 8 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 8 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 8 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 8. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 8 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 8, shown in Table 1. In some instances, such peptides include SEQ ID NO:186 and/or SEQ ID NO:188. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, the affinity of binding between the peptides and MICA can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 9 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 9 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 9 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 9 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 9. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 9 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 9, shown in Table 1. In some instances, such peptides include SEQ ID NO:204 and/or SEQ ID NO:206. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to MICA (e.g., human MICA (e.g., soluble MICA (sMICA))). In some instances, the affinity of binding between the peptides and MICA can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5, and/or 10 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, peptides can include at least two CDRs, wherein the at least two CDRs are CDRs shown in Table 1 for different antibodies. In other words, CDRs (and FRs and/or AA sequences) shown in Table 1 for antibodies IDs 2, 3 4, 5, and 10 are interchangeable and can be combined to generate peptides, so long as the peptides bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5, and/or 10 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5, and/or 10 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5, and/or 10 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5, and/or 10. In some instances, such peptides include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5, and/or 10 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5, and/or 10 5, shown in Table 1. In some instances, such peptides include one of SEQ ID NO:20, 38, 56, 74, or 222 and/or one of SEQ ID NO:29, 47, 65, 83 or 224. In some instances, peptides include one of SEQ ID NO:20, 38, 56, 74, or 222 and one of SEQ ID NO:29, 47, 65, 83 or 224. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2 (e.g, UniGene Hs.583870)).

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 2 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 2 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2. In some instances, such peptides

include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 2, shown in Table 1. In some instances, such peptides include SEQ ID NO:20 and/or SEQ ID NO:29. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, the affinity of binding between the peptides and angiopoietin-2 can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 3 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 3 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 3 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 3 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 3. In some instances, such peptides include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 3 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 3, shown in Table 1. In some instances, such peptides include SEQ ID NO:38 and/or SEQ ID NO:47. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, the affinity of binding between the peptides and angiopoietin-2 can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 4 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 4 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 4 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 4 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 4. In some instances, such peptides

include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 4 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 4, shown in Table 1. In some instances, such peptides include SEQ ID NO:56 and/or SEQ ID NO:65. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, the affinity of binding between the peptide and angiopoietin-2 can be between X-Y, for example, X-Y, X-Y. In some instances, the affinity of binding between the peptides and angiopoietin-2 can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 5 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 5 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 5 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 5 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 5. In some instances, such peptides include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 5 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 5, shown in Table 1. In some instances, such peptides include SEQ ID NO:74 and/or SEQ ID NO:83. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, the affinity of binding between the peptides and angiopoietin-2 can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include at least one CDR of the V_H and/or V_L of antibody ID 10 shown in Table 1, wherein the peptide binds (e.g., binds specifically and/or binds immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 10 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR3 of the V_H and V_L of antibody ID 10 and CDR1 and/or CDR2 of the V_H and/or V_L of antibody ID 10 shown in Table 1. In some instances, such peptides include CDR1,

CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 10. In some instances, such peptides include CDR1 CDR2, and CDR3 of the V_H and/or V_L of antibody ID 10 and at least one of FR1 FR2 FR3, and/or FR4 of the V_H and/or V_L of antibody ID 10, shown in Table 1. In some instances, such peptides include SEQ ID NO:222 and/or SEQ ID NO:224. In each instance, the peptide can bind (e.g., bind specifically and/or bind immunospecifically) to angiopoietin-2 (e.g., human angiopoietin-2). In some instances, the affinity of binding between the peptides and angiopoietin-2 can be between about 0.1nM to 1μM, for example, about 10nM.

In some instances, peptides that bind to angiopoietin-2 can also bind to angiopoietin-1 (e.g., Unigene Hs.369675) and/or angiopoietin-4 (e.g., Unigene Hs.278973). For example, in some instances, peptides that bind to angiopoietin-2 can also bind specifically and/or immunospecifically relative to other antigens (other than angiopoietin-1) to angiopoietin-1. In some instances, peptides that bind to angiopoietin-2 can also bind specifically and/or immunospecifically relative to other antigens (other than angiopoietin-4) to angiopoietin-4.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides that include: SEQ ID NO: 2 and/or SEQ ID NO:11; SEQ ID NO: 149 and/or SEQ ID NO:151; SEQ ID NO: 168 and/or SEQ ID NO:170; SEQ ID NO: 186 and/or SEQ ID NO:188; SEQ ID NO: 204 and/or SEQ ID NO:206; SEQ ID NO:20 and/or SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:38 and/or SEQ ID NO:47; SEQ ID NO:56 and/or SEQ ID NO:65; SEQ ID NO:74 and/or SEQ ID NO:83; and SEQ ID NO: 222 and/or SEQ ID NO:224.

TABLE 1

ID	Target	V_H | V_L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	Nuc. Acid ##
1	Human MICA	V_H	QVQLQQW GAGLLKP SETLALT CAVS (SEQ ID NO: 3)	GGSFTDH Y (SEQ ID NO: 4)	WSWIR QAPGK GLEWIGE (SEQ ID NO: 5)	INHSGVT (SEQ ID NO: 6)	NYNPS LKSRLT ISVDTS KSQFSL RLTSVT AADTA LYYC (SEQ ID NO: 7)	AKTG LYYD DVW GTFR PRGG FDS (SEQ ID NO: 8)	WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 9)	SEQ ID NO: 2 (see FIG. 2)	SEQ ID NO: 1 (see FIG. 1)
		V_L	DIVMTQS PD SLAVSLG ERATINC KSS (SEQ ID NO: 12)	QSILYSSD NKNY (SEQ ID NO: 13)	LAWYQ HKPGQPP KLLFY (SEQ ID NO: 14)	WAS (SEQ ID NO: 15)	IRESG VPDRF SGGGSGT DFTLT ISSLQA EDVAV YYC (SEQ ID NO: 16)	QQYYSP PCS (SEQ ID NO: 17)	FGQGTK LEIQ (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 11 (see FIG. 4)	SEQ ID NO: 10 (see FIG. 3)
		V_H	QVQLQES GPGLVEP SGTLSLT CTVS (SEQ ID NO: 152)	GGSISRS NW (SEQ ID NO: 153)	WSWVRQ PPGEGLE WIGE (SEQ ID NO: 154)	IHHIGRS (SEQ ID NO: 156)	SYNPSLK SRVTMS VDKSQN QFSLRLT SVTAAD TAVYY	CAKNGYY AMDVW (SEQ ID NO: 158)	GQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 155)	SEQ ID NO: 149 (see	SEQ ID NO: 148 (see

6	Human MICA	V_L	EIVLTQS PGTLSLS PGERATL SCRAS (SEQ ID NO: 159)	QSVSSDF (SEQ ID NO: 160)	LAWYQQ KPGQAPR LLIY (SEQ ID NO: 161)	ATS (SEQ ID NO: 162)	FRATGIS DRFSGSG SGTDFSL TINRLEP EDFAVYY (SEQ ID NO: 163)	CQHYRSS PPWYTF (SEQ ID NO: 164)	AQGTKL DMRRTV AAPSV (SEQ ID NO: 165)	SEQ ID NO: 151 (see FIG. 31)	SEQ ID NO: 150 (see FIG. 30)
		V_H	QVQLQES GPGLVKP SGTLSLT CAVS (SEQ ID NO: 171)	GASITNG AW (SEQ ID NO: 172)	WSWVRQ PPGKGLE WIGE (SEQ ID NO: 173)	IYLNGNT (SEQ ID NO: 174)	NSNPSLK SRVIISVD KSKNHFS LTLNSVT AADTAV YY (SEQ ID NO: 166)	CAKNAAY NLEFW (SEQ ID NO: 176)	GQGALVT VSS (SEQ ID NO: 177)	SEQ ID NO: 168 (see FIG. 33)	SEQ ID NO: 167 (see FIG. 32)
7	Human MICA	V_L	EIVLTQS PGTLSLS PGERATL SCRAS (SEQ ID NO: 178)	QTVSSPY (SEQ ID NO: 179)	VAWYQQ KRGQAP RLLIY (SEQ ID NO: 180)	GAS (SEQ ID NO: 181)	TRATGIP DRFSGSG SGTDFTL TISRLEP EDFAVYY (SEQ ID NO: 182)	CQQYDRS YYYTF (SEQ ID NO: 183)	GQGTKLE IK (SEQ ID NO: 184)	SEQ ID NO: 170 (see FIG. 35)	SEQ ID NO: 169 (see FIG. 34)
		V_H	QVQLQES GPGLVKP SENLSLT CTVS	DASMSD YH (SEQ ID NO: 190)	WSWIRQ AAGKGLE WIGR (SEQ ID	MYSTGSP (SEQ ID NO: 192)	YYKPSLK GRVTMSI DTSKNQ FSLKLAS	CASGQHI GGWVPP DFW (SEQ ID	GQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 195)	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:

8	Human MICA		(SEQ ID NO: 189)		NO: 191)		V TAADTAI YY (SEQ ID NO: 193)	NO: 194)		185 (see FIG. 36)
		V_L	DIVMTQT PLSSPVT LGQPASI SCRSS (SEQ ID NO: 196)	EGLVYSD GDTY (SEQ ID NO: 197)	LSWFHQ RPGQPPR LLIY (SEQ ID NO: 198)	KIS (SEQ ID NO: 199)	NRFSGVP DRFSGSG AGTDFTL KISRVEA EDVGVY Y (SEQ ID NO: 200)	CMQATH FPWTF (SEQ ID NO: 201)	GQGTKVE VKR (SEQ ID NO: 202)	SEQ ID NO: 188 (see FIG. 39)	SEQ ID NO: 187 (see FIG. 38)
9	Human MICA	V_H	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAAS (SEQ ID NO: 207)	GFTFSSY G (SEQ ID NO: 208)	LTWIRQA PGKGLE WVSS (SEQ ID NO: 209)	ISGSGNN T (SEQ ID NO: 210)	YYADSVK GRFTISR DKVKKT LYLQMD SLTVGDT AVYY (SEQ ID NO: 211)	CLGVGQ (SEQ ID NO: 212)	GHGIPVI VSS (SEQ ID NO: 213)	SEQ ID NO: 204 (see FIG. 41)	SEQ ID NO: 203 (see FIG. 40)
		V_L	DIVMTQT PLSSPVT LGQPASI SCRSS (SEQ ID NO: 214)	QSLVHRD GNTY (SEQ ID NO: 215)	LSWFLQ RPGQAPR LLIY (SEQ ID NO: 216)	RIS (SEQ ID NO: 217)	NRFSGVP DRFSGSG AGTDFTL KISRVEA EDVGVY Y (SEQ ID NO: 218)	CMQATQI PNTF (SEQ ID NO: 219)	GQGTKLE IK (SEQ ID NO: 220)	SEQ ID NO: 206 (see FIG. 43)	SEQ ID NO: 205 (see FIG. 42)

2	Angiopoietin-2	V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 21)	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 22)	MSWVRQAPGKGLEWVSG (SEQ ID NO: 23)	IYWSGGST (SEQ ID NO: 24)	YYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRADDTAVYYC (SEQ ID NO: 25)	ARGDYYGSGAHFDY (SEQ ID NO: 26)	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)	SEQ ID NO: 20 (see FIG. 6)	SEQ ID NO: 19 (see FIG. 5)
		V_L	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSS (SEQ ID NO: 30)	QSLVHSDGNTY (SEQ ID NO: 31)	LSWLQQRPGQPPRLLIY (SEQ ID NO: 32)	QIS (SEQ ID NO: 33)	NRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEQ ID NO: 34)	MQGTQFPRT (SEQ ID NO: 35)	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)	SEQ ID NO: 29 (see FIG. 8)	SEQ ID NO: 28 (see FIG. 7)
3	Angiopoietin-2	V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 39)	GFTFSNNW (SEQ ID NO: 40)	MHWVRQAPGKGLEWISE (SEQ ID NO: 41)	IRSDGNFT (SEQ ID NO: 42)	RYADSMKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRVEDTGLYYC (SEQ ID NO: 43)	ARDYPYSIDY (SEQ ID NO: 44)	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 45)	SEQ ID NO: 38 (see FIG. 10)	SEQ ID NO: 37 (see FIG. 9)
		V_L	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCTSS	QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO: 49)	LSWLQQRPGQPPRLLIY (SEQ ID	EIS (SEQ ID NO: 51)	KRVSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEA	MQGKQLRT (SEQ ID NO: 53)	FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 54)	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:

4	Angiopoietin-2	V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCAAS (SEQ ID NO: 57)	GFILSNFA (SEQ ID NO: 58)	MSWVRQAPGKGLDWVSG (SEQ ID NO: 59)	NFGGRENT (SEQ ID NO: 60)	EDVGVYYC (SEQ ID NO: 52)	ARGDYHGSGAHFDY (SEQ ID NO: 62)	WGQGILVTVSS (SEQ ID NO: 63)	SEQ ID NO: 56 (see FIG. 14)	SEQ ID NO: 55 (see FIG. 13)
		V_L	DIVMTQSPLSSPVILGQPASISCRS (SEQ ID NO: 66)	QSLLHSDGNTY (SEQ ID NO: 67)	LSWLHQRPGQPPRLLIY (SEQ ID NO: 68)	QIS (SEQ ID NO: 69)	NRFSGVPDRFSGSGTGTDFTLKISRVEAEDAGIYYC (SEQ ID NO: 70)	MQGTEFPRT (SEQ ID NO: 71)	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 72)	SEQ ID NO: 65 (see FIG. 16)	SEQ ID NO: 64 (see FIG. 15)
	Angiopoietin-2	V_H	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCATS (SEQ ID NO: 75)	GFTFRTSS (SEQ ID NO: 76)	MSWVRAPGKGLEWVSA (SEQ ID NO: 77)	IGAESHDT (SEQ ID NO: 78)	HYTDSAEGRFTISKDYSKNTVYLQMNGLRV	AHHYYYGSRQKPKDWGDAFDM (SEQ ID NO: 80)	WGQGTMVSVSS (SEQ ID NO: 81)	SEQ ID NO: 74 (see	SEQ ID NO: 73 (see

2		DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO: 84)	QDIS TW (SEQ ID NO: 85)	LTWYQQRAGKAPNLLIY (SEQ ID NO: 86)	GAS (SEQ ID NO: 87)	TLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPDDFATYYC (SEQ ID NO: 88)	QQSHSFPYT (SEQ ID NO: 89)	FGQGTQLGIS (SEQ ID NO: 90)		FIG. 17)
5	V_L								SEQ ID NO: 83 (see FIG. 20)	SEQ ID NO: 82 (see FIG. 19)
10	Angiopoietin-2	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 225)	GFLISSYF (SEQ ID NO: 226)	MSWVRQAPGKGPEWVSV (SEQ ID NO: 227)	IYSDGST (SEQ ID NO: 228)	YYVDSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTARYY (SEQ ID NO: 229)	CATRHLNYDGDHW (SEQ ID NO: 230)	GQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO: 175)	SEQ ID NO: 222 (see FIG. 45)	SEQ ID NO: 221 (see FIG. 44)
	V_H									
	V_L	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS (SEQ ID NO: 231)	QSLVHSDGNTY (SEQ ID NO: 232)	LNWFHQRPGQSPRRLIY (SEQ ID NO: 233)	KVS (SEQ ID NO: 234)	KRDSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGIYY (SEQ ID NO: 235)	CMQGTHWPTF (SEQ ID NO: 236)	GQGTKVEIKRTVAA (SEQ ID NO: 237)	SEQ ID NO: 224 (see FIG. 47)	SEQ ID NO: 223 (see FIG. 46)

[*] Sequences include sequences or variants with (e.g., with at least) 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, and/or 100% sequence identity to the sequences shown.

[**] Sequences can include one, two, three, four, five, less than five, or less than ten conservative amino acid modifications.

[#] Sequences include sequences or variants with (e.g., with at least) 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, and/or 100% sequence identity to the sequences shown, e.g., within regions corresponding to FR1, FR2, FR3, and/or FR4, and/or one, two, three, four, five, less than 5, or less than ten conservative amino acid modifications within regions corresponding to CDRs 1, 2, and/or 3.

[##] Sequences include sequences or variants with (e.g., with at least) 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, and/or 100% sequence identity to the sequences shown, wherein the sequences encode the corresponding AA.

A.A.[#] shows the V_H or V_L amino acid sequence.

Nuc. Acid [##] shows the V_H or V_L nucleic acid sequence.

While CDR and FR regions are shown above, such regions can also be defined according to Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)). Amino acid numbering of antibodies or antigen binding fragments is also according to that of Kabat.

In some instances, therapeutic compositions can include peptides, including for example, antibodies, including full length and/or intact antibodies, or antibody fragments. An "antibody" is an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target, such as a carbohydrate, polynucleotide, lipid, polypeptide, etc., through at least one antigen recognition site, located in the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, the term "antibody" encompasses not only intact polyclonal or monoclonal antibodies, but also any antigen binding fragment (i.e., "antigen-binding portion") or single chain thereof, fusion proteins comprising an antibody, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site including. An antibody includes an antibody of any class, such as IgG, IgA, or IgM (or sub-class thereof), and the antibody need not be of any particular class. Depending on the antibody amino acid sequence of the constant region of its heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2. The heavy-chain constant regions that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known. Exemplary antibodies and antibody fragments include, but are not limited to, monoclonal antibodies (including full-length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies formed from at least two different epitope binding fragments (e.g., bispecific antibodies), camelised antibodies, chimeric antibodies, single-chain Fvs (scFv), single-chain antibodies, single domain antibodies, domain antibodies, Fab fragments, F(ab')2 fragments, antibody fragments that exhibit the desired biological activity (e.g. the antigen binding portion), disulfide-linked Fvs (dsFv), and anti-idiotypic (anti-Id) antibodies (including, e.g., anti-Id antibodies to antibodies of the invention), intrabodies, and epitope-binding fragments of any of the above. Antibodies or antibody fragments can be human or humanized.

Fragments of antibodies are suitable for use in the methods provided so long as they retain the desired affinity and specificity of the full-length antibody. Thus, a

fragment of an anti- MICA antibody or the anti-Angiopoietin antibody will retain an ability to bind to MICA or angiopoietin, respectively, in the Fv portion and the ability to bind the Fc receptor on dendritic cells in the FC portion. Such fragments are characterized by properties similar to the corresponding full-length anti-MICA antibody or the anti-Angiopoietin antibody, that is, the fragments will specifically bind a human MICA antigen or the angiopoietin antigen, respectively, expressed on the surface of a human cell or the corresponding sMICA antigen that has been shed into the media.

An Fv fragment is an antibody fragment which contains a complete antigen recognition and binding site. This region consists of a dimer of one heavy and one light chain variable domain in tight association, which can be covalent in nature, for example in scFv. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen binding site on the surface of the VH-VL dimer. Collectively, the six CDRs or a subset thereof confer antigen binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) can have the ability to recognize and bind antigen, although usually at a lower affinity than the entire binding site.

Single-chain Fv or (scFv) antibody fragments comprise the V_H and V_L domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains, which enables the scFv to form the desired structure for antigen binding.

The Fab fragment contains a variable and constant domain of the light chain and a variable domain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. F(ab')2 antibody fragments comprise a pair of Fab fragments which are generally covalently linked near their carboxy termini by hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known in the art.

Diabodies are small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a V_H connected to a V_L in the same polypeptide chain (V_H and V_L). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites.

Linear antibodies comprise a pair of tandem Fd segments (V_H-CH1-V_H-CH1) which, together with complementary light chain polypeptides, form a pair of antigen binding regions. Linear antibodies can be bispecific or monospecific.

Antibodies and antibody fragments of the present disclosure can be modified in the Fc region to provide desired effector functions or serum half-life. In some instances, the Fc region can be conjugated to PEG or albumin to increase the serum half-life, or some other conjugation that results in the desired effect. Alternatively, where it is desirable to eliminate or reduce effector function, so as to minimize side effects or therapeutic complications, certain other Fc regions may be used.

Human and humanized antibodies include antibodies having variable and constant regions derived from (or having the same amino acid sequence as those derived from) human germline immunoglobulin sequences. Human antibodies may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (e.g., mutations introduced by random or site-specific mutagenesis in vitro or by somatic mutation in vivo), for example in the CDRs and in particular CDR3.

A "CDR" of a variable domain are amino acid residues within the hypervariable region that are identified in accordance with the definitions of the Kabat, Chothia, the cumulation of both Kabat and Chothia, AbM, contact, and/or conformational definitions or any method of CDR determination well known in the art. Antibody CDRs may be identified as the hypervariable regions originally defined by Kabat et al. See, e.g., Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. The positions of the CDRs may also be identified as the structural loop structures originally described by Chothia and others. See, e.g., Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883. Other approaches to CDR identification include the "AbM definition," which is a compromise between Kabat and Chothia and is derived using Oxford Molecular's AbM antibody modeling software (now Accelrys®), or the "contact definition" of CDRs based on observed antigen contacts, set forth in MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745. In another approach, referred to herein as the "conformational definition" of CDRs, the positions of the CDRs may be identified as the residues that make enthalpic contributions to antigen binding. See, e.g., Makabe et al.,

2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Still other CDR boundary definitions may not strictly follow one of the above approaches, but will nonetheless overlap with at least a portion of the Kabat CDRs, although they may be shortened or lengthened in light of prediction or experimental findings that particular residues or groups of residues or even entire CDRs do not significantly impact antigen binding. As used herein, a CDR may refer to CDRs defined by any approach known in the art, including combinations of approaches. The methods used herein may utilize CDRs defined according to any of these approaches. For any given embodiment containing more than one CDR, the CDRs may be defined in accordance with any of Kabat, Chothia, extended, AbM, contact, and/or conformational definitions.

In some instances, amino acid sequences of the peptides disclosed herein can be modified and varied to create peptide variants (e.g., peptides with a defined sequence homology to the peptides disclosed herein), for example, so long as the antigen binding property of the peptide variant is maintained or improved relative to the unmodified peptide (antigen binding properties of any modified peptide can be assessed using the in vitro and/or in vivo assays described herein and/or techniques known in the art).

While peptide variants are generally observed and discussed at the amino acid level, the actual modifications are typically introduced or performed at the nucleic acid level. For example, variants with 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, or 99% amino acid sequence identity to the peptides shown in Table 1 can be generated by modifying the nucleic acids encoding SEQ ID NOs:1, 10, 19, 28, 37, 46, 55, 64, 73, and/or 82 or portions/fragments thereof, using techniques (e.g., cloning techniques) known in the art and/or that are disclosed herein.

Amino acid sequence modifications typically fall into one or more of three classes: substitutional, insertional, or deletional modifications. Insertions include amino and/or terminal fusions as well as intra-sequence insertions of single or multiple amino acid residues. Insertions ordinarily will be smaller insertions than those of amino or carboxyl terminal fusions, for example, on the order of one to four residues. Deletions are characterized by the removal of one or more amino acid residues from the protein sequence. Typically, no more than about from 2 to 6 residues are deleted at any one site

within the protein molecule. Amino acid substitutions are typically of single residues, but can occur at a number of different locations at once; insertions usually will be on the order of about from 1 to 10 amino acid residues; and deletions will range about from 1 to 30 residues. Deletions or insertions can be made in adjacent pairs, i.e., a deletion of 2 residues or insertion of 2 residues. Substitutions, deletions, insertions or any combination thereof may be combined to arrive at a final construct. The mutations must not place the sequence out of reading frame and preferably will not create complementary regions that could produce secondary mRNA structure. Substitutional modifications are those in which at least one residue has been removed and a different residue inserted in its place. In some instances, substitutions can be conservative amino acid substitutions. In some instances, peptides herein can include one or more conservative amino acid substitutions relative to a peptide shown in Table 1. For example, variants can include 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20-30, 30-40, or 40-50 conservative amino acid substitutions relative to a peptide shown in Table 1. Alternatively, variants can include 50 or fewer, 40 or fewer, 30 or fewer, 20 or fewer, 10 or fewer, 9 or fewer, 8 or fewer, 7 or fewer, 6 or fewer, 5 or fewer, 4 or fewer, 3 or fewer, or 2 or fewer conservative amino acid substitutions relative to a peptide shown in Table 1. Such substitutions generally are made in accordance with the following Table 2 and are referred to as conservative substitutions. Methods for predicting tolerance to protein modification are known in the art (see, e.g., Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004)).

Table 2: Conservative Amino Acid Substitutions

Amino Acid	Substitutions (others are known in the art)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg

Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

In some instances, substitutions are not conservative. For example, an amino acid in a peptide shown in Table 1 can be replaced with an amino acid that can alter some property or aspect of the peptide. In some instances, non-conservative amino acid substitutions can be made, e.g., to change the structure of a peptide, to change the binding properties of a peptide (e.g., to increase or decrease the affinity of binding of the peptide to an antigen and/or to alter increase or decrease the binding specificity of the peptide to the antigen).

In some instances, peptides and/or peptide variants can include or can be fragments of the peptides shown in Table 1. Such fragments can include, for example, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 50-100, 101-150, fewer amino acids than the CDRs, FRs, and/or AAs shown in Table 1, e.g., so long as the fragments retain at least at portion of the binding properties of the full-length peptide (e.g., at least 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100% of the binding properties of the full-length peptide). Truncations can be made at the amino-terminus, the carboxy-terminus, and/or within the peptides herein.

In some instances, the interacting face of a peptide variant can be the same (e.g., substantially the same) as an unmodified peptide, e.g., to alter (e.g., increase or decrease), preserve, or maintain the binding properties of the peptide variant relative to the unmodified peptide. Methods for identifying the interacting face of a peptide are known in the art (Gong et al., BMC: Bioinformatics, 6:1471-2105 (2007); Andrade and Wei et al., Pure and Appl. Chem., 64(11):1777-1781 (1992); Choi et al., Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 77(1):14-25 (2009); Park et al., BMC: and Bioinformatics, 10:1471-2105 (2009).

Those of skill in the art readily understand how to determine the identity of two polypeptides (e.g., an unmodified peptide and a peptide variant). For example, identity can be calculated after aligning the two sequences so that the identity is at its highest level. Another way of calculating identity can be performed by published algorithms. Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted by the local identity algorithm of Smith and Waterman, Adv. Appl. Math, 2:482 (1981), by the identity alignment algorithm of Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by inspection.

The same types of identity can be obtained for nucleic acids by, for example, the algorithms disclosed in Zuker, Science 244:48-52 (1989); Jaeger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706-10 (1989); Jaeger et al., Methods Enzymol. 183:281-306 (1989), which are herein incorporated by reference for at least material related to nucleic acid alignment. It is understood that any of the methods typically can be used and that in certain instances the results of these various methods may differ, but the skilled artisan understands if identity is found with at least one of these methods, the sequences would be said to have the stated identity and to be disclosed herein.

In some instances, as described in more detail under the methods section below, therapeutic compositions disclosed herein can be produced using genetic material (e.g., DNA and/or mRNA) isolated and/or purified from immune cells (e.g., B cells, including

memory B cells) obtained using the methods disclosed herein. Once such genetic material has been obtained, methods for using it to produce the therapeutic compositions disclosed herein are known in the art and/or are summarized below.

In some instances, peptides can include a detectable label. As used herein, a "label" refers to a moiety that has at least one element, isotope, or functional group incorporated into the moiety which enables detection of the peptide to which the label is attached. Labels can be directly attached (ie, via a bond) or can be attached by a linker (e.g., such as, for example, a cyclic or acyclic, branched or unbranched, substituted or unsubstituted alkylene; cyclic or acyclic, branched or unbranched, substituted or unsubstituted alkenylene; cyclic or acyclic, branched or unbranched, substituted or unsubstituted alkynylene; cyclic or acyclic, branched or unbranched, substituted or unsubstituted heteroalkylene; cyclic or acyclic, branched or unbranched, substituted or unsubstituted heteroalkenylene; cyclic or acyclic, branched or unbranched, substituted or unsubstituted heteroalkynylene; substituted or unsubstituted arylene; substituted or unsubstituted heteroarylene; or substituted or unsubstituted acylene, or any combination thereof, which can make up a linker). Labels can be attached to a peptide at any position that does not interfere with the biological activity or characteristic of the inventive polypeptide that is being detected.

Labels can include: labels that contain isotopic moieties, which may be radioactive or heavy isotopes, including, but not limited to, ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{31}P, ^{32}P, ^{35}S, ^{67}Ga, ^{99m}Tc (Tc-99m), ^{111}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{169}Yb, and ^{186}Re; labels that include immune or immunoreactive moieties, which may be antibodies or antigens, which may be bound to enzymes {e.g., such as horseradish peroxidase); labels that are colored, luminescent, phosphorescent, or include fluorescent moieties (e.g., such as the fluorescent label FITC); labels that have one or more photoaffinity moieties; labels that have ligand moieties with one or more known binding partners (such as biotin-streptavidin, FK506-FKBP, etc.).

In some instances, labels can include one or more photoaffinity moieties for the direct elucidation of intermolecular interactions in biological systems. A variety of known photophores can be employed, most relying on photoconversion of diazo compounds, azides, or diazirines to nitrenes or carbenes (see, e.g., Bayley, H., Photogenerated

Reagents in Biochemistry and Molecular Biology (1983), Elsevier, Amsterdam, the entire contents of which are incorporated herein by reference). In certain embodiments of the invention, the photoaffinity labels employed are o-, m- and p-azidobenzoyls, substituted with one or more halogen moieties, including, but not limited to 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid.

Labels can also be or can serve as imaging agents. Exemplary imaging agents include, but are not limited to, those used in positron emissions tomography (PET), computer assisted tomography (CAT), single photon emission computerized tomography, x-ray, fluoroscopy, and magnetic resonance imaging (MRI); anti-emetics; and contrast agents. Exemplary diagnostic agents include but are not limited to, fluorescent moieties, luminescent moieties, magnetic moieties; gadolinium chelates (e.g., gadolinium chelates with DTPA, DTPA-BMA, DOTA and HP-DO3A), iron chelates, magnesium chelates, manganese chelates, copper chelates, chromium chelates, iodine -based materials useful for CAT and x-ray imaging, and radionuclides. Suitable radionuclides include, but are not limited to, ^{123}I, ^{125}I, ^{130}I, ^{131}I, ^{133}I, ^{135}I, ^{47}Sc, ^{72}As, ^{72}Se, ^{90}Y, ^{88}Y, ^{97}Ru, ^{100}Pd, ^{101}mRh, ^{119}Sb, ^{128}Ba, ^{197}Hg, ^{211}At, ^{212}Bi, ^{212}Pb, ^{109}Pd, ^{111}In, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{67}Cu, ^{75}Br, ^{77}Br, ^{99}mTc, ^{14}C, ^{13}N, $^{15}0$, ^{32}P, ^{33}P, and ^{18}F.

Fluorescent and luminescent moieties include, but are not limited to, a variety of different organic or inorganic small molecules commonly referred to as "dyes," "labels," or "indicators." Examples include, but are not limited to, fluorescein, rhodamine, acridine dyes, Alexa dyes, cyanine dyes, etc. Fluorescent and luminescent moieties may include a variety of naturally occurring proteins and derivatives thereof, e.g., genetically engineered variants. For example, fluorescent proteins include green fluorescent protein (GFP), enhanced GFP, red, blue, yellow, cyan, and sapphire fluorescent proteins, reef coral fluorescent protein, etc. Luminescent proteins include luciferase, aequorin and derivatives thereof. Numerous fluorescent and luminescent dyes and proteins are known in the art (see, e.g., U.S. Patent Publication 2004/0067503; Valeur, B., "Molecular Fluorescence: Principles and Applications," John Wiley and Sons, 2002; and Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, 9th edition, 2002).

The term "purified" as used herein, refers to other molecules, e.g. polypeptide, nucleic acid molecule that have been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Thus, in one embodiment the antibodies of the invention are purified antibodies wherein they have been separated from one or more components of their natural environment.

The term "epitope" as used herein refers to a protein determinant capable of binding to an antibody. Epitopes usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. Conformational and non-conformational epitopes are distinguished in that the binding to the former but not the latter is lost in the presence of denaturing solvents.

In some instances, the disclosure provides nucleotide sequences corresponding to (e.g., encoding) the disclosed peptides (e.g., disclosed in Table 1). These sequences include all degenerate sequences related to the disclosed peptides, i.e., all nucleic acids having a sequence that encodes one particular peptide and variants and derivatives thereof. Thus, while each particular nucleic acid sequence may not be written out herein, it is understood that each and every sequence is in fact disclosed and described herein through the disclosed polypeptide sequences.

In some instances, nucleic acids of the disclosed can include expression vectors. Examples of suitable vectors include, but are not limited to, plasmids, artificial chromosomes, such as BACs, YACs, or PACs, and viral vectors.

The provided vectors also can include, for example, origins of replication and/or markers. A marker gene can confer a selectable phenotype, e.g., antibiotic resistance, on a cell. The marker product is used to determine if the vector has been delivered to the cell and once delivered is being expressed. Examples of selectable markers for mammalian cells are dihydrofolate reductase (DHFR), thymidine kinase, neomycin, neomycin analog G418, hygromycin, puromycin, and blasticidin. When such selectable markers are successfully transferred into a mammalian host cell, the transformed mammalian host cell can survive if placed under selective pressure. Examples of other markers include, for example, the E. coli lacZ gene, green fluorescent protein (GFP), and

luciferase. In addition, an expression vector can include a tag sequence designed to facilitate manipulation or detection (e.g., purification or localization) of the expressed polypeptide. Tag sequences, such as GFP, glutathione S-transferase (GST), polyhistidine, c-myc, hemagglutinin, or FLAG™ tag (Kodak; New Haven, CT) sequences typically are expressed as a fusion with the encoded polypeptide. Such tags can be inserted anywhere within the polypeptide including at either the carboxyl or amino terminus.

In some instances, the disclosure includes cells comprising the nucleic acids (e.g., vectors) and/or peptides disclosed herein. Cells can include, for example, eukaryotic and/or prokaryotic cells. In general, cells that can be used herein are commercially available from, for example, the American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108. See also F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, (1998). Transformation and transfection methods useful in the generation of the cells disclosed herein are described, e.g., in F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, (1998).

Pharmaceutical Formulations

In some instances, therapeutic compositions disclosed herein can include other compounds, drugs, and/or agents used for the treatment of cancer. Such compounds, drugs, and/or agents can include, for example, chemotherapy drugs, small molecule drugs or antibodies that stimulate the immune response to a given cancer. In some instances, therapeutic compositions can include, for example, one or more peptides disclosed herein and one or more of an anti-CTLA-4 antibody or peptide, an anti-PD-1 antibody or peptide, and/or an anti-PDL-1 antibody or peptide. For example, in some instances, therapeutic compositions disclosed herein can be combined with one or more (e.g., one, two, three, four, five, or less than ten) compounds.

In some instances, therapeutic compositions disclosed herein can include other compounds including histone deacetylase inhibitors ("HDAC") inhibitors. Examples of HDAC inhibitors include, for example, hydroxamic acid, Vorinostat (Zolinza);

suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)(Merck), Trichostatin A (TSA), LAQ824 (Novartis), Panobinostat (LBH589) (Novartis), Belinostat (PXD101)(CuraGen), ITF2357 Italfarmaco SpA (Cinisello), Cyclic tetrapeptide; Depsipeptide (romidepsin, FK228) (Gloucester Pharmaceuticals), Benzamide; Entinostat (SNDX-275/MS-275)(Syndax Pharmaceuticals), MGCD0103 (Celgene), Short-chain aliphatic acids, Valproic acid, Phenyl butyrate, AN-9, pivanex (Titan Pharmaceutical), CHR-3996 (Chroma Therapeutics), and CHR-2845 (Chroma Therapeutics).

In some instances, therapeutic compositions disclosed herein can include other compounds including proteasome inhibitors, including, for example, Bortezomib, (Millennium Pharmaceuticals), NPI-0052 (Nereus Pharmaceuticals), Carfilzomib (PR-171)(Onyx Pharmaceuticals), CEP 18770, and MLN9708

In some instances, the therapeutic compositions disclosed herein can include alkylating agents such as mephalan and topoisomerase inhibitors such as Adriamycin (doxorubicin) have been shown to increase MICA expression, which could enhance efficacy of an anti-MICA monoclonal antibody.

In some instances, therapeutic compositions disclosed herein can be formulated for use as or in pharmaceutical compositions. Such compositions can be formulated or adapted for administration to a subject via any route, e.g., any route approved by the Food and Drug Administration (FDA). Exemplary methods are described in the FDA's CDER Data Standards Manual, version number 004 (which is available at fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm).

In some instances, pharmaceutical compositions can include an effective amount of one or more peptides. The terms "effective amount" and "effective to treat," as used herein, refer to an amount or a concentration of one or more peptides for a period of time (including acute or chronic administration and periodic or continuous administration) that is effective within the context of its administration for causing an intended effect or physiological outcome.

In some instances, pharmaceutical compositions can include one or more peptides and any pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant and/or vehicle. In some instances,

pharmaceuticals can further include one or more additional therapeutic agents in amounts effective for achieving a modulation of disease or disease symptoms.

The term "pharmaceutically acceptable carrier or adjuvant" refers to a carrier or adjuvant that may be administered to a patient, together with a peptide of this invention, and which does not destroy the pharmacological activity thereof and is nontoxic when administered in doses sufficient to deliver a therapeutic amount of the compound.

Pharmaceutically acceptable carriers, adjuvants and vehicles that may be used in the pharmaceutical compositions of this invention include, but are not limited to, ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) such as d-α-tocopherol polyethyleneglycol 1000 succinate, surfactants used in pharmaceutical dosage forms such as Tweens or other similar polymeric delivery matrices, serum proteins, such as human serum albumin, buffer substances such as phosphates, glycine, sorbic acid, potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, water, salts or electrolytes, such as protamine sulfate, disodium hydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, sodium chloride, zinc salts, colloidal silica, magnesium trisilicate, polyvinyl pyrrolidone, cellulose-based substances, polyethylene glycol, sodium carboxymethylcellulose, polyacrylates, waxes, polyethylene-polyoxypropylene-block polymers, polyethylene glycol and wool fat. Cyclodextrins such as α-, β-, and γ-cyclodextrin, may also be advantageously used to enhance delivery of compounds of the formulae described herein.

The pharmaceutical compositions of this invention may contain any conventional non-toxic pharmaceutically-acceptable carriers, adjuvants or vehicles. In some cases, the pH of the formulation may be adjusted with pharmaceutically acceptable acids, bases or buffers to enhance the stability of the formulated compound or its delivery form. The term parenteral as used herein includes subcutaneous, intracutaneous, intravenous, intramuscular, intra¬articular, intraarterial, intrasynovial, intrasternal, intrathecal, intralesional and intracranial injection or infusion techniques.

Pharmaceutical compositions can be in the form of a solution or powder for inhalation and/or nasal administration. Such compositions may be formulated according to techniques known in the art using suitable dispersing or wetting agents (such as, for

example, Tween 80) and suspending agents. The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally acceptable diluent or solvent, for example, as a solution in 1,3-butanediol. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are mannitol, water, Ringer's solution and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this purpose, any bland fixed oil may be employed including synthetic mono- or diglycerides. Fatty acids, such as oleic acid and its glyceride derivatives are useful in the preparation of injectables, as are natural pharmaceutically-acceptable oils, such as olive oil or castor oil, especially in their polyoxyethylated versions. These oil solutions or suspensions may also contain a long-chain alcohol diluent or dispersant, or carboxymethyl cellulose or similar dispersing agents which are commonly used in the formulation of pharmaceutically acceptable dosage forms such as emulsions and or suspensions. Other commonly used surfactants such as Tweens or Spans and/or other similar emulsifying agents or bioavailability enhancers which are commonly used in the manufacture of pharmaceutically acceptable solid, liquid, or other dosage forms may also be used for the purposes of formulation.

Pharmaceutical compositions can be orally administered in any orally acceptable dosage form including, but not limited to, capsules, tablets, emulsions and aqueous suspensions, dispersions and solutions. In the case of tablets for oral use, carriers which are commonly used include lactose and corn starch. Lubricating agents, such as magnesium stearate, are also typically added. For oral administration in a capsule form, useful diluents include lactose and dried corn starch. When aqueous suspensions and/or emulsions are administered orally, the active ingredient may be suspended or dissolved in an oily phase is combined with emulsifying and/or suspending agents. If desired, certain sweetening and/or flavoring and/or coloring agents may be added.

Alternatively or in addition, pharmaceutical compositions can be administered by nasal aerosol or inhalation. Such compositions are prepared according to techniques well-known in the art of pharmaceutical formulation and may be prepared as solutions in saline, employing benzyl alcohol or other suitable preservatives, absorption promoters to

enhance bioavailability, fluorocarbons, and/or other solubilizing or dispersing agents known in the art.

In some embodiments, the present disclosure provides methods for using any one or more of the peptides or pharmaceutical compositions (indicated below as 'X') disclosed herein in the following methods:

Substance X for use as a medicament in the treatment of one or more diseases or conditions disclosed herein (e.g., cancer, referred to in the following examples as 'Y'). Use of substance X for the manufacture of a medicament for the treatment of Y; and substance X for use in the treatment of Y.

In some instances, therapeutic compositions disclosed herein can be formulated for sale in the US, import into the US, and/or export from the US.

Methods

In some instances, methods can include selection of a human subject who has or had a condition or disease and who exhibits or exhibited a positive immune response towards the condition or disease. In some instances, suitable subjects include, for example, subjects who have or had a condition or disease but that resolved the disease or an aspect thereof, present reduced symptoms of disease (e.g., relative to other subjects (e.g., the majority of subjects) with the same condition or disease), and/or that survive for extended periods of time with the condition or disease (e.g., relative to other subjects (e.g., the majority of subjects) with the same condition or disease), e.g., in an asymptomatic state (e.g., relative to other subjects (e.g., the majority of subjects) with the same condition or disease). In some instances, subjects can be selected if they have been vaccinated (e.g., previously vaccinated and/or vaccinated and re-vaccinated (e.g., received a booster vaccine)) against a condition or disease.

The term "subject," as used herein, refers to any animal. In some instances, the subject is a mammal. In some instances, the term "subject", as used herein, refers to a human (e.g., a man, a woman, or a child). Samples for use in the methods can include serum samples, e.g., obtained from the selected subject.

In some instances, subject selection can include obtaining a sample from a subject (e.g., a candidate subject) and testing the sample for an indication that the subject is suitable for selection. In some instances, the subject can be confirmed or identified, e.g. by a health care professional, as having had or having a condition or disease. In some instances, exhibition of a positive immune response towards a condition or disease can be made from patient records, family history, and/or detecting an indication of a positive immune response. In some instances multiple parties can be included in subject selection. For example, a first party can obtain a sample from a candidate subject and a second party can test the sample. In some instances, subjects can be selected and/or referred by a medical practitioner (e.g., a general practitioner). In some instances, subject selection can include obtaining a sample from a selected subject and storing the sample and/or using the in the methods disclosed herein. Samples can include, for example, cells or populations of cells.

In some instances, obtaining or targeting immune cells can include one or more and/or combinations of, for example: obtaining or providing a tetrameric immunogen that can bind (e.g., bind specifically) to a target immune cell; contacting the tetrameric immunogen with a sample; detecting the tetrameric immunogen; determining whether the tetrameric immunogen is bound to a target immune cell; and, if the tetrameric immunogen is bound to a target immune cell, then obtaining the target immune cell.

Tetrameric immunogens can include immunogens related to a condition or disease and/or that bind (e.g., bind specifically) to a target immune cell, e.g., wherein the target immune cell is related to a selected condition or disease. Immunogens and target immune cells related to a condition or disease include, for example, immunogens or immune cells present in subjects with a certain condition or disease, but not subjects without the condition or disease; and/or immunogens or immune cells present at altered levels (e.g., increased) in subjects with a certain condition or disease relative to subjects without the condition or disease. In some instances, immunogens or immune cells can be cancer specific. Immunogens can be soluble. Tetrameric immunogen can include tetrameric (including, e.g., tetramerized monomeric, dimeric, and/or trimeric antigen immunogen (e.g., antigen and/or epitope). In some instances, a tetrameric immunogen has increased

binding to a cell relative to the level of binding between a non-tetrameric form of the immunogen to the cell under similar conditions. In some instances, a tetrameric antigen includes a detectable moiety, e.g., a streptavidin moiety. Tetramerization methods are known in the art and are disclosed herein.

Detecting tetrameric immunogen and/or determining whether tetrameric immunogen is bound to a target cell can be performed using methods known in the art and/or disclosed herein. For example, methods can include flow cytometry. Optimization methods for flow cytometry, including sorting and gating methods, are known in the art and/or are disclosed herein. In some instances, methods can include analysis of the level of binding, binding affinity, and/or binding specificity between a tetrameric immunogen bound to a target immune cell. For example, a target immune cell can be obtained if (e.g., only if) a pre-determined level of binding between a tetrameric immunogen and a target immune cell is determined. Pre-determined levels of binding can be specific levels and/or can be relative levels. Obtaining target immune cells can include obtaining, providing, identifying, selecting, purifying, and/or isolating the target immune cells. Such methods can include, for example, cell sorting methods, cell enrichment, and/or background reduction.

In some instances, obtaining immune cells directed against a self antigen can include one or more and/or combinations of, for example, identifying a subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen; obtaining or providing a multimeric form of the self antigen; contacting the multimeric form of the self antigen with a sample from the subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen; obtaining immune cells bound to the multimeric form of the self antigen.

In some instances, methods can include obtaining immune cells directed against a self antigen from a cancer patient, can include one or more and/or combinations of, for example, identifying a subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen; providing a multimeric form of the self antigen; contacting the multimeric form of the self antigen with a sample from the subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen; and obtaining immune cells bound to the multimeric form of the self antigen.

Multimeric forms of a self antigen can include self antigens related to a condition or disease and/or that bind (e.g., bind specifically) to a target immune cell, e.g., wherein the target immune cell is related to a selected condition or disease. Self antigens and target immune cells related to a condition or disease include, for example, antigens or immune cells present in subjects with a certain condition or disease, but not subjects without the condition or disease; and/or immunogens or immune cells present at altered levels (e.g., increased) in subjects with a certain condition or disease relative to subjects without the condition or disease. In some instances, the condition or disease can be a cancer. In some embodiments, the cancer is melanoma, lung, breast, kidney, ovarian, prostate, pancreatic, gastric, and colon carcinoma, lymphoma or leukemia. In some instances, the self antigens or immune cells can be cancer specific. The self antigens can be soluble. Multimeric form of the self antigen can include a tetrameric form (including, e.g., tetramerized monomeric, dimeric, and/or trimeric antigen) of the self-antigen (e.g., antigen and/or epitope). In some instances, a multimeric form of the self antigen includes a detectable moiety, e.g., a streptavidin moiety. Multimerization methods are known in the art and are disclosed herein.

Methods for isolating or purifying genetic material (e.g., DNA and/or mRNA) from the obtained target immune cell are known in the art and are exemplified herein. Once such genetic material has been obtained, methods for using it to produce the therapeutic compositions disclosed herein are known in the art and/or are summarized below. As discussed above, genetic material can be varied, using techniques known in the art to create peptide variants disclosed herein.

Generating peptides from nucleic acids (e.g., cDNA) contained within or obtained from the target cell can include, for example, analysis, e.g., sequencing of heavy and light chain variable domains from target immune cells (e.g., single or isolated identified target immune cells). In some instances, methods can include generating fully human antibodies, or fragments thereof (e.g., as disclosed above), and humanization of non-human antibodies. DNA can be readily isolated and/or sequenced from the obtained immune cells using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that

are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies).

Once isolated, DNA can be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *Escherichia coli* cells, simian COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce antibody protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in bacteria of DNA encoding the antibody include Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) and Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

Recombinant expression of an antibody or variant thereof generally requires construction of an expression vector containing a polynucleotide that encodes the antibody. The invention, thus, provides replicable vectors comprising a nucleotide sequence encoding an antibody molecule, a heavy or light chain of an antibody, a heavy or light chain variable domain of an antibody or a portion thereof, or a heavy or light chain CDR, operably linked to a promoter. Such vectors may include the nucleotide sequence encoding the constant region of the antibody molecule (see, e.g., US. Patent Nos. 5,981,216; 5,591,639; 5,658,759 and 5,122,464) and the variable domain of the antibody may be cloned into such a vector for expression of the entire heavy, the entire light chain, or both the entire heavy and light chains.

Once the expression vector is transferred to a host cell by conventional techniques, the transfected cells are then cultured by conventional techniques to produce an antibody. Thus, the invention includes host cells containing a polynucleotide encoding an antibody of the invention or fragments thereof, or a heavy or light chain thereof, or portion thereof, or a single-chain antibody of the invention, operably linked to a heterologous promoter. In certain embodiments for the expression of double-chained antibodies, vectors encoding both the heavy and light chains may be co-expressed in the host cell for expression of the entire immunoglobulin molecule, as detailed below.

Mammalian cell lines available as hosts for expression of recombinant antibodies are well known in the art and include many immortalized cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC), including but not limited to Chinese hamster

ovary (CHO) cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, monkey kidney cells (COS), human hepatocellular carcinoma cells (e.g., Hep G2), human epithelial kidney 293 cells, and a number of other cell lines. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and gene products. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the antibody or portion thereof expressed. To this end, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells include but are not limited to CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O and T47D, NS0 (a murine myeloma cell line that does not endogenously produce any functional immunoglobulin chains), SP20, CRL7O3O and HsS78Bst cells. In one embodiment, human cell lines developed by immortalizing human lymphocytes can be used to recombinantly produce monoclonal antibodies. In one embodiment, the human cell line PER.C6. (Crucell, Netherlands) can be used to recombinantly produce monoclonal antibodies.

In some instances, peptides disclosed herein can be generated synthetically. Synthetic chemistry transformations and protecting group methodologies (protection and deprotection) useful in synthesizing peptides described herein are known in the art and include, for example, those such as described in R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3d. Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); and L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995), and subsequent editions thereof.

Peptides can also be made by chemical synthesis methods, which are well known to the ordinarily skilled artisan. See, for example, Fields et al., Chapter 3 in Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, p. 77. Hence, peptides can be synthesized using the automated Merrifield techniques of solid phase synthesis with the α-NH_2 protected by either t-Boc or Fmoc chemistry using

side chain protected amino acids on, for example, an Applied Biosystems Peptide Synthesizer Model 430A or 431.

One manner of making of the peptides described herein is using solid phase peptide synthesis (SPPS). The C-terminal amino acid is attached to a cross-linked polystyrene resin via an acid labile bond with a linker molecule. This resin is insoluble in the solvents used for synthesis, making it relatively simple and fast to wash away excess reagents and by-products. The N-terminus is protected with the Fmoc group, which is stable in acid, but removable by base. Any side chain functional groups are protected with base stable, acid labile groups.

Longer peptides could be made by conjoining individual synthetic peptides using native chemical ligation. Alternatively, the longer synthetic peptides can be synthesized by well-known recombinant DNA techniques. Such techniques are provided in well-known standard manuals with detailed protocols. To construct a gene encoding a peptide of this invention, the amino acid sequence is reverse translated to obtain a nucleic acid sequence encoding the amino acid sequence, preferably with codons that are optimum for the organism in which the gene is to be expressed. Next, a synthetic gene is made, typically by synthesizing oligonucleotides which encode the peptide and any regulatory elements, if necessary. The synthetic gene is inserted in a suitable cloning vector and transfected into a host cell. The peptide is then expressed under suitable conditions appropriate for the selected expression system and host. The peptide is purified and characterized by standard methods.

The peptides can be made in a high-throughput, combinatorial fashion, e.g., using a high-throughput multiple channel combinatorial synthesizer available from Advanced Chemtech.

Peptide bonds can be replaced, e.g., to increase physiological stability of the peptide, by: a retro-inverso bonds (C(O)-NH); a reduced amide bond (NH-CH_2); a thiomethylene bond (S-CH_2 or CH_2-S); an oxomethylene bond (O-CH_2 or CH_2-O); an ethylene bond (CH_2-CH_2); a thioamide bond (C(S)-NH); a trans-olefin bond (CH=CH); a fluoro substituted trans-olefin bond (CF=CH); a ketomethylene bond (C(O)-CHR) or

CHR-C(O) wherein R is H or CH_3; and a fluoro-ketomethylene bond (C(O)-CFR or CFR-C(O) wherein R is H or F or CH_3.

Peptides can be further modified by: acetylation, amidation, biotinylation, cinnamoylation, farnesylation, fluoresceination, formylation, myristoylation, palmitoylation, phosphorylation (Ser, Tyr or Thr), stearoylation, succinylation and sulfurylation. As indicated above, peptides can be conjugated to, for example, polyethylene glycol (PEG); alkyl groups (e.g., C1-C20 straight or branched alkyl groups); fatty acid radicals; and combinations thereof.

In some instances, peptides can be purified by any method known in the art for purification of an immunoglobulin molecule, for example, by chromatography (e.g., ion exchange, affinity, particularly by affinity for the specific antigens Protein A or Protein G, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for the purification of proteins. Further, the antibodies of the present invention or fragments thereof may be fused to heterologous polypeptide sequences (refered to herein as "tags") described above or otherwise known in the art to facilitate purification.

An exemplary, non-limiting, overview of the methods is shown in FIG. 21. Ordering is not implied.

Methods of Use

In some instances, the disclosure provides methods of treatment that include administering to a subject a composition disclosed herein.

Provided herein are methods for treating and/or preventing cancer or symptoms of cancer in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition comprising a peptide that immunospecifically binds to MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA), wherein the peptide comprises complementarity determining region (CDR) 3 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and CDR3 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions. In some embodiments the cancer is a cancer associated with

overexpression of MICA. In some embodiments, the cancer is melanoma, lung, breast, kidney, ovarian, prostate, pancreatic, gastric, and colon carcinoma, lymphoma or leukemia. In some embodiments, the cancer is melanoma. In some embodiments, the cancer is a plasma cell malignancy, for example, multiple myeloma (MM) or pre-malignant condition of plasma cells. In some embodiments the subject has been diagnosed as having a cancer or as being predisposed to cancer.

In some instances, the disclosure provides methods for treating and/or preventing cancer or symptoms of cancer in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition comprising an isolated antibody which specifically binds to MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region (VH) comprising the VH CDR1, VH CDR2, and VH CDR3 as shown in the VH sequence of SEQ ID NO: 11, 149, 168, 186, or 204 and a light chain variable region (VL) sequence of SEQ ID No: 4, 151, 170, 189, or 206.

Also provided herein are methods for treating and/or preventing cancer or symptoms of cancer in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a peptide that immunospecifically binds to angiopoietin, wherein the peptide comprises complementarity determining region (CDR) 3 of the VH of antibody ID 2, 3, 4 or 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and CDR3 of the VL of antibody ID 2, 3, 4 or 5 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions. In some embodiments the cancer is a cancer associated with overexpression of MICA. In some embodiments, the cancer is melanoma, lung, breast, kidney, ovarian, prostate, pancreatic, gastric, and colon carcinoma, lymphoma or leukemia. In some embodiments, the cancer is melanoma. In some embodiments, the cancer is a plasma cell malignancy, for example, multiple myeloma (MM) or pre-malignant condition of plasma cells. In some embodiments the subject has been diagnosed as having a cancer or as being predisposed to cancer.

In some instances, the disclosure provides methods for treating and/or preventing cancer or symptoms of cancer in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition comprising an isolated antibody which

specifically binds to angiopoietin (e.g., angiopoietin-2), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region (VH) comprising the VH CDR1, VH CDR2, and VH CDR3 as shown in the VH sequence of SEQ ID NO: 20, 38, 56, 74, 222 and a light chain variable region (VL) sequence of SEQ ID No: 29, 47, 65, 83, or 224.

Symptoms of cancer are well-known to those of skill in the art and include, without limitation, unusual mole features, a change in the appearance of a mole, including asymmetry, border, color and/or diameter, a newly pigmented skin area, an abnormal mole, darkened area under nail, breast lumps, nipple changes, breast cysts, breast pain, death, weight loss, weakness, excessive fatigue, difficulty eating, loss of appetite, chronic cough, worsening breathlessness, coughing up blood, blood in the urine, blood in stool, nausea, vomiting, liver metastases, lung metastases, bone metastases, abdominal fullness, bloating, fluid in peritoneal cavity, vaginal bleeding, constipation, abdominal distension, perforation of colon, acute peritonitis (infection, fever, pain), pain, vomiting blood, heavy sweating, fever, high blood pressure, anemia, diarrhea, jaundice, dizziness, chills, muscle spasms, colon metastases, lung metastases, bladder metastases, liver metastases, bone metastases, kidney metastases, and pancreatic metastases, difficulty swallowing, and the like.

The methods disclosed herein can be applied to a wide range of species, e.g., humans, non-human primates (e.g., monkeys), horses, cattle, pigs, sheep, deer, elk, goats, dogs, cats, mustelids, rabbits, guinea pigs, hamsters, rats, and mice.

The terms "treat" or "treating," as used herein, refers to partially or completely alleviating, inhibiting, ameliorating, and/or relieving the disease or condition from which the subject is suffering. In some instances, treatment can result in the continued absence of the disease or condition from which the subject is suffering.

In general, methods include selecting a subject at risk for or with a condition or disease. In some instances, the subject's condition or disease can be treated with a pharmaceutical composition disclosed herein. For example, in some instances, methods include selecting a subject with cancer, e.g., wherein the subject's cancer can be treated by targeting one or both of MICA and/or angiopoetin-2.

In some instances, treatments methods can include a single administration, multiple administrations, and repeating administration as required for the prophylaxis or treatment of the disease or condition from which the subject is suffering. In some instances treatment methods can include assessing a level of disease in the subject prior to treatment, during treatment, and/or after treatment. In some instances, treatment can continue until a decrease in the level of disease in the subject is detected.

The terms "administer," "administering," or "administration," as used herein refers to implanting, absorbing, ingesting, injecting, or inhaling, the inventive peptide, regardless of form. In some instances, one or more of the peptides disclosed herein can be administered to a subject topically (e.g., nasally) and/or orally. For example, the methods herein include administration of an effective amount of compound or compound composition to achieve the desired or stated effect. Specific dosage and treatment regimens for any particular patient will depend upon a variety of factors, including the activity of the specific compound employed, the age, body weight, general health status, sex, diet, time of administration, rate of excretion, drug combination, the severity and course of the disease, condition or symptoms, the patient's disposition to the disease, condition or symptoms, and the judgment of the treating physician.

Following administration, the subject can be evaluated to detect, assess, or determine their level of disease. In some instances, treatment can continue until a change (e.g., reduction) in the level of disease in the subject is detected.

Upon improvement of a patient's condition (e.g., a change (e.g., decrease) in the level of disease in the subject), a maintenance dose of a compound, composition or combination of this invention may be administered, if necessary. Subsequently, the dosage or frequency of administration, or both, may be reduced, as a function of the symptoms, to a level at which the improved condition is retained. Patients may, however, require intermittent treatment on a long-term basis upon any recurrence of disease symptoms.

In some instances, the disclosure provides methods for detecting immune cells e.g., B cells and/or memory B cells, from a human subject. Such methods can be used, for example, to monitor the levels of immune cells e.g., B cells and/or memory B cells, in

a human subject, e.g., following an event. Exemplary events can include, but are not limited to, detection of diseases, infection; administration of a therapeutic composition disclosed herein, administration of a therapeutic agent or treatment regimen, administration of a vaccine, induction of an immune response. Such methods can be used clinically and/or for research.

EXAMPLES

The invention is further described in the following examples, which do not limit the scope of the invention described in the claims.

Methods are described herein that allow sensitive, specific, and reliable detection of rare memory B cells, with defined antigen specificity, from limited quantities of peripheral blood. Methods allowed visualization and isolation of memory B cells months to years after antigen had been cleared.

Proof of principle for the methods disclosed herein was established using tetramers of tetanus toxin C-fragment (TTCF), as reported in detail in Franz et al. (Blood, 118(2):348-357 (2011)), which reference is hereby incorporated by reference in its entirety.

TTCF (i.e., the 52 kDa, non-toxic, C-terminal fragment of TTCF) was selected as a model antigen because the majority of individuals have been vaccinated with tetanus toxoid and persistent IgG antibody titers are induced by the vaccine (Amanna et al., N. Engl. J. Med., 357:1903-1915, 2007). Accordingly, use of TTCF afforded a large pool of subjects in which the methods disclosed herein could be verified. One of skill in the art will appreciate, however, that the present methods can be adapted to include any disease-related antigen using routine skill. As demonstrated in the examples below, such adaption has been shown through the acquisition of antibodies directed against MICA and angiopoietin-2, which are cancer-related antigens.

Example 1: Antigen Expression and Tetramer Formation

As described in further detail below, TTCF was expressed in *Eschericia coli* and a BirA site was attached to the N-terminus for site-specific mono-biotinylation by BirA

enzyme. A flexible linker was placed between the protein and the biotinylation site to prevent steric hindrance of antibody binding. TTCF was purified by anion-exchange chromatography, biotinylated with BirA, and separated from free biotin and BirA by gel filtration chromatography. TTCF tetramers were generated by incubating fluorescently tagged streptavidin with biotinylated TTCF antigen at a molar ratio of 1:4. These tetramers were then used along with a panel of mAbs for the identification of tetanus toxoid specific memory B cells.

TTCF was cloned in pET-15b (Novagen). Protein expression was induced in BL21(DE3) *Eschericia coli* with 1mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 hours at 28°C. Cells were washed, lysed, and resulting supernatant was collected. TTCF was purified using a HIS-Select affinity column (Sigma). The His-tag was removed proteolytically. Murine CD80 membrane proximal domain was produced using similar methods. Proteins were mono-biotinylated. For certain experiments, Alexa-488 dye molecules (Molecular probes) were linked to primary amines on biotinylated TTCF or CD80.

Antigen tetramers were prepared by incubating biotinyated antigen with premium grade PE labeled streptavidin (Molecular Probes) for at least 20 minutes on ice at a molar ratio of 4:1. Prior to use, tetramer preparations were centrifuged to remove aggregates. In some experiments, tetramers were formed with Alexa-fluor-488 tagged antigens and non-fluorescent streptavidin at a 4:1 ratio.

Example 2: Identification Methods

Methods were performed as described in Franz et al., Blood, 118(2):348-357 (2011).

Cells were sorted on a BD FACS Aria II cell sorter. Cells were single-cell sorted. Samples were first gated on $CD19^+$ cells that were negative for a panel of exclusion markers (CD3, CD14, CD16, 7AAD) then gated on plasmablasts, identified by high levels of CD27 and an immediate level of CD19 expression, and finally on $tetramer^+$ $CD19^+$ cells.

Due to the low frequency of memory B cells, it was necessary to carefully reduce background as much as possible. B cells were first enriched by negative selection (cocktail of antibodies to CD2, CD3, CD14, CD16, CD56 and glycophorin A) to remove most cells that could non-specifically bind the tetramer. Enriched cells were split evenly and stained with TTCF or a control tetramer followed by labeling with CD19, CD27 and IgM to specifically select class-switched memory B cells. The gating strategy considered expression of CD19, lack of labeling with a panel of exclusion markers (CD3, CD14, CD16, 7AAD), expression of the memory marker CD27 and lack of IgM expression as evidence of class switching. Tetramer staining was plotted versus CD27 staining for visualization of memory B cells with the antigen specificity of interest. Tetramer-positive B cells were directly sorted into PCR strips containing 3 µl mRNA extraction buffer.

Tubes were kept cold during sorting and sorted cells were frozen and stored at -80°C. CD19+ CD27+ IgM- B cells were used as positive controls.

A previously reported nest PCR protocol was used to amplify heavy and light chain variable segments (Wang et al., J. Immunol. Methods., 244:217-225, 2000). mRNA amplification was carried out under conditions suitable to minimize contamination. Primers used included:

TAATACGACTCACTATAGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG (SEQ ID NO: 91);

TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACAC (SEQ ID NO:92);

TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC (SEQ ID NO:93).

Nested RT-PCR was performed as described in Franz et al., Blood, 118(2):348-357 (2011).

Negative controls were included to monitor and guard against contamination. From a total of 35 single cells labeled with the TTCF tetramer, 32 heavy and 30 light chain segments were amplified and directly sequence from gel-purified PCR products, corresponding to an overall PCR efficiency of 89%. Sequence analysis revealed that

TTCF tetramer$^+$ cells employed a variety of different V_HD-J_H gene segments, without dominance of one particular gene segment. Sequences observed supported that clones represented cells diversified by somatic hypermutation.

Antibody production and purification included cloning heavy and light variable domain DNA into separate pcDNA3.3 expression vectors containing the bovine prolactin signal peptide sequence as well as full length IgG1 heavy or kappa light chain constant domains. Antibodies were expressed in CHO-S media (Invitrogen) supplemented with 8mM Glutamax (Gibco) in 100ml sinner flasks at 37 °C with 8% CO_2. One day prior to transfection, cells were split to $6x10^5$ cells/ml. On the day of transfection, cells were adjusted, were necessary, to $1x10^6$ cells/ml. 25 μg of heavy and light chain plasmid DNA were co-transfected using MAX transfection reagent (Invitrogen) and transfected cells were cultured for 6-8 days. Protein was obtained using Protein G sepharose beads and antibody was eluted using 100mM glycine pH2.5 and separated from beads using Spin-X centrifuge tubes. Purified antibody was exchanged into phosphate buffered saline (PBS) using Micro Bio-Spin columns (BioRad). Protein concentration was assessed by absorbance at 280nm.

For saturation binding assay, non-biotinylated, MonoQ purified TTCF was labeled with europium and free europium was removed. 96-well flat bottom plates were coated overnight with 20ng of antibody per well in 100mM $NaHCO_3$ buffer at pH 9.6. Blocking was performed with assay buffer supplemented with bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma globulins. TTCF-europium was diluted in assay buffer (100nM to 4pM) and 200μl was added per well in triplicate. Plates were incubated for 2 hours at 37 °C and washed three times with 200 μl wash buffer (50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 20 μM EDTA, 0.05% Tween). 100 μl enhancement solution was added to each well and fluorescence counts measured using a Victor^3 plate reader at 615nm.

Heavy and light chain variable domain sequences were analyzed using IMGT/V-Quest and JIONSOLVER software. Flow cytometry data were evaluated using FlowJo analysis software. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5 software using unpaired t-test. To determine antibody K_D values, saturation binding data were fitted using GraphPad Prism 5 software using non-linear regression analysis.

Example 3: Multimerization Enhances Identification of Memory B Cells

Tetrameric and monomeric TTCF were compared. TTCF was fluorescently labeled with Alexa-488 and then used in monomeric form or was converted to a tetramer using unlabeled streptavidin (see above). Enriched B cells were then incubated with tetrameric or monomeric TTCF-Alexa-488 at the same concentration. Control protein (CD80 membrane proximal domain) was labeled in the same way and also used as a tetramer.

As shown in FIGs. 22A and 22B, TTCF labeled some memory B cells, but frequencies identified with tetramer were substantially larger (1.6-7.3 fold) using cells from three donors. In one of the three donors TTCF specific memory B cells could be detected with the tetramer but not with the monomer.

These results demonstrate that antigen tetramers enable sensitive detection of memory B cells based on the antigen specificity of their BCR, despite such cells being very rare in peripheral blood. Class-switched memory B cells specific for TTCF were brightly labeled by the appropriate tetrameric TTCF antigen, while background labeling with control tetramer was consistently low.

Example 4: Method/Antibody Validation

Fully human antibodies were generated by joining constant regions of IgG heavy and kappa chains to isolated variable segments via overlap PCR. Antibodies were expressed in a transient, serum free mammalian expression system using CHO-S cells for a period of 6-8 days. Antibodies were purified using protein G and gel filtration chromatography.

As shown in FIG. 23, antibodies isolated from TTCF-specific plasmablasts showed high binding affinities to TTCF antigen, with a K_D of 2.2 nM (TTCF Ab 1) and 323 pM (TTCF Ab 2)(FIG. 23B. Antibodies isolated from memory B cells also exhibited high binding affinities, with K_D of 382 pM, 228 pM, and 1.4 nM, for other antibodies (TTCF Abs 3, 4, and 5)(FIG. 23B).

These data support the specificity of the methods disclosed herein. Moreover, the specificity of the methods herein was demonstrated by the construction of five anti-TTCF antibodies from three different donors, all of which bound to TTCF with high affinities.

Data herein also demonstrate that antigen tetramers enable sensitive detection of memory B cells long after clearance of the antigen from the host.

Example 5: Obtaining Anti-MICA Antibodies

Antibodies that immunospecifically bind to MICA were developed using the methods herein.

Briefly, MICA antigen (UniGene Hs.130838) was expressed with a C-terminal BirA tag (GLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO: 238)), which enables mono-biotinylation of the antigen. Antigen was tetramerized with streptavidin (SA) labeled with R-Phycoerythrin (PE) at a molar ration of 4 MICA: 1 SA. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from advanced stage melanoma patients who had been vaccinated with autologous tumor cells transduced with a GM-CSF expression vector (GVAX) (PNAS 103: 9190, 2006), and subsequently treated with the anti-CTLA-4 monoclonal antibody ipilimumab (YERVOY™ (available from Bristol Myers Squib)) Peripheral blood mononuclear cells were quickly thawed, washed and resuspended at $5x10^6$ in phosphate buffered saline (pH 7.2) supplemented with 2% fetal calf serum and stained with approximately 0.1ug/ml tetramer for 30 minutes on ice. Antibodies were added to identify class-switched, memory B-cells ($CD19^+$, $CD27^+$, and IgM^-). A panel of exclusion antibodies labeling T-cells, natural killer-cells, marcrophages, and dead cells were included to reduce background tetramer staining (CD3, CD14, CD16, 7-AAD). Single B-cells that bound to the MICA tetramer were sorted into 8-tube-PCR strips using the BD FACS Aria II. The B-cell receptor (BCR) mRNA was amplified using a commercial kit from Epicentre Biotechnologies (catalog number: MBCL90310) using gene specific primers shown below:

mRNA Amplification

IgG-T7: AATACGACTCACTATAGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG (SEQ ID NO:94)

Kappa-T7:
TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACAC (SEQ ID NO:95)

Lambda-T7:
TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC (SEQ ID NO:96)

PCR One

VHL-1: TCACCATGGACTG(C/G)ACCTGGA (SEQ ID NO:97)
VHL-2: CCATGGACACACTTTG(C/T)TCCAC (SEQ ID NO:98)
VHL-3: TCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC (SEQ ID NO:99)
VHL-4: AGAACATGAAACA(C/T)CTGTGGTTCTT (SEQ ID NO:100)
VHL-5: ATGGGGTCAACCGCCATCCT (SEQ ID NO:101)
VHL-6: ACAATGTCTGTCTCCTTCCTCAT (SEQ ID NO:102)
VkL-1: GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG (SEQ ID NO:103)
VkL-2: CTGGGGCTGCTAATGCTCTGG (SEQ ID NO:104)
VkL-3: TTCCTCCTGCTACTCTGGCTC (SEQ ID NO:105)
VkL-4: CAGACCCAGGTCTTCATTTCT (SEQ ID NO:106)
VlL-1: CCTCTCCTCCTCACCCTCCT (SEQ ID NO:107)
VlL-2: CTCCTCACTCAGGGCACA (SEQ ID NO:108)
VlL-3: ATGGCCTGGA(T/C)C(C/G)CTCTCC (SEQ ID NO:109)
CgII: GCCAGGGGGAAGAC(C/G)GATG (SEQ ID NO:110)
CkII: TTTCAACTGCTCATCAGATGGCGG (SEQ ID NO:111)
ClII: AGCTCCTCAGAGGAGGG(C/T)GG (SEQ ID NO:112)

PCR Two

VH-1: CAGGT(G/C)CAGCTGGT(G/A)CAGTC (SEQ ID NO:113)
VH-2: CAG(A/G)TCACCTTGAAGGAGTC (SEQ ID NO:114)
VH-3: (G/C)AGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:115)
VH-4: CAGGTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO:116)
VH-5: GA(G/A)GTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO:117)
VH-6: CAGGTACAGCTGCAGCAGTC (SEQ ID NO:118)

Vk-1: CG(A/C)CATCC(A/G)G(A/T)TGACCCAGT (SEQ ID NO:119)

Vk-2: CGAT(A/G)TTGTGATGAC(C/T)CAG (SEQ ID NO:120)

Vk-3: CGAAAT(T/A)GTG(T/A)TGAC(G/A)CAGTCT (SEQ ID NO:121)

Vk-4: CGACATCGTGATGACCCAGT (SEQ ID NO:122)

Vl-1: CCAGTCTGTGCTGACTCAGC (SEQ ID NO:123)

Vl-2: CCAGTCTGCCCTGACTCAGC (SEQ ID NO:124)

Vl-3: CTCCTATGAGCTGAC(T/A)CAGC (SEQ ID NO:125)

CgIII: GAC(C/G)GATGGGCCCTTGGTGGA (SEQ ID NO:126)

CkIII: AAGATGAAGACAGATGGTGC (SEQ ID NO:127)

ClIII: GGGAACAGAGTGACCG (SEQ ID NO:128)

The primers and PCR cycling conditions used in PCR one and PCR two are adapted from Wang and Stollar et al. (journal of immunological methods2000).

An alternate heavy chain variable region forward primer set was developed to cover heavy chain variable region sequences potentially not adequately covered by the above primer set. The following alternate primers were generated:

PCR One

VHL1-58: TCACTATGGACTGGATTTGGA (SEQ ID NO:129)

VHL2-5: CCATGGACA(C/T)ACTTTG(C/T)TCCAC (SEQ ID NO:130)

VHL3-7: GTAGGAGACATGCAAATAGGGCC (SEQ ID NO:131)

VHL3-11: AACAAAGCTATGACATATAGATC (SEQ ID NO:132)

VHL3-13.1: ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGGGTT (SEQ ID NO:133)

VHL3-13.2: AGTTGTTAAATGTTTATCGCAGA (SEQ ID NO:134)

VHL3-23: AGGTAATTCATGGAGAAATAGAA (SEQ ID NO:135)

VHL4-39: AGAACATGAAGCA(C/T)CTGTGGTTCTT (SEQ ID NO:136)

VHL4-61: ATGGACTGGACCTGGAGCATC (SEQ ID NO:137)

VHL-9: CCTCTGCTGATGAAAACCAGCCC (SEQ ID NO:138)

PCR Two

VH1-3/18: CAGGT(C/T)CAGCT(T/G)GTGCAGTC (SEQ ID NO:139)

VH1-45/58: CA(A/G)ATGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO:140)

VH2-5: CAG(A/G)TCACCTTGA(A/G)GGAGTCTGGT (SEQ ID NO:141)

VH3-9/23/43: GA(A/G)GTGCAGCTG(T/G)TGGAGTC (SEQ ID NO:142)
VH3-16: GAGGTACAACTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:143)
VH3-47: GAGGATCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:144)
V4-34: CAGGTGCAGCTACAGCAGTG (SEQ ID NO:145)
V4-30-2/ 39: CAGCTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO:146)
VH7-4-1: CAGGTGCAGCTGGTGCAATC (SEQ ID NO:147)

Briefly, 2ul cDNA generated via mRNA amplification was used as a template for first-round PCR, with the following cycling conditions: 3 cycles of preamplification (94°C/45 seconds, 45°C/45 seconds, 72°C/105 seconds); 30 cycles of amplification (94°C/45 seconds, 50°C/45 seconds, 72°C/105 seconds); 10 minutes of final extension at 72°C.

3ul of first-round PCR product served as a template for the second round of nested PCR. The same cycling conditions were used for the first round of PCR, but the 3 cycles of preamplification were omitted. Both PCR steps were performed by the use of cloned Pfu polymerase AD (Agilent Technologies). PCR products were separated on 1% agarose gels and products of 300-400 nucleotides in size isolated with the use of Zymoclean DNA gel recovery kit (Zymo Research). Sequencing was performed by the use of forward and reverse primers used for the second-round nested PCR. A two-step nested PCR amplifies the BCR variable domains of heavy and light chains (see above). Peripheral blood mononuclear cells were obtained from advanced stage melanoma patients who had been vaccinated with autologous tumor cells transduced with a GM-CSF expression vector (GVAX) (PNAS 103: 9190, 2006). The antibodies were expressed as full-length IgG1 antibodies in a transient CHO-S expression system.

Validation of anti-MICA antibody binding to MICA was performed using two independent bead-based assays. The first assay used a commercially available solution-based bead assay kit designed for detection of anti-MICA antibodies reactive to a variety of MICA alleles (One Lambda, catalog number LSMICA001). Varying concentrations of the MICA antibody were incubated with beads, then washed, and incubated with an anti-human IgG antibody conjugated with phycoerythrin. Following a

second wash step, beads were analyzed on a Luminex machine. A negative control consisted of incubation of beads with anti-human IgG antibody conjugated with phycoerythrin alone (no anti-MICA antibody). A positive control consisted of incubation of beads with a commercially available anti-MICA/MICB monoclonal antibody (clone 6D4) directly conjugated to phycoerythrin (BioLegend catalog #320906). The second assay was developed internally using polystyrene beads conjugated with streptavidin. Beads were coated with monobiotinylated MICA protein, and incubated with varying concentrations of anti-MICA antibody, anti-TTCF antibody (isotype negative control), or BioLegend anti-MICA/MICB antibody directly conjugated to phycoerythrin (positive control). Beads incubated with anti-MICA antibody or anti-TTCF antibody were washed and then incubated with anti-human IgG antibody conjugated with Alexa488. To determine background binding to the beads, the same incubation was performed using streptavidin-conjugated beads not coated with MICA protein for comparison. Beads were analyzed for binding to antibodies on a FACS Caliber flow cytometer.

As shown in FIGs. 24 and 25, anti-MICA antibodies (MICA-Ab12 and MICA-Ab20) bind with high affinity to MICA. MICA-Ab20 corresponds to the anti-MICA antibody ID-1 described in Table 1.

Example 6: Anti-MICA Antibodies

Additional anti- MICA antibodies with clinically relevant biological properties were developed using the methods herein. MICA-specific antibodies reactive to common alleles were identified in patients who had received a cellular cancer vaccine (GM-CSF transduced cancer cells, referred to as GVAX) and an antibody that blocks the inhibitory CTLA-4 receptor on T cells ipilimumab (YERVOY™ (available from Bristol Myers Squib)). MICA tetramers were then used to isolate B cells from peripheral blood mononuclear cells of patients with the highest serum MICA reactivity. Heavy and light chain sequences were determined from these B cells by single cell PCR, as outlined in the in Example 5. This effort led to the identification of antibodies that recognize alleles common in the North American population.

CM24002 Ab2 (anti-MICA antibody ID-6 described in Table 1) is an antibody isolated from a patient with acute myeloid leukemia (AML) who demonstrated a significant clinical response to the GVAX + Ipilimumab combination therapy and whose plasma reacted strongly with MICA. The CM24002 Ab2 light chain (FIGs. 30 and 31) and heavy chain (FIGs. 28 and 29) nucleotide and amino acid sequences are shown, with CDR1, CDR2 and CDR3 sequences underlined. An additional antibody with strong binding was obtained from the same patient and is labeled as CM24002 Ab4 (anti-MICA antibody ID-7 described in Table 1) The CM24002 Ab4 light chain (FIGs. 34 and 35) and heavy chain (FIGs. 23 and 32) nucleotide and amino acid sequences are shown, with CDR1, CDR2 and CDR3 sequences underlined.

CM33322 Ab11 (anti-MICA antibody ID-8 described in Table 1) and CM33322 Ab29 (anti-MICA antibody ID-9 described in Table 1) are antibodies isolated from a patient with metastatic melanoma who is a long-term responder (>15 years) to the GVAX + Ipilimumab combination therapy. The CM33322 Ab11 light chain ((FIGs. 38 and 39) and heavy chain (FIGs. 36 and 37) nucleotide and amino acid sequences are shown, with CDR1, CDR2 and CDR3 sequences underlined. The CM33322 Ab29 light chain ((FIGs. 42 and 43) and heavy chain (FIGs. 40 and 41) nucleotide and amino acid sequences are shown, with CDR1, CDR2 and CDR3 sequences underlined. Due to the long-term clinical response of this patient, these antibodies are of particular interest.

After initial identification, cloning, and expression of the antibodies of interest, the specificity of these antibodies for different MICA alleles was determined with a cytometric bead assay. Briefly, soluble, recombinant MICA alleles 002, 008, 009 and MICB with a single BirA biotinylation site were expressed, purified, and captured on streptavidin beads. Indicated anti-MICA antibodies were then incubated with the beads coated with recombinant MICA at different concentrations for one hour, then washed, and incubated with a FITC-labeled anti-human IgG secondary antibody. Following a second wash step, quantification of bead-bound FITC fluorescence was completed by flow cytometry. MICA alleles 002, 008, 009 as well as the related MICB protein were chosen based on their prevalence in the North American population (FIG. 48). MICA alleles 002, 008, 009 as well as the related MICB protein were also chosen based on their generally

high prevalence worldwide. Importantly, CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29 bound strongly to all MICA alleles as well as to MICB. The other two antibodies bound to a subset of alleles: CM24002 Ab4 bound highly to MICA*009 and MICB, and CM33322 Ab11 bound highly to MICA*002, MICA*008, and MICB. (FIGs. 48A-F) Specificity was documented by use of a negative human control antibody generated with the same technology (specific for tetanus toxoid C-terminal fragment, TTCF) and a positive control antibody to MICA (a commercial murine antibody from BioLegend directed against MICA). These studies identified CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29 as potential candidates for clinical application.

Example 7: Binding of Anti-MICA Antibody to Autologous Tumor Cells

The ability of isolated anti-MICA antibody CM24002 Ab2 to bind to autologous tumor cells was examined by flow cytometry (FIG. 49). Bone marrow obtained from patient CM24002 and tested binding to tumor cells by CM24002 Ab2. Tumor cells were then identified from the bone marrow sample as CD33+ CD34+ cells. The tumor cells were then stained with 10 μg/ml with anti-MICA antibody CM24002 Ab2, positive control commercial MICA antibody (BioLegend) or a negative control antibody (TTCF specific). As shown in FIG. 49, CM24002 Ab2 strongly bound to these cells. CM24002 Ab2 did not display binding to non-tumor cells (CD16+ and CD3+ cells) and only background binding to CD14+ cells, demonstrating anti-tumor specificity (data not shown).

Example 8. Anti-MICA Antibody Inhibition of NKG2D Receptor on NK Cells.

The ability of isolated anti-MICA antibody CM24002 Ab2 to prevent soluble MICA-mediated down-regulation of is cognate receptor, NKG2D was examined. Serum from patient CM24002 was used at a 1:10 dilution and incubated with human NK cells for a period of 48 hours. CM24002 Ab2 (concentration of 10μg/ml), positive control commercial MICA antibody (BioLegend) or a negative control antibody (TTCF specific) were added to these cultures. NKG2D expression was assessed by flow cytometry at 48hr (FIG. 50). Serum from patient CM24002 strongly down-regulated expression of

NKG2D (thus disabling the function of this receptor). CM24002 Ab2 and the positive control MICA antibody partially restored NKG2D surface expression by NK cells. To demonstrate specificity, we repeated the above experiment by incubating cells with recombinant MICA at 2ng/ml instead of patient serum (FIG. 51). CM24002 Ab2 completely prevented MICA-mediated down-regulation of NKG2D expression, while the negative control antibody (specific for TTCF) had no effect (FIG. 51). These data demonstrate that human MICA antibodies can prevent inhibition of the critical NKG2D receptor on human NK cells.

Example 9: Anti-MICA Antibody Cell-Mediated Cytotoxicity

To determine if CM24002 Ab2 enables cell-mediated cytotoxicity, human NK cells (effector cells) were incubated for 48 hours with recombinant MICA (2ng/ml) in the presence of CM24002 Ab2, a negative control antibody (TTCF specific) or a positive control antibody (BioLegend), all at 10μg/ml. After 48 hours, cells were washed and incubated with K562 tumor cells at 20:1, 10:1, and 5:1 effector:target ratios for 4 hours. Specific lysis of target cells by NK cells was determined by release of a cytosolic protein (LDH) from K562 tumor cells. In the absence of MICA antibodies, there was no killing of K562 tumor cells by NK cells. However, CM24002 Ab2 greatly enhanced NK cell mediated lysis of K562 tumor cells and was more effective than the positive control murine MICA antibody at all effector:target ratios (FIG. 52). It was further demonstrated that killing of K562 tumor cells was indeed mediated by the NKG2D pathway (rather than Fc receptors). The above experiment was repeated, with the addition two experimental groups: a blocking antibody for NKG2D and human Fc block. In addition, CM33322 Ab29 was also tested. The data show that addition of CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29 enabled NK cell mediated cytotoxicity. Killing of K562 cells did not occur when a blocking NKG2D antibody was added, while the Fc blocking reagent had little effect (FIG. 53). These data show that CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29 restore the anti-tumor function of the NKG2D pathway.

Example 10: Binding of Anti-MICA Antibody to Alpha 3 MICA domain

The NKG2D receptor binds to the top alpha 1 and alpha 2 domains of MICA, and antibodies that bind to the same site may compete with the NKG2D receptor and thereby block killing of tumor cells by NK cells. Antibodies that bind to the alpha 3 domain are of particular interest because they cannot block NKG2D receptor binding. At the same time, such antibodies can interfere with proteolytic cleavage of MICA from the tumor cell surface. The ability of anti-MICA antibodies to the MICA alpha 3 domain was assessed using the previously described cytometric bead assay. The biotinylated recombinant protein was captured on streptavidin beads. Beads were then incubated with antibodies CM24002 Ab2, CM24002 Ab4, CM33322 Ab11, CM33322 AB29, a negative control antibody (TTCF specific) or a positive control antibody (BioLegend), at 10μg/ml followed by a FITC-labeled anti-human IgG secondary antibody and quantification of bead-bound FITC fluorescence by flow cytometry (FIG. 54). As shown in FIG. 54, CM33322 Ab29 bound to the MICA alpha 3 domain and is therefore of great interest for therapeutic applications.

Example 11: Binding of Anti-MICA Antibody to Tumor Cells

The potential of CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29 to be used to target a broad range of cancers was assessed. A panel of multiple myeloma (RPMI 8226 and Xg-1), ovarian cancer (OVCAR3), acute myeloid leukemia (U937), melanoma (K028), lung cancer (1792 and 827), and breast cancer (MCF7) cells were tested for labeling by CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29. The tumor cells were resuspended at a concentration of $1x10^6$ cells/ml in PBS with 1% BSA and stained with the CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29, as well as positive and negative controls (murine MICA antibody and TTCF-specific antibody, respectively)(directly conjugated) at a concentration of 10 μg/ml for 1 hour at 4°C. Labeling was assessed by flow cytometry (FIG. 55). CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29 both bound every tumor cell type tested, with labeling being greater than the commercial positive control for the majority of tested cell lines.

Example 11: MICA Allele Specificity of Anti-MICA antibody

The allelic specificity of CM33322 Ab29 was assessed using a commercially available Luminex assay. The commercial test kit contains recombinant MICA alleles (MICA*001, *002, *007, *012, *017, *018, *027, *004, *009, and*015) directly conjugated to Luminex beads, each with intrinsic fluorescent properties enabling binding to be assessed in a single sample. Luminex beads coated with the indicated MICA alleles were incubated with CM33322 Ab29, BioLegend positive control, and the negative control (TTCF), at 10 μg/ml for 1 hr, with subsequent incubation with PE-conjugated anti-human IgG secondary antibody. Fluorescence was determined following incubation for 60 minutes with the indicated antibodies and subsequent incubation with anti-human PE-conjugated secondary antibody using a Luminex 200 instrument (FIG. 56). CM33322 Ab29 was able to bind to all alleles present in the commercial assay, indicating that it may be used in patients regardless of MICA genotype.

These data demonstrate the high biological activity of CM24002 Ab2 and CM33322 Ab29 and their ability to restore NK cell mediated lysis of tumor cells. These data demonstrate that cancer patients who responded to immunotherapies produced MICA antibodies that restored the anti-tumor activity of NK cells. Together, these results highlight the therapeutic potential of anti-MICA antibodies to overcome immune suppression and promote tumor destruction in cancer patients.

Example 12: Obtaining Anti-Angiopoietin-2 Antibodies

Antibodies that bind to angiopoietin-2 were developed using the methods herein. Briefly, biotinylated angiopoietin-2 (UniGene Hs.583870) was purchased from R&D Systems. Peripheral blood mononuclear cells were quickly thawed, washed and resuspended at $5x10^6$ in phosphate buffered saline (pH 7.2) supplemented with 2% fetal calf serum and stained with approximately 0.5ug/ml angiopoietin-2 for 30 minutes on ice. Cells were washed twice with 4ml PBS/2% FCS. Then antibodies were added to identify class-switched, memory B-cells (CD19+, CD27+, and IgM-) as well as SA-PE to label B-cells with biotinylated angiopoietin on the surface. A panel of exclusion antibodies labeling T-cells, natural killer-cells, marcrophages, and dead cells were included to

reduce background tetramer staining (CD3, CD14, CD16, 7-AAD). Single B-cells that bound to angiopoietin-2 were sorted into 8-tube-PCR strips using the BD FACS Aria II. The B-cell receptor (BCR) mRNA was amplified using a commercial kit from Epicentre Biotechnologies (catalog number: MBCL90310) using gene specific primers (see above). A two-step nested PCR amplifies the BCR variable domains of heavy and light chains (see above). Peripheral blood mononuclear cells were obtained from a patient with malignant non-small cell lung carcimonnoma who had been vaccinated with autologous tumor cells transduced with a GM-CSF expression vector (GVAX) (Cancer Res. 70: 10150, 2010). The antibodies were expressed as full-length IgG1 antibodies in a transient CHO-S expression system.

Validation of anti-angiopoietin-2 antibodies binding to angiopoietin-2 was performed using ELISA assays. Briefly, angiopoietin-2 was coated overnight at 4μg/ml in 100mM sodium bicarbonate buffer pH 9.6 in 96-well flat bottom plates (PerkinElmer) at 4°C. Plates were blocked with assay buffer containing bovine serum albumin and bovine gamma globulins (PerkinElmer) at room temperature for three hours. Antibodies were diluted in assay buffer at 20ug/ml-0.16ug/ml and incubated for 1 hour at 4°C. Plates were washed three times with 200μl wash buffer (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 20mM EDTA, 0.05% Tween). 100μl enhancement solution (PerkinElmer) was added to each well and fluorescence counts measured using a Victor3 plate reader (PerkinElmer) at a wavelength of 615nm. Human angiopoietin-1 and -4 was also tested for binding and showed similar reactivity.

Relevant data is shown in FIGs. 27A-27C, that provide graphs and a gel relating to isolation of angiopoietin-specific antibodies from a lung cancer patient. (A) Angiopoietin-2 reactivity of lung cancer patient (L19) serum (diluted 1:1000) determined by ELISA. Dates of serum collection are shown on the X-axis. The control protein bovine serum albumin (BSA) was included as a negative control. (B) FACS plot showing PBMC sample (timepoint- 10/98) gated on CD19+, CD27+ IgM-B cells with CD19 on the X-axis and fluorescently-tagged angiopoietin-2 on the Y-axis. The gate indicates approximately where the sorting cut-off was made. Ten B-cells were sorted from this sample. (C) Heavy, light chain, and hinge region PCR products from 10

angiopoietin-2 reactive memory B-cells isolated from pateitn L19. Heavy (top) and light (bottom) chain PCR products after two rounds of nested PCR of approximately 350 base pairs.

Example 13: Binding of Anti-Angiopoietin-2 Antibodies Against Human Recombinant Angiopoietin Family Members

96 well plates were coated overnight with 4 μg/mL recombinant angiopoietin-1, -2, and -4 (R&D Systems) in sodium bicarbonate buffer at pH9.6. Plates were subsequently blocked for 3 hours at room temperature with assay buffer (Perkin Elmer) containing bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma-globulins. Antibodies ID 2, 3, 4, and 5 (see Table 1), diluted between 20 μg/mL-0.16 μg/mL, were incubated on plates for 1 hour at 4°C with rotation. Plates were subsequently washed before being incubated with anti-human IgG-Europium antibody (Perkin Elmer). Fluorescent counts at 615 nm were obtained via plate reader. A negative control antibody (clone 8.18.C5) was used to determine specificity. Data was determined in duplicate.

As shown in FIGs. 26A-26C, antibodies ID 2, 3, 4, and 5 (see Table 1)bind with high specificity to angiopoietin-1 -2, and -4. Antibodies do not bind to Ang-like-3, a structurally-related protein (*see* FIG. 26D).

An additional anti- angiopoietin antibody, designated anti-Ang2 Ab6 (anti-MICA antibody ID-10 described in Table 1) with clinically relevant biological properties were developed using the methods herein. Binding of anti-Ang2 Ab6 to human recombinant angiopoietin family members was analyzed as described above. Briefly, ELISA plates were coated with 4 μg/ml of angiopoietins Ang-1, Ang-2, Ang4, and Ang-like-3 binding, and detection by anti-Ang2 Ab6 was tested at 20 μg/ml. 4 μg/ml, 0.8 μg/ml, and 0.16 μg/ml. Europium conjugated anti-human IgG secondary was used, with europium counts measured after 45 minutes. As shown in FIG. 57, anti-Ang2 Ab6 binds to all angiopoietins in a dose dependent manner.

OTHER EMBODIMENTS

It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate

and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition comprising a peptide that immunospecifically binds to MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA), wherein the peptide comprises complementarity determining region (CDR) 3 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and CDR3 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions.

2. The composition of claim 1, wherein the peptide comprises complementarity determining region (CDR) 3 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, and CDR3 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1.

3. The compositions of any one of claims 1-2, wherein the peptide comprises CDR2 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or CDR2 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or both.

4. The composition of claim 3, wherein the peptide comprises complementarity determining region CDR2 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, or CDR2 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, or both.

5. The compositions of any one of claims 1-4, wherein the peptide comprises CDR1 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or CDR1 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or both.

6. The composition of claim 5, wherein the peptide comprises complementarity determining region CDR1 of the V_H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, or CDR1 of the V_L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1, or both.

7. The composition of any one of claims 1-6, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising:

a V_H chain with identity to SEQ ID NO:2, 149, 168, 186, or 204, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID-1, 6, 7, 8 or 9 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:2, 149, 168, 186, or 204 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID-1, 6, 7, 8 or 9 shown in table 1; and

a V_L chain with identity to SEQ ID NO:11, 151, 170, 189, or 206 wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody 1 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:11 151, 170, 189, or 206 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody 1 shown in table 1.

8. The composition of claim 7, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:2, 149, 168, 186, or 204 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:11, 151, 170, 189, or 206.

9. The composition of any one of claims 1-8 further comprising an anti-cancer therapeutic.

10. The composition of any one of claims 1-9, formulated as a pharmaceutical composition.

11. A composition comprising a peptide that immunospecifically binds to angiopoietin, wherein the peptide comprises complementarity determining region (CDR)

3 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and CDR3 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4 or 5 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions.

12. The composition of claim 11, wherein the peptide comprises complementarity determining region (CDR) 3 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1, and CDR3 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1.

13. The compositions of any one of claims 11-12, wherein the peptide comprises CDR2 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4, or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or CDR2 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or both.

14. The composition of claim 13, wherein the peptide comprises complementarity determining region CDR2 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1, or CDR2 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1, or both.

15. The compositions of any one of claims 11-14, wherein the peptide comprises CDR1 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or CDR1 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, or both.

16. The composition of claim 15, wherein the peptide comprises complementarity determining region CDR1 of the V_H of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1, or CDR1 of the V_L of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1, or both.

17. The composition of any one of claims 11-16, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising:

a V_H chain with identity to SEQ ID NO:20, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 2

shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:20 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 2 shown in table 1; and

a V_L chain with identity to SEQ ID NO:29, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 2 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:29 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 2 shown in table 1.

18. The composition of claim 17, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:20 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:29.

19. The composition of any one of claims 11-16, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising:

a V_H chain with identity to SEQ ID NO:38, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 3 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:38 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 3 shown in table 1; and

a V_L chain with identity to SEQ ID NO:47, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 3 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:47 corresponding to

FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 3 shown in table 1.

20. The composition of claim 19, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:38 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:47.

21. The composition of any one of claims 11-16, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising:

a V_H chain with identity to SEQ ID NO:56, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID 4 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:56 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID 4 shown in table 1; and

a V_L chain with identity to SEQ ID NO:65, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID 4 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:65 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID 4 shown in table 1.

22. The composition of claim 21, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:56 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:65.

23. The composition of any one of claims 11-16, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising:

a V_H chain with identity to SEQ ID NO:74, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID-5 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:74 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID-5 shown in table 1; and

a V_L chain with identity to SEQ ID NO:83, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID-5 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:83 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID-5 shown in table 1.

24. The composition of claim 23, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:74 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:83.

25. The composition of any one of claims 11-24, wherein the peptide immunospecifically binds to angiopoietin-2.

26. The composition of any one of claims 11-25 further comprising an anti-cancer therapeutic.

27. The composition of any one of claims 11-26, formulated as a pharmaceutical composition.

28. A method of treating cancer in a subject, the method comprising administering to a subject a composition of any one of claims 1-27.

29. The composition of any one of claims 11-16, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising:

a V_H chain with identity to SEQ ID NO:222, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_H of antibody ID-10 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:74 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_H of antibody ID-10 shown in table 1; and

a V_L chain with identity to SEQ ID NO:224, wherein regions corresponding to CDR1, CDR2, and CDR3 comprise CDR1, CDR2, and CDR3 of the V_L of antibody ID-10 shown in table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions within the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, and regions within SEQ ID NO:224 corresponding to FR1, FR2, FR3, FR4, comprise amino acid sequences with at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, or 100% identity to FR1, FR2, FR3, FR4 of the V_L of antibody ID-10 shown in table 1.

30. The composition of claim 23, wherein the peptide is an antibody or antibody fragment comprising a V_H chain comprising SEQ ID NO:222 and a V_L chain comprising SEQ ID NO:224.

31. The composition of any one of claims 1-8 and 11-16 further comprising an histone deacetylase inhibitor (HDAC) selected from the group consisting of hydroxamic acid, vorinostat, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, trichostatin A (TSA), LAQ824, panobinostat (LBH589), belinostat (PXD101), ITF2357 italfarmaco SpA, cyclic tetrapeptide, depsipeptide (romidepsin, FK228), benzamide; entinostat (SNDX-

275/MS-275), MGCD0103, short-chain aliphatic acids, valproic acid, phenyl butyrate, AN-9, pivanex, CHR-3996, and CHR-2845.

32. The composition of any one of claims 1-8 and 11-16 further comprising a proteasome inhibitor selected from the group consisting of bortezomib, NPI-0052, carfilzomib (PR-171), CEP 18770, and MLN9708.

33. A method of obtaining immune cells directed against a self antigen from a subject, the method comprising

identifying a subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen;

providing a multimeric form of the self antigen ;

contacting the multimeric form of the self antigen with a sample from the subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen; and

obtaining immune cells bound to the multimeric form of the self antigen.

34. A method of obtaining immune cells from a cancer patient directed against a self antigen, the method comprising

identifying a subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen;

providing a multimeric form of the self antigen ;

contacting the multimeric form of the self antigen with a sample from the subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen; and

obtaining immune cells bound to the multimeric form of the self antigen.

35. The method of any one of claims 33- 34, wherein the multimeric form of the self antigen is a tetrameric form of the self antigen.

36. The method of claim 35, wherein the multimeric form of the self antigen comprises a detectable moiety.

37. The method of claim 33, wherein the subject is a mammal.

38. The method of claim 37, wherein the subject is a human.

39. The method of claim 33, wherein the sample if from a human subject.

40. The method of claim 33, wherein the self antigen relates to condition or disease.

41. The method of claim 33, wherein the self antigen relates to cancer.

42. The method of claim 40, wherein the condition or disease is a cancer selected from the group consisting of melanoma, lung, breast, kidney, ovarian, prostate, pancreatic, gastric, and colon carcinoma, lymphoma or leukemia.

43. The method of any one of claims 33-34, wherein the self antigen is MHC class I chain-related protein A (MICA).

44. The method of any one of claims 33-34, wherein the self antigen is an angiopoietin.

45. The method of any one of claims 33-34, wherein the immune cell is a memory B-cell.

46. The method of any one of claims 33-34, wherein the self antigen is a cancer specific self antigen.

47. The method of claim 33, wherein the subject is a cancer patient.

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGGCCCTCACCTGCGCTGTCTCT
GGTGGGGTCCTTCACTGATCATTACTGGAGTTGGATCCGTCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGAA
ATCAATCATAGTGGAGTCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGACTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAG
AGCCAGTTCTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTCTGTACTACTGTGCGAAAACTGGCCTG
TATTATGATGACGTTTTGGGGGACTTTTCGTCCACGGGGCGGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 1)

FIG. 1

Q	V	Q	L	Q	Q	W	G	A	G	L	L	K	P	S	E	T	L	A	L	T	C	A	V	S
G	G	S	F	T	D	H	Y	W	S	W	I	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	G	E
I	N	H	S	G	V	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	T	I	S	V	D	T	S	K
S	Q	F	S	L	R	L	T	S	V	T	A	A	D	T	A	L	Y	Y	C	A	K	T	G	L
Y	Y	D	D	V	W	G	T	F	R	P	R	G	G	F	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T
V	S	S	(SEQ ID NO: 2)																					

FIG. 2

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCGGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCC
AGCCAGAGTATTTTATATAGCTCCGACAATAAGAATTACTTAGCTTGGTACCAGCAGCACAAGGCAGGACAGCCTCCT
AAGCTGCTCTTTACTGGGCATCTATCCGGGAATCCGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCGGGTCTGGGACA
GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTCCT
CCTTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCCAA (SEQ ID NO: 10)

FIG. 3

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S
S Q S I L Y S S N K N Y L A W Y Q H K P G Q P P
K L L F Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T
D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S P
P C S F G Q G T K L E I Q (SEQ ID NO: 11)

FIG. 4

```
1    GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
61   TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGT AGTTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
121  CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTTATTGGA GTGGTGGTAG CACATACTAC
181  GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA TATCCAAGAA CACGCTGTAT
241  CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCCGACGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGGCGAT
301  TACTATGGTT CGGGGGCTCA CTTTGACTAC TGGGGCCAGG GAACCCTGGT CACCGTCTCC
361  TCA    (SEQ ID NO: 19)
```

FIG. 5

```
1    EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
21   SCAASGFTFS SYAMSWVRQA CDR1
41   PGKGLEWVSG IYWSGGSTYY CDR2
61   ADSVKGRFTI SRDISKNTLY
81   LQMNSLRADD TAVYYCARGD CDR3
101  YYGSGAHFDY WGQGTLVTVS
121  S    (SEQ ID NO: 20)
```

FIG. 6

```
1    GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCC TCACCTGTCA CCCTTGGACA GCCGGCCTCC
61   ATCTCCTGCA GGTCTAGCCA AAGCCTCGTA CACAGTGATG GAAACACCTA CTTGAGTTGG
121  CTTCAGCAGA GGCCAGGCCA GCCTCCAAGA CTCCTAATTT ATCAGATTTC TAACCGGTTC
181  TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGGCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
241  AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGTCGGGGTT TACTACTGCA TGCAAGGTAC ACAATTTCCT
301  CGGACGTTCG GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAA          (SEQ ID NO: 28)
```

FIG. 7

```
1    DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS
21   ISCRSSQSLV HSDGNTYLSW CDR1
41   LQQRPGQPPR LLIYQISNRF CDR2
61   SGVPDRFSGS GAGTDFTLKI
81   SRVEAEDVGV YYCMQGTQFP CDR3
101  RTFGQGTKVE IK          (SEQ ID NO: 29)
```

FIG. 8

```
1    GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC CGGGGGAGGC TTAGTTCAGC CTGGGGGATC CCTGAGACTC
61   TCCTGTGCAG CCTCAGGGTT CACCTTTAGT AATAACTGGA TGCACTGGGT CCGCCAGGCT
121  CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GATCTCAGAG ATTAGAAGTG ATGGGAATTT CACAAGGTAC
181  GCGGACTCCA TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAG CACACTGTAT
241  TTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGTCGAGGAC ACGGGTCTGT ATTACTGTGC AAGAGACTAC
301  CCCTATAGCA TTGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCCTC A    (SEQ ID NO: 37)
```

FIG. 9

```
1    EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
21   SCAAS GFTFS NNWMHWVRQA CDR1
41   PGKGLEWISE IRSDGNFTRY CDR2
61   ADSMKGRFTI SRDNAKSTLY
81   LQMNSLRVED TGLYYC ARDY CDR3
101  PYSIDYWGQG TLVTVSS    (SEQ ID NO: 38)
```

FIG. 10

```
1       GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCC TCACCTGTCA CCCTTGGACA GCCGGCCTCC
61      ATCTCCTGCA CATCTAGTCA AAGCCTCGTA CACAGTAATG GAAACACCTA CTTGAGTTGG
121     CTTCAGCAGA GGCCAGGCCA GCCCCCAAGA CTCCTAATTT ATGAGATTTC TAAGCGGGTC
181     TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGGCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
241     AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGTCGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGGTAA ACAACTTCGG
301     ACTTTTGGCC AGGGGACCAA GCTGGAGATC AAA
```

(SEQ ID NO: 46)

FIG. 11


```
1       DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS
21      ISCTSSQSLV HSNGNTYLSW CDR1
41      LQQRPGQPPR LLIYEISKRV CDR2
61      SGVPDRFSGS GAGTDFTLKI
81      SRVEAEDVGV YYCMQGKQLR CDR3
101     TFGQGTKLEI K
```

(SEQ ID NO: 47)

FIG. 12

```
1    GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGCTC CGTGAGACTG
61   TCTTGTGCGG CCTCAGGCTT CATTCTTAGC AACTTTGCCA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
121  CCAGGGAAGG GGCTGGACTG GGTCTCAGGT AATTTTGGTG GTCGTGAAAA TACATATTAC
181  GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA GTTCCAAGAG CACACTGTAT
241  CTGCAAATGA ACAATTTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GCGAGGCGAT
301  TACCATGGTT CGGGGGCTCA CTTTGACTAC TGGGGCCAGG GAATACTGGT CACCGTCTCC
361  TCA    (SEQ ID NO: 55)
```

FIG. 13

```
1      EVQLVESGGG LVQPGGSVRL
21     SCAASGFILS NFAMSWVRQA CDR1
41     PGKGLDWVSG NFGGRENTYY CDR2
61     ADSVKGRFTI SRDSSKSTLY
81     LQMNNLRAED TAVYYCARGD CDR3
101    YHGSGAHFDY WGQGILVTVS
121    S      (SEQ ID NO: 56)
```

FIG. 14

```
1    GATATTGTGA TGACCCAGAG TCCACTCTCC TCACCTGTCA TCCTTGGACA GCCGGCCTCC
61   ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA AAGCCTCCTA CACAGTGATG GAAACACCTA CTTGAGTTGG
121  CTTCACCAGA GGCCAGGCCA GCCTCCTAGA CTCCTAATTT ATCAGATTTC TAACCGGTTC
181  TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGACAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
241  AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGCCGGGATT TATTACTGCA TGCAAGGTAC AGAATTTCCT
301  CGGACGTTCG GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAA
```

(SEQ ID NO: 64)

FIG. 15

```
1    DIVMTQSPLS SPVILGQPAS
21   ISCRSSQSLL HSDGNTYLSW CDR1
41   LHQRPGQPPR LLIYQISNRF CDR2
61   SGVPDRFSGS GTGTDFTLKI
81   SRVEAEDAGI YYCMQGTEFP CDR3
101  RTFGQGTKVE IK
```

(SEQ ID NO: 65)

FIG. 16

```
1    GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGATACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
61   TCCTGTGCAA CCTCTGGATT CACCTTTAGA ACTTCTTCCA TGAGTTGGGT CCGTCGGGCT
121  CCAGGGAAGG GGCTGGAATG GGTCTCAGCT ATTGGTGCTG AAAGTCATGA CACGCACTAC
181  ACAGACTCCG CGGAGGGCCG GTTCACCATC TCCAAAGACT ATTCAAAGAA CACAGTATAT
241  CTGCAGATGA ACGGCCTGAG AGTCGACGAC ACGGCCATAT ATTATTGTGC CCATCACTAT
301  TACTATGGCT CGCGGCAGAA ACCCAAAGAT TGGGGAGATG CTTTTGATAT GTGGGGCCAG
361  GGGACAATGG TCTCCGTCTC TTCA          (SEQ ID NO: 73)
```

FIG. 17

```
1    EVQLVESGGG LIQPGGSLRL
21   SCATSGFTFR TSSMSWVRRA CDR1
41   PGKGLEWVSA IGAESHDTHY CDR2
61   TDSAEGRFTI SKDYSKNTVY
81   LQMNGLRVDD TAIYYCAHHY CDR3
101  YYGSRQKPKD WGDAFDMWGQ
121  GTMVSVSS          (SEQ ID NO: 74)
```

FIG. 18

```
1    GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCT GTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CAGAGTCACC
61   ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGATATTAGC ACCTGGTTAA CCTGGTATCA GCAGAGAGCA
121  GGGAAGGCCC CTAACCTCCT GATCTATGGT GCATCCACTT TGGAAGATGG GGTCCCATCC
181  AGGTTCAGCG GCAGTGGATC CGGGACAGAT TTCACTCTCA CTATCGACAG CCTGCAGCCT
241  GACGATTTTG CAACTTACTA TTGTCAACAG TCTCACAGTT TCCCCTACAC TTTTGGCCAG
301  GGGACCCAGC TGGGGATCTC A          (SEQ ID NO: 82)
```

FIG. 19

```
1    DIQMTQSPSS VSASVGDRVT
21   ITCRASQDIS TWLTWYQQRA CDR1
41   GKAPNLLIYG ASTLEDGVPS CDR2
61   RFSGSGSGTD FTLTIDSLQP
81   DDFATYYCQQ SHSFPYTFGQ CDR3
101  GTQLGIS          (SEQ ID NO: 83)
```

FIG. 20

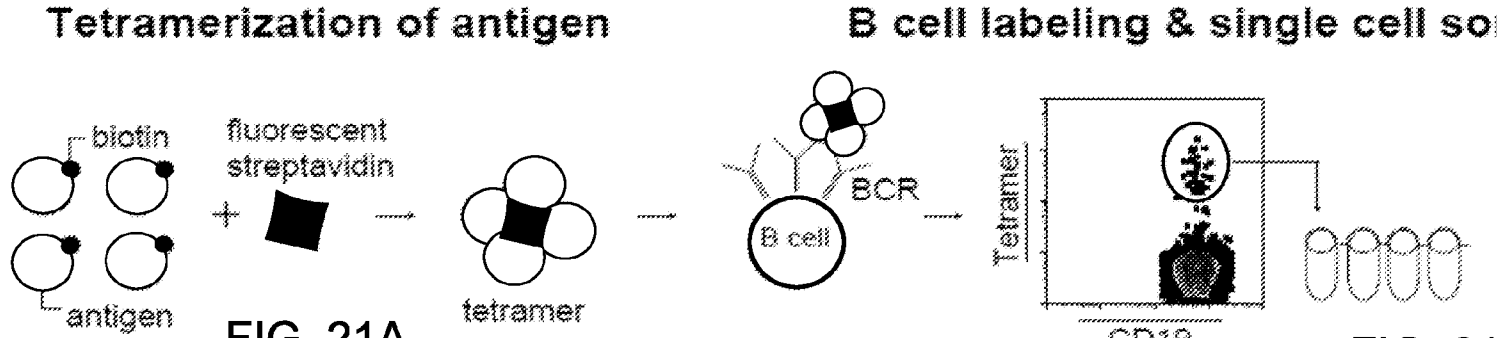


FIG. 21A

FIG. 21B

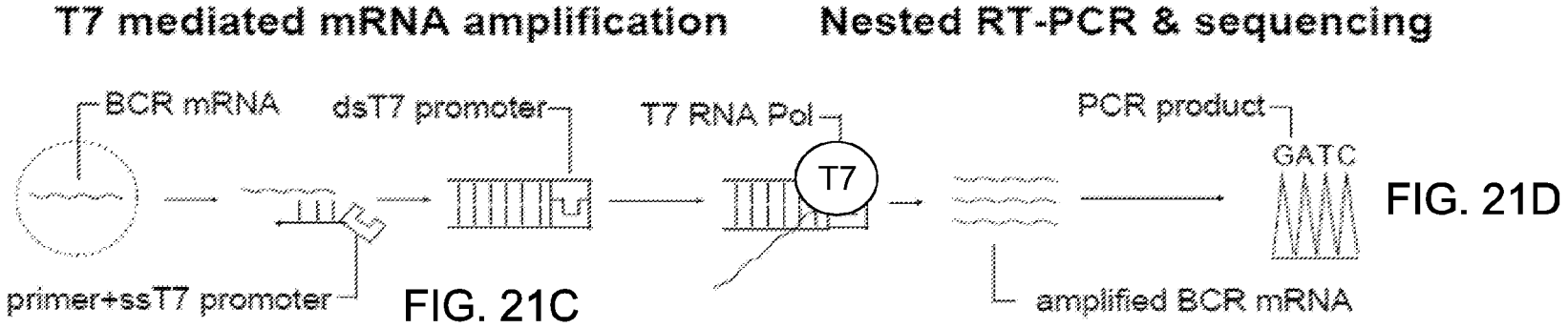


FIG. 21C

FIG. 21D

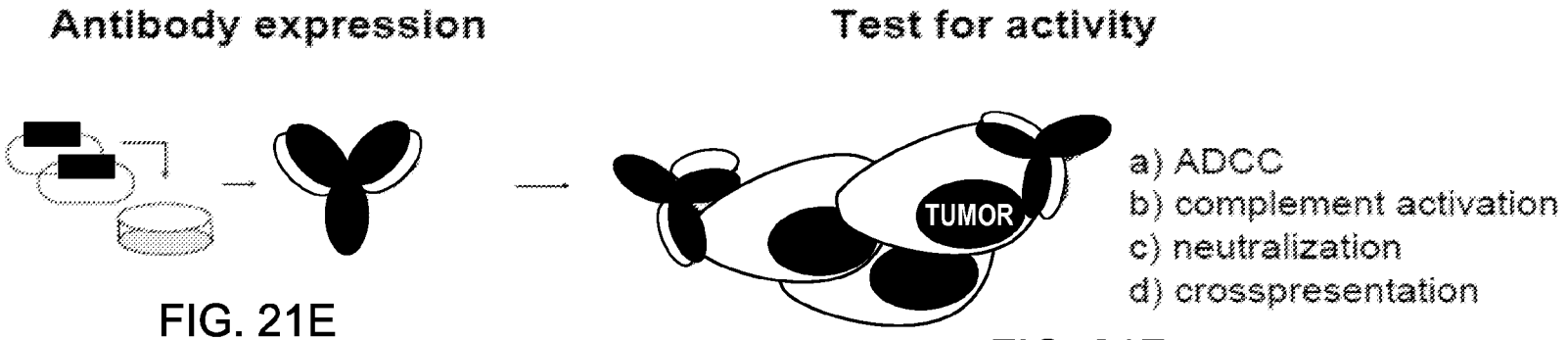


FIG. 21E

FIG. 21F

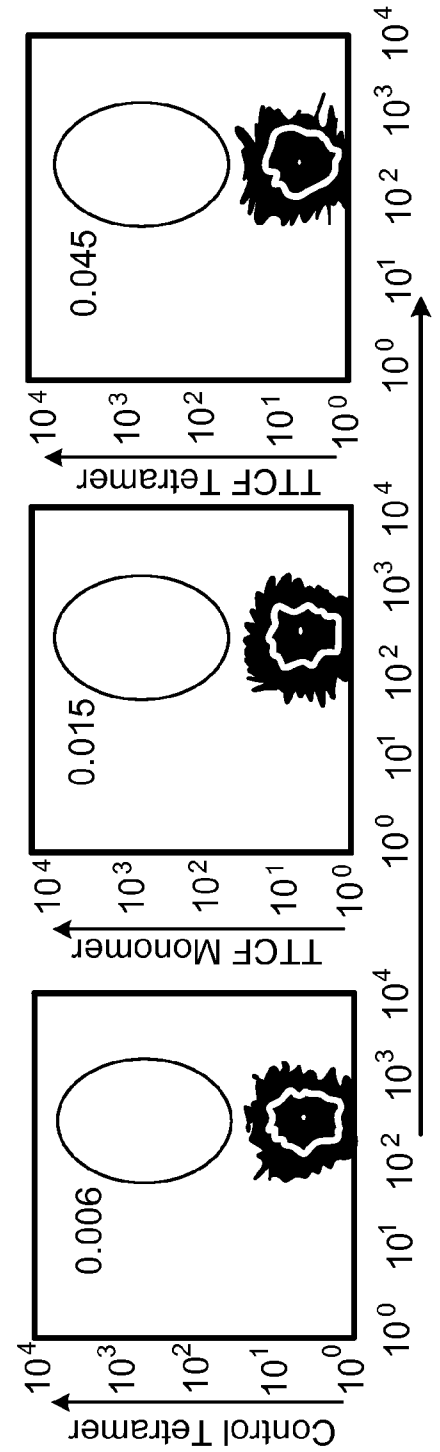


FIG. 22A

	Control Tet/ 10^5 B cells	TTCF Moncmen/ 10^4 B cells	TTCF Tet/# 10^4 B cells	#Tet/#Mono Foldchange
Donor 1	3.98	2.53	18.41	7.3
Donor 2	15.03	38.64	117.18	3.1
Donor 3	4.14	48.92	77.55	1.6

FIG. 22B

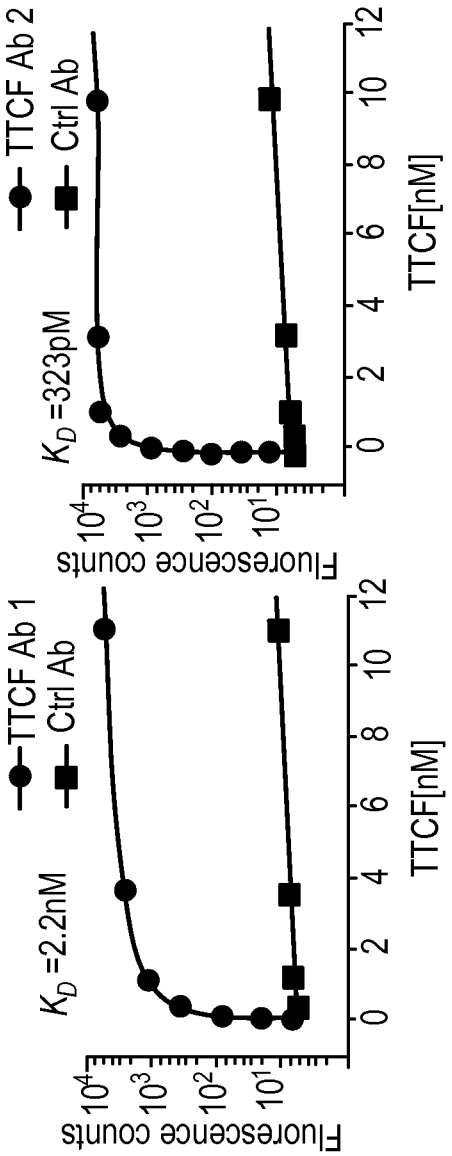


FIG. 23A

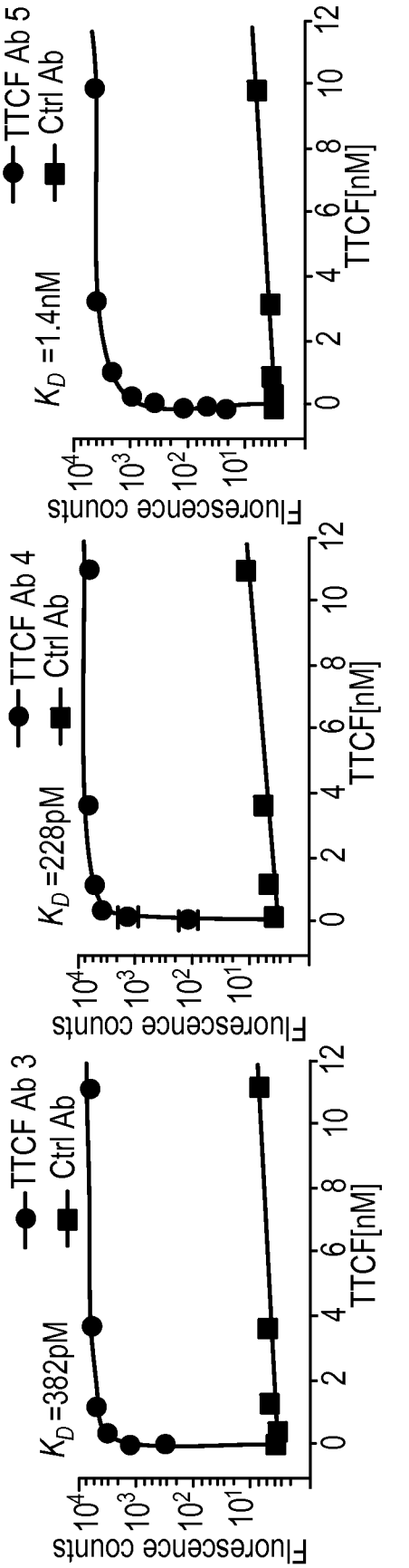


FIG. 23B

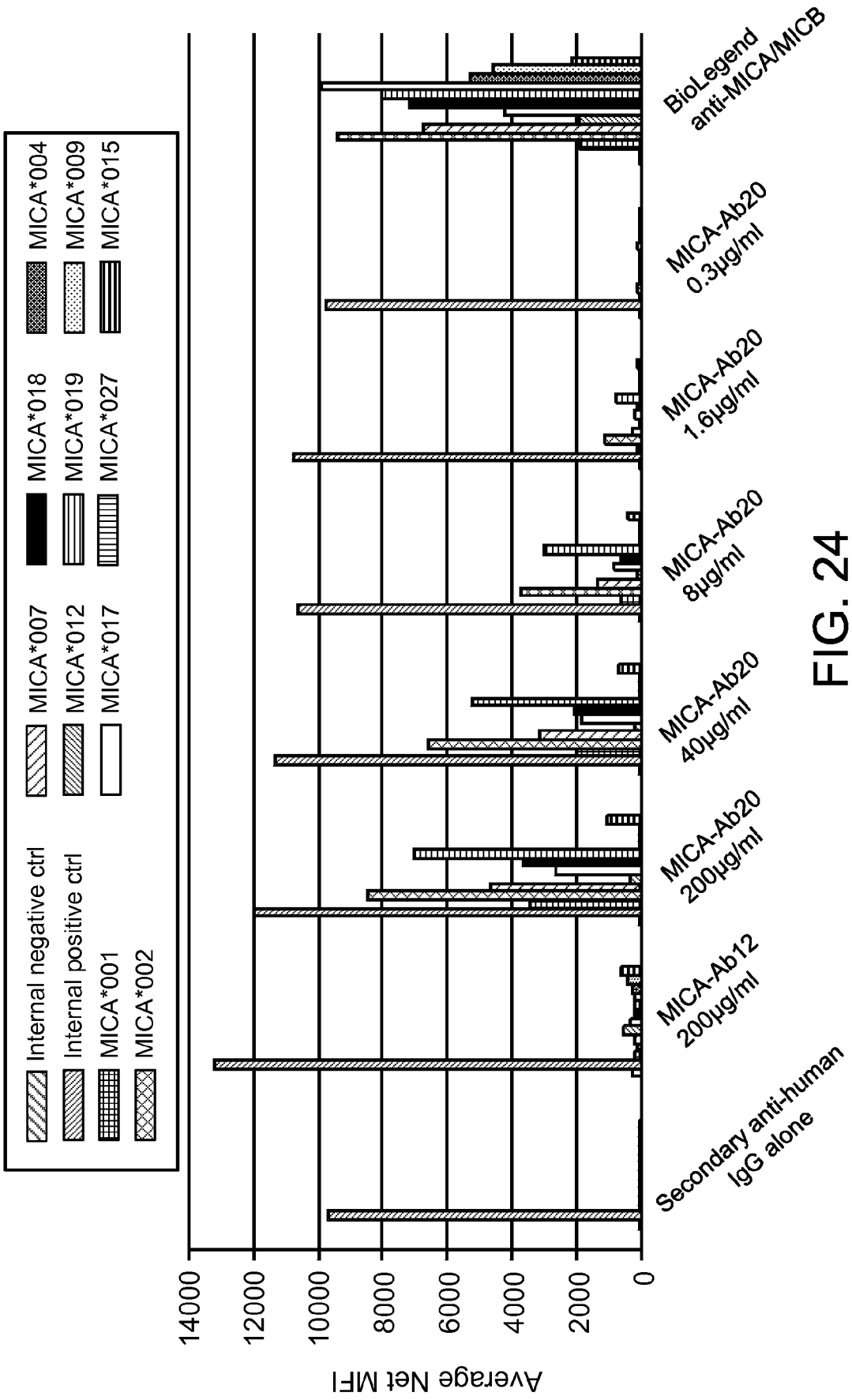

Internal negative ctrl
Internal positive ctrl
MICA*001
MICA*002
MICA*007
MICA*012
MICA*017
MICA*018
MICA*019
MICA*027
MICA*004
MICA*009
MICA*015
Average Net MFI
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Secondary anti-human IgG alone
MICA-Ab12 200µg/ml
MICA-Ab20 200µg/ml
MICA-Ab20 40µg/ml
MICA-Ab20 8µg/ml
MICA-Ab20 1.6µg/ml
MICA-Ab20 0.3µg/ml
BioLegend anti-MICA/MICB

FIG. 24

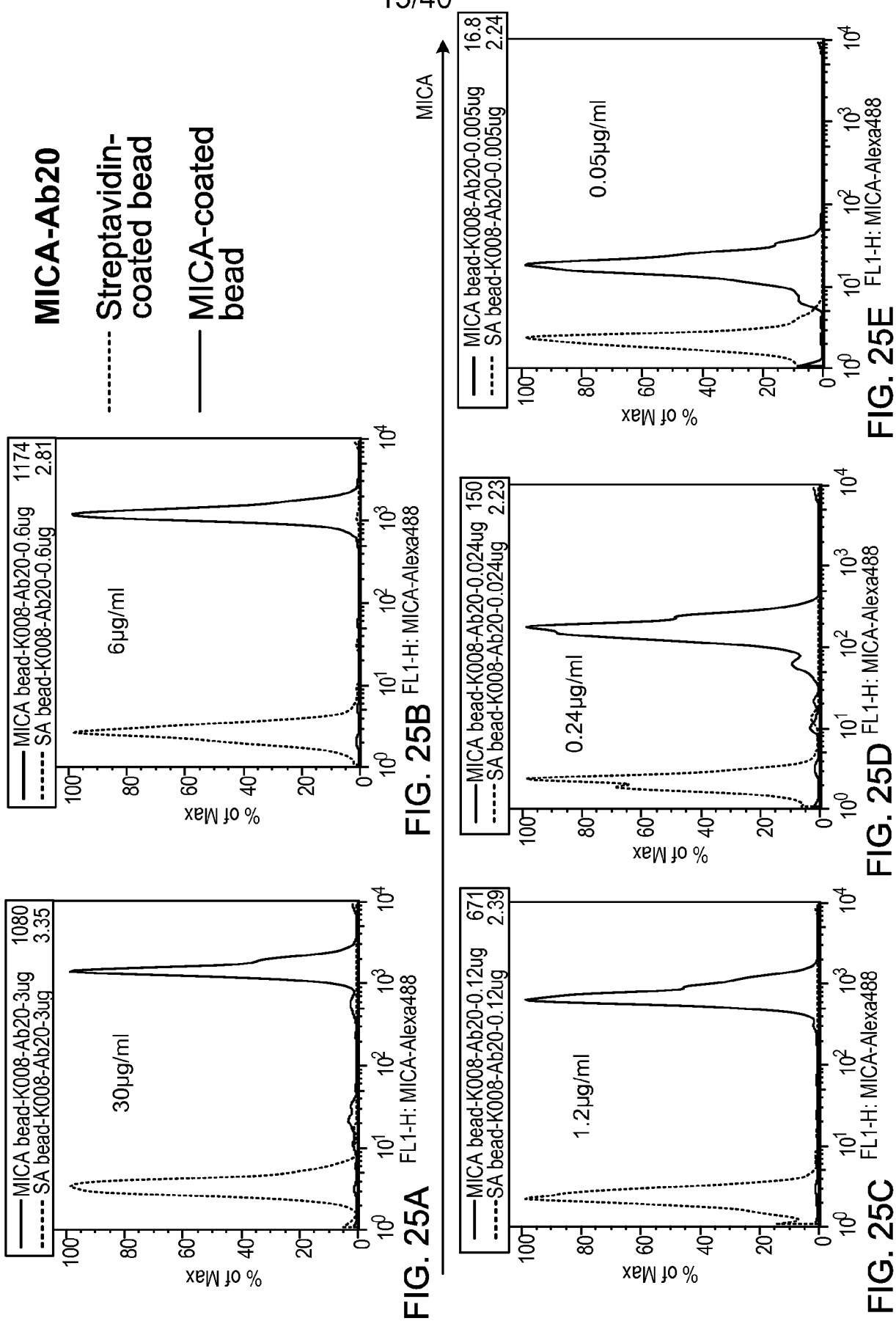


FIG. 25A

FIG. 25B

FIG. 25C

FIG. 25D

FIG. 25E

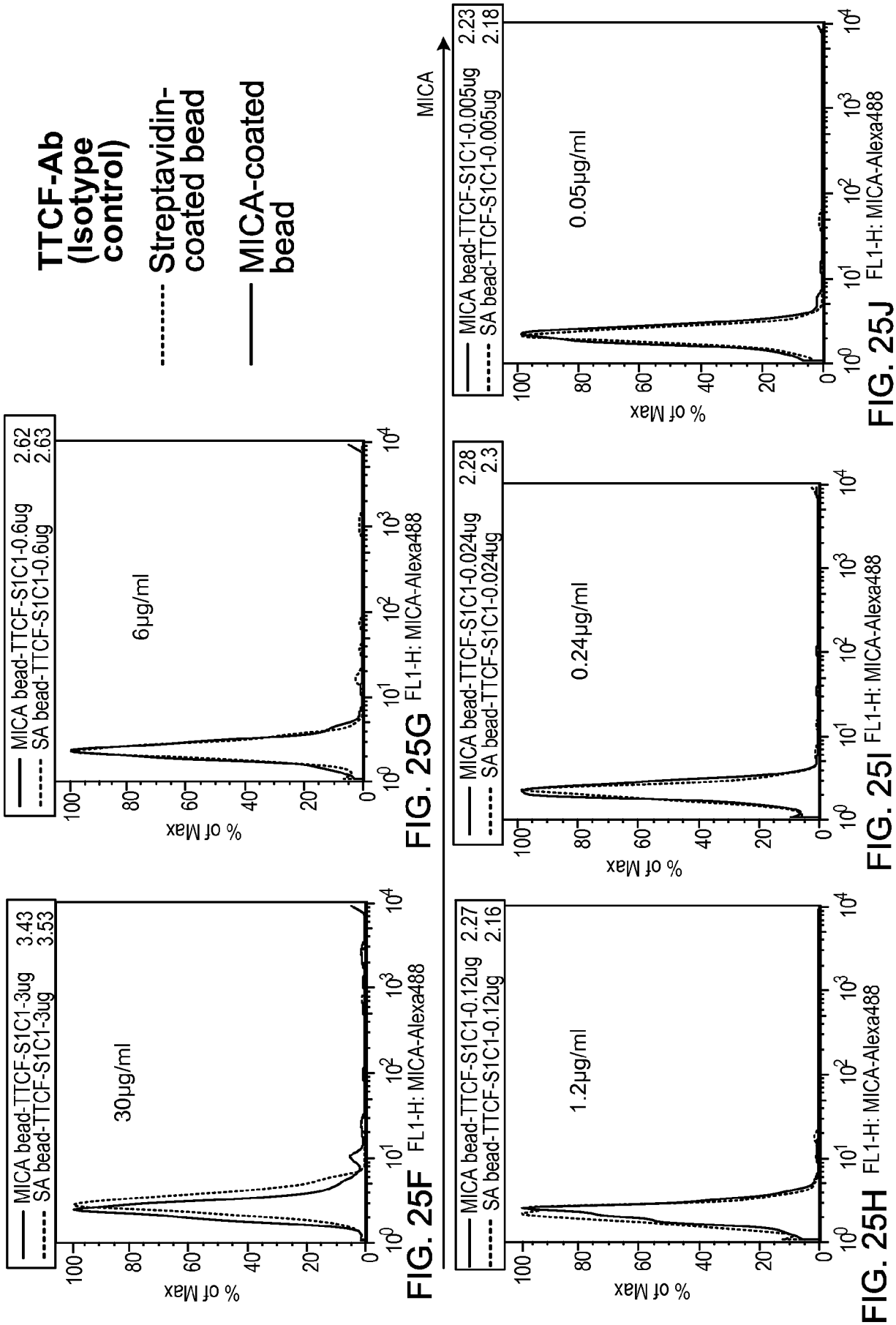


FIG. 25F FIG. 25G FIG. 25H FIG. 25I FIG. 25J

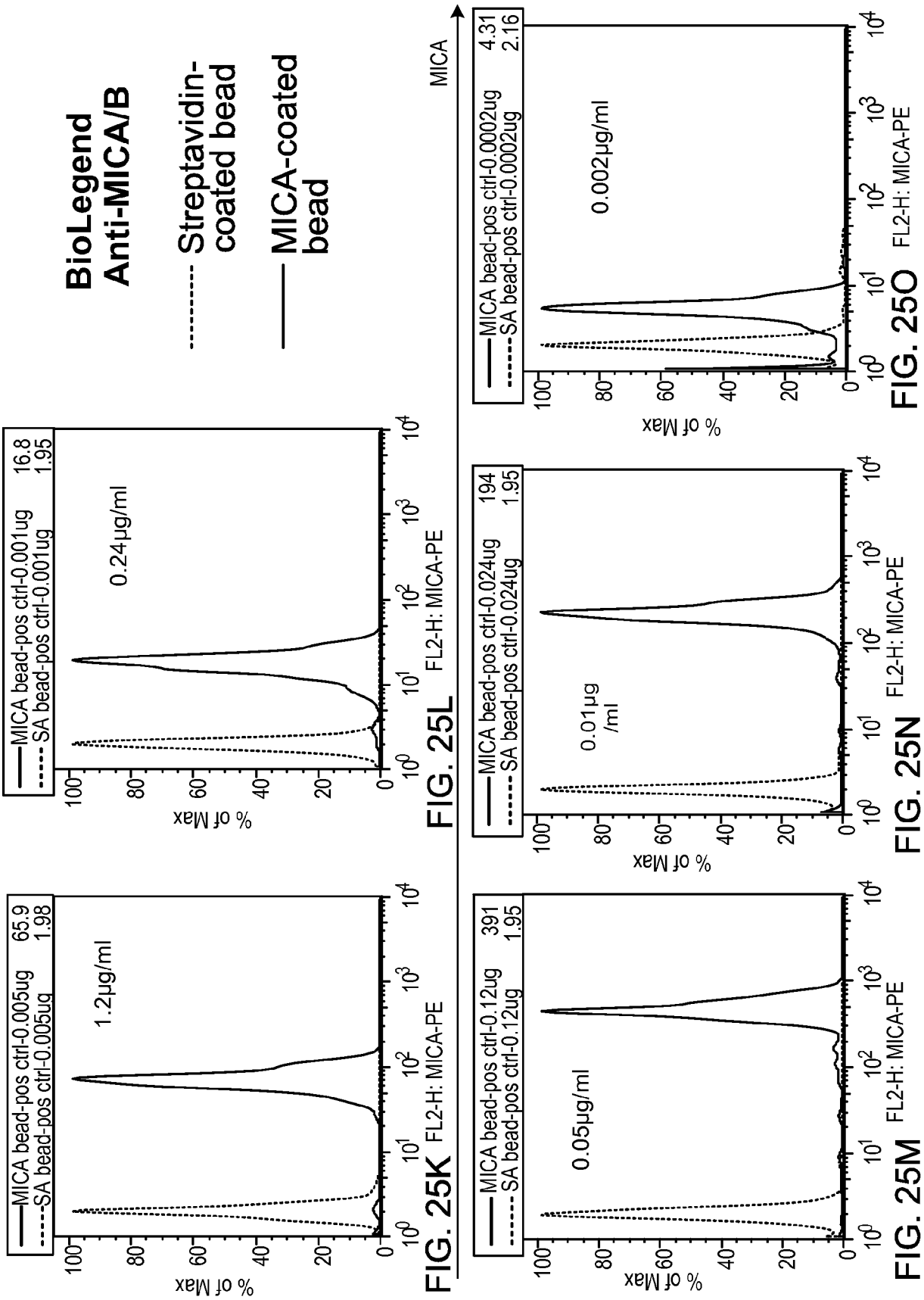
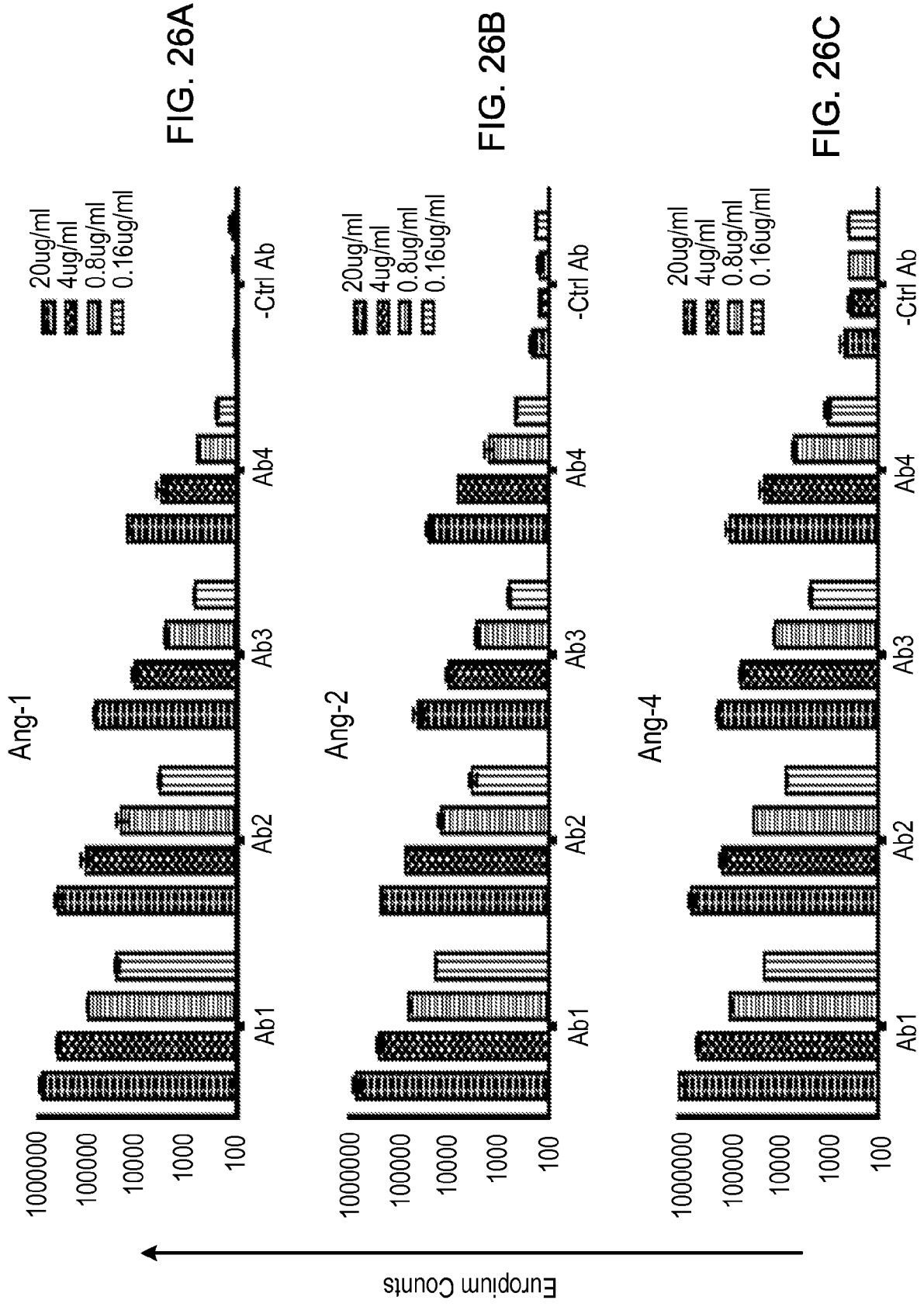


FIG. 25K FIG. 25L FIG. 25M FIG. 25N FIG. 25O


FIG. 26A
FIG. 26B
FIG. 26C
Ang-1
Ang-2
Ang-4
20ug/ml
4ug/ml
0.8ug/ml
0.16ug/ml
Ab1
Ab2
Ab3
Ab4
-Ctrl Ab
1000000
100000
10000
1000
100
Europium Counts

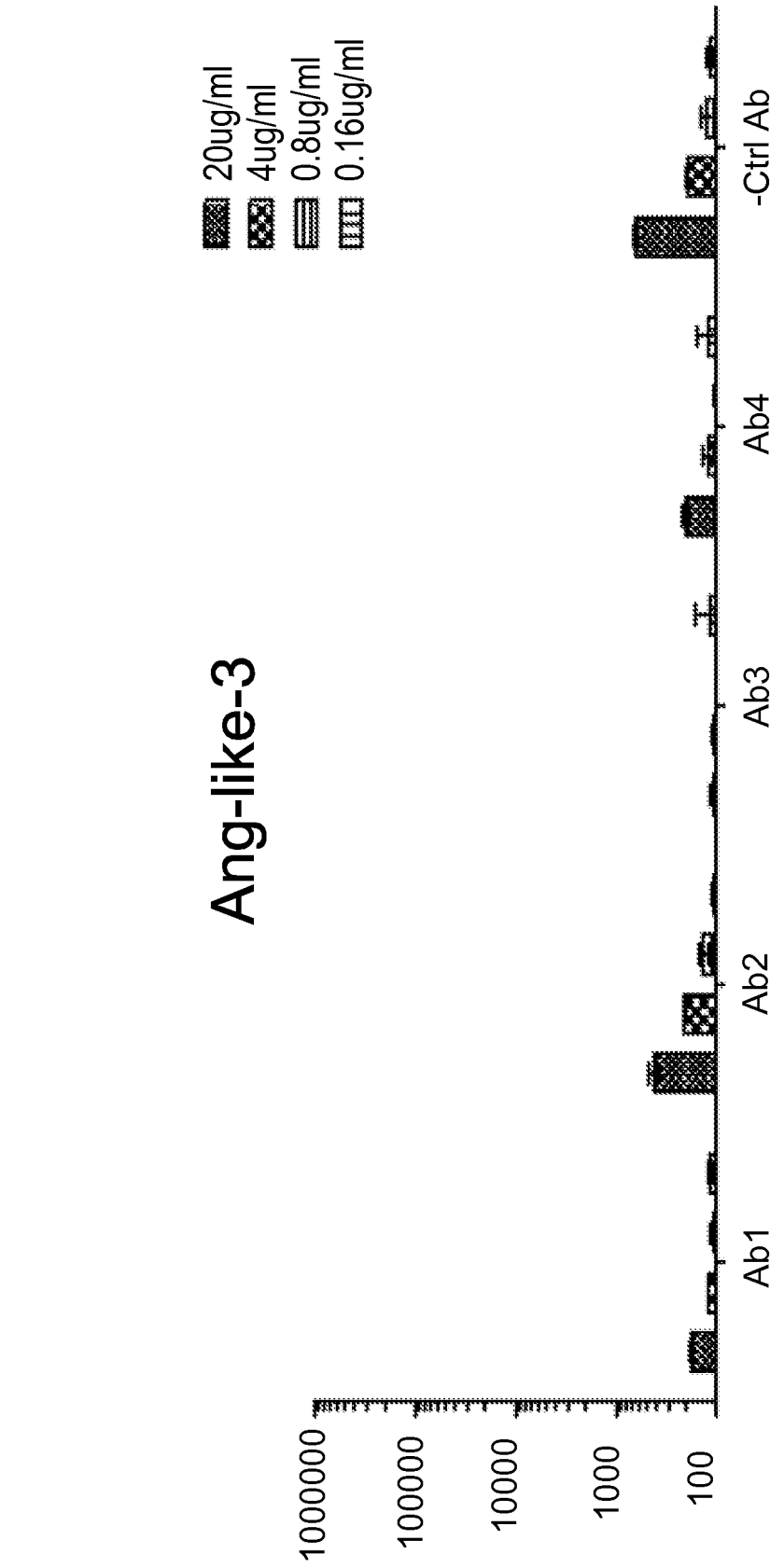

Ang-like-3
20ug/ml
4ug/ml
0.8ug/ml
0.16ug/ml
1000000
100000
10000
1000
100
Ab1
Ab2
Ab3
Ab4
-Ctrl Ab

FIG. 26D

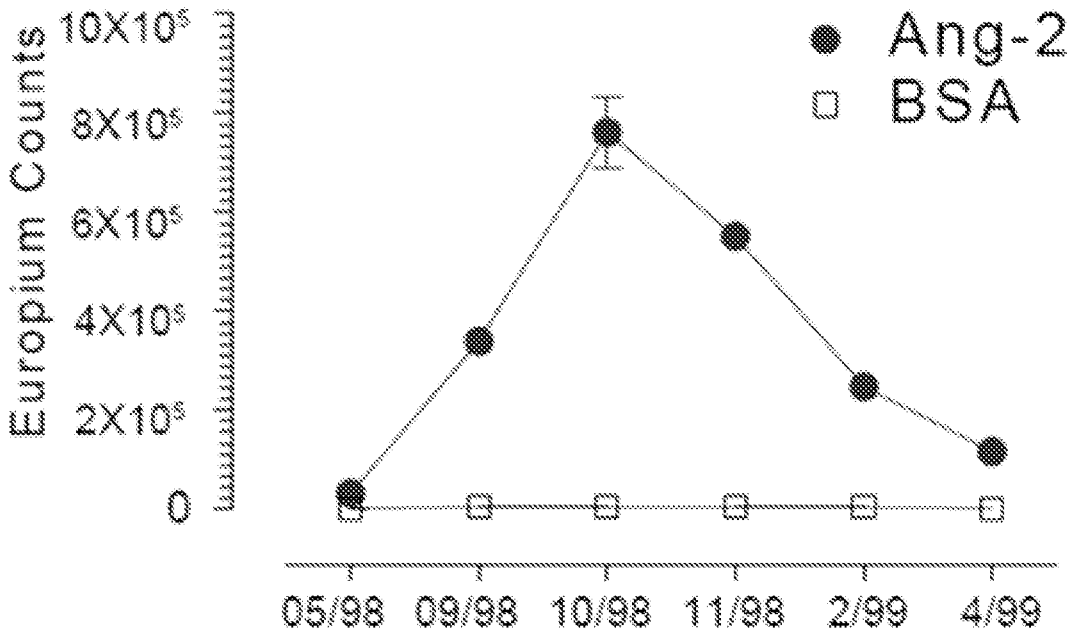


FIG. 27A

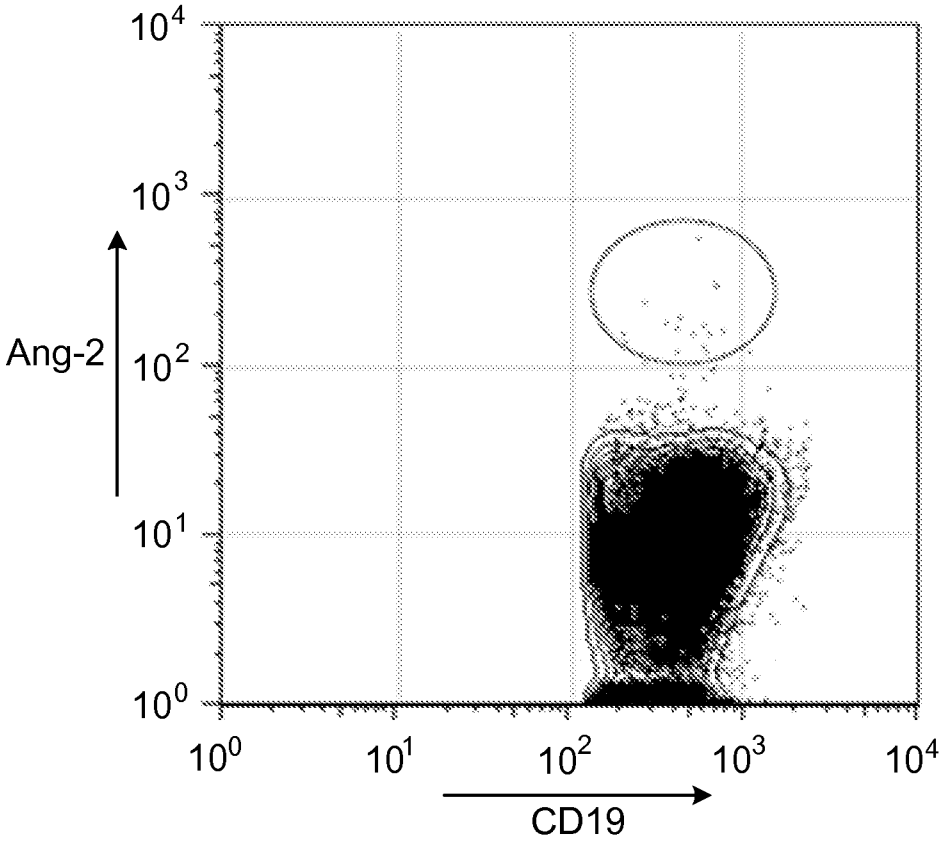


FIG. 27B

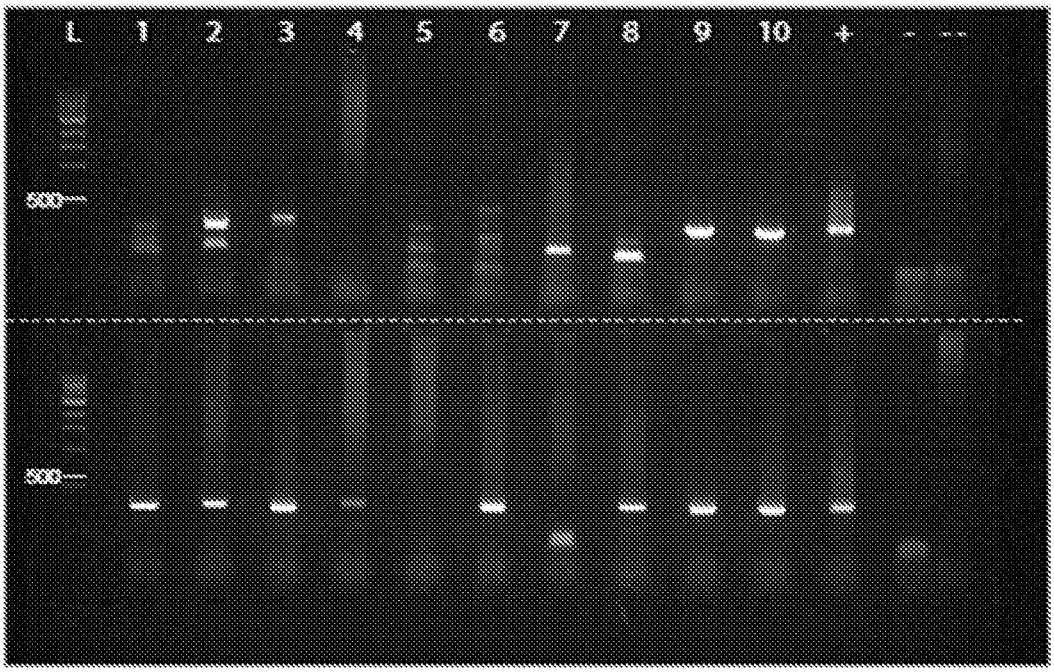


FIG. 27C

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGGAGCCTTCGGGGACCCTGTCCCT
CACCTGCACTGTGTCTGGTGGCTCCATCAGCAGGAGTAACTGGTGGAGTTGGGTCCGCC
AGCCCCCAGGGGAGGGGCTGGAATGGATTGGAGAAATCCATCACATTGGGAGGTCCAGC
TACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCTGTAGACAAGTCCCAGAACCAGTT
CTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAA
ATGGCTACTACGCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG
(SEQ ID NO. 148)

FIG. 28

QVQLQESGPGLVEPSGTLSLTCTVSGGSISRSNWWSWVRQPPGEGLEWIGEIHHIGRSS
YNPSLKSRVTMSVDKSQNQFSLRLTSVTAADTAVYYCAKNGYYAMDVWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 149)

FIG. 29

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCGACTTCCTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGCTACATCCTTCAGGGCCACTGGCATC
TCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCTCTCTCACCATCAACAGACT
GGAACCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACTATCGTAGTTCACCTCCGTGGT
ACACTTTTGCCCAGGGGACCAAGCTGGACATGAGACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC
(SEQ ID NO. 150)

FIG. 30

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSDFLAWYQQKPGQAPRLLIYATSFRATGI
SDRFSGSGSGTDFSLTINRLEPEDFAVYYCQHYRSSPPWYTFAQGTKLDMRRTVAAPSV
(SEQ ID NO. 151)

FIG. 31

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGGACCCTGTCCCTC
ACCTGCGCTGTCTCTGGTGCCTCCATTACCAATGGTGCCTGGTGGAGTTGGGTCCGCCAG
CCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGAAATCTATCTTAATGGGAACACCAACTCC
AACCCGTCCCTGAAGAGTCGAGTCATCATATCAGTGGACAAGTCCAAGAACCACTTCTCG
CTGACCCTGAACTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAGAACGCT
GCCTACAACCTTGAGTTCTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
167)

FIG. 32

QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGASITNGAWWSWVRQPPGKGLEWIGEIYLNGNTNS
NPSLKSRVIISVDKSKNHFSLTLNSVTAADTAVYYCAKNAAYNLEFWGQGALVTVSS (SEQ
ID NO: 168)

FIG. 33

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC

CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTGTTAGCAGCCCCTACGTAGCCTGGTACCAGCAGAAA

CGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACCGGCATCCCAG

ACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGC

CTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGATAGATCATACTATTACACTTTT

GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 169)

FIG. 34

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTVSSPYVAWYQQKRGQAPRLLIYGASTRATGIPDR

FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRSYYYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 170)

FIG. 35

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAACCTGTCGCTC
ACCTGCACTGTCTCTGATGCCTCCATGAGTGATTATCACTGGAGCTGGATCCGGCAGGCC
GCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATGTACAGCACTGGGAGTCCCTACTACAA
ACCCTCCCTCAAAGGTCGGGTCACCATGTCAATAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCT
GAAGCTGGCCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCCATCTATTATTGTGCGAGCGGACAACA
TATTGGTGGCTGGGTCCCCCCTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC
A (SEQ ID NO: 185)

FIG. 36

QVQLQESGPGLVKPSENLSLTCTVSDASMSDYHWSWIRQAAGKGLEWIGRMYSTGSPYY
KPSLKGRVTMSIDTSKNQFSLKLASVTAADTAIYYCASGQHIGGWVPPDFWGQGTLVTVS
S (SEQ ID NO: 186)

FIG. 37

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCA
TCTCCTGCAGGTCTAGTGAAGGCCTCGTATATAGTGATGGAGACACCTACTTGAGTTGGT
TTCACCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTGATTTATAAAATTTCTAACCGGTTCT
CTGGGGTCCCCGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGCACAGATTTCACACTGAAAATCA
GCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACACATTTTCCGT
GGACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAGTCAAACGT (SEQ ID NO: 187)

FIG. 38

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSEGLVYSDGDTYLSWFHQRPGQPPRLLIYKISNRFSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHFPWTFGQGTKVEVKR (SEQ ID NO:
188)

FIG. 39

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTTCATATGGCTTGACCTGGATACGCCAGGCT
CCGGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAAGTATCAGTGGCAGTGGCAATAACACATACTA
CGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAAGTCAAGAAGACACTATA
TCTACAAATGGACAGCCTGACAGTCGGAGACACGGCCGTCTATTACTGCTTAGGAGTCGG
TCAGGGCCACGGAATTCCGGTCATCGTCTCCTCA (SEQ ID NO. 203)

FIG. 40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGLTWIRQAPGKGLEWVSSISGSGNNTYYA
DSVKGRFTISRDKVKKTLYLQMDSLTVGDTAVYYCLGVGQGHGIPVIVSS (SEQ ID NO.
204)

FIG. 41

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCA
TCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCGTACACCGTGATGGAAACACCTACTTGAGTTGGT
TTCTGCAGAGGCCAGGCCAGGCTCCAAGACTCCTAATTTATCGGATTTCTAACCGGTTCT
CTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACGGATTTCACACTGAAAATC
AGCAGGGTGGAAGCTGAGGATGTCGGCGTTTACTACTGCATGCAAGCTACACAAATCCCC
AACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO. 205)

FIG. 42

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHRDGNTYLSWFLQRPGQAPRLLIYRISNRFSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQIPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO.
206)

FIG. 43

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTAATCCAGCCGGGGGGGTCCCTAAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCGGGCTTCCTCATCAGTAGTTATTTCATGAGCTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGGAAGGGGCCGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGATGGTAGTACATATTAC
GTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCACAGACAATTCCAAGAACACACTATA
TCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGATATTACTGTGCGACACGGC
ATTTGAATTATGACGGTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC
TCCACCAAG (SEQ ID NO: 221)

FIG. 44

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFLISSYFMSWVRQAPGKGPEWVSVIYSDGSTYY
VDSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTARYYCATRHLNYDGDHWGQGTLVTVSSA
STK (SEQ ID NO: 222)

FIG. 45

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTC
CATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGACGGAAACACCTACTTGAATT
GGTTTCACCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAAGCGG
GACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGTAGTGATTTCACACTGAA
AATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAATTTATTACTGCATGCAAGGTACACATT
GGCCGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCA (SEQ
ID NO: 223)

FIG. 46

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFHQRPGQSPRRLIYKVSKR
DSGVPDRFSGSGSGSDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPTFGQGTKVEIKRTVAA
(SEQ ID NO: 224)

FIG. 47

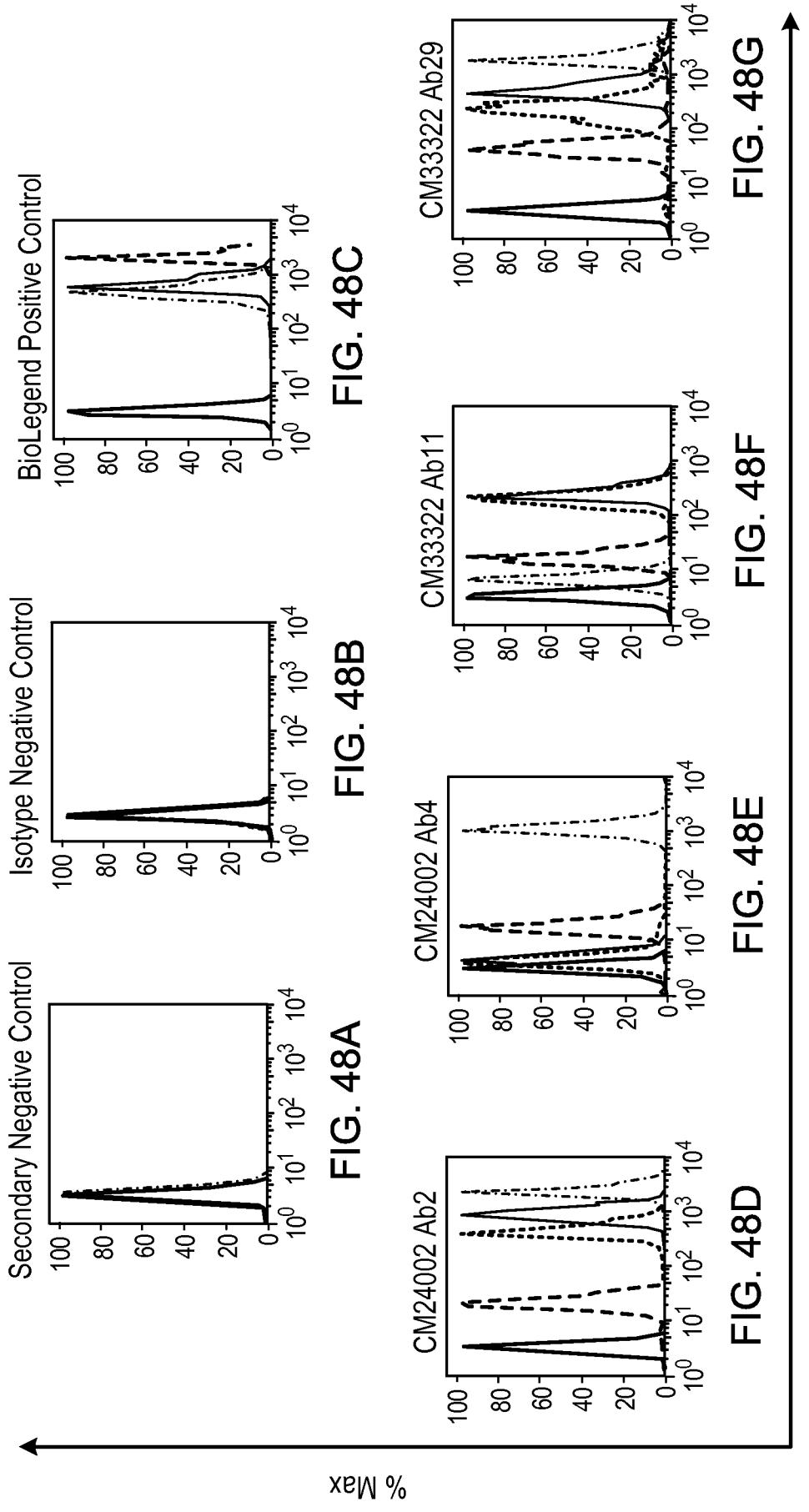


FIG. 48A FIG. 48B FIG. 48C

FIG. 48D FIG. 48E FIG. 48F FIG. 48G

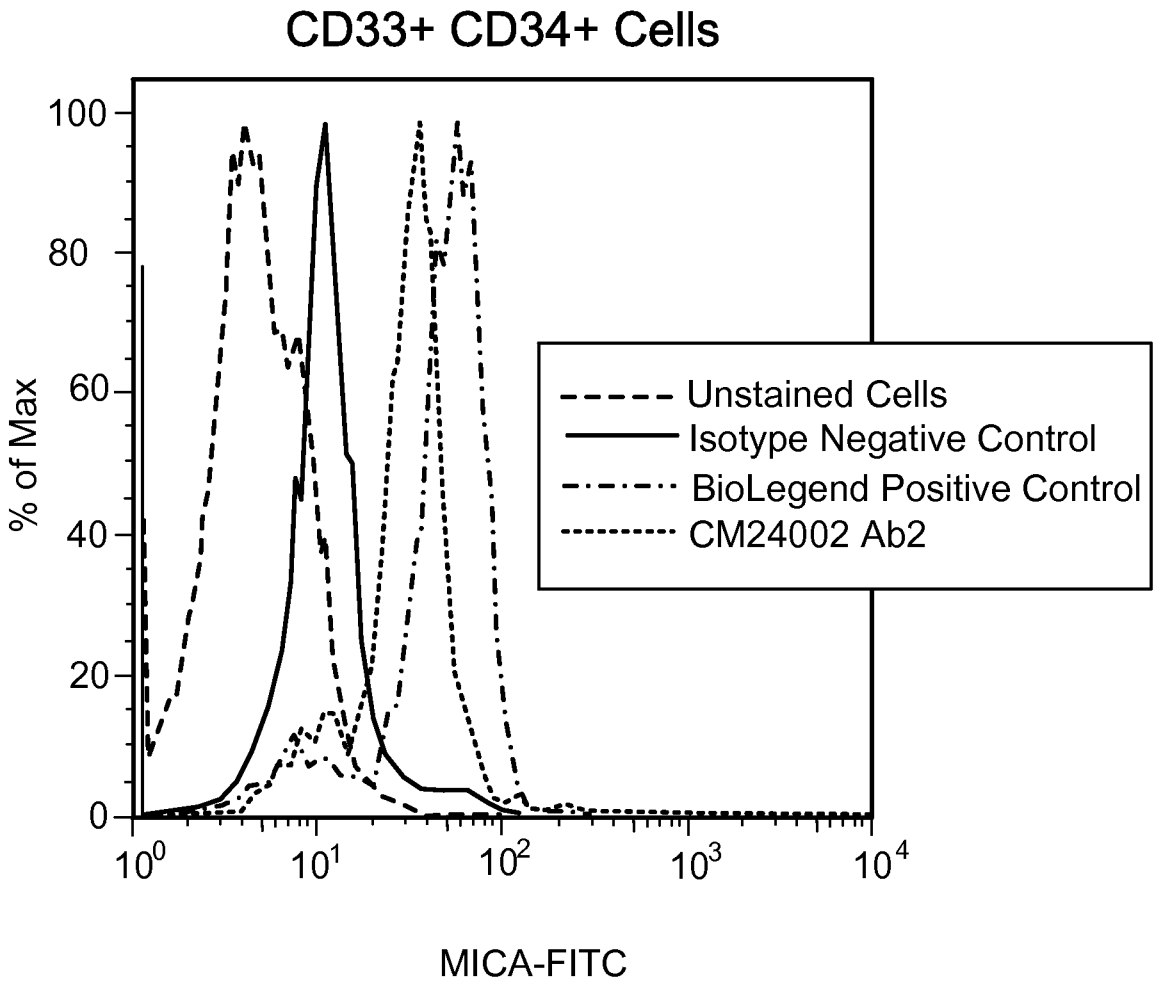

CD33+ CD34+ Cells
% of Max
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
MICA-FITC
Unstained Cells
Isotype Negative Control
BioLegend Positive Control
CM24002 Ab2

FIG. 49

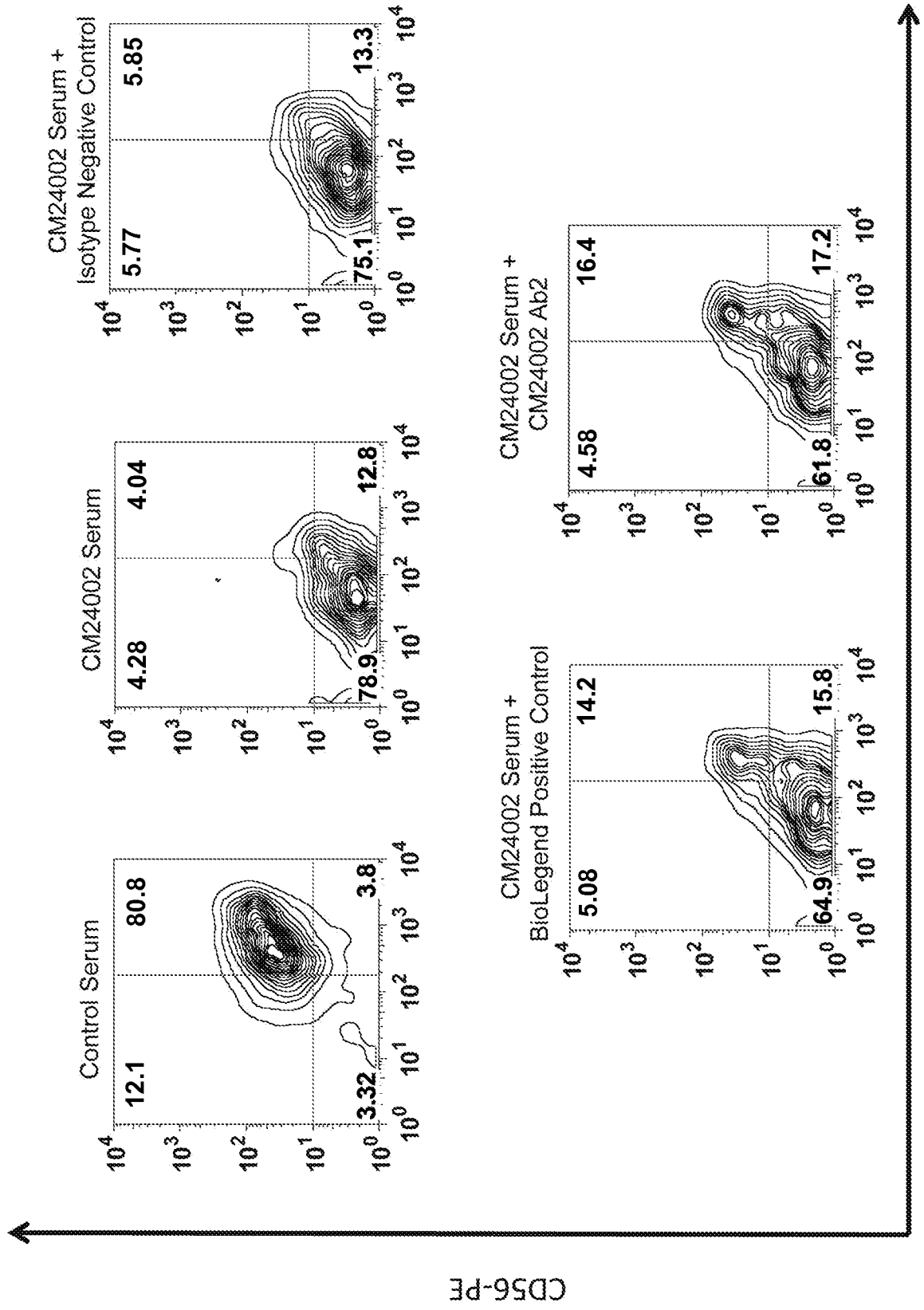

Control Serum
12.1
80.8
3.32
3.8
CM24002 Serum
4.28
4.04
78.9
12.8
CM24002 Serum +
Isotype Negative Control
5.77
5.85
75.1
13.3
CM24002 Serum +
BioLegend Positive Control
5.08
14.2
64.9
15.8
CM24002 Serum +
CM24002 Ab2
4.58
16.4
61.8
17.2
CD56-PE
NKG2D-APC

FIG. 50

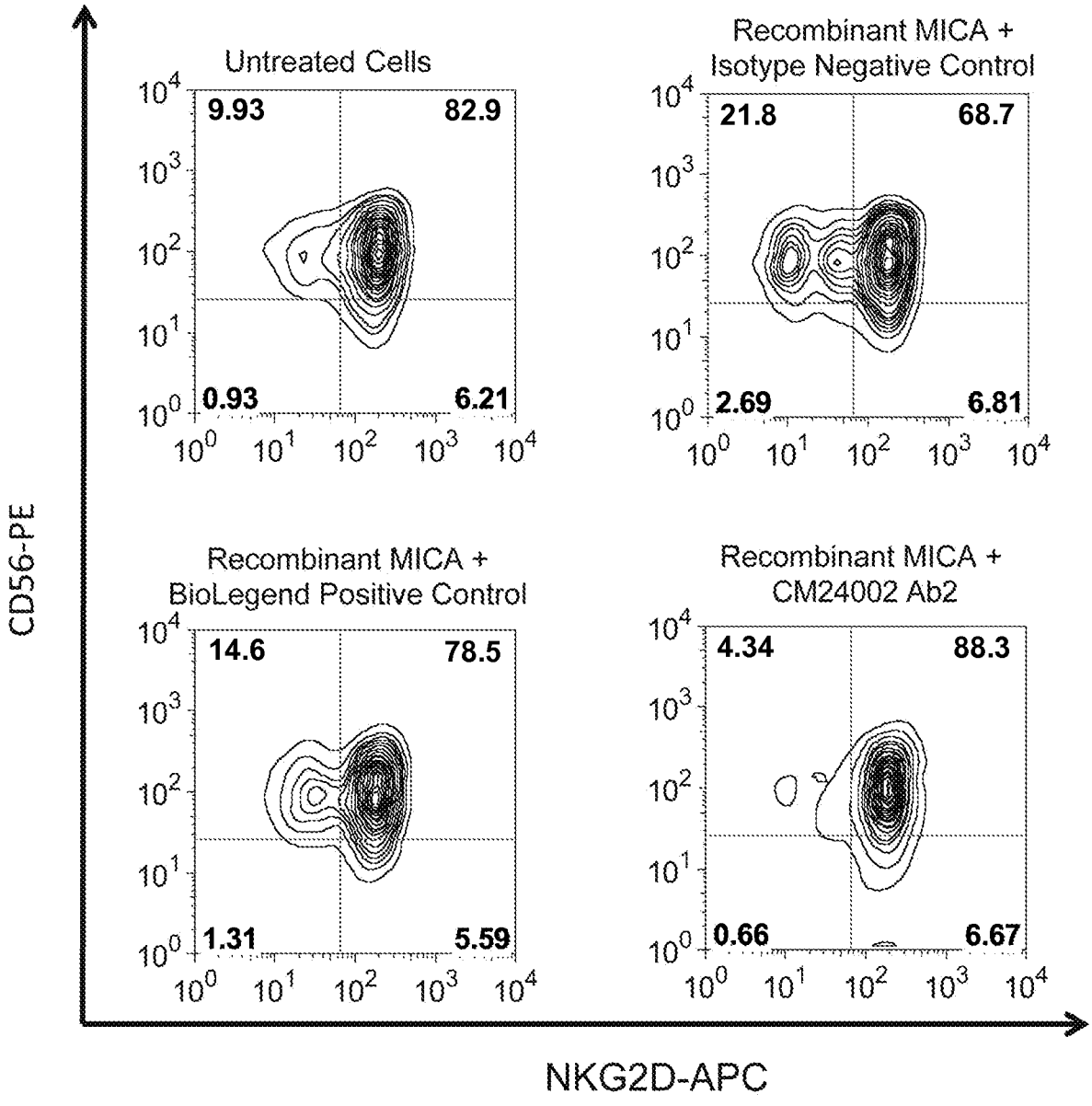

Untreated Cells
9.93
82.9
0.93
6.21
Recombinant MICA +
Isotype Negative Control
21.8
68.7
2.69
6.81
Recombinant MICA +
BioLegend Positive Control
14.6
78.5
1.31
5.59
Recombinant MICA +
CM24002 Ab2
4.34
88.3
0.66
6.67
CD56-PE
NKG2D-APC

FIG. 51

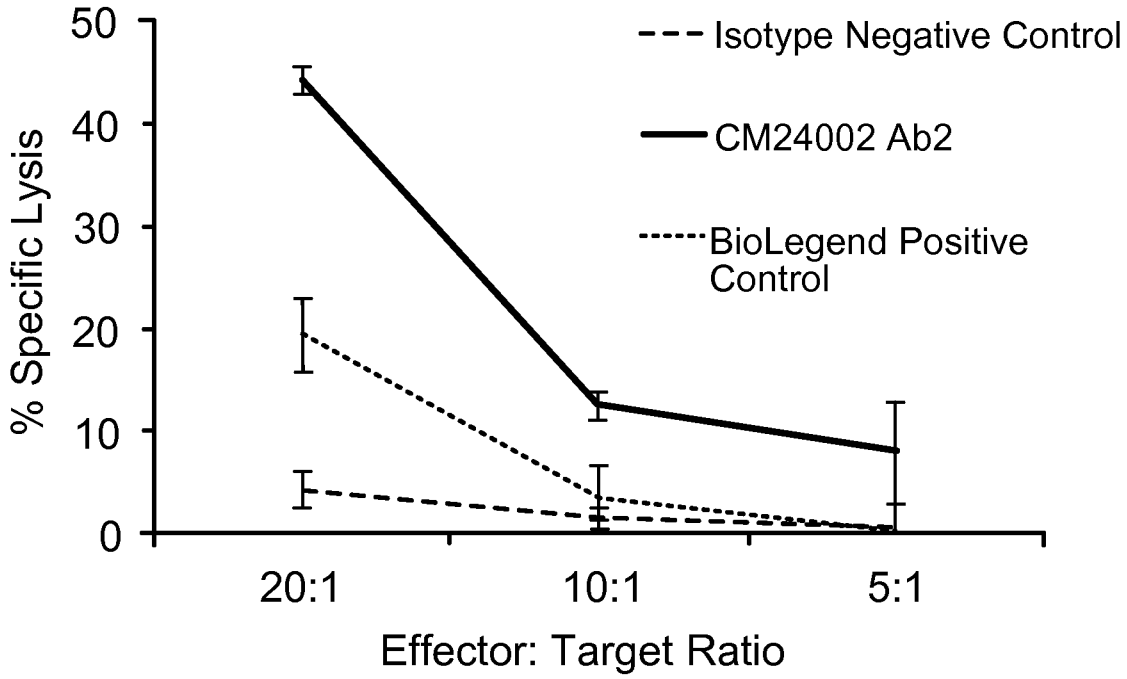

50
40
30
20
10
0
% Specific Lysis
Isotype Negative Control
CM24002 Ab2
BioLegend Positive Control
20:1
10:1
5:1
Effector: Target Ratio

FIG. 52

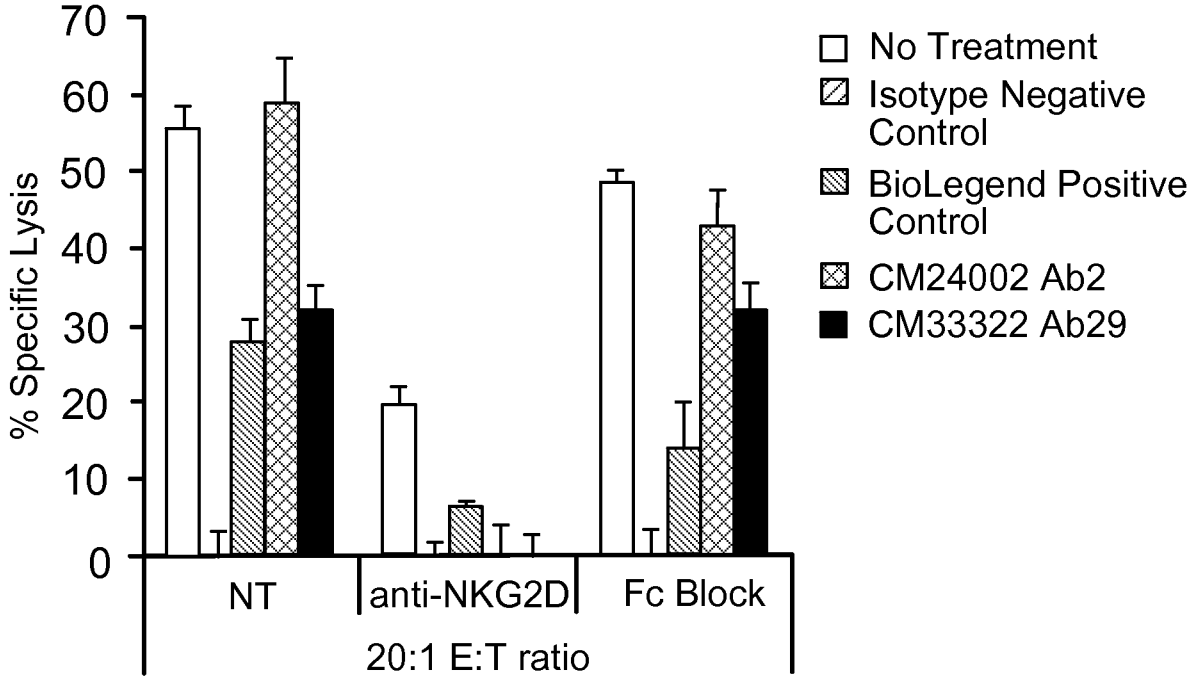

70
60
50
40
30
20
10
0
% Specific Lysis
No Treatment
Isotype Negative Control
BioLegend Positive Control
CM24002 Ab2
CM33322 Ab29
NT
anti-NKG2D
Fc Block
20:1 E:T ratio

FIG. 53

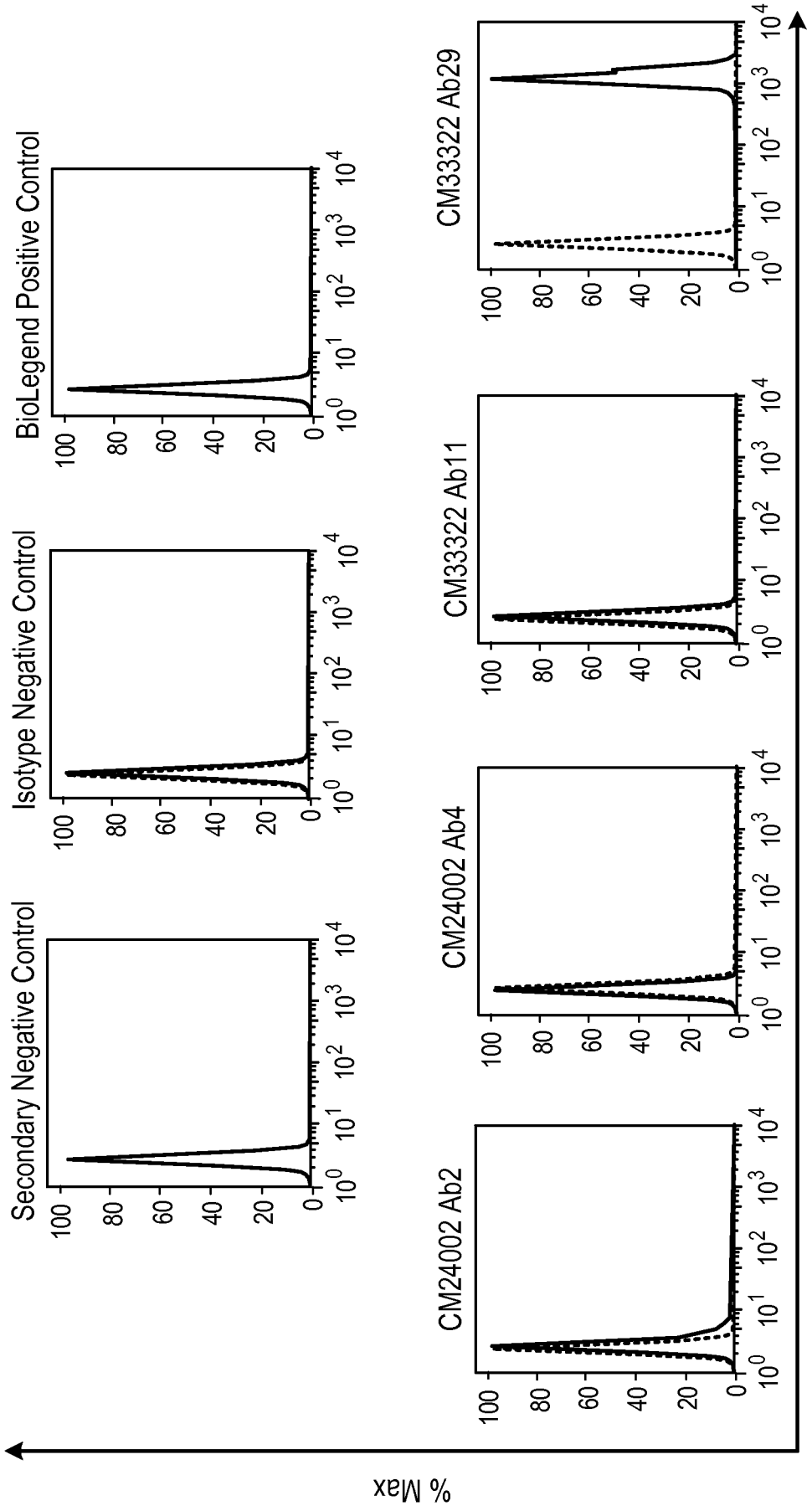

Secondary Negative Control
Isotype Negative Control
BioLegend Positive Control
CM24002 Ab2
CM24002 Ab4
CM33322 Ab11
CM33322 Ab29
% Max
MICA-α3 DOMAIN-FITC
Streptavidin Negative Control
MICA α3 Domain

FIG. 54

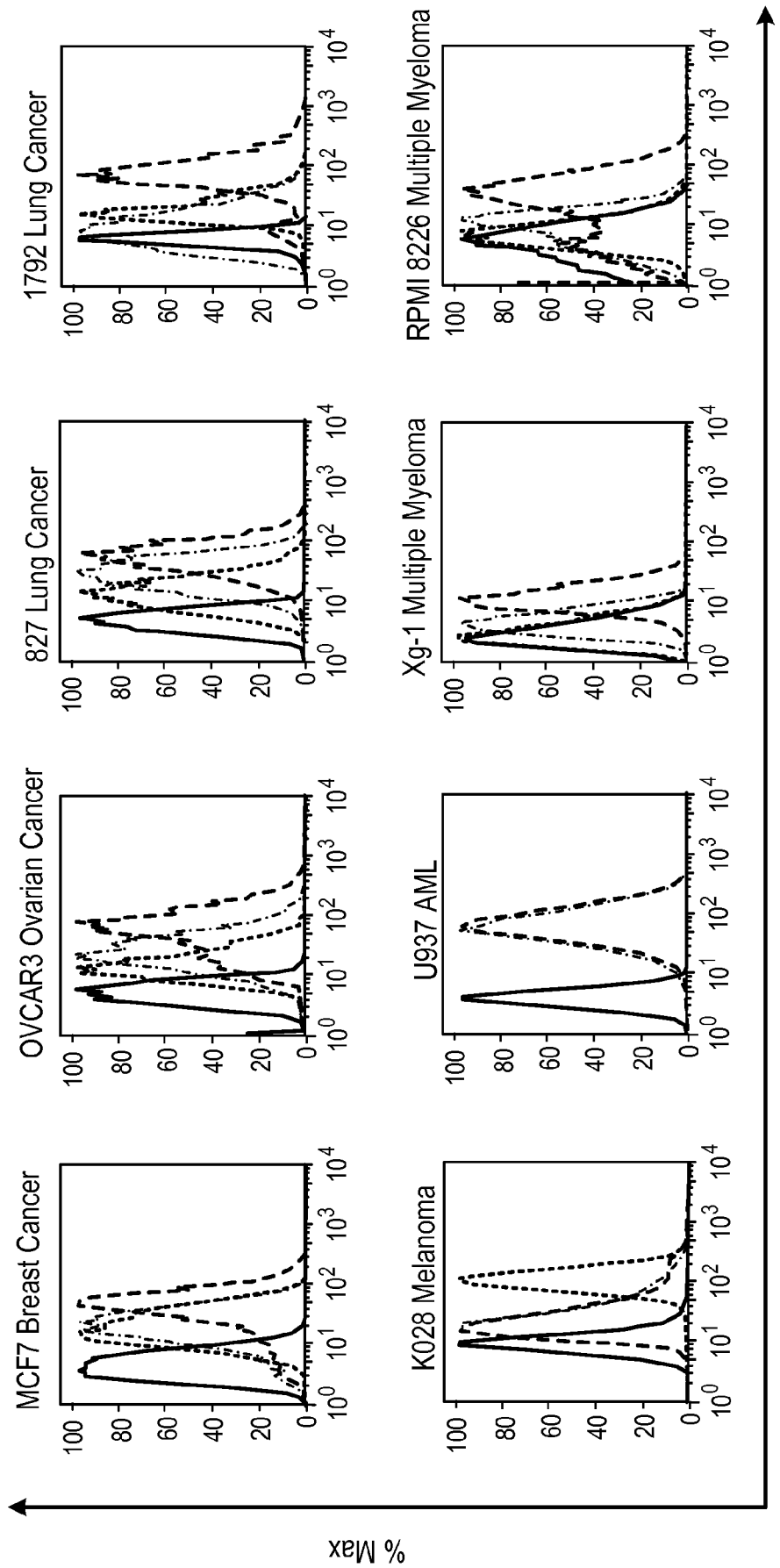

MCF7 Breast Cancer
OVCAR3 Ovarian Cancer
827 Lung Cancer
1792 Lung Cancer
K028 Melanoma
U937 AML
Xg-1 Multiple Myeloma
RPMI 8226 Multiple Myeloma
% Max
MICA-FITC
Unstained Cells
Isotype Negative Control
BioLegend Positive Control
CM24002 Ab2
CM33322 Ab29

FIG. 55

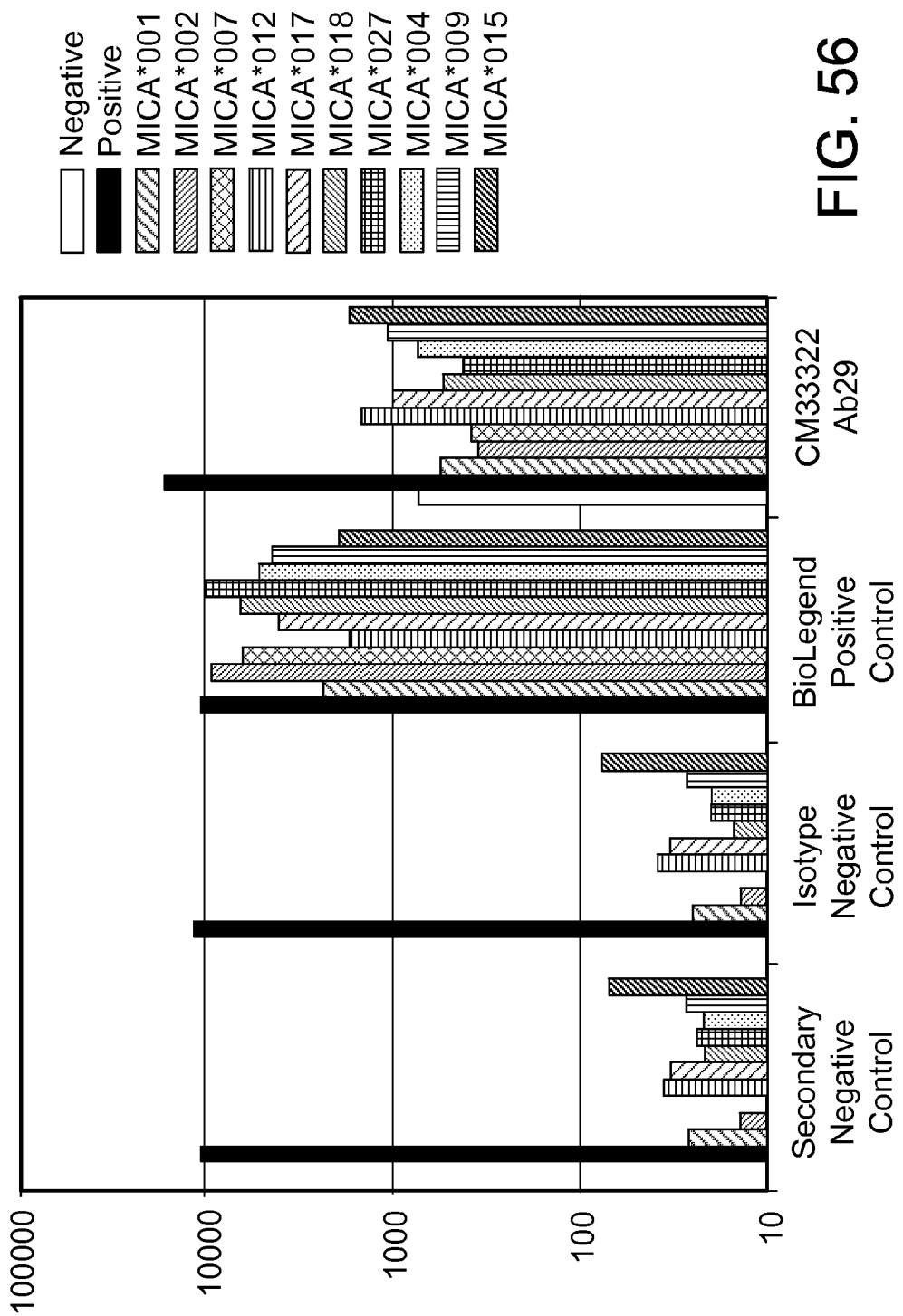

Negative
Positive
MICA*001
MICA*002
MICA*007
MICA*012
MICA*017
MICA*018
MICA*027
MICA*004
MICA*009
MICA*015
100000
10000
1000
100
10
Secondary Negative Control
Isotype Negative Control
BioLegend Positive Control
CM33322 Ab29

FIG. 56

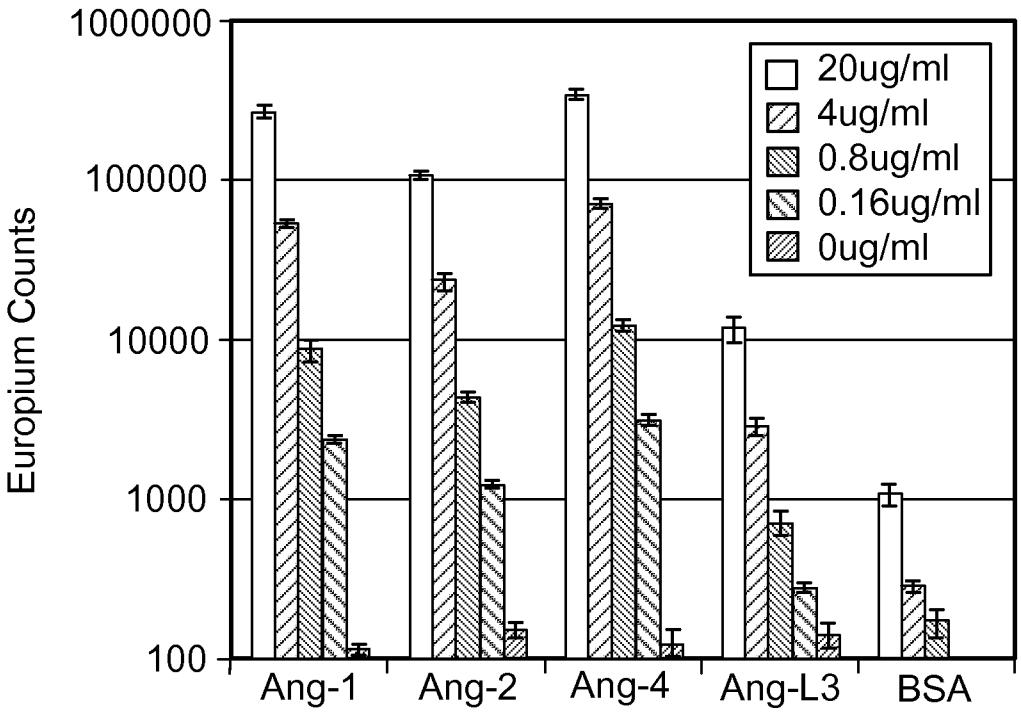

1000000
100000
10000
1000
100
Europium Counts
20ug/ml
4ug/ml
0.8ug/ml
0.16ug/ml
0ug/ml
Ang-1
Ang-2
Ang-4
Ang-L3
BSA

FIG. 57

PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS

REIVINDICACIÓN DE LA PRIORIDAD

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de patente de EE.UU. No 61/541,921, presentada el 30 de septiembre de 2011, la totalidad de los contenidos los cuales se incorporan aquí como referencia.

APOYO DEL GOBIERNO

Esta invención se realizó con el apoyo del Gobierno bajo la subvención No. PO1 AI045757, otorgada por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene una Listado de Secuencias que se han presentado en formato ASCII a través de EFS-Web y se incorporan en este documento como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 27 de septiembre de 2012, es denominada 53293WO1.txt y tiene un tamaño de 90.411 bytes.

CAMPO TÉCNICO

Esta invención se refiere a composiciones terapéuticas (por ejemplo, péptidos) relacionados con los sujetos humanos.

ANTECEDENTES

Los sujetos humanos expuestos a una condición o enfermedad ofrecen una fuente de anticuerpos con potenciales terapéuticos y métodos generales para la obtención de tales anticuerpos que son conocidos en la técnica. Sin embargo, los métodos para la obtención específicamente de anticuerpos con potencial terapéutico son generalmente limitados por la baja frecuencia, baja tasa de proliferación, y bajos niveles de secreciones de anticuerpos de células B que expresan tales anticuerpos. Por ejemplo, las células B de memoria con especificidad definida típicamente cuentan para solamente una célula por millón de células mononucleares de sangre periférica o aproximadamente un mililitro de sangre

(Lanzavecchia y otros., Curr. Opin. Immunol, 21:298-304 (2009): Yoshida y otros, Immunol. Rev., 237:117-139 (2010)). La frecuencia de anticuerpos con potencial terapéutico es probable que sea inclusive más baja en pacientes con cáncer, lo que exige el desarrollo de nuevos enfoques que permitan el aislamiento de tales células con alta sensibilidad y eficiencia.

Los métodos convencionales se basan generalmente en la conversión de las células B de memoria a células secretoras de anticuerpos mediante un cultivo in vitro y/o el uso de modelos animales inmunizados (por ejemplo, ratones) (Crotty y otros., J. Immunol., 171:4969-4973 (2003): Fecteau y otros, Inmunology, 128: e353-e365 (2009): Buisman y otros, Vaccine, 28:179-186 (2009): Corti y otros, PLoS One, 5: e8805 (2010)). Por ejemplo, tras el cultivo in vitro por hasta una semana, los anticuerpos pueden ser medidos en sobrenadantes de cultivos celulares y las frecuencias de células secretoras de anticuerpos se evalúan utilizando el ensayo de puntos por inmunoabsorción unido a enzimas (ELISPOT). Limitaciones de tales métodos se reportan (Henn y otros, J. Immunol, 183:31777-3187 (2009): Cao y otros, J. Immunol, Methods, 358:56-65 (2010)). Por ejemplo, el cultivo in vitro de células B de memoria altera el fenotipo de las células B de memoria para asemejarse a las células plasmáticas con distintas propiedades funcionales (Jiang y otros., Eur. J. Immunol, 37:2205-2213 (2007): Huggins y otros, Blood, 109:1611-1619 (2007): Jourdan y otros, Blood, 114:5173-5181 (2009)). Además se reportan Limitaciones para los métodos basados en antígenos fluorescentes (Hofer y otros., Immunol. Rev., 211:295-302 (2006): Odendahl y otros, Blood, 105:1614-1621 (2005); Kunkel y otros., Nat. Rev. Immunol, 3:822-829 (2003): Scheid y otros, Nature, 458:636-640 (2009): Wu y otros, Science, 329:856-861 (2010)).

Se requieren métodos mejorados para obtener o marcar específicamente anticuerpos con potencial terapéutico.

El MICA es un ligando para NKG2D, un receptor transmembrana Tipo II, similar a la lectina tipo C expresado en la mayoría de las células humanas NK, células T $\gamma\delta$, y células T CD8 +. Tras el ligamiento, las señales NKG2D a través de la proteína adaptadora DAP10 provocan la citólisis dependiente de perforina y proporcionan la co-estimulación. En humanos, los ligandos de NKG2D incluyen la proteína A relacionada con el MHC clase I (MICA), el MICB estrechamente relacionado, proteínas de unión UL-16 (ULBP) 1-4, y

RAE-1G. Aunque los ligandos NKG2D generalmente no se encuentran en los tejidos sanos, las diversas formas de estrés celular, que incluyen el daño en el ADN, pueden sobreregular la expresión del ligando, lo que resulta en su detección frecuente en multiples malignidades sólidas y hematológicas, incluyendo melanoma. La activación de NKG2D a través de las células transformadas de un ligando positivo contribuye a la supresión tumoral extrínseca, ya que los ratones tipo silvestre y que carecen de NKG2D tratados con anti anticuerpos bloqueadores NKG2D muestran una mejorada susceptibilidad del tumor. La evasión inmune puede ser obtenida en los pacientes, sin embargo, por el desprendimiento de ligandos de NKG2D de las células tumorales, las cuales desencadenan la internalización de NKG2D de superficie y la función alterada de los linfocitos citotóxicos. Los ligandos solubles de NKG2D también pueden estimular la expansión de reguladores y células T-Foxp3+ CD4+NKG2D que pueden antagonizar la citotoxicidad antitumoral a través del ligando Fas, IL-10, y TGF-β. El MICA es un ligando de NKG2D que se desprende de las células tumorales, por ejemplo, liberados de la superficie celular hacia el medio circundante, y los sueros de los pacientes con cáncer típicamente contienen elevados niveles de las formas solubles (SMICA). El desprendimiento de MICA se logra en parte a través de interacciones con la proteína disulfuro isomerasa ERP5, la cual forma un enlace disulfuro con una cisteína crítica que resulta en el despliegue del dominio α3, haciéndola susceptible a la proteolisis mediante la ADAM-10/17 y MMP14.

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes y se ha implicado como una parte crítica del crecimiento y diseminación tumoral. Los tumores estimulan la angiogénesis para satisfacer los requerimientos en el aumento de oxígeno y nutrientes que exceden aquellos que pueden ser satisfechos por simple difusión. En consecuencia, los tumores reclutan, remodelan y expanden vasculatura existente para satisfacer sus demandas metabólicas. La dependencia del crecimiento de los tumores en la formación de nuevos vasos sanguíneos ha hecho a la angiogénesis un objetivo atractivo para las terapias anticancerígenas. Muchas citoquinas se han creido que juegan un papel en la regulación de la angiogénesis, incluyendo miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de las angiopoyetinas. Los angiopoyetinas fueron descubiertas como ligandos de los Ties, una familia de tirosina quinasas que es expresada selectivamente en el endotelio vascular. Hay cuatro

angiopoyetinas conocidas: angiopoyetina-1 ("Ang-1") hasta la angiopoyetina-4 ("Ang-4"). Los estudios han sugerido que las angiopoyetinas (por ejemplo, Ang-1 y Ang-2) pueden estar involucradas y la angiogénesis tumoral. Con esta información, las angiopoyetinas se han identificado como potenciales blancos de la terapia de tipo inmunologíca contra el cancer.

Hay una necesidad de identificar nuevos agentes que reconozcan y se unan específicamente a blancos de la terapia de tipo inmunologíca contra el cancer, tales como el MICA y las angiopoyetinas. Tales agentes serían útiles como panel diagnóstico e intervención terapéutica en estados de enfermedades que están asociadas con el desarrollo de tumores.

RESUMEN

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos relacionados a anticuerpos con potencial terapéutico.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona composiciones que contienen péptidos que se unen inmunoespecíficamente a la proteína A relacionada con el MHC clase I (MICA), o un epítope del mismo. En algunos aspectos, los péptidos de las composiciones incluyen las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 del V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, y CDR3 del V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados. En algunos aspectos, tales péptidos incluyen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 del V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, y CDR3 del V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1. En algunos aspectos, los péptidos incluyen, además, el CDR2 del V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, o CDR2 del V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, o ambos. En algunos aspectos, tales péptidos incluyen regiones determinantes de la complementariedad CDR2 del V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, o el CDR2 del V_L del anticuerpo ID1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, o ambos. En algunos aspectos, los péptidos incluyen, además, la CDR1 del V_H del

anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, o el CDR1 del V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados o ambos. En algunos aspectos, , tales péptidos incluyen regiones determinantes de la complementariedad CDR1 del V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, o el CDR1 del V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, o ambos.

En algunos aspectos, los péptidos son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que incluyen: una cadena de V_H con identidad por la SEC ID NO: 2, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 del V_H del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, y regiones dentro de SEC ID NO: 2 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95% , 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 del V_H del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1, y una cadena de V_L de similitud con la SEC ID NO: 11 , donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 del V_L de anticuerpos ID 1 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, y las regiones dentro de SEC ID NO: 11 correspondientes a FR1 , FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 del V_L del anticuerpo ID 1 mostrado en la tabla 1.En algunos aspectos, los péptidos incluyen unos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que contienen una cadena de V_H que contienen SEC ID NO: 2 y una cadena de V_L que contiene la SEC ID NO: 11. En algunos aspectos, además de los péptidos, las composiciones incluyen además uno o más (por ejemplo, 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) terapéuticos contra el cancer. En algunos aspectos, las composiciones se formulan como composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para la administración a un sujeto).

En algunos aspectos, los péptidos son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que incluyen: una cadena de V_H con identidad por la SEC ID NO: 149, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID

NO: 149 correspondiente a FR1, FR2, FR3, FR4, que contiene secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud a FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad porla SEC ID NO: 151, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L de anticuerpos ID 6 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de regiones CDR1 , CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 151 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de similitud a FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la tabla 1.En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos que contienen una cadena V_H que contienen la SEC ID NO: 149 y una cadena V_L que contienen la SEC ID NO: 151.En algunos aspectos, además de los péptidos, las composiciones incluyen además uno o más (por ejemplo, 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) terapéuticos contra el cáncer. En algunos aspectos, las composiciones se formulan como composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para la administración a un sujeto).

En algunos aspectos, los péptidos son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que incluyen: una cadena de V_H con identidad por la SEC ID NO: 168, donde las regiones corresondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y dentro de regiones SEC ID NO: 168 correspondiente a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad por la SEC ID NO: 170, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la Tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y dentro de regiones SEC ID NO: 170 correspondiente a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 7 mostrado en la tabla 1.En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o

fragmento del anticuerpo que contienen una cadena de V_H que contiene la SEC ID NO: 168 y una cadena de V_L que contiene la SEC ID NO: 170. En algunos aspectos, además de los péptidos, las omposiciones incluyen además uno o más (por ejemplo, 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) terapéuticos contra el cáncer. En algunos aspectos, las composiciones se formulan como composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para la administración a un sujeto).

En algunos aspectos, los péptidos son anticuerpo o fragmento del anticuerpo que incluyen: una cadena de V_H con identidad por la SEC ID NO: 186, donde las regions correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y dentro de regiones SEC ID NO: 186 correspondiente a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad por la SEC ID NO:188, donde las regionescorrespondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L de del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y dentro de regiones SEC ID NO: 188 correspondiente a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la tabla 1.En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contienen una cadena de V_H que contiene la SEC ID NO: 186 y una cadena de V_L que contiene la SEC ID NO: 188. En algunos aspectos, además de los péptidos, las composiciones incluyen además uno o más (por ejemplo, 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) terapéuticos contra el cáncer. En algunos aspectos, las composiciones se formulan como composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para la administración a un sujeto).

En algunos aspectos, los péptidos son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que incluyen: una cadena de V_H con identidad por la SEC ID NO: 204, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos

conservados dentro de regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y dentro de regiones SEC ID NO: 204 correspondiente a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad porla SEC ID NO:206, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L de del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y dentro de regiones SEC ID NO: 206 correspondiente a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la tabla 1.En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena de V_H que contiene la SEC ID NO: 204 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO: 206. En algunos aspectos, además de los péptidos, las composiciones incluyen además uno o más (por ejemplo, 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o menos de 20) terapéuticos contra el cáncer. En algunos aspectos, las composiciones se formulan como composiciones farmacéuticas (por ejemplo, para la administración a un sujeto).

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona composiciones que incluyen uno o más péptidos que se unen a la angiopoyetina o un epítope del mismo. En algunos aspectos, los péptidos de las composiciones incluyen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 or 10 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3. En algunos aspectos, los péptidos pueden incluir regiones determinantes de complementariedad (CDR) 3 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1. En algunos aspectos, los péptidos pueden incluir, además, la CDR2 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, o CDR2 de V_L del anticuerpo ID 2, 3 , 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, o ambos. En algunos aspectos, tales péptidos pueden incluir

región determinante de complementariedad CDR2 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, o CDR2 de V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, o ambos. En algunos aspectos, los péptidos pueden incluir, además, CDR1 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, o CDR1 de V_L del anticuerpo ID 2, 3 4, o 5 mostrado en la Tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, o ambos. En algunos aspectos, tales péptidos pueden incluir regiones determinantes de complementariedad CDR1 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, o la CDR1 de V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, o ambos.

En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contienen: una cadena de V_H con identidad porla SEC ID NO:20, donde las regions correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y las regiones dentro de la SEC ID NO:20 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, que contiene secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1; y una cadena V_L con identidad por la SEC ID NO:29, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 que contiene CDR1, CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1 , CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO:29 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de similitud a FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1. En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena de V_H que contiene la SEC ID NO:20 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO:29.

En algunos aspectos, los péptidos de un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contienen: una cadena de V_H SEC ID NO:38, donde las regions correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 3 mostrado en

la tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y dentro de las regiones SEC ID NO:38 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, que contiene secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1, y una cadena V_L con identidad por la SEC ID NO:47, donde las regions correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1 , CDR2, y CDR3, y las regiones dentro de la SEC ID NO:47 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de similitud a FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1.En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena de V_H que contienen la SEC ID NO:38 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO:47.

En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene: una cadena de V_H con identidad por la SEC ID NO:56, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y las regiones dentro de la SEC ID NO:56 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1, y una cadena V_L con similitud a la SEC ID NO:65, donde las regions correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO:65 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1.En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contienen una

cadena de V_H que contiene la SEC ID NO:56 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO:65.

En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene: una cadena de V_H con similitud a la SEC ID NO:74, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y dentro de la SEC ID NO:74 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1, y una cadena V_L con similitud a la SEC ID NO: 83, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de la CDR1 , regiones CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 83 correspondientes con FR1, FR2, FR3, FR4, que contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99% o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 del V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la tabla 1. En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena de V_H que contiene la SEC ID NO:74 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO:83. En algunos aspectos, los péptidos se unen inmunoespecíficamente a por lo menos la angiopoyetina-2. En algunos aspectos, las composiciones incluyen además uno o más terapéuticos contra el cáncer. En algunos aspectos, las composiciones se formulan como una composición farmacéutica.

En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene: un cadena V_H con similitud a la SEC ID NO:222, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 10 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, dentro de la SEC ID NO:222 correspondiente con FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80% , 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1; y

una cadena V_L con similitud a la SEC ID NO:224, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1 , CDR2, y CDR3, y dentro de la SEC ID NO:224 correspondientes con FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de similitud con FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la tabla 1. En algunos aspectos, los péptidos incluyen un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena de V_H que contiene la SEC ID NO:222 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO:224. En algunos aspectos, los péptidos se unen inmunoespecíficamente a por lo menos la angiopoyetina-2. En algunos aspectos, las composiciones incluyen además uno o más terapéuticos contra el cáncer. En algunos aspectos, las composiciones se formulan como una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, la divulgación incluyen métodos de tratamiento de cáncer en un sujeto. En algunos aspectos, los métodos incluyen administrar a un sujeto una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-27.

La presente divulgación proporciona también métodos de aislamiento de anticuerpos humanos de pacientes con cáncer después de la inmunoterapia.

En algunas realizaciones, las revelaciones incluyen métodos de obtención de células inmunes dirigidas contra un antígeno propio de un sujeto, el método consiste en identificar un sujeto que presenta una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio, proporcionando una forma multimérica del antígeno propio, contactando la forma multimérica del antígeno propio con una muestra del sujeto exhibiendo una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio, y la obtención de células inmunes unidos a la forma multimérica del antígeno propio.

En algunas realizaciones, las revelaciones incluyen métodos de obtención de células inmunes de un paciente de cáncer dirigido contra un antígeno propio, el método consiste en identificar un sujeto que presenta una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio; proporcionando una forma multimérica del antígeno propio; contactando la forma multimérica del antígeno propio con una muestra del sujeto exhibiendo una respuesta

inmune positiva hacia el antígeno propio; y obteniendo células inmunes unidos a la forma multimérica del antígeno propio.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto cualquiera en la técnica a la que pertenece esta invención. Métodos y materiales se describen en el presente documento para su uso en la presente invención; otros, métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica también se pueden utilizar. Los materiales, métodos, y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes, secuencias, las entradas en las bases de datos, y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las definiciones, se controlaran.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las figuras, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG.1 | La secuencia de ácido nucleico de la región hipervariable de la cadena pesada (V_H) del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti- MHC de clase I de proteína A de cadena relacionada (MICA)) (SEC ID NO:1).

FIG.2 | La secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 2).

FIG.3 | La secuencia de ácido nucleico de la región hipervariable de la cadena pesada ($V_{L)}$ del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 10).

FIG.4 | La secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 1 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 11).

FIG.5 | La secuencia de ácido nucleico de cadena V_H del anticuerpo ID 2 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 19).

FIG.6 | La secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo ID 2 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 20).

FIG.7 | La secuencia de ácido nucleico de la región hipervariable de la cadena pesada V_L del anticuerpo ID 2 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 28).

FIG.8 | La secuencia de aminoácidos de cadena V_L del anticuerpo ID 2 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 29).

FIG.9 | La secuencia de ácido nucleico de la cadena V_H del anticuerpo ID 3 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 37).

FIG.10 | La secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo ID 3 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 38).

FIG.11 | La secuencia de ácido nucleico de la cadena V_L del anticuerpo ID 3 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 46).

FIG.12 | La secuencia de aminoácidos de cadena V_L del anticuerpo ID 3 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 47).

FIG.13 | La secuencia de ácido nucleico de la cadena V_H del anticuerpo ID 4 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 55).

FIG.14 | La secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo ID 4 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 56).

FIG.15 | La secuencia de ácido nucleico de la cadena V_L del anticuerpo ID 4 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 64).

FIG.16 | La secuencia de aminoácidos de cadena V_L del anticuerpo ID 4 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 65).

FIG.17 | La secuencia de ácido nucleico de la cadena V_H del anticuerpo ID 5 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 73).

FIG.18 | La secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo ID 5 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 74).

FIG.19 | La secuencia de ácido nucleico de la cadena V_L del anticuerpo ID 5 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 82).

FIG.20 | La secuencia de aminoácidos de cadena V_L del anticuerpo ID 5 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 83).

FIG.21A-21F | Ilustra métodos ejemplares para preparar anticuerpos de células B. (A) El antígeno se expresa con un marcador BirA para la biotinilación y tetramerización sitio especifica y con estreptovidina marcada fluorescentemente. (B) Las células B son marcadas con un tetrámero y un panel de anticuerpos monoclonales. El Tetrámero$^+$, las células B de memoria con recombinación del cambio de clase son células individuales

clasificadas en tiras de geles producto de PCR. (C) la amplificación del ARNm se realiza con la ARN polimerasa de T7. (D) La secuenciación de productos de la PCR se lleva a cabo utilizando productos de PCR de 300-400bp. (E) La superposición de PCR se utiliza para la construcción de secuencias de cadenas pesadas de longitud total IgG1 y cadenas livianas kappa / lambda las cuales son clonadas en vectores separados. Los vectores se transfectaron de forma transitoria en células CHO-S para la expresión de anticuerpos recombinantes completamente humanos. (F) Los anticuerpos son probados para unión a antígenos y evaluados para potenciales propiedades terapéuticas.

FIGs.22A-22B | Gráficos que muestran la comparación del antígeno monomérico y tetramérico para la identificación de las células B de memoria. (A) Los antígenos Mono-biotinilados TTCF o CD80 fueron marcados directamente con fluoróforo Alexa-488; los tetrámeros fueron generados con estreptavidina no marcada. Las células B enriquecidas de cada donante fueron divididas en tres fracciones y se tiñeron con tetrámero de control CD80, monomero de TTCF, o tetrámero de TTCF a la misma concentración total de antígeno de 0,125 µg/mL. Las gráficas de FACS representan las células B de memoria con recombinación del cambio de clase $CD19^{+}$ $CD27^{+}$ IgM^{-} ; los números adyacentes a los grupos celulares representan el porcentaje del grupo parental. (B) Las frecuencias del tetrámero $^{+}$ de células B de memoria detectados en tres donantes diferentes. Los números se calculan como células de tetrámero $^{+}$ por $1x10^{6}$ de células $CD19^{+}$ B de memoria.

FIGs.23A-23B | Los gráficos de línea que muestran alta afinidad de unión de TTCF mediante anticuerpos generados de plasmablastos y células B de memoria. Los experimentos de unión de saturación se llevaron a cabo para determinar las afinidades de los anticuerpos recombinantes. El antígeno TTCF se marcó con europio, el cual emite una fuerte señal fluorescente a 615 nm tras la incubación con un reactivo quelante. Los anticuerpos fueron inmovilizados en una placa de 96 pozos e incubados con europio de TTCF (100 nM a 4 pM) durante dos horas a 37 ° C. Los recuentos fluorescentes a 615 nm fueron registrados y el K_D calculado utilizando análisis de regresión no lineal. El anticuerpo de control (clon 8.18.C5) que además se produjo en células CHO-S fue incluido en todos los experimentos. (A) Los Abs 1 y 2 recombinantes de TTCF fueron generados a partir de plasmablastos de tetrámero $^{+}$ de TTCF (donante 1). (B) Los anticuerpos 3, 4, y 5

de TTCF se originaron a partir de células B de memoria de tetrámero $^{+}$ de TTCF de tres donantes diferentes.

FIG.24 | Gráfico de barras que muestra la unión de anticuerpos anti-MICA con microesferas de luminex recubiertas de MICA.

FIGs.25A-25O | Gráficos de líneas que muestran la unión de los anticuerpos anti-MICA a microesferas recubiertas de MICA.

FIGs. 26A-26D | Gráficos de barras que muestran la unión de cuatro anticuerpos humanos específicos de angiopoyetina 2, como también un anticuerpo de control para tres angiopoyetinas humanas (angiopoyetina-1, 2 y 4) y similar a Ang-3. Las angiopoyetinas recombinantes se inmovilizan en un plato de ELISA y se detecta la unión de los anticuerpos recombinantes humanos con la estreptavidina marcada con europio.

FIGs.27A-27C | Muestra gráficos y un gel que relaciona el aislamiento de anticuerpos específicos de angiopoyetina de un paciente con cáncer de pulmón. (A) La reactividad de la angiopoyetina-2 del suero del paciente con cáncer de pulmón (L19) (diluido 1:1000), determinado por ELISA. (B) El gráfico de FACS que refleja la muestra de PBMC (punto de tiempo-10/98) de los grupos celulares de células B IgM CD19 $^{+,}$ CD27 $^{+}$ con CD19 en el eje X y marcadas en el eje Y fluorescentemente con-angiopoyetina-2. (C)Los productos de PCR de la cadena pesada, liviana, y la región bisagra de las células B de memoria reactivas a angiopoyetina-2 aisladas del paciente L19. El marcador de 500 pares de bases se indica a la izquierda.

FIG.28 | La secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada hipervariable ($V_{H)}$ del anticuerpo ID 6 (anticuerpo anti secuencia A (MICA) relacionado al polipéptido del MHC clase I) (SEC ID NO: 148).

FIG.29 | Secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo 6 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 149).

FIG.30 | Secuencia de ácido nucleico de la region hipervariable de la cadena liviana ($V_{L)}$ del anticuerpo ID 6 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 150).

FIG.31 | Secuencia de aminoácidos de cadena V_L del anticuerpo ID 6 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 151).

FIG.32 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada hipervariable ($V_{H)}$ del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti secuencia A (MICA) relacionado al polipéptido del MHC clase I) (SEC ID NO: 167).

FIG.33 | Secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 168).

FIG.34 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena hipervariable ($V_{L)}$ del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 169).

FIG.35 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 7 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 170).

FIG.36 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada hipervariable (VH) del anticuerpo ID 86 (anticuerpo anti secuencia A (MICA) relacionado al polipéptido del MHC clase I) (SEC ID NO: 185).

FIG.37 | Secuencia de aminoácidos de la cadena VH del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 186).

FIG.38 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena liviana hipervariable (VL) del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 187).

FIG.39 | Secuencia de aminoácidos de la cadena VL del anticuerpo ID 8 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 188).

FIG.40 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada hipervariable ($V_{H)}$ del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti secuencia A (MICA) relacionado al polipéptido del MHC clase I) (SEC ID NO: 203).

FIG.41 | Secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 204).

FIG.42 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena liviana hipervariable ($V_{L)}$ del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 205).

FIG.43 | Secuencia de aminoácidos de la cadena V_L del anticuerpo ID 9 (anticuerpo anti-MICA) (SEC ID NO: 206).

FIG.44 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_H del anticuerpo ID 10 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 221).

FIG.45 | Secuencia de aminoácidos de cadena V_H del anticuerpo ID 10 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 222).

FIG.46 | Secuencia de ácido nucleico de la cadena V_L del anticuerpo ID 10 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 223).

FIG.47 | Secuencia de aminoácidos de cadena V_L del anticuerpo ID 10 (anticuerpo anti-angiopoyetina-2) (SEC ID NO: 224).

FIGs.48A-G | Gráficos de líneas que muestran la unión alelo específica de MICA por los anticuerpos anti-MICA recombinantes.

FIG.49 | Gráfico de líneas que muestra el marcaje de las células tumorales autólogas por el anticuerpo anti-MICA CM24002 Ab2.

FIG.50 | Una serie de gráficos de FACS que muestran la regulación de NKG2D por el MICA del suero. Las células NK humanas se incubaron con suero de control de paciente CM24002 a una dilución de 1:10 durante 48 horas. Los anticuerpos indicados se añadieron al inicio de la incubación a una concentración de 10 mg / ml. La expresión de NKG2D se evaluó en las células CD56 + NK por citometría de flujo.

FIG.51 | Una serie de gráficos de FACS que muestran la regulación de NKG2D por MICA recombinante. Células NK humanas se incubaron con MICA recombinante a una concentración de 2 ng / ml durante 48 horas. Los anticuerpos indicados se añadieron al inicio de la incubación a una concentración de 10 mg / ml. Después de 48 horas, la expresión de NKG2D se evaluó en células CD56 + NK mediante citometría de flujo.

FIG.52 | Gráfico de líneas que demuestra un mejoramiento de la toxicidad mediada por células por el anticuerpo anti-MICA CM24002 Ab2. Las células NK humanas fueron incubadas con MICA recombinante (2ng/ml) durante 48 horas en presencia de anticuerpos indicados a 10 mg / ml. La capacidad de las células NK (efectoras) para matar células diana K562 se evaluó midiendo la liberación de LDH después de la incubación por 4 horas a las proporciones indicadas.

FIG.53 | Demostración en gráfica de barras de la toxicidad mediada por células por los anticuerpos anti-MICA Ab2 CM24002 CM33322 y AB29. Las células NK humanas se incubaron con MICA recombinante (2ng/ml) durante 48 horas en presencia de anticuerpos indicados a 10 mg / ml. La capacidad de las células NK (efectoras) para matar células diana K562 se evaluó midiendo la liberación de LDH después de la incubación de 4 horas. El anticuerpo bloqueador de NKG2D o anticuerpo bloqueador Fc se adicionó durante la

incubación de 4 hr del efector y las células diana para evaluar la contribución del receptor Fc y NKG2D a la toxicidad mediada por células.

FIG.54 | Una serie de gráficos de líneas que muestra la unión del dominio alfa 3 de MICA por los anticuerpos recombinantes anti-MICA. Los dominios de alfa 3 de MICA recombinantes se biotinilaron y capturaron en la superficie de microesferas recubiertas con estreptavidina. Anticuerpos indicados se incubaron a 10µg/ml con microesferas revestidas con la proteína recombinante individual durante 1 hora. Las microesferas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugadas con FITC posteriormente. La fluorescencia de FITC se cuantificó por citometría de flujo.

FIG.55 | Los gráficos de líneas que muestran el marcaje de las células tumorales mediante anticuerpos anti-MICA CM24002 CM33322 Ab2 y AB29. La fluorescencia se determinó por citometría de flujo.

FIG.56 | Gráfico de barras que demuestra especificidad alélica de MICA de los anticuerpos anti-MICA CM33322 Ab29 como se determina por el ensayo de Luminex.

FIG.57 | Gráficos de barras que muestran la unión del anticuerpo anti-Ang6 Ab2 anti-angiopoyetina 2 específico, así como un anticuerpo de control a tres angiopoyetinas humanas (angiopoyetina-1, 2 y 4) y similar a ang-3. Las angiopoyetinas recombinantes se inmovilizan en un plato de ELISA y la unión de los anticuerpos recombinantes humanos se detectó con estreptavidina marcada con europio.

Descripción detallada

La presente divulgación se basa, en parte, en la observación de que los anticuerpos dirigidos contra dianas terapéuticas importantes en una enfermedad pueden ser obtenidos de sujetos humanos expuestos a la enfermedad mediante el marcaje de las células B con una forma tetramérica del antígeno de interés. Como se describe arriba en la sección de antecedentes, los métodos anteriores se limitan por lo menos en que son ineficientes en la identificación de células B apropiadas en sujetos humanos y/o porque inducen algunas células B capturadas a experimentar cambios fenotípicos, reduciendo así su valor. En contraste, los métodos que se describen en el presente documento que permiten la captura de las células B de memoria rara o alteradas dirigidas contra los antígenos específicos relacionados con la enfermedad. Como se describe a continuación, los métodos requieren

de tetramerización del antígeno relacionado con la enfermedad, proceso el cual, como se demuestra en los Ejemplos a continuación, mejora la identificación de células B de memoria apropiadas. Específicamente, los métodos aquí presentes permiten la captura más eficiente de células B de memoria apropiadas por periodos prolongados de tiempo luego de la exposición inicial de un sujeto al antígeno. Los métodos aquí presentes incluyen además anticuerpos (y péptidos generados a partir de secuencias de tales anticuerpos) generados utilizando material genético obtenido a partir de células B de memoria capturadas utilizando los métodos revelados en este documento.

Como se describe aquí son anticuerpos humanos anti secuencia A (MICA) relacionado al polipéptido del MHC clase I y anticuerpos humanos dirigidos contra la angiopoyetina-2. Ambos tipos de anticuerpos humanos fueron identificados a partir de pacientes que habían recibido una vacuna contra el cáncer de base celular (células tumorales autólogas traducidas de GM-CSF) por métodos que implican el uso de antígenos tetraméricos.

En algunos casos, las divulgación proporciona métodos para obtener o atacar específicamente anticuerpos dirigidos con potencial terapéutico de sujetos humanos seleccionados y composiciones terapéuticas que resultan de las mismas. Estos métodos pueden incluir: la obtención o ataque a las células inmunes en un sujeto humano, en el que las células inmunes incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, células B y/o células B de memoria, para aislar o purificar el material genético (por ejemplo, ADN y/o ARNm) de las células inmunes obtenidas o atacadas, y utilizando el material genético aislado o purificado para producir composiciones terapéuticas, por ejemplo, las composiciones terapéuticas aquí reveladas. Una descripción adicional de los métodos se proporciona en la sección titulada "Métodos", más adelante.

En algunos casos, las revelaciones proporcionan composiciones terapéuticas (por ejemplo, incluyendo péptidos terapéuticos, incluyendo los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, derivados de anticuerpos, y/o conjugados de anticuerpos) relacionado con los anticuerpos presentes en los sujetos que tienen o tuvieron una condición o enfermedad y que mostraron una respuesta inmune positiva hacia la condición o enfermedad.

Composiciones terapéuticas

En algunos casos, las composiciones terapéuticas en el presente documento pueden interactuar con (por ejemplo, se unen, se unen específicamente y/o se unen inmunoespecíficamente) parejas de unión (por ejemplo, un inmunógeno (s), antígeno (s), y/o epítope (s)) relacionados con una enfermedad o condición, en el que la interacción entre la composición terapéutica y las parejas de unión resulta en una respuesta inmune positiva hacia la condición o enfermedad (por ejemplo, una disminución en el nivel de la enfermedad o de síntomas de la misma en un sujeto).

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen (por ejemplo, que contienen, que consisten esencialmente de, o consisten en) al menos uno (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis) región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada hipervariable ($V_{H)}$ y/o de la cadena liviana hipervariable ($V_{L)}$ del anticuerpo ID 1, 2, 3, 4, o 5, 6, 7, 8, 9 o 10, mostrado en la Tabla 1.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen (por ejemplo, que consisten, que consisten esencialmente de, o consisten en) al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis) región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada hipervariable (V_H) y/o de la cadena liviana hipervariable ($V_{L)}$ del anticuerpo ID 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, mostrado en la Tabla 1, y que interactúan con (por ejemplo, que se unen, se unen específicamente y/o se unen inmunoespecíficamente) la proteína A relacionada con el MHC clase I (MICA) (por ejemplo, UniGene Hs.130838)) (por ejemplo, MICA soluble (sMICA)) y/o angiopoyetina-2 (por ejemplo, UniGene Hs.583870), incluyendo epítopes de los mismos.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9 mostrado en la Tabla 1, donde se une el péptido (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, los péptidos pueden incluir al menos dos CDRs, donde al menos dos CDRs son CDRs mostrados en la Tabla 1 para diferentes anticuerpos. En otras palabras, los CDRs (y los FRs y/o secuencias de AA) mostrados en la Tabla 1 para los anticuerpo IDs 1, 6, 7, 8 y 9 son intercambiables y se pueden combinar para generar péptidos, siempre y cuando los péptidos se unan (por ejemplo, se unen específicamente y/o

se unen inmunoespecíficamente) para MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6 , 7, 8 y/o 9 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 y/o 9, mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen una de las SEC ID NO: 2, 149, 168, 186 o 204 y/o una de las SEC ID NO: 11, 151, 170, 188, o 206. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA solubles (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 mostrados en la Tabla 1, en el que se une el péptido (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 6 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 6, mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen la SEC ID NO: 149 y/o SEC ID NO: 151. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la Tabla 1, donde el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 7 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 7, mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen la SEC ID NO: 168 y/o SEC ID NO: 170. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la Tabla 1, en el que el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 8 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 8, mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen la SEC ID NO: 186 y/o SEC ID NO: 188. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA solubles (sMICA))). En algunos

casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 mostrados en la Tabla 1, donde el péptido se une (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA soluble (sMICA))). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 9 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 9, mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen la SEC ID NO: 204 y/o SEC ID NO: 206. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a MICA (por ejemplo, MICA humana (por ejemplo, MICA solubles (sMICA))). En algunos casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y MICA puede estar entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 mostrados en la Tabla 1, en la que se une el péptido (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, los péptidos pueden incluir al menos dos CDRs, en el que los al menos dos CDRs son CDRs mostrados en la Tabla 1 para los diferentes anticuerpos. En otras palabras, las CDRs (y las FR y/o secuencias de AA) mostradas en la Tabla 1 para los anticuerpos IDs de 2, 3, 4, 5, y 10 son intercambiables y se pueden combinar para generar péptidos, siempre y cuando los péptidos se unan (por ejemplo, se unen específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L

del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5, y/o 10 5, mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen una de las SEC ID NO: 20, 38, 56, 74, o 222 y/o una de las SEC ID NO: 29, 47, 65, 83 o 224. En algunos casos, los péptidos incluyen una de las SEC ID NO: 20, 38, 56, 74, o 222 y uno de las SEC ID NO: 29, 47, 65, 83 o 224. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana (por ejemplo, UniGene Hs.583870)).

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2 mostrados en la Tabla 1, en el que se une el péptido (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina -2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 2 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 2, mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen la SEC ID NO: 20 y/o SEC ID NO: 29. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3 mostrados en la Tabla 1, en el que se une el péptido (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina -2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En

algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 3 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3 mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 3, mostrados en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen la SEC ID NO: 38 y/o SEC ID NO: 47. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la Tabla 1, en el que se une el péptido (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina -2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 4 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 4, mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen la SEC ID NO: 56 y/o SEC ID NO: 65. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de la unión entre el péptido y la angiopoyetina-2 puede ser entre X-Y, por ejemplo, X-Y, X-Y. En algunos casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la Tabla 1, en el

que se une el péptido (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina -2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 5 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 5, mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen la SEC ID NO: 74 y/o SEC ID NO: 83. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen al menos un CDR de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la Tabla 1, en la que se une el péptido (por ejemplo, se une específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina -2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR3 de V_H y V_L del anticuerpo ID 10 y CDR1 y/o CDR2 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10 mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1, CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10. En algunos casos, tales péptidos incluyen CDR1 CDR2, y CDR3 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10 y al menos uno de FR1 FR2 FR3, y/o FR4 de V_H y/o V_L del anticuerpo ID 10, mostrado en la Tabla 1. En algunos casos, tales péptidos incluyen la SEC ID NO: 222 y/o SEC ID NO: 224. En cada caso, el péptido se puede unir (por ejemplo, unirse específicamente y/o se une inmunoespecíficamente) a la angiopoyetina-2 (por ejemplo, angiopoyetina-2 humana). En algunos casos, la afinidad de la unión entre los péptidos y angiopoyetina-2 puede ser de entre aproximadamente 0,1 nM a 1μM, por ejemplo, aproximadamente 10 nM.

En algunos casos, los péptidos que se unen a la angiopoyetina-2 también se pueden unir a la angiopoyetina-1 (por ejemplo, Unigene Hs.369675) y/o angiopoyetina-4 (por ejemplo, Unigene Hs.278973). Por ejemplo, en algunos casos, los péptidos que se unen a la angiopoyetina-2 pueden también unirse específicamente y/o inmunoespecíficamente con relación a otros antígenos (distintos de la angiopoyetina-1) a la angiopoyetina-1. En algunos casos, los péptidos que se unen a la angiopoyetina-2 también se pueden unir específicamente y/o inmunoespecíficamente con relación a otros antígenos (distintos de la angiopoyetina-4) a la angiopoyetina-4.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos que incluyen: la SEC ID NO: 2 y/o SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 149 y/o SEC ID NO: 151; SEC ID NO: 168 y/o SEC ID NO:170, SEC ID NO: 186 y/o SEC ID NO: 188; SEC ID NO: 204 y/o SEC ID NO: 206; SEC ID NO: 20 y/o SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 38 y/o SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 56 y/o SEC ID NO: 65, SEC ID NO: 74 y/o SEC ID NO: 83, y SEC ID NO: 222 y/o SEC ID NO : 224.

1

TABLE 1

ID	Target	V_H | V_L	FR1 *	CDR1 **	FR2 *	CDR2 **	FR3 *	CDR3 **	FR4 *	AA #	Acido nucleico ##
1	MICA humana	V_H	QVQLQQW GAGLLKP SETLALTCAV S (SEC ID NO: 3)	GGSF TDHY (SEC ID NO: 4)	WSWIR QAPGK GLEWIGE (SEC ID NO: 5)	INH SGV T (SEC ID NO: 6)	NYNPS LKSRLT ISVDTS KSQFSL RLTSVT AADTA LYYC (SEC ID NO: 7)	AKTG LYYD DVW GTFR PRGG FDS (SEC ID NO: 8)	WGQGT LVTVSS (SEC ID NO: 9)	SEC ID NO: 2 (Véase Fig. 2).	SEC ID NO: 1 (.Véase figura 1)

		V_L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS (SEC ID NO: 12)	QSILYSSDNKNY (SEC ID NO: 13)	LAWYQHKPGQPPKLLFY (SEC ID NO: 14)	WAS (SEC ID NO: 15)	IRESGVPDRFSGGGSGTDFTLT ISSLQAEDVAV YYC (SEC ID NO: 16)	QQYYSPPCS (SEC ID NO: 17)	FGQGTKLEIQ (SEC ID NO: 18)	SEC ID NO: 11 (Véase Fig. 4)	SEC ID NO: 10 (Véase Fig. 3)
6	MICA humana	V_H	QVQLQESGPGLVEPSGTLSLTCTVS (SEC ID NO: 152)	GGSISRSNW (SEC ID NO: 153)	WSWVRQPPGEGLEWIGE (SEC ID NO: 154)	IHHIGRS (SEC ID NO: 156)	SYNPSLKSRVTMSVDKSQNQFSLRLTSVTAADTAVYY (SEC ID NO: 157)	CAKNGYYAMDVW (SEC ID NO: 158)	GQGTTVTVSS (SEC ID NO: 155)	SEC ID NO: 149 (Véase la fig. 28)	SEC ID NO: 148 (Véase la fig. 29)
		V_L	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS (SEC ID NO: 159)	QSVSSDF (SEC ID NO: 160)	LAWYQQKPGQAPRLLIY (SEC ID NO: 161)	ATS (SEC ID NO: 162)	FRATGISDRFSGSGSGTDFSLTINRLEPEDFAVYY (SEC ID NO: 163)	CQHYRSSPPWYTF (SEC ID NO: 164)	AQGTKLDMRRTVAAPSV (SEC ID NO: 165)	SEC ID NO: 151 (Véase la fig. 31)	SEC ID NO: 150 (Véase la fig. 30)
7	MICA humana	V_H	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS (SEC ID NO: 171)	GASITNGAW (SEC ID NO: 172)	WSWVRQPPGKGLEWIGE (SEC ID NO: 173)	IYLNGNT (SEC ID NO: 174)	NSNPSLKSRVIISVDKSKNHFSLTLNSVTAADTAVYY (SEC ID NO: 166)	CAKNAAYNLEFW (SEC ID NO: 176)	GQGALVTVSS (SEC ID NO: 177)	SEC ID NO: 168 (Véase la fig. 33)	SEC ID NO: 167 (Véase la fig. 32)
		V_L	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS (SEC ID NO: 178)	QTVSSPY (SEC ID NO: 179)	VAWYQQKRGQAPRLLIY (SEC ID NO: 180)	GAS (SEC ID NO: 181)	TRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY (SEC ID NO: 182)	CQQYDRSYYYTF (SEC ID NO: 183)	GQGTKLEIK (SEC ID NO: 184)	SEC ID NO: 17	SEC ID NO: 16

										0 (Véase la fig. 35)	9 (Véase la fig. 34)
8	MICA humana	V_H	QVQLQESGPGLVKPSENLSLTCTVS (SEC ID NO: 189)	DASMSDYH (SEC ID NO: 190)	WSWIRQAAGKGLEWIGR (SEC ID NO: 191)	MYSTGSP (SEC ID NO: 192)	YYKPSLKGRVTMSIDTSKNQFSLKLASVTAADTAIYY (SEC ID NO: 193)	CASGQHIGGWVPPDFW (SEC ID NO: 194)	GQGTLVTVSS (SEC ID NO: 195)	SEC ID NO: 186 (Véase la fig. 37)	SEC ID NO: 185 (Véase la fig. 36)
		V_L	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSS (SEC ID NO: 196)	EGLVYSDGDTY (SEC ID NO: 197)	LSWFHQRPGQPPRLLIY (SEC ID NO: 198)	KIS (SEC ID NO: 199)	NRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYY (SEC ID NO: 200)	CMQATHFPWTF (SEC ID NO: 201)	GQGTKVEVKR (SEC ID NO: 202)	SEC ID NO: 188 (Véase la fig. 39)	SEC ID NO: 187 (Véase la fig. 38)
9	MICA humana	V_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO: 207)	GFTFSSYG (SEC ID NO: 208)	LTWIRQAPGKGLEWVSS (SEC ID NO: 209)	ISGSGNNT (SEC ID NO: 210)	YYADSVKGRFTISRDKVKKTLYLQMDSLTVGDTAVYY (SEC ID NO: 211)	CLGVGQ (SEC ID NO: 212)	GHGIPVIVSS (SEC ID NO: 213)	SEC ID NO: 204 (Véase la fig. 41)	SEC ID NO: 203 (Véase la fig. 40)
		V_L	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSS (SEC ID NO: 214)	QSLVHRDGNTY (SEC ID NO: 215)	LSWFLQRPGQAPRLLIY (SEC ID NO: 216)	RIS (SEC ID NO: 217)	NRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYY (SEC ID NO: 218)	CMQATQIPNTF (SEC ID NO: 219)	GQGTKLEIK (SEC ID NO: 220)	SEC ID NO: 206 (Véase	SEC ID NO: 205 (Véase la

										la fig. 43)	fig. 42)
2	Angiopoyetina-2	V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO: 21)	GFTFSSYA (SEC ID NO: 22)	MSWVRQAPGKGLEWVSG (SEC ID NO: 23)	IYWSGGST (SEC ID NO: 24)	YYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRADDTAVYYC (SEC ID NO: 25)	ARGDYYGSGAHFDY (SEC ID NO: 26)	WGQGTLVTVSS (SEC ID NO: 27)	SEC ID NO: 20 (Véase Fig. 6)	SEC ID NO: 19 (Véase Fig.5)
		V_L	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSS (SEC ID NO: 30)	QSLVHSDGNTY (SEC ID NO: 31)	LSWLQQRPGQPPRLLIY (SEC ID NO: 32)	QIS (SEC ID NO: 33)	NRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC (SEC ID NO: 34)	MQGTQFPRT (SEC ID NO: 35)	FGQGTKVEIK (SEC ID NO: 36)	SEC ID NO: 29 (Véase fig. 8)	SEC ID NO: 28 (Véase Fig. 7)
3	Angiopoyetina-2	V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO: 39)	GFTFSNNW (SEC ID NO: 40)	MHWVRQAPGKGLEWISE (SEC ID NO: 41)	IRSDGNFT (SEC ID NO: 42)	RYADSMKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRVEDTGLYYC (SEC ID NO: 43)	ARDYPYSIDY (SEC ID NO: 44)	WGQGTLVTVSS (SEC ID NO: 45)	SEC ID NO: 38 (Véase. Fig. 10)	SEC ID NO: 37 (Véase Fig. 9.)
		V_L	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCTSS (SEC ID NO: 48)	QSLVHSNGNTY (SEC ID NO: 49)	LSWLQQRPGQPPRLLIY (SEC ID NO: 50)	EIS (SEC ID NO: 51)	KRVSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEC ID NO: 52)	MQGKQLRT (SEC ID NO: 53)	FGQGTKLEIK (SEC ID NO: 54)	SEC ID NO: 47 (Véase la fig. 12)	SEC ID NO: 46 (Véase la fig. 11)
	Angio	V_H	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCAAS (SEC ID NO: 57)	GFILSNFA (SEC ID NO: 58)	MSWVRQA PGKGLDWVSG (SEC ID NO: 59)	NFGGRENT (SEC ID NO: 60)	YY ADSVKGRFTISRDSSKSTLYLQMNNLRAED TAVYYC (SEC ID NO: 61)	ARGD YHGSGAHFDY (SEC ID NO: 62)	WGQGILVTVSS (SEC ID NO: 63)	SEC ID NO: 56 (V	SEC ID NO: 55 (V

4	poyetina-2									véase la fig. 14)	ase la fig. 13)
		VL	DIVMTQSPLSSPVILGQPASISCRSS (SEC ID NO: 66)	QSLLHSDGNTY (SEC ID NO: 67)	LSWLHQRPGQPPRLLIY (SEC ID NO: 68)	QIS (SEC ID NO: 69)	NRF SGVPDRFSGSGTGTDFTLKISRVEAEDAGI YYC (SEC ID NO: 70)	MQGTEFPRT (SEC ID NO: 71)	FGQGTKVE IK (SEC ID NO: 72)	SEC ID NO: 65 (Véase la fig. 16)	SEC ID NO: 64 (Véase la fig. 15)
5	Angio poyetina-2	VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCATS (SEC ID NO: 75)	GFTFR TSS (SEC ID NO: 76)	MSWVRRAPGKGLEWVSA (SEC ID NO: 77)	IGAESHDT (SEC ID NO: 78)	HY TDSAEGRFTISKDYSKNTVYLQMNGLRVDDTAIYYC (SEC ID NO: 79)	AHHYYYGSRQKPKD WGDAFDM (SEC ID NO: 80)	WGQ GTMVSVSS (SEC ID NO: 81)	SEC ID NO: 74 (Véase Fig. 18)	SEC ID NO: 73 (Véase Fig. 17)
		VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS (SEC ID NO: 84)	QDISTW (SEC ID NO: 85)	LTWYQQRAGKAPNLLIY (SEC ID NO: 86)	GAS (SEC ID NO: 87)	TLEDGVPSRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPDDFATYYC (SEC ID NO: 88)	QQSHSFPYT (SEC ID NO: 89)	FGQ GTQLGIS (SEC ID NO: 90)	SEC ID NO: 83 (Véase la fig. 20)	SEC ID NO: 82 (Véase la fig. 19)
10	Angio poyetina-2	VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO: 225)	GFLISSYF (SEC ID NO: 226)	MSWVRQAPGKGPEWVSV (SEC ID NO: 227)	IYS DGST (SEC ID NO: 228)	YYVDSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTARYY (SEC ID NO: 229)	CATRHLNYDGDHW (SEC ID NO: 230)	GQGTLVTVSSASTK (SEC ID NO: 175)	SEC ID NO: 222 (Véase la fig. 45)	SEC ID NO: 221 (Véase la fig. 44)

		V_L	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS (SEC ID NO: 231)	QSLVHSDGNTY (SEC ID NO: 232)	LNWFHQRPGQSPRRLIY (SEC ID NO: 233)	KVS (SEC ID NO: 234)	KRDSGVPDRFSGSGSGSDFTLKISRVEAEDVGIYY (SEC ID NO: 235)	CMQGTHWPTF (SEC ID NO: 236)	GQGTKVEIKRTVAA (SEC ID NO: 237)	SEC ID NO: 224 (Véase la fig. 47)	SEC ID NO: 223 (Véase la fig. 46)

[*] Las secuencias incluyen secuencias o variantes con (por ejemplo, con al menos) 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, y/o 100% de similitud de secuencias para las secuencias mostradas.

[**] Las secuencias pueden incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco, menos de cinco, o menos de diez modificaciones de aminoácidos conservados.

[#] Las secuencias incluyen secuencias o variantes con (por ejemplo, con al menos) 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, y/o 100% de similitud de secuencias con las secuencias mostradas, por ejemplo, dentro de las regiones correspondientes con FR1, FR2, FR3, y/o FR4, y/o uno, dos, tres, cuatro, cinco, menos de 5, o menos de diez modificaciones de aminoácidos conservadoros dentro de las regiones correspondientes a las CDRs 1, 2, y/o 3.

[##] Las Secuencias incluyen secuencias o variantes con (por ejemplo, con al menos) 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, y/o 100% de similitud de secuencias para las secuencias mostradas, donde las secuencias codifican el AA correspondiente.

AA. [#] muestra la secuencia de aminoácidos de V_H o V_L.

Acido nucléico [##] muestra la secuencia de ácido nucléico de V_H o V_L.

Mientras que las regiones CDR y FR aparecen arriba, tales regiones también se pueden definir de acuerdo con Kabat (Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). La numeración de aminoácidos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también es de acuerdo a la de Kabat.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir péptidos, incluyendo por ejemplo, anticuerpos, incluyendo de longitud completa y/o anticuerpos intactos, o fragmentos de anticuerpos. Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse a una diana, tales como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región hipervariable de la molécula de inmunoglobulina específica. Como se usa aquí, el término "anticuerpo" abarca no sólo anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, sino también cualquier fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, "porción de unión a antígeno") o de cadena única de los mismos, proteínas de fusión que contienen un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que incluyen un sitio de reconocimiento del antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, como IgG, IgA o IgM (o subclase de los mismos), y el anticuerpo no tiene que ser de una clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y muchas de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada correspondientes a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Ejemplos de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos dos fragmentos diferentes epítopo de unión (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos camélidos, anticuerpos quiméricos, Fvs de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, los fragmentos Fab, F (ab ') 2 fragmentos, fragmentos de anticuerpos que exhiben la actividad biológica deseada (por ejemplo, la porción de unión al antígeno), ligado a disulfuro Fvs (dsFv), y anti-idiotípico (anti-Id) anticuerpos (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id a anticuerpos de la invención), los intracuerpos, y fragmentos de unión a epítope de cualquiera de los

anteriores. Los anticuerpos o fragmentos del anticuerpo pueden ser humanos o humanizados.

Los fragmentos de anticuerpos son adecuados para su uso en los métodos proporcionados mientras que retengan la afinidad deseada y especificidad del anticuerpo de longitud completa. Por lo tanto, un fragmento de un anticuerpo anti-MICA o el anticuerpo anti-angiopoyetina retendrá una capacidad para unirse a MICA o a la angiopoyetina, respectivamente, en la porción de Fv y la capacidad de unirse al receptor de Fc en las células dendríticas en la porción Fc. Tales fragmentos se caracterizan por propiedades similares a las que corresponden a la del anticuerpo anti MICA de longitud completa o a la del anticuerpo anti-angiopoyetina, es decir, los fragmentos se unirán específicamente a un antígeno MICA humano o el antígeno de la angiopoyetina, respectivamente, expresados en la superficie de una célula humana o el antígeno sMICA correspondiente que ha sido liberado al medio.

Un fragmento Fv es un fragmento del anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y de reconocimiento al antígeno. Esta región consiste en un dímero de dominio hipervariable de una cadena liviana y una pesada en estrecha asociación, que puede ser covalente en naturaleza, por ejemplo, en scFv. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio hipervariable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis CDRs o un subconjunto de los mismos confieren especificidad de unión antígeno anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio hipervariable (o la mitad de un Fv que contiene sólo tres CDRs específicos para un antígeno) puede tener la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque usualmente con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Los fragmentos de anticuerpos de la cadena única Fv o (scFv) comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv contiene además un polipéptido de enlace entre el dominios V_H y V_L, que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

El fragmento Fab contiene un dominio hipervariable y constante de la cadena liviana y un dominio hipervariable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo F (ab ') 2 contienen un par de fragmentos Fab que

están generalmente unidos de manera covalente cerca de sus extremos carboxi entre ellos mediante bisagras de cisteínas. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos también son conocidos en la técnica.

Los diacuerpos son pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos contienen un V_H conectado a un V_L en la misma cadena polipeptídica (V_H y $V_{L)}$. Mediante el uso de un enlace que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

Los anticuerpos lineales contienen un par de segmentos Fd en tándem (V_H -CH1-V_{H-} CH1$_)$ los cuales, junto con los polipéptidos de cadena liviana complementaria, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación se pueden modificar en la región Fc para proporcionar las funciones efectoras deseadas o la vida media en suero. En algunos casos, la región Fc puede ser conjugada con PEG o albúmina para aumentar la vida media en suero, o alguna otra conjugación que resulta en el efecto deseado. Alternativamente, cuando es deseable eliminar o reducir la función efectora, con el fin de minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, pueden usarse algunas otras regiones Fc.

Los anticuerpos humanos y humanizados incluyen anticuerpos que tienen regiones hipervariables y constantes derivadas de (o que tienen la misma secuencia de aminoácidos como las derivadas de) secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o sitio específica in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDRs y en particular la CDR3.

A "CDR" de un dominio hipervariable son residuos de aminoácidos en la región hipervariable que están identificados de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la agrupación de tanto Kabat como Chothia, AbM, de contacto, y/o definiciones conformacionales o cualquier método de la determinación de CDR bien conocido en la

técnica. Los CDRs de anticuerpos pueden ser identificados como las regiones hipervariables originalmente definidas por Kabat y otros. Véase, por ejemplo, Kabat y otros., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 ª ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de los CDRs también pueden ser identificadas como las estructuras de bucle estructurales originalmente reveladas por Chothia y otros. Véase, por ejemplo, Chothia y colaboradores, 1989, Nature 342:877-883. Otros enfoques para la identificación CDR incluyen la "definición de AbM", que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva utilizando el software de modelamiento de anticuerpo AbM de Molecular de Oxford (ahora Accelrys ®), o la "definición de contacto" del CDRs sobre la base de contactos de antígenos observados, expuesto por MacCallum y otros., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745. En otro enfoque, denominado en este documento como la "definición conformacional" de CDRs, las posiciones de las CDRs pueden ser identificados como los residuos que hacen contribuciones entálpicos a la unión al antígeno. Véase, por ejemplo, Makabe y otros., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Todavía otras definiciones de contorno de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero no obstante, se superpondran con al menos una parte de las CDRs de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de los hallazgos de predicción o experimentales de los residuos particulares o grupos de residuos o incluso CDRs completos que no impactan significativamente la unión al antígeno. Tal como se usa en el presente documento, un CDR puede referirse a CDRs definidos por cualquier enfoque conocido en la técnica, incluyendo combinaciones de enfoques. Los métodos utilizados en el presente documento pueden utilizar CDRs definidos de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier realización dada que contenga más de un CDR, los CDRs pueden ser definidos de acuerdo con cualquiera de Kabat, Chothia, extendidos, AbM, de contacto, y/o definiciones conformacionales.

En algunos casos, las secuencias de aminoácidos de los péptidos revelados en el presente documento pueden ser modificados y variados para crear variantes de péptidos (por ejemplo, péptidos con una homología de secuencia definida a los péptidos revelados en el presente documento), por ejemplo, siempre que la propiedad de unión al antígeno del péptido variante se mantenga o mejore en relación con el péptido sin modificar (propiedades de unión al antígeno de cualquier péptido modificado se pueden evaluar

utilizando los ensayos in vitro y/o in vivo revelados en este documento y/o técnicas conocidas en la técnica).

Si bien las variantes del péptido generalmente se observan y analizan en el nivel de aminoácidos, las modificaciones actuales son típicamente introducidas o realizadas a nivel del ácido nucleico. Por ejemplo, las variantes con 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, o 99% de similitud de secuencia de aminoácidos de los péptidos mostrados en la Tabla 1 se pueden generar mediante la modificación de los ácidos nucleicos que codifican la SEC ID NO: 1, 10, 19, 28, 37, 46, 55, 64, 73, y/o 82 o porciones / fragmentos de los mismos, usando técnicas (por ejemplo, técnicas de clonación) conocidos en la técnica y/o que se revelan en el presente documento.

Las modificaciones de la secuencia de aminoácidos típicamente se dividen en una o más de tres clases: modificaciones de sustitución, inserción, o deleción. Las inserciones incluyen amino y/o fusiones terminales así como inserciones intra-secuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Las inserciones normalmente serán inserciones mas pequeñas que las de fusiones terminales amino o carboxilo, por ejemplo, del orden de uno a cuatro residuos. Las deleciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de la proteína. Típicamente, no más de aproximadamente de 2 a 6 residuos se eliminan en cualquier sitio dentro de la molécula de proteína. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales, pero pueden ocurrir en un número de diferentes ubicaciones a la vez; inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente de 1 a 10 residuos de aminoácidos; y las deleciones oscilarán alrededor de 1 a 30 residuos. Las deleciones o inserciones se pueden realizar en pares adyacentes, por ejemplo, una deleción de 2 residuos o inserción de 2 residuos. Las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de los mismos pueden combinarse para llegar a una construcción final. Las mutaciones no deben colocar la secuencia fuera del marco de lectura y preferiblemente no crearán regiones complementarias que podrían producir estructura de ARNm secundaria. Las modificaciones de sustitución son aquellas en las que al menos un residuo se ha eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. En algunos casos, las sustituciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservados. En algunos casos, los péptidos de la presente invención pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos conservados en relación

con un péptido mostrado en la Tabla 1. Por ejemplo, las variantes pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20-30, 30-40, o 40-50 sustituciones de aminoácidos conservados con relación a un péptido mostrado en la Tabla 1. Alternativamente, las variantes pueden incluir 50 o menos, el 40 o menos, el 30 o menos, el 20 o menos, el 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, el 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos sustituciones de aminoácidos conservados en relación con un péptido mostrado en la Tabla 1. Tales sustituciones se hacen generalmente de acuerdo con la siguiente Tabla 2 y se refieren a sustituciones conservadas. Los métodos para la predicción de la tolerancia a la modificación de proteínas son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Guo y otros., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101 (25) :9205-9210 (2004)).

Tabla 2: Sustituciones de Aminoácidos conservados

Aminoácidos	Sustituciones (otros son conocidos en la técnica)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe

Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

En algunos casos, las sustituciones son no conservadas. Por ejemplo, un aminoácido en un péptido mostrado en la Tabla 1 puede ser sustituido con un aminoácido que puede alterar alguna propiedad o aspecto del péptido. En algunos casos, las sustituciones de aminoácidos no conservados se pueden hacer, por ejemplo, para cambiar la estructura de un péptido, para cambiar las propiedades de unión de un péptido (por ejemplo, para aumentar o disminuir la afinidad de unión del péptido a un antígeno y/o para alterar aumentar o disminuir la especificidad de unión del péptido al antígeno).

En algunos casos, los péptidos y/o variantes de péptidos puede incluir o pueden ser fragmentos de los péptidos mostrados en la Tabla 1. Tales fragmentos pueden incluir, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 , 48, 49, 50, 50-100, 101-150, menos aminoácidos que las CDRs, FRs, y/o AAs mostrados en la Tabla 1, por ejemplo, siempre y cuando los fragmentos retengan al menos una porción de las propiedades de unión del péptido de longitud completa (por ejemplo, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% de las propiedades de unión del péptido de longitud completa). Los truncamientos pueden ser hechos en el extremo amino-terminal, el extremo carboxi, y/o dentro de los péptidos de este documento.

En algunos casos, la superficie de interacción de una variante de péptido puede ser la misma (por ejemplo, sustancialmente la misma) como un péptido sin modificar, por ejemplo, para alterar (por ejemplo, aumento o disminución), conservar, o mantener las propiedades de unión de la variante del péptido en relación con el péptido no modificado. Los métodos para la identificación de la superficie de interacción de un péptido son conocidos en la técnica (Gong y otros, BMC: Bioinformatics, 6:1471-2105 (2007); Andrade y Wei y otros, Pure and Appl. Chem., 64 (11) :1777-1781 (1992); Choi y otros, Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, 77 (1) :14-25 (2009); Park y otros, BMC: and Bioinformatics, 10:1471-2105 (2009).

Los expertos en la técnica entienden fácilmente cómo determinar la identidad de dos polipéptidos (por ejemplo, un péptido no modificado y una variante del péptido). Por

ejemplo, la identidad se puede calcular después de alinear las dos secuencias de manera que la identidad está en su nivel más alto. Otra forma de calcular la identidad se puede realizar mediante algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse por el algoritmo de similitud local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math, 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de similitud de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Se pueden obtener los mismos tipos de identidad para ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos revelados en Zuker, Science 244:48-52 (1989); Jaeger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:7706-10 (1989); Jaeger y otros, Methods Enzymol. 183:281-306 (1989), los cuales se incorporan aquí como referencia para al menos el material relacionado con la alineación del ácido nucleico. Se entiende que cualquiera de los métodos típicamente se pueden utilizar y que en ciertos casos los resultados de estos diferentes métodos pueden diferir, pero el experto en la materia entiende si la similitud se encuentra con al menos uno de estos métodos, se diría que las secuencias tienen la similitud afirmada y son reveladas en este documento.

En algunos casos, como se describe con más detalle en la sección de métodos más abajo, las composiciones terapéuticas reveladas en la presente pueden ser producidas utilizando material genético (por ejemplo, ADN y/o ARNm) aislado y/o purificado a partir de células inmunes (por ejemplo, células B, incluyendo células B de memoria) obtenido utilizando los métodos revelados en este documento. Una vez que se ha obtenido dicho material genético, los métodos para utilizarlos para producir las composiciones terapéuticas reveladas en la presente son conocidos en la técnica y/o se resumen a continuación.

En algunos casos, los péptidos pueden incluir un marcador detectable. Como se usa en el presente documento, un "marcador" se refiere a una fracción que tiene al menos un elemento, isótopo, o grupo funcional incorporado en la fracción que permite la detección del péptido al que se fija el marcador. Los marcadores se pueden unir directamente (es decir, mediante un enlace) o pueden estar unidos por un enlace (por ejemplo, tal como, por

ejemplo, un, alquileno cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado sustituido o no sustituido; alquenileno cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o sin sustituir; alquinileno cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; heteroalquileno cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; heteroalquenileno cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; heteroalquinileno cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; arileno sustituido o no sustituido; heteroarileno sustituido o no sustituido, o acileno sustituido o no sustituido, o cualquier combinación de los mismos, que puede conformar un enlace). Los marcadores pueden estar unidos a un péptido en cualquier posición que no interfieran con la actividad biológica o característica del polipéptido de la invención que está siendo detectado.

Los marcadores pueden incluir: marcadores que contienen fracciones isotópicas, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados, incluyendo, pero no limitado a, ^{2} H, ^{3} H, ^{13} C, ^{14} C, ^{15} N, ^{31} P, ^{32} P, ^{35} S, ^{67} Ga, ^{99m} Tc (Tc-99m), ^{111} En, ^{123} I, ^{125} I, ^{169} Yb, y ^{186} Re; marcadores que incluyen fracciones inmunes o inmunorreactivas, que pueden ser anticuerpos o antígenos, que pueden estar unidos a enzimas (por ejemplo, tal como la peroxidasa de rábano picante); marcadores coloreados, luminiscentes, fosforescentes, o incluyen fracciones fluorescentes (por ejemplo, tales como el marcador fluorescente FITC); los marcadores que tienen uno o más fracciones de fotoafinidad; marcadores que tienen fracciones de ligando con uno o más similares de unión conocidos (tales como biotina-estreptavidina, FK506-FKBP, etc).

En algunos casos, los marcadores pueden incluir uno o más fracciones de fotoafinidad para la elucidación directa de interacciones intermoleculares en los sistemas biológicos. Una variedad de fotóforos conocidos puede ser empleados, la mayoría confiadamente en fotoconversión de compuestos diazo, azidas, o diazirinas a nitrenos o carbenos (véase, por ejemplo, Bayley, H., Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology (1983), Elsevier, Amsterdam, los cuales son incorporados en su totalidad aquí como referencia). En ciertas realizaciones de la invención, los marcadores de fotoafinidad empleados son o-, m- y p-azidobenzoilos, sustituidos con una o más fracciones de halógeno, incluyendo, pero no limitado a 4-azido-2, 3,5,6-ácido tetrafluorobenzoico .

Los marcadores también pueden ser o pueden servir como agentes de imágenes. Agentes de imágenes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los que se utilizan en la tomografía por emisiones de positrones (PET), tomografía asistida por ordenador (CAT), tomografía computarizada por emisión de fotón único, rayos X, fluoroscopia, y la resonancia magnética (MRI); antieméticos, y agentes de contraste. Agentes de diagnóstico de ejemplo incluyen pero no se limitan a, fracciones fluorescentes, fracciones luminiscentes, fracciones magnéticos; quelatos de gadolinio (por ejemplo, quelatos de gadolinio con DTPA, DTPA-BMA, DOTA y HP-DO3A), quelatos de hierro, quelatos de magnesio, quelatos de manganeso, quelatos de cobre, quelatos de cromo, materiales a base de yodo útiles para obtener imágenes de TAC y rayos X, y radionucleidos. Radionucleidos adecuados incluyen, pero no se limitan to, ^{123} I, ^{125} I, ^{130} I, ^{131} I, ^{133} I, ^{135} I, ^{47} Sc, ^{72} As, ^{72} Se, ^{90} Y, ^{88} Y, ^{97} Ru, ^{100} Pd, ^{101} mRh, ^{119} Sb, ^{128} Ba, ^{197} Hg, ^{211} At, ^{212} Bi, ^{212} Pb, ^{109} Pd, ^{111} In, ^{67} Ga, ^{68} Ga, ^{67} Cu, ^{75} Br, ^{77} Br, ^{99} mTc, ^{14} C, ^{13} N, ^{15} 0, ^{32} P, ^{33} P, y ^{18} F.

Las fracciones fluorescentes y luminiscentes incluyen, pero no se limitan a, una variedad de diferentes moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas comúnmente referidas como "tintes", "marcadores", o "indicadores". Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, colorantes de acridina, colorantes de Alexa, colorantes de cianina, etc. Fracciones fluorescentes y luminiscentes pueden incluir una variedad de proteínas de origen natural y derivados de las mismas, por ejemplo, variantes de ingeniería genética. Por ejemplo, las proteínas fluorescentes incluyen la proteína verde fluorescente (GFP), GFP mejorada, rojo, azul, amarillo, cian y proteínas fluorescentes de zafiro, proteína fluorescente de arrecifes de coral etc. Proteínas luminiscentes incluyen luciferasa, aequorina y derivados de las mismas. Numerosos colorantes y proteínas fluorescentes y luminiscentes son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación de Patentede los EE.UU. 2004/0067503; Valeur, B., "Molecular Fluorescence: Principles and Applications", John Wiley and Sons, 2002; y el Handbook of Fluorescences Probes and Research Products, Molecular Probes, 9th edition, 2002).

El término "purificado" tal como se utiliza aquí, se refiere a otras moléculas, por ejemplo, polipéptido, molécula de ácido nucleico que ha sido identificada y separada y/o recuperada de un componente de su entorno natural. Por lo tanto, en una realización, los

anticuerpos de la invención son anticuerpos purificados donde han sido separados de uno o más componentes de su ambiente natural.

El término "epítope", como se usa aquí se refiere a un determinante de proteína capaz de unirse a un anticuerpo. Los epítopes consisten habitualmente en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características carga específicas. Los epítopes conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a la primera, pero no el último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

En algunos casos, las divulgación proporciona secuencias de nucleótidos correspondientes a (por ejemplo, codificación) los péptidos revelados (por ejemplo, revelados en la Tabla 1). Estas secuencias incluyen todas las secuencias degeneradas relacionadas con los péptidos revelados, por ejemplo, todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica un péptido particular y variantes y derivados de los mismos. Por lo tanto, mientras que cada secuencia de ácido nucleico particular puede no ser descrita en el presente documento, se entiende que todas y cada secuencia es, de hecho, reveladas y descritas en el presente documento a través de las secuencias de polipéptidos revelados.

En algunos casos, los ácidos nucleicos de los revelados pueden incluir vectores de expresión. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cromosomas artificiales, tales como BACs, YACs, o PACs, y vectores virales.

Los vectores proporcionados también pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación y/o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable, por ejemplo, resistencia a los antibióticos, en una célula. El producto marcador se utiliza para determinar si el vector ha sido liberado a la célula y una vez liberado está siendo expresado. Ejemplos de marcadores seleccionables para células de mamíferos son la dihidrofolato reductasa (DHFR), la timidina quinasa, la neomicina, la neomicina G418 análoga, higromicina, puromicina, y blasticidina. Cuando tales marcadores seleccionables se transfieren con éxito en una célula huésped de mamífero, la célula huésped de mamífero transformada puede sobrevivir si se coloca bajo presión selectiva. Ejemplos de otros marcadores incluyen, por ejemplo, el gen lacZ de E. coli, la proteína fluorescente verde (GFP), y luciferasa. Además, un vector de expresión puede incluir un marcador de

secuencia diseñado para facilitar la manipulación o la detección (por ejemplo, purificación o localización) del polipéptido expresado. Secuencias de marcadores, tales como GFP, glutation S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina, o marcador de FLAG ™ (Kodak; New Haven, CT) secuencias típicamente se expresan como una fusión con el polipéptido codificado. Tales marcadores se pueden insertar en cualquier lugar dentro del polipéptido que incluye, ya sea en el extremo carboxilo o amino terminal.

En algunos casos, las divulgación incluye células que contienen los ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores) y/o péptidos revelados en este documento. Las células pueden incluir, por ejemplo, células eucariotas y/o procariotas. En general, las células que se pueden utilizar en el presente documento están disponibles comercialmente, por ejemplo, la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108.. Véase también F. Ausubel y otros., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, (1998). Los métodos de transformación y transfección útiles en la generación de las células reveladas en este documento se describen, por ejemplo, en F. Ausubel y otros., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (1998).

Formulaciones farmacéuticas

En algunos casos, las composiciones terapéuticas reveladas en este documento pueden incluir otros compuestos, fármacos, y/o agentes usados para el tratamiento de cáncer. Tales compuestos, drogas, y/o agentes pueden incluir, por ejemplo, medicamentos para quimioterapia, fármacos de moléculas pequeñas o anticuerpos que estimulan la respuesta inmune a un cáncer determinado. En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir, por ejemplo, uno o más péptidos revelados en este documento y uno o más de un anticuerpo o péptido anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-1 o un péptido, y/o un anticuerpo anti-PDL-1 o péptido. Por ejemplo, en algunos casos, las composiciones terapéuticas reveladas en este documento se pueden combinar con uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o menos de diez) compuestos.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas reveladas en este documento pueden incluir otros compuestos inhibidores, incluyendo inhibidores de histona desacetilasa ("HDAC"). Ejemplos de inhibidores de HDAC incluyen, por ejemplo, ácido hidroxámico,

vorinostat (Zolinza); suberoilanilida del ácido hidroxámico (SAHA) (Merck), tricostatina A (TSA), LAQ824 (Novartis), panobinostat (LBH589) (Novartis), Belinostat (PXD101) (CuraGen), ITF2357 Italfarmaco SpA (Cinisello), Tetrapéptido cíclico; Depsipéptido (romidepsin, FK228) (Gloucester Pharmaceuticals), Benzamida; Entinostat (SNDX-275/MS-275) (Syndax Pharmaceuticals), MGCD0103 (Celgene), Acidos alifáticos de cadena corta, Acido valproico, fenil butirato, AN-9, pivanex (Titan Pharmaceutical), CHR-3996 (Chroma Therapeutics), y CHR-2845 (Chroma Therapeutics).

En algunos casos, las composiciones terapéuticas reveladas en este documento pueden incluir otros compuestos, incluyendo los inhibidores del proteasoma, incluyendo, por ejemplo, bortezomib, (Millennium Pharmaceuticals), NPI-0052 (Nereus Pharmaceuticals), carfilzomib (PR-171) (Onyx Pharmaceuticals), CEP 18770, y MLN9708

En algunos casos, las composiciones terapéuticas reveladas en este documento pueden incluir agentes alquilantes tales como inhibidores de mefalan y de topoisomerasa tales como Adriamicina (doxorubicina) han demostrado aumentar la expresión de MICA, que podría mejorar la eficacia de un anticuerpo monoclonal anti-MICA.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas reveladas en este documento pueden formularse para su uso como o en composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones se pueden formular o adaptar para la administración a un sujeto por cualquier vía, por ejemplo, cualquier ruta aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Los métodos de ejemplo se describen en el CDER Data Standards Manual de la FDA, número de versión 004 (que está disponible en fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm).

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir una cantidad eficaz de uno o más péptidos. Los términos "cantidad efectiva" y "efectiva a tratar," tal como se usa en el presente documento, se refieren a una cantidad o una concentración de uno o más péptidos durante un período de tiempo (incluyendo la administración aguda o crónica y la administración periódica o continua) que es eficaz dentro de el contexto de su administración para causar un efecto deseado o un resultado fisiológico.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más péptidos y cualquier transportador farmacéuticamente aceptable, adyuvante y/o vehículo. En algunos casos, los farmacéuticos pueden incluir además uno o más agentes terapéuticos

adicionales en cantidades efectivas para lograr una modulación de la enfermedad o síntomas de la enfermedad.

El término "transportador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un trnsportador o adyuvante que puede administrarse a un paciente, junto con un péptido de esta invención, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para liberar una cantidad terapéutica del compuesto.

Los transportadores farmacéuticamente aceptables, adyuvantes y vehículos que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero no se limitan a intercambiadores iónicos, alumina, estearato de aluminio, lecitina, de sistemas de liberación del medicamento autoemulsificantes (SEDDS) tales como d−I -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato, surfactantes usados en formas de dosificación farmacéuticas tales como Tweens u otras matrices de liberación polimérica similares, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tapones tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato disodico de hidrógeno, fosfato potásico de hidrógeno, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, pirrolidona de polivinilo, sustancias basadas en celulosa, polietilen glicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos , ceras, polímeros bloqueadores de polioxipropileno-polietileno, polietilenglicol y grasa de lana. Las ciclodextrinas tales como I -, ϑ -, y K− ciclodextrina, también se pueden usar ventajosamente para mejorar la liberación de los compuestos de las fórmulas reveladas en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualquier transportador, adyuvantes o vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, el pH de la formulación puede ajustarse con ácidos farmacéuticamente aceptables, bases o tampones para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de liberación. El término parenteral, como se usa aquí incluye inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intra articular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una solución o polvo para inhalación y/o la administración nasal. Tales composiciones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando dispersantes o agentes humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear aceptables son manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijados, estériles, se emplean convencionalmente como un medio solvente o de suspensión. Para este propósito, cualquier aceite suave fijado puede emplearse incluyendo mono-o diglicéridos sintéticos. Ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de castor, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, o agentes de carboximetilcelulosa o dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables tales como emulsiones y/o suspensiones. Otros surfactantes comúnmente usados, tales como Tweens o Spans y / u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad similares que se usan comúnmente en la fabricación sólidos, líquidos, u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables también pueden ser utilizadas para los propósitos de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, pero no limitado a, cápsulas, tabletas, emulsiones y suspensiones acuosas, dispersiones y soluciones. En el caso de tabletas para uso oral, los transportadores que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, también se añaden típicamente. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones y/o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo puede ser suspendido o disuelto en una

fase oleosa sea combinado con agentes emulsionantes y/o de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes y/o saborizantes y/o agentes colorantes.

Alternativamente o además, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y / u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para la utilización de cualquiera o más de los péptidos o composiciones farmacéuticas (indicados a continuación como "X") revelados en este documento en los métodos siguientes:

La sustancia X para usarse como un medicamento en el tratamiento de una o más enfermedades o condiciones reveladas en este documento (por ejemplo, el cáncer, se hace referencia en los siguientes ejemplos como "Y"). Uso de la sustancia X para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de Y, y la sustancia X para uso en el tratamiento de Y.

En algunos casos, las composiciones terapéuticas reveladas en este documento pueden ser formuladas para la venta en los EE.UU., la importación hacia los EE.UU. y/o exportación desde los EE.UU.

Métodos

En algunos casos, los métodos pueden incluir la selección de un sujeto humano quien tiene o tuvo una condición o enfermedad y quien exhibe o exhibió una respuesta inmune positiva hacia la condición o enfermedad. En algunos casos, los sujetos adecuados incluyen, por ejemplo, los sujetos quienes tienen o tuvieron una condición o enfermedad, pero que resolvió la enfermedad o un aspecto de la misma, presentan síntomas reducidos de la enfermedad (por ejemplo, en relación con otros sujetos (por ejemplo, la mayoría de los sujetos) con la misma condición o enfermedad), y/o que sobreviven por períodos prolongados de tiempo con la condición o enfermedad (por ejemplo, en relación con otros sujetos (por ejemplo, la mayoría de los sujetos) con la misma condición o enfermedad), por ejemplo, en un estado asintomático (por ejemplo, en relación con otros sujetos (por

ejemplo, la mayoría de los sujetos) con la misma condición o enfermedad). En algunos casos, los sujetos pueden ser seleccionados si han sido vacunados (por ejemplo, previamente vacunados y/o vacunados y revacunados (por ejemplo, recibió una vacuna de refuerzo)) contra de una condición o enfermedad.

El término "sujeto", como se usa en este documento, se refiere a cualquier animal. En algunos casos, el sujeto es un mamífero. En algunos casos, el término "sujeto", como se usa en este documento, se refiere a un ser humano (por ejemplo, un hombre, una mujer, o un niño). Las muestras para el uso en los métodos pueden incluir muestras de suero, por ejemplo, obtenidas del individuo seleccionado.

En algunos casos, la selección del sujeto puede incluir la obtención de una muestra de un sujeto (por ejemplo, un sujeto candidato) y pruebas de la muestra para una indicación de que el sujeto es adecuado para la selección. En algunos casos, el sujeto puede ser confirmado o identificado, por ejemplo, por un profesional de la salud, como haber tenido o que tiene una condición o enfermedad. En algunos casos, la exposición de una respuesta inmune positiva hacia una condición o enfermedad se puede hacer de los datos de historia clínica de los pacientes, la historia familiar y/o detección un indicio de una respuesta inmune positiva. En algunos casos, multiples sectores pueden ser incluidos en la selección de sujetos. Por ejemplo, un primer sector puede obtener una muestra de un sujeto candidato y una segundo sector puede probar la muestra. En algunos casos, los sujetos pueden ser seleccionados y/o referidos por un médico (por ejemplo, un médico general). En algunos casos, la selección del sujeto puede incluir la obtención de una muestra de un sujeto seleccionado y almacenar la muestra y/o uso en los métodos revelados en este documento. Las muestras pueden incluir, por ejemplo, células o poblaciones de células.

En algunos casos, la obtención o marcación de células inmunes puede incluir uno o más y/o combinaciones de, por ejemplo: obtener o proporcionar un inmunógeno tetramérica que se pueda unir (por ejemplo, unirse específicamente) a una célula inmune objetivo; contactar el inmunógeno tetramérico con un muestra; detectar el inmunógeno tetramérico; determinar si el inmunógeno tetramérico se une a una célula inmune objetivo, y, si el inmunógeno tetramérico se une a una célula inmune objetivo, a continuación, obteniéndose la célula inmune objetivo.

Los inmunógenos tetraméricos pueden incluir inmunógenos relacionados con una condición o enfermedad y/o que se unen (por ejemplo, unirse específicamente) a una célula inmune objetivo, por ejemplo, en el que la célula inmune objetivo está relacionada con una condición o enfermedad seleccionada. Los inmunógenos y células inmunes diana relacionados con una condición o enfermedad incluyen, por ejemplo, inmunógenos o células inmunes presentes en sujetos con una cierta condición o enfermedad, pero no sujetos sin la condición o enfermedad, y/o inmunógenos o células inmunes presentes en niveles alterados (por ejemplo, elevadas) en sujetos con una cierta condición o enfermedad en relación con los sujetos sin la condición o enfermedad. En algunos casos, los inmunógenos o las células inmunes pueden ser cáncer específicos. Los inmunógenos pueden ser solubles. Tetramérica inmunógeno puede incluir tetramérica (incluyendo, por ejemplo, tetramerized monomérica, dimérica, y/o inmunógeno de antígeno trimérico (por ejemplo, antígeno y/o epítopo). En algunos casos, un inmunógeno tetramérico ha incrementado la unión a una célula en relación con el nivel de unión entre una forma no tetramérica del inmunógeno para la célula en condiciones similares. En algunos casos, un antígeno tetramérica incluye un fracción detectable, por ejemplo, una fracción de estreptavidina. Los métodos de tetramerización son conocidos en la técnica y se revelan en el presente documento.

La detección del inmunógeno tetramérico y/o la determinación si el inmunógeno tetramérico sea unido a una célula diana se puede realizar utilizando métodos conocidos en la técnica y/o revelados en este documento. Por ejemplo, los métodos pueden incluir citometría de flujo. Métodos de optimización para citometría de flujo, incluyendo la clasificación y métodos de diferenciación, son conocidos en la técnica y/o se dan a conocer en el presente documento. En algunos casos, los métodos pueden incluir el análisis de el nivel de unión, afinidad de unión, y/o especificidad de unión entre un inmunógeno tetramérico unido a una célula inmune objetivo. Por ejemplo, una célula inmune objetivo puede obtenerse si (por ejemplo, sólo si) se determina un predeterminado nivel de unión entre un inmunógeno tetramérico y una célula inmune objetivo. Niveles predeterminados de unión pueden ser niveles específicos y/o pueden ser los niveles relativos. La obtención de células inmunes diana pueden incluir la obtención, proporcionar, identificación, selección, purificación, y/o el aislamiento de las células inmunes diana. Tales métodos

pueden incluir, por ejemplo, métodos de la clasificación de células, el enriquecimiento de células, y/o la reducción basal.

En algunos casos, la obtención de células inmune dirigida contra un antígeno propio puede incluir uno o más y/o combinaciones de, por ejemplo, la identificación de un sujeto que presenta una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio; la obtención o proporcionar una forma multimérica del antígeno propio; el contacto con la forma multimérica del antígeno propio con una muestra del sujeto que exhibe una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio; la obtención de células inmunes unidas a la forma multimérica del antígeno propio.

En algunos casos, los métodos pueden incluir la obtención de células inmune dirigidas contra un antígeno propio de un paciente con cáncer, puede incluir uno o más y/o combinaciones de, por ejemplo, la identificación de un sujeto que presenta una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio, proporcionar una forma multimérica del antígeno propio; el contacto de la forma multimérica del antígeno propio con una muestra del sujeto que exhibe una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio, y la obtención de células inmunes unidas a la forma multimérica del antígeno propio.

Formas multiméricas de un antígeno propio pueden incluir antígenos propios relacionados con una condición o enfermedad y/o que se unen (por ejemplo, unirse específicamente) a una célula inmune objetivo, por ejemplo, en el que la célula inmune objetivo está relacionada con una condición o enfermedad seleccionada. Antígenos propios y células inmunes diana relacionadas con una condición o enfermedad incluyen, por ejemplo, antígenos o células inmunes presentes en sujetos con una cierta condición o enfermedad, pero no sujetos sin la condición o enfermedad, y/o inmunógenos o células inmunes presentes en niveles alterados (por ejemplo, elevados) en sujetos con una condición o enfermedad determinada en relación con los sujetos sin la condición o enfermedad. En algunos casos, la condición o enfermedad puede ser un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, de pulmón, de mama, de riñón, de ovario, de próstata, de páncreas, gástrico, y el carcinoma de colon, linfoma o leucemia. En algunos casos, los antígenos propios o células inmunes pueden ser específicos del cáncer. Los antígenos propios pueden ser solubles. Forma multimérica del antígeno propio puede incluir una forma tetramérica (incluyendo, por ejemplo, antígeno monomérico

tetramerizado, dimérico, y/o trimérico) de la antígeno propio (por ejemplo, antígeno y/o epítopo). En algunos casos, una forma multimérica del antígeno propio incluye una fracción detectable, por ejemplo, una fracción de estreptavidina. Los Métodos de multimerización son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

Los métodos para aislar o purificar el material genético (por ejemplo, ADN y/o ARNm) a partir de la célula inmune objetivo obtenida se conocen en la técnica y se ejemplifican en este documento. Una vez que se ha obtenido dicho material genético, métodos para usarlo para producir las composiciones terapéuticas reveladas en la presente son conocidos en la técnica y/o se resumen a continuación. Como se discutió anteriormente, el material genético se puede variar, usando técnicas conocidas en la técnica para crear variantes de péptidos revelados en este documento.

La generación de péptidos de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc) contenidos dentro de u obtenidos a partir de la célula diana pueden incluir, por ejemplo, el análisis, por ejemplo, la secuenciación de los dominios hipervariables de la cadena pesada y liviana a partir de células inmunes diana (por ejemplo, células inmunes diana únicas o aisladas identificadas). En algunos casos, los métodos pueden incluir la generación de anticuerpos totalmente humanos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, como se revela más arriba), y la humanización de anticuerpos no humanos. El ADN puede aislarse y/o secuenciarse facilmente a partir de las células inmunes obtenidas utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana de anticuerpos murinos).

Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación son transfectos a células huésped, tales como células de *Escherichia coli,* células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína anticuerpo, para obtener el síntesis de anticuerpos monoclonales en las células recombinantes del huésped. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en ADN de bacterias que codifican el anticuerpo incluyen Skerra y otros., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) and Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

La expresión recombinante de un anticuerpo o variante del mismo generalmente requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. La invención, por lo tanto, proporciona vectores replicables que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o liviana de un anticuerpo, un dominio hipervariable de cadena pesada o liviana de un anticuerpo o una porción del mismo, o una cadena pesada o liviana de CDR, operativamente unido a un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula del anticuerpo (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N º 5.981.216; 5.591.639; 5.658.759 y 5.122.464) y el dominio hipervariable del anticuerpo puede ser clonado en un vector de expresión de la cadena pesada entera, la cadena liviana entera, o ambas.

Una vez que el vector de expresión se transfiere a una célula huésped por técnicas convencionales, las células transfectas se cultivan entonces mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo. Por lo tanto, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o fragmentos de los mismos, o una cadena pesada o liviana del mismo, o parte del mismo, o un anticuerpo de cadena única de la invención, unido operativamente a un promotor heterólogo. En ciertas realizaciones para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas y livianas pueden ser co-expresados en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, tal como se detalla a continuación.

Líneas celulares de mamífero disponibles como hospederos para la expresión de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo pero no limitado a células (CHO), Células de Ovario de Hámster Chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células epiteliales de riñón humano 293, y un número de otras líneas celulares. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Líneas celulares o sistemas hospederos apropiados se pueden elegir para asegurar la modificación correcta y el procesamiento del

anticuerpo o porción expresada de las mismas. Para este fin, pueden usarse células huésped eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, glicosilación, y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen pero no se limitan a, células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente las cadenas de inmunoglobulina funcionales), SP20, CRL7O3O y HsS78Bst. En una forma de realización, las líneas celulares humanas desarrolladas por inmortalización de linfocitos humanos se pueden utilizar para producir de forma recombinante anticuerpos monoclonales. En una forma de realización, la línea celular PER.C6 humana. (Crucell, Países Bajos) se puede utilizar para producir de forma recombinante anticuerpos monoclonales.

En algunos casos, los péptidos revelados en este documento se pueden generar sintéticamente. Las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías de protección de grupos (protección y desprotección) útiles en la síntesis de péptidos revelados en el presente documento son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellos que, como se describe en R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); TW Greene y P.G.M Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3d. Ed., John Wiley and Sons (1999);. L. Fieser y M. Fieser, Fieser and Fieser ´s Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995), y las ediciones posteriores de los mismos.

Los péptidos también se pueden sintetizar mediante métodos de síntesis química, que son bien conocidos por el experto en la materia. Véase, por ejemplo, Fields y otros, el Capítulo 3 de Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, p. 77. Por lo tanto, los péptidos se pueden sintetizar utilizando las técnicas automatizadas de Merrifield de síntesis de fase sólida con el α-NH_2 protegido tanto por la química de t-Boc o de Fmoc utilizando aminoácidos protegidos en la cadena lateral, por ejemplo, un sintetizador de péptidos Applied Biosystems de Modelo 430A or 431.

Una forma de sintetizar de los péptidos revelados en el presente documento es utilizando síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). El aminoácido C-terminal se une a una resina de poliestireno entrecruzada en un enlace lábil en medio ácido con una molécula

de enlace. Esta resina es insoluble en los solventes utilizados para la síntesis, por lo que es relativamente simple y rápido para lavar el exceso de reactivos y subproductos. El extremo N-terminal está protegido con el grupo Fmoc, que es estable en ácido, pero extraíble por base. Cualquiera de los grupos funcionales de cadena lateral están protegidos con grupos básicos estables, y grupo lábiles de ácido.

Los péptidos más largos pueden sintetizarse mediante conjunción de péptidos sintéticos individuales usando la unión química nativa. Alternativamente, los péptidos sínteticos más largos se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Tales técnicas se proporcionan en manuales estándar bien conocidos con protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un péptido de esta invención, la secuencia de aminoácidos se traduce inversamente para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, de preferencia con codones que son óptimos para el organismo en el que el gen se va a expresar. A continuación, se hace un gen sintético, típicamente mediante la síntesis de oligonucleótidos que codifican el péptido y cualesquiera elementos reguladores, en caso necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfectó en una célula huésped. El péptido se expresa después bajo condiciones adecuadas apropiadas para el sistema de expresión seleccionado y del huesped. El péptido se purifica y caracteriza por métodos estándar.

Pueden sintetizarse péptidos con un gran rendimiento, de manera combinatoria, por ejemplo, mediante la utilización de un sintetizador combinatorio de canal multiple de alta producción disponible de Advanced Chemtech.

Los enlaces peptídicos se pueden sustituir, por ejemplo, para aumentar la estabilidad fisiológica del péptido, mediante: uniones retro inversas (C (O)-NH); una unión amida reducida (NH-CH_2); una unión tiometileno (S-CH_2 or CH_2-S); una unión oxometileno (O-CH_2 or CH_2-O); una uniónde etileno (CH_2-CH_2); una unión tioamida (C (S)-NH); una unión trans-olefina (CH = CH); una unión de fluor a una sustituida trans-olefina (CF = CH); una unión cetometileno (C (O)-CHR) o CHR-C (O) en la que R es H o CH_3, y una unión fluoro- cetometileno (C (O)-CFR o CFR-C (O) en la que R es H o F o CH_3.

Los péptidos se pueden modificar adicionalmente por: acetilación, amidación, biotinilación, cinamoilación, farnesilación, fluoresceinación, formilación, miristoilación, palmitoilación, fosforilación (Ser, Tir o Thr), estearoilación, succinilación y sulfurilación.

Como se indicó anteriormente, los péptidos pueden conjugarse con, por ejemplo, polietilenglicol (PEG); grupos alquilo (por ejemplo, C1-C20 grupos alquilo lineales o ramificados); radicales de ácidos grasos, y combinaciones de los mismos.

En algunos casos, los péptidos se pueden purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad de las Proteinas A o Proteina G de los antígenos específicos, y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos (referenciadas en este documento como "marcadores") revelados anteriormente o conocidos de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

A manera de ejemplo, no limitativo, una descripción general de los métodos se muestra en FIG.21. Orden no está implícito.

Métodos de uso

En algunos casos, las revelaciones proporcionan métodos de tratamiento que incluyen administrar a un sujeto una composición revelada en este documento.

Los métodos proporcionados en este documento son métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o síntomas de cáncer en un sujeto que consiste en administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que contiene un péptido que se une inmunoespecíficamente a la proteína A relacionada con el MHC clase I (MICA), en el que el péptido contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 de V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer asociado con la sobreexpresión de MICA. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, de pulmón, de mama, de riñón, de ovario, de próstata, de páncreas, gástrico, y el carcinoma de colon, linfoma o leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor de células plasmáticas, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) o condición pre-maligna de las

células plasmáticas. En algunas realizaciones, el sujeto ha sido diagnosticado como que tiene un cáncer o como si estuviera predispuesto al cáncer.

En algunos casos, las revelaciones proporciona métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o síntomas de cáncer en un sujeto que consiste en administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína A relacionada con el MHC clase I (MICA), en el que el anticuerpo contiene una región hipervariable de la cadena pesada (VH) que contiene el VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 como se muestra en la secuencia VH de la SEC ID NO: 11, 149, 168, 186, o 204 y una región hipervariable de la cadena liviana (VL) secuencia de la SEC ID No: 4, 151, 170, 189, o 206.

También se proporcionan en este documento métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o síntomas de cáncer en un sujeto que consiste en administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido que se une inmunoespecíficamente a la angiopoyetina, en el que el péptido contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 de VH del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, y CDR3 de VL del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciónes de aminoácidos conservados. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer asociado con la sobreexpresión de MICA. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, de pulmón, de mama, de riñón, de ovario, de próstata, de páncreas, gástrico, y el carcinoma de colon, linfoma o leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor de células plasmáticas, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) o condición pre-maligna de las células plasmáticas. En algunas realizaciones, el sujeto ha sido diagnosticado como que si tuviera un cáncer o como si estuviera predispuesto al cáncer.

En algunos casos, las divulgación proporciona métodos para tratar y/o prevenir el cáncer o síntomas de cáncer en un sujeto que consiste en administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene un anticuerpo aislado que se une específicamente a la angiopoyetina (por ejemplo, angiopoyetina-2) , en el que el anticuerpo contiene una región hipervariable de la cadena pesada (VH) que contiene el VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 como se muestra en la secuencia VH de la SEC ID NO: 20, 38, 56, 74,

222 y una secuencia (VL) de la región hipervariable de la cadena liviana de la SEC ID No: 29, 47, 65, 83, o 224.

Los síntomas del cáncer son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, sin limitación, características inusuales de lunares, un cambio en la apariencia de un lunar, incluyendo la asimetría, borde, el color y/o el diámetro, un área de la piel recién pigmentada, un lunar anormal, área oscura bajo las uñas, nódulos en los senos, cambios en el pezón, quistes mamarios, dolor de pecho, muerte, pérdida de peso, debilidad, fatiga excesiva, dificultad para comer, pérdida de apetito, tos crónica, empeoramiento de la dificultad para respirar, tos con sangre, sangre en la orina, sangre en las heces, náuseas, vómitos, metástasis hepáticas, metástasis pulmonares, metástasis óseas, llenura abdominal, distensión, líquido en la cavidad peritoneal, hemorragia vaginal, constipación, distensión abdominal, perforación del colon, peritonitis aguda (infección, fiebre, dolor), dolor, vómitos con sangre, sudor intenso, fiebre, presión arterial alta, anemia, diarrea, ictericia, mareos, escalofríos, espasmos musculares, las metástasis de colon, metástasis pulmonares, metástasis en la vejiga, metástasis hepáticas, metástasis óseas, metástasis renales y metástasis pancreática, dificultad para tragar, y similares.

Los métodos revelados en este documento se pueden aplicar a una amplia gama de especies, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos), caballos, vacas, cerdos, ovejas, ciervos, alces, cabras, perros, gatos, mustélidos, conejos, cerdos de guínea, hámsters, ratas, y ratones.

Los términos "tratar" o "tratamiento", como se usan aquí, se refiere a alivio, inhibición, mejora, y/o alivio parcialmente o completamente de la enfermedad o condición de la que el sujeto está sufriendo. En algunos casos, el tratamiento puede resultar en la ausencia continuada de la enfermedad o condición de la que el sujeto está sufriendo.

En general, los métodos incluyen la selección de un sujeto en riesgo de o con una condición o enfermedad. En algunos casos, la condición del sujeto o de la enfermedad se pueden tratar con una composición farmacéutica descrita en este documento. Por ejemplo, en algunos casos, los métodos incluyen la selección de un sujeto con cáncer, por ejemplo, en el que el cáncer del sujeto puede ser tratado mediante la marcación de uno o ambos MICA y/o angiopoyetina-2.

En algunos casos, los métodos de tratamiento pueden incluir una administración única, múltiples administraciones, y la administración repetida como se requiere para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad o condición de la que el sujeto está sufriendo. En algunos casos los métodos de tratamiento pueden incluir la evaluación de un nivel de enfermedad en el sujeto antes del tratamiento, durante el tratamiento, y/o después del tratamiento. En algunos casos, el tratamiento puede continuar hasta que se detecta una disminución en el nivel de enfermedad en el sujeto.

Los términos "administrar", "el administrar" o "administración", como se usa aquí, se refiere a la implantación, absorción, ingestión, inyección o inhalación, el péptido de la invención, independientemente de la forma. En algunos casos, uno o más de los péptidos revelados en el presente documento pueden administrarse a un sujeto por vía tópica (por ejemplo, nasal) y/o por vía oral. Por ejemplo, los métodos de la presente invención incluyen la administración de una cantidad efectiva del compuesto o composición de compuesto para lograr el efecto deseado o afirmado. La dosificación específica y regímenes de tratamiento para cualquier paciente particular dependerán de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, combinación del medicamento, la gravedad y curso de la enfermedad, condición o síntomas, la disposición del paciente a la enfermedad, condición o síntomas, y el juicio del médico tratante.

Después de la administración, el sujeto puede ser evaluado para detectar, evaluar, o determinar su grado de enfermedad. En algunos casos, el tratamiento puede continuar hasta que se detecta un cambio (por ejemplo, reducción) en el nivel de enfermedad en el sujeto.

Tras la mejora de la condición del paciente (por ejemplo, un cambio (por ejemplo, reducción) en el nivel de enfermedad en el sujeto), una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de esta invención se puede administrar, si es necesario. Posteriormente, la dosis o frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse, en función de los síntomas, a un nivel en el que la mejora de la condición es mantenida. Los pacientes pueden, sin embargo, requerir un tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

En algunos casos, las revelaciones proporcionan métodos para detectar células inmunes, por ejemplo, células B y/o células B de memoria, de un sujeto humano. Tales métodos se pueden utilizar, por ejemplo, para supervisar los niveles de células inmunitarias, por ejemplo, células B y/o células B de memoria, en un sujeto humano, por ejemplo, después de un evento. Los ejemplos de eventos pueden incluir, pero no se limitan a, la detección de enfermedades, la infección, la administración de una composición terapéutica descrita en este documento, la administración de un agente terapéutico o régimen de tratamiento, la administración de una vacuna, la inducción de una respuesta inmune. Tales métodos pueden ser utilizados clínicamente y/o para la investigación.

EJEMPLOS:

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Los métodos se describen en el presente documento que permiten la detección sensible, específica, y la detección confiable de las células B de memoria raras o alteradas, con especificidad definida del antígeno, a partir de cantidades limitadas de sangre periférica. Los métodos permiten la visualización y el aislamiento de las células B de memoria de meses a años después de que el antígeno se sido depurado.

La comprobación del principio para los métodos dados a conocer en el presente documento se estableció utilizando tetrámeros de los fragmentos C de la toxina tetánica (TTCF), como se reporta en detalle en Franz y otros. (Blood, 118 (2): 348-357 (2011)), cuya referencia se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

El TTCF (es decir, el fragmento C-terminal de TTCF, no tóxico, de 52 kDa) fue seleccionado como un antígeno modelo porque la mayoría de las personas han sido vacunadas con toxoide tetánico y los títulos de anticuerpos IgG persistentes son inducidos por la vacuna (Amanna y otros ., N. Engl. J. Med., 357:1903-1915, 2007). En consecuencia, el uso de TTCF proporcionó un gran número de sujetos en los que los métodos revelados en el presente documento pueden ser verificados. Un experto en la técnica apreciará, sin embargo, que los presentes métodos se pueden adaptar para incluir cualquier antígeno relacionado a enfermedad utilizando técnicas de rutina. Como se demuestra en los ejemplos a continuación, tal adaptación se ha demostrado a través de la

adquisición de anticuerpos dirigidos contra MICA y la angiopoyetina-2, que son antígenos relacionados con el cáncer.

Ejemplo 1: Expresión de antígenos y Formación del Tetrámero

Como se describe con más detalle a continuación, el TTCF se expresó en *Escherichia coli* y en un sitio BirA fue unido al extremo N-terminal para la mono-biotinilación sitio específica por la enzima BirA. Un enlazador flexible se coloca entre la proteína y el sitio de biotinilación para evitar el impedimento estérico de la unión del anticuerpo. El TTCF se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico, biotininilado con BirA, y separado de biotina libre y BirA por cromatografía de filtración en gel. Los tetrámeros TTCF fueron generados mediante la incubación de estreptavidina marcada fluorescentemente con el antígeno TTCF biotinilado en una relación molar de 1:4. Estos tetrámeros se utilizaron junto con un panel de mAbs para la identificación de células B de memoria específicas de toxoide tetánico.

El TTCF fue clonado en pET-15b (Novagen). La expresión de la proteína se indujo en *Escherichia coli* BL21 (DE3) con 1 mM isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) durante 4 horas a 28 º C. Las células se lavaron, se lisaron, y se recogió el sobrenadante resultante. El TTCF se purificó utilizando una columna de afinidad HIS-Select (Sigma). El marcador His se removío proteolíticamente. El dominio proximal de membrana CD80 de murino fue producido utilizando métodos similares. Las proteínas fueron mono-biotiniladas. Para ciertos experimentos, la moléculas colorantes de Alexa-488 (Sondas Moleculares) se relacionaron con aminas primarias en el TTCF biotinilado o CD80.

Tetrámeros de antígeno se prepararon mediante la incubación del antígeno biotinilado con estreptavidina marcada PE de grado premium (Sondas Moleculares) durante al menos 20 minutos en hielo en una relación molar de 4:1. Antes de su uso, las preparaciones de tetrámeros se centrifugaron para eliminar los agregados. En algunos experimentos, tetrámeros se formaron con antígenos marcados de Alexa-Fluor-488 y estreptavidina no fluorescente en una tasa de 4:1.

Ejemplo 2: Métodos de Identificación

Los métodos se realizaron como se describe en Franz y otros., Blood, 118 (2): 348-357 (2011).

Las células fueron ordenadas en un clasificador de células BD FACS Aria II. Las células fueron clasificadas en células únicas. Las muestras fueron primero diferenciadas en células CD19 $^{+}$ que fueron negativas para un panel de marcadores de exclusión (CD3, CD14, CD16, 7AAD) entonces encerradas en plasmablastos, identificadas por los altos niveles de CD27 y un nivel inmediato de la expresión de CD19, y, finalmente, en tetrámero de células $^{+}$ CD19 $^{+}$.

Debido a la baja frecuencia de células B de memoria, fue necesario reducir cuidadosamente el fondo tanto como fuera posible. Las células B se enriquecieron primero por selección negativa (cóctel de anticuerpos a CD2, CD3, CD14, CD16, CD56 y glicoforina A) para remover la mayoría de las células que podrían unirse de forma no específica al tetrámero. Las células enriquecidas fueron divididas en partes iguales y teñidas con TTCF o un tetrámero de control seguido por la marcación con CD19, CD27 e IgM para seleccionar específicamente las células B de memoria con recombinación del cambio de clase. La estrategia de diferenciación consideraba la expresión de CD19, la falta de marcación con un panel de marcadores de exclusión (CD3, CD14, CD16, 7AAD), expresión del marcador CD27 de memoria y la falta de expresión de IgM como evidencia de cambio de clase. La tinción de tetrámero se representó gráficamente frente a la tinción CD27 para la visualización de células B de memoria con la especificidad del antígeno de interés. Las células B de tetrámero positivas fueron directamente clasificadas en tiras de PCR que contienen 3 µl de tampón de extracción de ARNm.

Los tubos se mantienen fríos durante la clasificación y las células clasificadas fueron congeladas y almacenadas a -80 º C. Las células B-IgM CD19 + CD27 se utilizaron como controles positivos.

Como previamente se reportó un protocolo de PCR en nido se utilizó para amplificar segmentos hipervariables de cadena pesada y liviana (Wang y otros., J. Immunol. Methods., 244:217-225, 2000). La amplificación de ARNm se llevó a cabo bajo condiciones adecuadas para minimizar la contaminación. Los cebadores utilizados fueron:

TAATACGACTCACTATAGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG (SEC ID NO: 91);

TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACAC (SEC ID NO: 92);

TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC (SEC ID NO: 93).

PCR-TR anidada se realizó como se describe en Franz y otros., Blood, 118 (2): 348-357 (2011).

Se incluyeron controles negativos para monitorizar y proteger contra la contaminación. De un total de 35 células individuales marcadas con el tetrámero TTCF, 32 segmentos de cadena pesada y 30 segmentos de cadena liviana se amplificaron y secuenciados directamente de los productos de PCR purificados en gel, correspondiente a una eficiencia global de PCR de 89%. El análisis de secuencia reveló que las células de tetrámero $^{+}$ TTCF emplearon una variedad de distintos segmentos de genes V_HD-J_H, sin predominio de un segmento de gen particular. Las secuencias observadas sostienen que los clones representaban células diversificadas por hipermutación somática.

La producción y purificación de anticuerpos incluyen la clonación de dominios hipervariables de ADN de cadena pesada y liviana en vectores de expresión separados pcDNA3.3 que contienen la secuencia del péptido señal de prolactina bovina, así como los dominios constantes de cadenas pesadas o livianas kappa de longitud completa IgG1. Los anticuerpos se expresaron en medio de CHO-S (Invitrogen), suplementado con 8 mM Glutamax (Gibco) en matras de agitación de 100 ml a 37 º C con 8% de CO_2.Un día antes de la transfección, las células se dividieron a $6x10^5$ células / ml. En el día de la transfección, las células se ajustaron, y fue necesario a, a $1x10^6$ células / ml. Los 25 µg de plásmido de cadena pesada y liviana de ADN fueron co-transfectados usando el reactivo de transfección MAX (Invitrogen) y las células transfectadas se cultivaron durante 6-8 días. La proteína se obtuvo utilizando microesferas de Sepharose de Proteína G y el anticuerpo se eluyó utilizando 100 mM de glicina a pH 2,5 y se separó de las microesferas utilizando tubos de centrifugado Spin-X. El anticuerpo purificado se intercambió en tampón fosfato salino (PBS) usando columnas de Micro Bio-spin (BioRad). La concentración de proteína se evaluó mediante la absorbancia a 280 nm.

Para el ensayo de unión de saturación, no biotinilado, el TCCF purificado MonoQ fue marcado con europio y se removió el europio libre. Los platos de fondo plano de 96

pozos se recubrieron durante la noche con 20 ng del anticuerpo por pozo en tampón de 100 mM de $NaHCO_3$ a Ph 9.6. El bloqueo se realizó con tampón de ensayo suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) y gamma globulinas de especie bovina. El TTCF-europio se diluyó en tampón de ensayo (100 nM a 4 pM) y se adicionaron 200µl por pozo en triplicado. Los platos se incubaron durante 2 horas a 37 º C y se lavaron tres veces con 200µl de tampón de lavado (50 mM de Tris pH 8, 150 mM de NaCl, 20 µM de EDTA, 0,05% de Tween). La solución de mejoramiento de 100 µl solución de mejora l se adicionó a cada pozo y los conteos fluorescentes medidos utilizando un lector de platos Victor ^{3} a 615 nm.

Las secuencias de los dominios hipervariables de la cadena pesada y liviana se analizaron utilizando IMGT / V-Quest y JIONSOLVER sofware. Los datos de citometría de flujo se evaluaron utilizando el software de análisis FlowJo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5 utilizando el test-t no pareado. Para determinar los valores de anticuerpos $K_{D,}$ los datos de unión de saturación se ajustaron utilizando el software GraphPad Prism 5 mediante análisis de regresión no lineal.

Ejemplo 3: La multimerización mejora la identificación de las células B de memoria

Los TTCF tetramérico y monomérico fueron comparados. El TTCF fue marcado fluorescentemente con Alexa-488 y después utilizado en forma monomérica o fue convertido en un tetrámero utilizando estreptavidina no marcada (véase más arriba). Las células B enriquecidas se incubaron a continuación con TTCF-Alexa-488 tetramérico o monomérico a la misma concentración. La proteína de control (dominio proximal de membrana CD80) se marcó de la misma manera y también se utiliza como un tetrámero.

Como se representa en FIGs.22A y 22B, algunas células B de memoria marcadas con TTCF, pero las frecuencias identificadas con tetrámero fueron sustancialmente más largas (1.6 a 7.3 veces) utilizando células de tres donantes. En uno de los tres donantes de células B de memoria TTCF específicos podrían ser detectados con el tetrámero pero no con el monómero.

Estos resultados demuestran que los tetrámeros del antígeno permiten la detección sensible de células B de memoria basados en la especificidad antigénica de sus BCR, a pesar de ser muy raras tales células en la sangre periférica. Las células B de memoria con

recombinación del cambio de clase específicas para TTCF fueron marcadas con brillo por el antígeno TTCF tetramerico adecuado, mientras que la marcación basal con tetrámero de control fue consistentemente baja.

Ejemplo 4: Método / Validación del Anticuerpo

Los anticuerpos completamente humanos fueron generados mediante la unión a regiones constantes de cadenas pesadas de IgG y cadenas kappa a segmentos hipervariables aislados a través de PCR de solapamiento. Los anticuerpos se expresaron en un sistema expresión transitoria libre de suero mamífero utilizando células de CHO-S durante un período de 6-8 días. Los anticuerpos se purificaron utilizando proteína G y cromatografía de filtración en gel.

Como muestra la FIG.23, los anticuerpos aislados de plasmablastos TTCF específicos mostraron altas afinidades de unión al antígeno TTCF, con una K_D de 2,2 nM (TTCF Ab 1) y 323 pM (TTCF Ab 2) (FIG. 23B. Los anticuerpos aislados a partir de células B de memoria también mostraron altas afinidades de unión, con K_D de 382 pM, 228 pM, y 1,4 nM, para otros anticuerpos (TTCF Abs 3, 4, y 5) (FIG. 23B).

Estos datos apoyan la especificidad de los métodos revelados en este documento. Además, la especificidad de los métodos del presente documento se demostró por la construcción de cinco anticuerpos anti-TTCF de tres donantes diferentes, todos los cuales unían a TTCF con altas afinidades.

Los datos aquí también demuestran que los tetrámeros del antígeno permiten la detección sensible de las células B de memoria mucho después de la depuración del antígeno del hospedero.

Ejemplo 5: Obtención de anticuerpos anti-MICA

Los anticuerpos que se une inmunoespecíficamente a MICA fueron desarrollados utilizando los métodos del presente documento.

Brevemente, el antígeno MICA (UniGene Hs.130838) se expresó con un marcador BirA C-terminal (GLNDIFEAQKIEWHE (SEC ID NO: 238)), que permite mono-biotinilación del antígeno. El antígeno se tetramerizó con estreptavidina (SA) marcada con R-ficoeritrina (PE) a una proporción molar de 4 MICA: 1 SA. Las células mononucleares

de sangre periférica se obtuvieron a partir de pacientes con melanoma en estadío avanzado que habían sido vacunados con células tumorales autólogas traducidas con un vector de expresión de GM-CSF (GVAX) (PNAS 103: 9190, 2006), y posteriormente tratados con el anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab (YERVOY ™ (disponible de Bristol Myers Squib)). Las células mononucleares de sangre periférica se descongelaron rápidamente, lavadas y resuspendidas a $5x10^{6}$ en tampón fosfato salino (pH 7,2) enriquecido con 2% de suero de ternero fetal y se tiñeron con aproximadamente 0.1ug/ml de tetrámero durante 30 minutos en hielo. Se añadieron anticuerpos para identificar las células B de memoria con recombinación del cambio de clase ($CD19^{+,}$ $CD27^{+,}$ e $IgM^{-),}$Un panel de anticuerpos de exclusión que marca las células T, células asesinas naturales, marcrofagos y células muertas fueron incluidas para reducir la tinción de los tetrámeros basales (CD3, CD14, CD16, 7-AAD). Las células B individuales que unidas al tetrámero MICA se clasificaron en tiras de PCR de 8 tubos utilizando el BD FACS Aria II. El receptor de células B (BCR) ARNm fue amplificado utilizando un kit comercial de Epicentre Biotechnologies (número de catálogo: MBCL90310) utilizando cebadores específicos de genes mostrados a continuación:

Amplificación de mRNA

IgG-T7: AATACGACTCACTATAGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG (SEC ID NO: 94)

Kappa-T7: TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACAC (SEC ID NO: 95)

Lambda-T7: TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC (SEC ID NO: 96)

PCR Uno

VHL-1: TCACCATGGACTG (C / G) ACCTGGA (SEC ID NO: 97)

VHL -2: CCATGGACACACTTTG (C / T) TCCAC (SEC ID NO: 98)

VHL -3: TCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC (SEC ID NO: 99)

VHL -4: AGAACATGAAACA (C / T) CTGTGGTTCTT (SEC ID NO: 100)

VHL -5: ATGGGGTCAACCGCCATCCT (SEC ID NO: 101)

VHL -6: ACAATGTCTGTCTCCTTCCTCAT (SEC ID NO: 102)

Vkl-1: GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG (SEC ID NO: 103)

Vkl-2: CTGGGGCTGCTAATGCTCTGG (SEC ID NO: 104)

Vkl-3: TTCCTCCTGCTACTCTGGCTC (SEC ID NO: 105)

Vkl-4: CAGACCCAGGTCTTCATTTCT (SEC ID NO: 106)

VIL-1: CCTCTCCTCCTCACCCTCCT (SEC ID NO: 107)

VIL-2: CTCCTCACTCAGGGCACA (SEC ID NO: 108)

VIL-3: ATGGCCTGGA (T / C) C (C / G) CTCTCC (SEC ID NO: 109)

CgII: GCCAGGGGGAAGAC (C / G) GATG (SEC ID NO: 110)

CkII: TTTCAACTGCTCATCAGATGGCGG (SEC ID NO: 111)

ClII: AGCTCCTCAGAGGAGGG (C / T) GG (SEC ID NO: 112)

PCR Dos

VH-1: CAGGT (G / C) CAGCTGGT (G / A) CAGTC (SEC ID NO: 113)

VH-2: CAG (A / G) TCACCTTGAAGGAGTC (SEC ID NO: 114)

VH-3: (G / C) AGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEC ID NO: 115)

VH-4: CAGGTGCAGCTGCAGGAGTC (SEC ID NO: 116)

VH-5: GA (G / A) GTGCAGCTGGTGCAGTC (SEC ID NO: 117)

VH-6: CAGGTACAGCTGCAGCAGTC (SEC ID NO: 118)

Vk-1: CG (A / C) CATCC (A / G) G (A / T) TGACCCAGT (SEC ID NO: 119)

Vk-2: CGAT (A / G) TTGTGATGAC (C / T) CAG (SEC ID NO: 120)

Vk-3: CGAAAT (T / A) GTG (T / A) TGAC (G / A) CAGTCT (SEC ID NO: 121)

Vk-4: CGACATCGTGATGACCCAGT (SEC ID NO: 122)

Vl-1: CCAGTCTGTGCTGACTCAGC (SEC ID NO: 123)

Vl-2: CCAGTCTGCCCTGACTCAGC (SEC ID NO: 124)

Vl-3: CTCCTATGAGCTGAC (T / A) CAGC (SEC ID NO: 125)

CgIII: GAC (C / G) GATGGGCCCTTGGTGGA (SEC ID NO: 126)

CkIII: AAGATGAAGACAGATGGTGC (SEC ID NO: 127)

ClIII: GGGAACAGAGTGACCG (SEC ID NO: 128)

Los cebadores y condiciones de ciclaje de PCR utilizados en la PCR uno y PCR dos son adaptaciones de Wang y Stollar y otros. (journal of immunological methods 2000).

Un conjunto de cebadores mas delante de la region hipervariable alterna de cadena pesada fue desarrollado para cubrir secuencias de regiones hipervariables de cadena pesada

potencialmente no cubiertas adecuadamente por el conjunto de cebadores mencionado anteriormente. Se generaron los siguientes cebadores alternos:

PCR Uno

VHL1-58: TCACTATGGACTGGATTTGGA (SEQ ID NO:129)

VHL2-5: CCATGGACA(C/T)ACTTTG(C/T)TCCAC (SEQ ID NO:130)

VHL3-7: GTAGGAGACATGCAAATAGGGCC (SEQ ID NO:131)

VHL3-11: AACAAAGCTATGACATATAGATC (SEQ ID NO:132)

VHL3-13.1: ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGGGTT (SEQ ID NO:133)

VHL3-13.2: AGTTGTTAAATGTTTATCGCAGA (SEQ ID NO:134)

VHL3-23: AGGTAATTCATGGAGAAATAGAA (SEQ ID NO:135)

VHL4-39: AGAACATGAAGCA(C/T)CTGTGGTTCTT (SEQ ID NO:136)

VHL4-61: ATGGACTGGACCTGGAGCATC (SEQ ID NO:137)

VHL-9: CCTCTGCTGATGAAAACCAGCCC (SEQ ID NO:138)

PCR Dos

VH1-3/18: CAGGT(C/T)CAGCT(T/G)GTGCAGTC (SEQ ID NO:139)

VH1-45/58: CA(A/G)ATGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO:140)

VH2-5: CAG(A/G)TCACCTTGA(A/G)GGAGTCTGGT (SEQ ID NO:141)

VH3-9/23/43: GA(A/G)GTGCAGCTG(T/G)TGGAGTC (SEQ ID NO:142)

VH3-16: GAGGTACAACTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:143)

VH3-47: GAGGATCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:144)

V4-34: CAGGTGCAGCTACAGCAGTG (SEQ ID NO:145)

V4-30-2/ 39: CAGCTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO:146)

VH7-4-1: CAGGTGCAGCTGGTGCAATC (SEQ ID NO:147)

Brevemente, ADNc 2UL generados a través de la amplificación de RNAm se utilizó como molde para la primera ronda de PCR, con las siguientes condiciones de ciclaje: 3 ciclos de preamplificación (94 ° C/45 segundos, 45 ° C/45 segundos, 72 ° C/105 segundos), 30 ciclos de amplificación (94 ° C/45 segundos, 50 ° C/45 segundos, 72 ° C/105 segundo); 10 minutos de extensión final a 72 ° C.

El 3ul de la primera ronda del producto de PCR sirvió como molde para la segunda ronda de PCR anidada. Las mismas condiciones de ciclajes fueron utilizados para la

primera ronda de PCR, pero los 3 ciclos de preamplificación se omitieron. Ambos pasos de PCR se realizaron mediante el uso de clonado de la Pfu clonada de la AD polimerasa (Agilent Technologies). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1% y los productos de 300-400 nucleótidos de tamaño aislados con el uso de kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean (Zymo Research). La secuenciación se realizó mediante el uso de de cebadores utilizados de inicio y reverso para la segunda ronda de PCR anidada inversa. Una PCR anidada de dos pasos amplifica los dominios hipervariables de BCR de cadenas pesadas y livianas (ver arriba). Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron a partir de pacientes con melanoma de etapa avanzada quienes habían sido vacunados con células tumorales autólogas traducidas con un vector de expresión de GM-CSF (GVAX) (PNAS 103: 9190, 2006). Los anticuerpos se expresaron como anticuerpos IgG1 de longitud completa en un sistema de expression transitorio de CHO-S.

La validación del anticuerpo anti-MICA que se une a MICA se realizó utilizando dos ensayos independientes basados en microesferas. El primer ensayo utiliza un kit de ensayo basado de soluciones basados en microesferas comercialmente disponible y diseñado para la detección de anticuerpos anti-MICA reactivos a una variedad de alelos de MICA (One Lambda, número de catálogo LSMICA001). Las concentraciones variables del anticuerpo MICA se incubaron con microesferas, luego lavado, y se incubó con un anticuerpo anti-IgG humano conjugado con ficoeritrina. Después de una segunda etapa de lavado, se analizaron las microesferas en un equipo Luminex. Un control negativo consistió en la incubación de las microesferas con anticuerpo anti-IgG humano conjugado con ficoeritrina sola (sin anticuerpo anti-MICA). Un control positivo consistió en la incubación de las microesferas con un anticuerpo monoclonal anti-MICA/MICB (clon 6D4) disponible comercialmente directamente conjugado con ficoeritrina (BioLegend catálogo # 320906). El segundo ensayo fue desarrollado internamente utilizando microesferas de poliestireno conjugadas con estreptavidina. Las microesferas se recubrieron con la proteína MICA monobiotinilada, y se incubaron con concentraciones variables del anticuerpo anti-MICA, anticuerpo anti-TTCF (control negativo de isotipo), o anticuerpo anti-MICA/MICB conjugado directamente con ficoeritrina (control positivo). Las microesferas incubadas con anticuerpo anti-MICA o anticuerpo anti-TTCF se lavaron y después se incubaron con anticuerpo anti-IgG humano conjugado con Alexa488. Para determinar la unión a las

microesferas de fondo, se realizó la misma incubación utilizando microesferas conjugadas con estreptavidina no recubiertas con proteína MICA para la comparación. Se analizaron las microesferas para unirse a los anticuerpos en un citómetro de flujo FACScalibur.

Como se muestra en las FIGs. 24 y 25, los anticuerpos anti-MICA (MICA-Ab12 y MICA-AB20) se unen con alta afinidad a MICA. La MICA-Ab20 corresponde al anticuerpo anti-MICA ID-1 descrito en la Tabla 1.

Ejemplo 6: Anticuerpos anti-MICA

Anticuerpos adicionales anti MICA con propiedades biológicas clínicamente relevantes fueron desarrollados utilizando los métodos del presente documento. Los anticuerpos MICA-específicos reactivos a alelos comunes fueron identificados en pacientes que habían recibido una vacuna contra el cáncer celular (GM-CSF células cancerosas traducidas, referidas como GVAX) y un anticuerpo ipilimumab que bloquea el receptor inhibitorio CTLA-4 en las células T (YERVOY ™ (disponible de Bristol Myers Squib)). Los tetrámeros MICA se utilizaron luego para aislar las células B de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con la mayor reactividad MICA en suero. Las secuencias de cadena pesada y liviana se determinaron a partir de estas células B por PCR de células individuales, como se indica en el Ejemplo 5. Este esfuerzo condujo a la identificación de anticuerpos que reconocen alelos comunes en la población de América del Norte.

El CM24002 Ab2 (anticuerpo anti-MICA ID-6 descrito en la Tabla 1) es un anticuerpo aislado de un paciente con leucemia mieloide aguda (LMA) quienes demostraron una respuesta clínica significativa a la terapia de combinación GVAX + ipilimumab y cuyo plasma reaccionó fuertemente con MICA. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cadena liviana CM24002 Ab2 (FIGs. 30 y 31) y de la cadena pesada (FIGs. 28 y 29) son mostradas, con las secuencias subrayadas CDR1, CDR2 y CDR3. Un anticuerpo adicional con fuerte unión se obtuvo a partir del mismo paciente y se marca como CM24002 Ab4 (anticuerpo anti-MICA ID-7 descrito en la Tabla 1). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cadena liviana CM24002 Ab4 (FIGs. 34 y 35) y de la cadena pesada (FIGs. 23 y 32) son mostradas, con las secuencias subrayadas CDR1, CDR2 y CDR3.

El CM33322 Ab11 (anticuerpo anti-MICA ID-8 descrito en la Tabla 1) y el CM33322 Ab29 (anticuerpo anti-MICA ID-9 descrito en la Tabla 1) son anticuerpos aislados de un paciente con melanoma metastásico quienes exhiben una respuesta a largo plazo (> 15 años) a la terapia de combinación GVAX + ipilimumab. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cadena liviana CM33322 Ab11 (FIGs. 38 y 39) y de la cadena pesada (FIGs. 36 y 37) son mostradas, con las secuencias subrayadas CDR1, CDR2 y CDR3. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cadena liviana CM33322 Ab29 (FIGs. 42 y 43) y de la cadena pesada (FIGs. 40 y 41) son mostradas, con las secuencias subrayadas CDR1, CDR2 y CDR3. Debido a la respuesta clínica a largo plazo de este paciente, estos anticuerpos son de particular interés.

Después de la identificación inicial, la clonación y la expresión de los anticuerpos de interés, la especificidad de estos anticuerpos para diferentes alelos MICA se determinó con un ensayo de microesferas de citometría. En pocas palabras, los alelos solubles y recombinantes MICA 002, 008, 009 y MICB con un único sitio de biotinilación BirA se expresaron, purificaron, y capturaron en microesferas de estreptavidina. Los anticuerpos anti-MICA indicados se incubaron a continuación con las microesferas recubiertas con MICA recombinante a diferentes concentraciones durante una hora, después se lavaron, y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG humano marcado con FITC. Después de una segunda etapa de lavado, la cuantificación de la fluorescencia FITC unida a microesferas se completó por citometría de flujo. Los alelos MICA 002, 008, 009, así como la proteína MICB relacionada fueron elegidos en función de su prevalencia en la población de América del Norte (FIG. 48). Los alelos MICA 002, 008, 009, así como la proteína MICB relacionada también fueron elegidos con base en su alta prevalencia en todo el mundo en general. Es importante destacar que, CM24002 Ab2 y CM33322 Ab29 se unieron fuertemente a todos los alelos MICA, así como a MICB. Los otros dos anticuerpos unidos a un subconjunto de alelos: CM24002 Ab4 unidos altamente a MICA * 009 y MICB, y CM33322 Ab11 unidos altamente a MICA * 002, MICA * 008, y MICB. (FIGs.48A-F). La especificidad se documentó mediante el uso de un anticuerpo de control humano negativo generado con la misma tecnología (específico para el fragmento toxoide tetánico C-terminal, TTCF) y un anticuerpo de control positivo para MICA (un anticuerpo

murino comercial de BioLegend dirigido contra MICA). Estos estudios identificaron CM24002 Ab2 y CM33322 Ab29 como candidatos potenciales para la aplicación clínica.

Ejemplo 7: Unión de Anticuerpos Anti-MICA a Células Tumorales Autólogas

La capacidad del anticuerpo anti-MICA aislado CM24002 Ab2 de unirse a células tumorales autólogas se examinó por citometría de flujo (FIG. 49). La médula ósea obtenida del paciente CM24002 fue probada para determinar la unión a las células tumorales mediante CM24002 Ab2. Las células tumorales fueron luego identificadas a partir de la muestra de médula ósea como células CD33 + CD34 +. Las células tumorales fueron teñidas con 10 µg/ml con anticuerpo anti- MICA CM24002 Ab2, control positivo de anticuerpos MICA comercial (BioLegend) o un anticuerpo de control negativo (TTCF específico). Como se muestra en FIG.49, CM24002 Ab2 fuertemente unido a estas células. CM24002 Ab2 no mostró unión a células no tumorales (CD16 + y las células CD3 +) y sólo hubo una unión basal a las células CD14 +, que demuestra la especificidad anti tumoral (datos no mostrados).

Ejemplo 8. Inhibición del Anticuerpo Anti-MICA de receptor NKG2D en las células NK.

La capacidad del anticuerpo anti-MICA aislado CM24002 Ab2 para evitar la disminución de la actividad de su receptor afín mediada por el MICA soluble, NKG2D se examina. El suero de paciente CM24002 se utilizó a una dilución 1:10 y se incubó con células NK humanas por un período de 48 horas. El CM24002 Ab2 (concentración de 10µg/ml), control positivo de anticuerpos MICA comercial (BioLegend) o un anticuerpo de control negativo (TTCF específico) fueron añadidos a estos cultivos. La expresión de NKG2D se evaluó por citometría de flujo en 48h (FIG. 50). El suero del paciente CM24002 de expresión fuertemente regulada a la baja de NKG2D (por lo tanto inhabilitando así la función de este receptor). El CM24002 Ab2 y el anticuerpo MICA de control positivo parcialmente restaurado a la expresión de superficie de NKG2D por las células NK. Para demostrar la especificidad, se repitió el experimento anterior mediante la incubación de las células con MICA recombinante a 2ng/ml en lugar de suero del paciente (FIG. 51). El CM24002 Ab2 previno completamente la expresión de la regulación a la

baja mediada por MICA de NKG2D, mientras que el anticuerpo de control negativo (específico para TTCF) no tuvo ningún efecto (FIG. 51). Estos datos demuestran que los anticuerpos MICA humanos pueden evitar la inhibición del receptor crítico NKG2D en células NK humanas.

Ejemplo 9: Citotoxicidad Mediada por Células del Anticuerpo anti-MICA

Para determinar si el CM24002 Ab2 permite la citotoxicidad mediada por células, las células NK humanas (células efectoras) se incubaron durante 48 horas con MICA recombinante (2ng/ml) en presencia de CM24002 Ab2, un anticuerpo de control negativo (TTCF específico) o un anticuerpo de control positivo (BioLegend), todo a 10µg/ml. Después de 48 horas, las células se lavaron y se incubaron con células tumorales K562 en 20:1, 10:1, y efector 5:1: proporciones de objetivo durante 4 horas. La lisis específica de células diana por células NK se determinó por la liberación de una proteína citosólica (LDH) a partir de células tumorales K562. En la ausencia de anticuerpos MICA, no hubo destrucción de células tumorales K562 por las células NK. Sin embargo, el CM24002 Ab2 mejoró grandemente la lisis mediada de células NK de células tumorales K562 y fue más efectivo que el anticuerpo murino de control positivo MICA en todos los efectores: proporciones de objetivo (FIG. 52). Se demostró además que la destrucción de células tumorales K562 fue de hecho mediada por la vía de NKG2D (en lugar de los receptores de Fc). El experimento anterior se repitió, con la adición de dos grupos experimentales: un anticuerpo de bloqueo para NKG2D y el bloqueo de Fc humano. Además, el CM33322 Ab29 también fue probado. Los datos muestran que la adición de el CM24002 Ab2 y el CM33322 AB29 permitió la citotoxicidad mediada por células NK. La muerte de células K562 no se produjo cuando se añadió un anticuerpo de bloqueo de NKG2D, mientras que el reactivo de bloqueo de Fc tuvo poco efecto (FIG. 53). Estos datos muestran que CM24002 Ab2 y CM33322 Ab29 restauran la función antitumoral de la vía de NKG2D.

Ejemplo 10: La Unión del Anticuerpo Anti-MICA al Dominio Alfa 3 MICA

El receptor NKG2D se une a la parte superior de los dominios de MICA alfa 1 y alfa 2, y los anticuerpos que se unen al mismo sitio pueden competir con el receptor NKG2D y por lo tanto bloquean la muerte de células tumorales por las células NK. Los

anticuerpos que se unen al dominio alfa 3 son de particular interés porque no pueden bloquear la unión del receptor de NKG2D. Al mismo tiempo, tales anticuerpos pueden interferir con la escisión proteolítica de MICA de la superficie de la célula tumoral. La capacidad de los anticuerpos anti-MICA para el dominio alfa 3 MICA se evaluó mediante el ensayo de microesferas de citometría descrito anteriormente. La proteína recombinante biotinilada se capturó en microesferas de estreptavidina. Las microesferas se incubaron entonces con anticuerpos CM24002 Ab2, CM24002 Ab4, CM33322 Ab11, CM33322 Ab29, un anticuerpo de control negativo (TTCF específico) o un anticuerpo de control positivo (BioLegend), a 10µg/ml seguido por un anticuerpo secundario anti-IgG humano marcado con FITC y cuantificación de la fluorescencia FITC unido a microesferas mediante citometría de flujo (FIG. 54). Como se muestra en la FIG.54, CM33322 Ab29 unido al dominio alfa 3 MICA y por lo tanto es de gran interés para aplicaciones terapéuticas.

Ejemplo 11: La Unión de Anticuerpo Anti-MICA a las Células Tumorales

Se evaluó el potencial de CM24002 Ab2 y CM33322 Ab29 para ser utilizados para apuntar a una amplia gama de cánceres. Un panel de células de mieloma múltiple (RPMI 8226 y Xg-1), de cáncer de ovario (OVCAR3), de leucemia mieloide aguda (U937) de melanoma (K028), de cáncer de pulmón (1792 y 827), y de cáncer de mama (MCF7) se probaron para marcación por CM24002Ab2 y CM33322 Ab29. Las células tumorales se resuspendieron a una concentración de $1x10^6$ células / ml en PBS con BSA al 1% y se tiñeron con el y CM24002 Ab2 y CM33322 Ab29, así como controles positivos y negativos (anticuerpo murino MICA y anticuerpo TTCF-específico, respectivamente) (conjugado directamente) a una concentración de 10 µg/ml durante 1 hora a 4 ° C. La marcación fue evaluada por citometría de flujo (FIG. 55). Los CM24002 Ab2 y CM33322 Ab29 se unieron a cada tipo de célula tumoral probada, con una marcación siendo mayor que el control positivo comercial para la mayoría de las líneas celulares probadas.

Ejemplo 11: Especificidad del Alelo MICA del anticuerpo anti-MICA

La especificidad alélica de CM33322 Ab29 se evaluó mediante un ensayo de Luminex disponible en el mercado. El kit de prueba comercial contiene alelos MICA

recombinantes (MICA * 001, * 002, * 007, * 012, * 017, * 018, * 027, * 004, * 009 y * 015) directamente conjugados con microesferas de Luminex, cada uno con propiedades fluorescentes intrínsecas que permiten la unión a ser evaluada en una sola muestra. Las microesferas de Luminex recubiertas con los alelos MICA indicados se incubaron con CM33322 Ab29, control positivo BioLegend, y el control negativo (TTCF), a 10 µg / ml durante 1 hora, con la posterior incubación con anticuerpo secundario anti-humano IgG anticuerpo secundario PE conjugado. La fluorescencia se determinó después de la incubación durante 60 minutos con los anticuerpos indicados y la posterior incubación con anticuerpo secundario PE conjugado anti-humano utilizando un instrumento Luminex 200 (FIG. 56). CM33322 Ab29 fue capaz de unirse a todos los alelos presentes en el ensayo comercial, lo que indica que se puede usar en pacientes, independientemente del genotipo MICA.

Estos datos demuestran la alta actividad biológica de CM24002 Ab2 y CM33322 Ab29 y su capacidad para restaurar la lisis de células tumorales mediadas por células NK. Estos datos demuestran que los pacientes con cáncer quienes respondieron a inmunoterapias producen anticuerpos MICA que restauraron la actividad anti-tumoral de las células NK. Juntos, estos resultados ponen de manifiesto el potencial terapéutico de anticuerpos anti-MICA para superar la supresión inmune y promover la destrucción del tumor en pacientes con cáncer.

Ejemplo 12: Obtención de Anticuerpos Anti-angiopoyetina-2

Los anticuerpos que se unen a la angiopoyetina-2 fueron desarrollados utilizando los métodos del presente documento. En pocas palabras, la angiopoyetina-2 biotinilada (UniGene Hs.583870) fue adquirida de R & D Systems. Las células mononucleares de sangre periférica se descongelaron rápidamente, se lavaron y se resuspendieron a $5x10^{6}$ en tampón fosfato salino (pH 7,2) suplementado con 2% de suero fetal bovino y se tiñeron con 0.5ug/ml de angiopoyetina-2 durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces con 4 ml de PBS / 2% de FCS. A continuación, se añadieron anticuerpos para identificar células B de memoria de cambio de clase (CD19 +, CD27 +, e IgM-), así como SA-PE para marcar las células B con la angiopoyetina biotinilada en la superficie. Un panel de células

T marcadores de anticuerpos de exclusión, células asesinas naturales, macrófagos y células muertas fueron incluidas para reducir la tinción del tetrámero basal (CD3, CD14, CD16, 7-AAD). Las células B individuales que unidas a la angiopoyetina-2 fueron clasificadas en tiras de 8 tubos de PCR utilizando el BD FACS Aria II. El receptor de células B (BCR) ARNm fue amplificado utilizando un kit comercial de Epicentre Biotechnologies (número de catálogo: MBCL90310) utilizando cebadores específicos de genes (véase más arriba). Una PCR anidada de dos pasos amplifica los dominios hipervariables de BCR de cadenas pesadas y livianas (ver arriba). Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron a partir de un paciente con carcinoma de pulmón de células no pequeñas quienes habían sido vacunados con células tumorales autólogas traducidas con un vector de expresión de GM-CSF (GVAX) (Cancer Res. 70: 10150, 2010). Los anticuerpos se expresaron como anticuerpos IgG1 de longitud completa en un sistema de expresión transitorio de CHO-S.

La validación de anticuerpos anti-angiopoyetina-2 que se unen a la angiopoyetina-2 se realizó utilizando ensayos de ELISA. Brevemente, se recubrió la angiopoyetina-2 durante la noche a 4µg/ml en 100 mM de tampón de bicarbonato de sodio a pH 9,6 en platos de 96 pozos de fondo plano (PerkinElmer) a 4 ° C. Los platos se bloquearon con tampón de ensayo que contiene albúmina de suero bovino y gamma globulinas de la especie bovina (PerkinElmer) a temperatura ambiente durante tres horas. Los anticuerpos se diluyeron en tampón de ensayo a 20ug/ml-0.16ug/ml y se incubaron durante 1 hora a 4 ° C. Los platos se lavaron tres veces con 200µl de tampón de lavado (50 mM Tris pH 8, 150 mM de NaCl 150 mM, EDTA de 20 mM, 0,05% de Tween). Solución de mejora de 100 µl (PerkinElmer) se añadió a cada pozo y los conteos de fluorescencia medidos utilizando un lector de platos Victor3 (PerkinElmer) a una longitud de onda de 615 nm. Se evaluó también la angiopoyetina-1 y -4 humanas para la unión y mostraron reactividad similar.

Los datos relevantes se muestran en las FIGs.27A-27C, que proporcionan gráficos y un gel en relación al aislamiento de anticuerpos específicos de angiopoyetina de un paciente con cáncer de pulmón. (A) La reactividad de angiopoyetina-2 del suero de un paciente con cáncer de pulmón (L19) de suero (diluido 1:1000), determinado por ELISA. Las fechas de recolección de suero se muestran en el eje x. La proteína de albúmina de control de suero bovino (BSA) se incluyó como un control negativo. (B) El gráfico de

FACS que exhiben la muestra de PBMC (punto de tiempo-10/98) diferenciada en células CD19 +, CD27 + IgM-B con CD19 en el eje X y la angiopoyetina-2 fluorescentemente marcada en el eje-Y. La diferencia indica aproximadamente donde se hizo la clasificación de corte. Diez células B fueron ordenadas por esta muestra. (C) cadena pesada, liviana, y productos de PCR de la región de bisagra de 10 células B de memoria reactivos de angiopoyetina-2 aisladas de paciente L19. Los productos de PCR de cadena pesada (arriba) y liviana (abajo) después de dos rondas de PCR anidada de aproximadamente 350 pares de bases.

Ejemplo 13: Unión de Anticuerpos Anti Angiopoyetina-2 Contra Miembros de la Familia de Angiopoyetina Recombinante

Los platos de 96 pozos se recubrieron durante la noche con 4 µg / ml de angiopoyetina-1, -2, y -4 recombinante (R & D Systems) en tampón de bicarbonato de sodio a pH 9,6. Los platos se bloquearon posteriormente durante 3 horas a temperatura ambiente con tampón de ensayo (Perkin Elmer) que contiene albúmina de suero bovino (BSA) y gamma-globulinas bovinas. Los anticuerpo ID 2, 3, 4, y 5 (ver Tabla 1), se diluyeron entre 20 µg/mL-0.16 µg / ml, se incubaron en los platos durante 1 hora a 4 ° C con rotación. Los platos se lavaron posteriormente antes de ser incubados con anticuerpo IgG-europio anti-humano (Perkin Elmer). Los recuentos fluorescentes en 615 nm se obtuvieron a través de un lector de platos. Un anticuerpo de control negativo (clon 8.18.C5) se utilizó para determinar la especificidad. Los datos se determinaron por duplicado.

Como se muestra en las FIGs. 26A-26C, los anticuerpos ID 2, 3, 4, y 5 (ver Tabla 1) se unen con alta especificidad a la angiopoyetina-1 -2, y -4. Los anticuerpos no se unen a Ang similar a 3, una proteína estructuralmente relacionada *(ver.* FIG. 26D).

Un anticuerpo anti-angiopoyetina adicional, designado anti Ang2 Ab6 (anticuerpo anti-MICA ID-10 descrito en la Tabla 1) con propiedades biológicas clínicamente relevantes fue desarrollado utilizando los métodos del presente documento. La unión de miembros de la familia de la angiopoyetina humana recombinante anti-Ang2 Ab6 se analizó como se describe anteriormente. Brevemente, los platos de ELISA se recubrieron con 4 µg / ml de angiopoyetinas Ang-1, Ang-2, Ang4, y de unión similar a Ang-3, y la

detección por anti-Ang2 Ab6 se probó a 20 µg / ml. 4 µg / ml, 0,8 µg / ml, y 0,16 µg / ml. Se utilizó europio conjugado anti-IgG humano secundario, con recuentos de europio medidos después de 45 minutos. Como se muestra en la FIG.57, anti-Ang2 Ab6 se une a todas las angiopoyetinas de una manera dosis dependiente.

Otras realizaciones

Es de entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que contiene un péptido que se une inmunoespecíficamente a la proteína A relacionada con el MHC clase I (MICA), en el que el péptido contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 de V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1 teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados.

2. La composición de la reivindicación 1, en el que el péptido contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 de V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 1, 6 , 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1.

3. Las composiciones de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el péptido contiene la CDR2 de V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , o la CDR2 de V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , o ambos.

4. La composición de la reivindicación 3, en el que el péptido contiene la región determinante de la complementariedad de CDR2 de V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, o la CDR2 de V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, o ambos.

5. Las composiciones de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el péptido contiene la CDR1 de V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , o la CDR1 de V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , o ambos.

6. La composición de la reivindicación 5, en el que el péptido contiene la región determinante de la complementariedad CDR1 de V_H del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, o la CDR1 de V_L del anticuerpo ID 1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la Tabla 1, o ambos.

7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene:

un cadena de V_H con identidad por la SEC ID NO:2, 149, 168, 186, o 204, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID-1, 6 , 7, 8 o 9 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 2, 149, 168, 186, o 204 correspondiente con FR1, FR2 , FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID-1, 6, 7, 8 o 9 mostrado en la tabla 1; y

una cadena V_L con identidad por la SEC ID NO:11, 151, 170, 189, o 206 donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo 1 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 11 151, 170, 189, o 206 correspondientes con FR1, FR2, FR3, FR4, comprenden secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por la FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo 1 mostrado en la tabla 1.

8. La composición de la reivindicación 7, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que comprende una cadena V_H que contiene la SEC ID NO: 2, 149, 168, 186, o 204 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO: 11, 151, 170 , 189, o 206.

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que contiene además un agente terapéutico contra el cáncer.

10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, formulada como una composición farmacéutica.

11. Una composición que contiene un péptido que se une inmunoespecíficamente a la angiopoyetina, en el que el péptido contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4 o 5 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados.

12. La composición de la reivindicación 11, en el que el péptido contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 2, 3 , 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1.

13. Las composiciones de cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en el que el péptido contiene la CDR2 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4, o 10 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , o la CDR2 de V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , o ambos.

14. La composición de la reivindicación 13, en el que el péptido contiene la región determinante de la complementariedad de CDR2 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, o la CDR2 de V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, o ambos.

15. Las composiciones de cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que el péptido contiene la CDR1 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , o la CDR1 de V_L del

anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados , o ambos.

16. La composición de la reivindicación 15, en el que el péptido contiene la región determinante de la complementariedad CDR1 de V_H del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, o la CDR1 de V_L del anticuerpo ID 2, 3, 4, 5 o 10 mostrado en la Tabla 1, o ambos.

17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en el que el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene:

un cadena V_H con identidad por la SEC ID NO: 20, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 20 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1; y

un cadena V_L con identidad por la SEC ID NO: 29, en donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 29 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 2 mostrado en la tabla 1.

18. La composición de la reivindicación 17, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena V_H que contiene la SEC ID NO: 20 y una cadenaV_L que contiene la SEC ID NO: 29.

19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene:

un cadena V_H con identidad por la SEC ID NO: 38, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo 3 ID mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 38 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, el 98, 99% o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1, y

una cadena V_L con identidad por la SEC ID NO: 47, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 3 mostrado en la Tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 47 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 3 mostrado en la tabla 1.

20. La composición de la reivindicación 19, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena de V_H que contiene la SEC ID NO: 38 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO: 47.

21. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene:

un cadena V_H con identidad por la SEC ID NO: 56, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 56 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, el 98, 99% o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1, y

una cadena V_L con identidad por la SEC ID NO: 65, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos

conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones dentro de la SEC ID NO: 65 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID 4 mostrado en la tabla 1.

22. La composición de la reivindicación 21, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena de V_H que contiene la SEC ID NO: 56 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO: 65.

23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene:

un cadena V_H con identidad por la SEC ID NO: 74, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID-5 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y las regiones dentro de la SEC ID NO: 74 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96% , 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID-5 mostrado en la tabla 1; y

una cadena V_L con identidad por la SEC ID NO: 83, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID-5 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y las regiones dentro de la SEC ID NO: 83 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96% , 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID-5 mostrado en la tabla 1.

24. La composición de la reivindicación 23, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena V_H que contiene la SEC ID NO: 74 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO: 83.

25. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-24, en donde el péptido se une inmunoespecíficamente a la angiopoyetina-2.

26. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-25, que contiene además un agente terapéutico contra el cáncer.

27. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-26, formulada como una composición farmacéutica.

28. Un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, el método consiste en administrar en un sujeto una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-27.

29. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene:

un cadena V_H con identidad por la SEC ID NO:222, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_H del anticuerpo ID-10 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y las regiones dentro de la SEC ID NO: 74 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96% , 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_H del anticuerpo ID-10 mostrado en la tabla 1; y

una cadena V_L con identidad por la SEC ID NO:224, donde las regiones correspondientes a CDR1, CDR2, y CDR3 contienen CDR1 , CDR2, y CDR3 de V_L del anticuerpo ID-10 mostrado en la tabla 1, teniendo 5 o menos sustituciones de aminoácidos conservados dentro de las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, y las regiones dentro de la SEC ID NO: 224 correspondientes a FR1, FR2, FR3, FR4, contienen secuencias de aminoácidos con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96% , 97%, 98, 99%, o 100% de identidad por FR1, FR2, FR3, FR4 de V_L del anticuerpo ID-10 mostrado en la tabla 1.

30. La composición de la reivindicación 23, en donde el péptido es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo que contiene una cadena V_H que contiene la SEC ID NO: 222 y una cadena V_L que contiene la SEC ID NO: 224.

31. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y 11-16, que contiene además un inhibidor de la deacetilasa de histona (HDAC) seleccionado del grupo que consiste en ácido hidroxámico, vorinostat, suberoilanilida del ácido hidroxámico (SAHA, tricostatina A (TSA), LAQ824, panobinostat (LBH589), belinostat (PXD101), ITF2357 Italfarmaco SpA, tetrapéptido cíclico, depsipéptido (romidepsin, FK228), benzamida; entinostat (SNDX-275/MS-275), MGCD0103, ácidos alifáticos de cadena corta, ácido valproico, butirato de fenilo, AN -9, pivanex, CHR-3996 y CHR-2845.

32. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y 11-16, que contiene además un inhibidor del proteasoma seleccionado del grupo que consiste de bortezomib, NPI-0052, carfilzomib (PR-171), CEP 18770, y MLN9708.

33. Un método de obtención de células inmunes dirigidas contra un antígeno propio de un sujeto, en donde el método comprende

identificación de un sujeto que presenta una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio;

proporcionar una forma multimérica del antígeno propio;

contactar la forma multimérica del antígeno propio con una muestra del sujeto que exhibe una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio; y

la obtención de células inmunes ligadas a la forma de multímeros del antígeno propio.

34. Un método de obtención de las células inmunitarias de un paciente con cáncer dirigidas contra un antígeno propio, comprendiendo el método

identificación de un sujeto que presenta una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio;

proporcionar una forma multimérica del antígeno propio;

contactar la forma multimérica del antígeno propio con una muestra del sujeto que exhibe una respuesta inmune positiva hacia el antígeno propio; y

la obtención de células inmunes ligados a la forma de multímeros del antígeno propio.

35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33 - 34, en el que la forma multimérica del antígeno propio es una forma tetramérica del antígeno propio.

36. El método de la reivindicación 35, en el que la forma multimérica del antígeno propio contiene un fracción detectable.

37. El método de la reivindicación 33, en el que el sujeto es un mamífero.

38. El método de la reivindicación 37, en el que el sujeto es un humano.

39. El método de la reivindicación 33, en donde la muestra es de un sujeto humano.

40. El método de la reivindicación 33, en el que el antígeno propio se refiere a la condición o enfermedad.

41. El método de la reivindicación 33, en el que el antígeno propio se refiere a cáncer.

42. El método de la reivindicación 40, donde la afección o enfermedad es un cáncer seleccionado del grupo que consistente en melanoma, carcinoma de pulmón, de mama, de riñón, de ovario, de próstata, de páncreas, gástrico, y el carcinoma de colon, linfoma o leucemia.

43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33-34, en el que el antígeno propio es el la proteína A relacionada con el MHC clase I (MICA)

44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33-34, en el que el autoantígeno es una angiopoyetina.

45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 33-34, en el que la célula inmune es una célula B de memoria.

46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33-34, en el que el antígeno propio es un antígeno propio específico de cáncer.

47. El método de la reivindicación 33, en el que el sujeto es un paciente con cáncer.

RESUMEN

La presente divulgación proporciona en parte, composiones que comprenden péptidos los cuales se unen de manera inmunoespecífica a compañeros de unión, en donde dichos péptidos comprenden por lo menos regiones determinantes de la complementariedad con relación a las regiones de complementariedad mostradas en la Tabla 1.

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGGCCCTCACCTGCGCTGTCTCT
GGTGGGTCCTTCACTGATCATTACTGGAGTTGGATCCGTCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGAA
ATCAATCATAGTGGAGTCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGACTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAG
AGCCAGTTCTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTCTGTACTACTGTGCGAAAACTGGCCTG
TATTATGATGACGTTTGGGGGACTTTTCGTCCACGGGGCGGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 1)

FIG. 1

Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L A L T C A V S
G G S F T D H Y W S W I R Q A P G K G L E W I G E
I N H S G V T N Y N P S L K S R L T I S V D T S K
S Q F S L R L T S V T A A D T A L Y Y C A K T G L
Y Y D D V W G T F R P G G G F D S W G Q G T L V T
V S S (SEQ ID NO: 2)

FIG. 2

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCGGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCC
AGCCAGAGTATTTTATATAGCTCCGACAATAAGAATTACTTAGCTTGGTACCAGCACAAGCCAGGACAGCCTCCT
AAGCTCCTCTTTTACTGGGCATCTATCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCGGCGGGTCTGGGACA
GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTCCT
CCTTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCCAA (SEQ ID NO: 10)

FIG. 3

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S
S Q S I L Y S S D N K N Y L A W Y Q H K P G Q P P
K L L F Y W A S I R E S G V P D R F S G G G S G T
D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S P
P C S F G Q G T K L E I Q (SEQ ID NO: 11)

FIG. 4

```
1    GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
61   TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGT AGTTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
121  CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTTATTGGA GTGGTGGTAG CACATACTAC
181  GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA TATCCAAGAA CACGCTGTAT
241  CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCCGACGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGGCGAT
301  TACTATGGTT CGGGGGCTCA CTTTGACTAC TGGGGCCAGG GAACCCTGGT CACCGTCTCC
361  TCA    (SEQ ID NO: 19)
```

FIG. 5

```
1    EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
21   SCAASGFTFS SYAMSWVRQA CDR1
41   PGKGLEWVSG IYWSGGSTYY CDR2
61   ADSVKGRFTI SRDISKNTLY
81   LQMNSLRADD TAVYYCARGD CDR3
101  YYGSGAHFDY WGQGTLVTVS
121  S    (SEQ ID NO: 20)
```

FIG. 6



```
1     GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCC TCACCTGTCA CCCTTGGACA GCCGGCCTCC
61    ATCTCCTGCA GGTCTAGCCA AAGCCTCGTA CACAGTGATG GAAACACCTA CTTGAGTTGG
121   CTTCAGCAGA GGCCAGGCCA GCCTCCAAGA CTCCTAATTT ATCAGATTTC TAACCGGTTC
181   TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGGCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
241   AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGTCGGGGTT TACTACTGCA TGCAAGGTAC ACAATTTCCT
301   CGGACGTTCG GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAA      (SEQ ID NO: 28)
```

FIG. 7

```
1     DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS
21    ISCRSS QSLV HSDGNTYLSW CDR1
41    LQQRPGQPPR LLIY QISNRF CDR2
61    SGVPDRFSGS GAGTDFTLKI
81    SRVEAEDVGV YYC MQGTQFP CDR3
101   RT FGQGTKVE IK      (SEQ ID NO: 29)
```

FIG. 8

```
1    GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC CGGGGGAGGC TTAGTTCAGC CTGGGGGATC CCTGAGACTC
61   TCCTGTGCAG CCTCAGGGTT CACCTTTAGT AATAACTGGA TGCACTGGGT CCGCCAGGCT
121  CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GATCTCAGAG ATTAGAAGTG ATGGGAATTT CACAAGGTAC
181  GCGGACTCCA TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAG CACACTGTAT
241  TTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGTCGAGGAC ACGGGTCTGT ATTACTGTGC AAGAGACTAC
301  CCCTATAGCA TTGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCCTC A    (SEQ ID NO: 37)
```

FIG. 9

```
1    EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
21   SCAASGFTFS NNWMHWVRQA CDR1
41   PGKGLEWISE IRSDGNFTRY CDR2
61   ADSMKGRFTI SRDNAKSTLY
81   LQMNSLRVED TGLYYCARDY CDR3
101  PYSIDYWGQG TLVTVSS    (SEQ ID NO: 38)
```

FIG. 10

```
1    GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCC TCACCTGTCA CCCTTGGACA GCCGGCCTCC
61   ATCTCCTGCA CATCTAGTCA AAGCCTCGTA CACAGTAATG GAAACACCTA CTTGAGTTGG
121  CTTCAGCAGA GGCCAGGCCA GCCCCCAAGA CTCCTAATTT ATGAGATTTC TAAGCGGGTC
181  TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGGCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
241  AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGTCGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGGTAA ACAACTTCGG
301  ACTTTTGGCC AGGGGACCAA GCTGGAGATC AAA          (SEQ ID NO: 46)
```

FIG. 11

```
1    DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS
21   ISCTSSQSLV HSNGNTYLSW CDR1
41   LQQRPGQPPR LLIYEISKRV CDR2
61   SGVPDRFSGS GAGTDFTLKI
81   SRVEAEDVGV YYCMQGKQLR CDR3
101  TFGQGTKLEI K          (SEQ ID NO: 47)
```

FIG. 12

```
1    GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGCTC CGTGAGACTG
61   TCTTGTGCGG CCTCAGGCTT CATTCTTAGC AACTTTGCCA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
121  CCAGGGAAGG GGCTGGACTG GGTCTCAGGT AATTTTGGTG GTCGTGAAAA TACATATTAC
181  GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA GTTCCAAGAG CACACTGTAT
241  CTGCAAATGA ACAATTTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GCGAGGCGAT
301  TACCATGGTT CGGGGGCTCA CTTTGACTAC TGGGGCCAGG GAATACTGGT CACCGTCTCC
361  TCA   (SEQ ID NO: 55)
```

FIG. 13

```
1     EVQLVESGGG LVQPGGSVRL
21    SCAASGFILS NFAMSWVRQA CDR1
41    PGKGLDWVSG NFGGRENTYY CDR2
61    ADSVKGRFTI SRDSSKSTLY
81    LQMNNLRAED TAVYYCARGD CDR3
101   YHGSGAHFDY WGQGILVTVS
121   S     (SEQ ID NO: 56)
```

FIG. 14

```
1    GATATTGTGA TGACCCAGAG TCCACTCTCC TCACCTGTCA TCCTTGGACA GCCGGCCTCC
61   ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA AAGCCTCCTA CACAGTGATG GAAACACCTA CTTGAGTTGG
121  CTTCACCAGA GGCCAGGCCA GCCTCCTAGA CTCCTAATTT ATCAGATTTC TAACCGGTTC
181  TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGACAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
241  AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGCCGGGATT TATTACTGCA TGCAAGGTAC AGAATTTCCT
301  CGGACGTTCG GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAA   (SEQ ID NO: 64)
```

FIG. 15

```
1    DIVMTQSPLS SPVILGQPAS
21   ISCRSSQSLL HSDGNTYLSW CDR1
41   LHQRPGQPPR LLIYQISNRF CDR2
61   SGVPDRFSGS GTGTDFTLKI
81   SRVEAEDAGI YYCMQGTEFP CDR3
101  RTFGQGTKVE IK   (SEQ ID NO: 65)
```

FIG. 16

```
1     GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGATACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
61    TCCTGTGCAA CCTCTGGATT CACCTTTAGA ACTTCTTCCA TGAGTTGGGT CCGTCGGGCT
121   CCAGGGAAGG GGCTGGAATG GGTCTCAGCT ATTGGTGCTG AAAGTCATGA CACGCACTAC
181   ACAGACTCCG CGGAGGGCCG GTTCACCATC TCCAAAGACT ATTCAAAGAA CACAGTATAT
241   CTGCAGATGA ACGGCCTGAG AGTCGACGAC ACGGCCATAT ATTATTGTGC CCATCACTAT
301   TACTATGGCT CGCGGCAGAA ACCCAAAGAT TGGGGAGATG CTTTTGATAT GTGGGGCCAG
361   GGGACAATGG TCTCCGTCTC TTCA
```

(SEQ ID NO: 73)

FIG. 17

```
1     EVQLVESGGG LIQPGGSLRL
21    SCATSGFTFR TSSMSWVRRA CDR1
41    PGKGLEWVSA IGAESHDTHY CDR2
61    TDSAEGRFTI SKDYSKNTVY
81    LQMNGLRVDD TAIYYCAHHY CDR3
101   YYGSRQKPKD WGDAFDMWGQ
121   GTMVSVSS
```

(SEQ ID NO: 74)

FIG. 18

```
1    GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCT GTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CAGAGTCACC
61   ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGATATTAGC ACCTGGTTAA CCTGGTATCA GCAGAGAGCA
121  GGGAAGGCCC CTAACCTCCT GATCTATGGT GCATCCACTT TGGAAGATGG GGTCCCATCC
181  AGGTTCAGCG GCAGTGGATC CGGGACAGAT TTCACTCTCA CTATCGACAG CCTGCAGCCT
241  GACGATTTTG CAACTTACTA TTGTCAACAG TCTCACAGTT TCCCCTACAC TTTTGGCCAG
301  GGGACCCAGC TGGGGATCTC A          (SEQ ID NO: 82)
```

FIG. 19

```
1    DIQMTQSPSS VSASVGDRVT
21   ITCRAS QDIS TWLTWYQQRA CDR1
41   GKAPNLLIY G ASTLEDGVPS CDR2
61   RFSGSGSGTD FTLTIDSLQP
81   DDFATYYC QQ SHSFPYTF GQ CDR3
101  GTQLGIS          (SEQ ID NO: 83)
```

FIG. 20

Tetramerización del antígeno
Biotina
estreptavidina fluorescente
antígeno
tetrámero
FIG. 21A
Rotulado con células B & sorteado de células únicas
BCR
células B
tetrámero
CD19
FIG. 21B
T7 mediated mRNA amplification
RT-PCR anidado & secuenciamiento
ARNm BCR
promotor dsT7
cebador + promotor ssT7
T7 ARN Pol
T7
Producto PCR
GATC
ARNm BCR amplificado
FIG. 21C
FIG. 21D
Expresión de anticuerpos
Prueba de actividad
TUMOR
a) ADCC
b) activación de complemento
c) neutralización
d) presentación cruzada
FIG. 21E
FIG. 21F

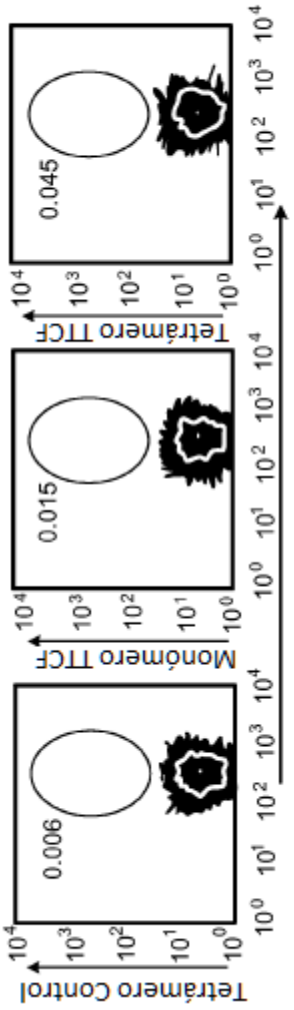


FIG. 22A

	Control tetrámero/ 10^3 células B	Monómero TTCF/ 10^4 células B	Tet TTCF/# 10^4 células B	Veces #Tet/#Mono
Donante 1	3.98	2.53	18.41	7.3
Donante 2	15.03	38.64	117.18	3.1
Donante 3	4.14	48.92	77.55	1.6

FIG. 22B

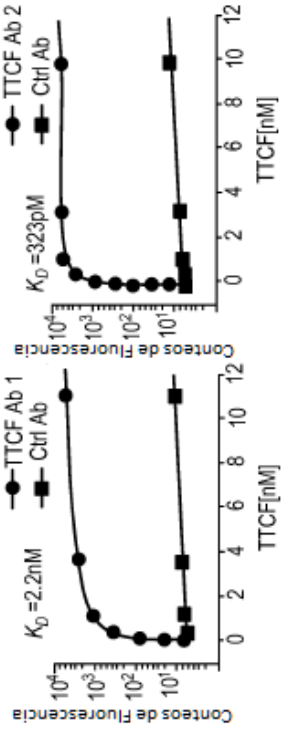


FIG. 23A

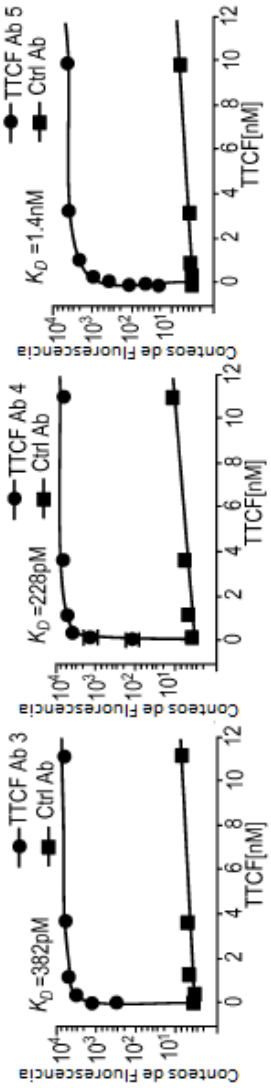


FIG. 23B

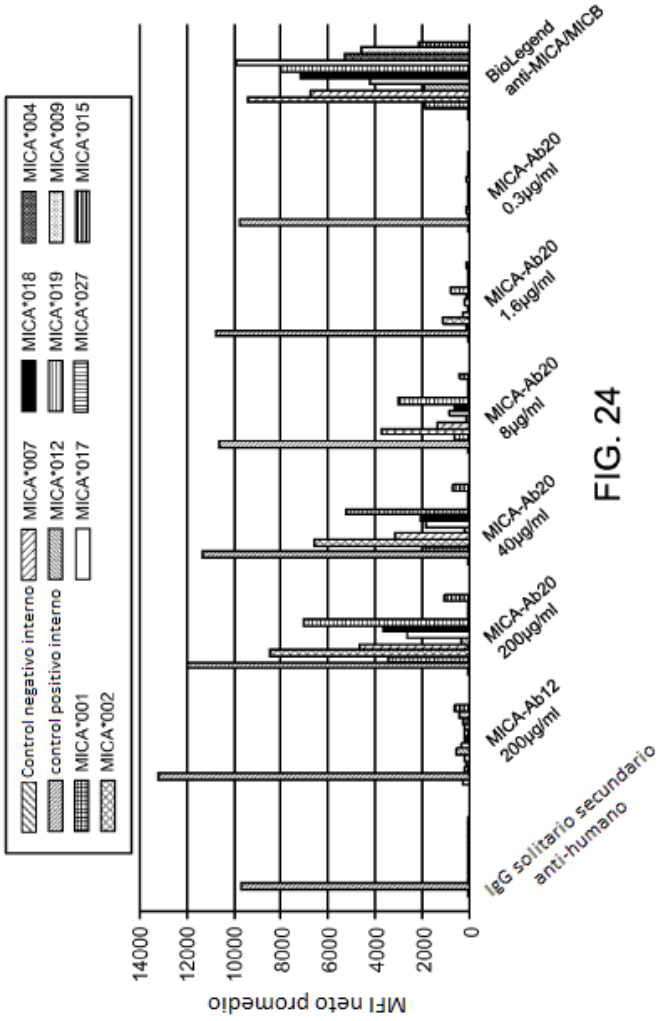

Control negativo interno
control positivo interno
MICA*001
MICA*002
MICA*007
MICA*012
MICA*017
MICA*018
MICA*019
MICA*027
MICA*004
MICA*009
MICA*015
MFI neto promedio
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
IgG solitario secundario anti-humano
MICA-Ab12 200µg/ml
MICA-Ab20 200µg/ml
MICA-Ab20 40µg/ml
MICA-Ab20 8µg/ml
MICA-Ab20 1.6µg/ml
MICA-Ab20 0.3µg/ml
BioLegend anti-MICA/MICB

FIG. 24

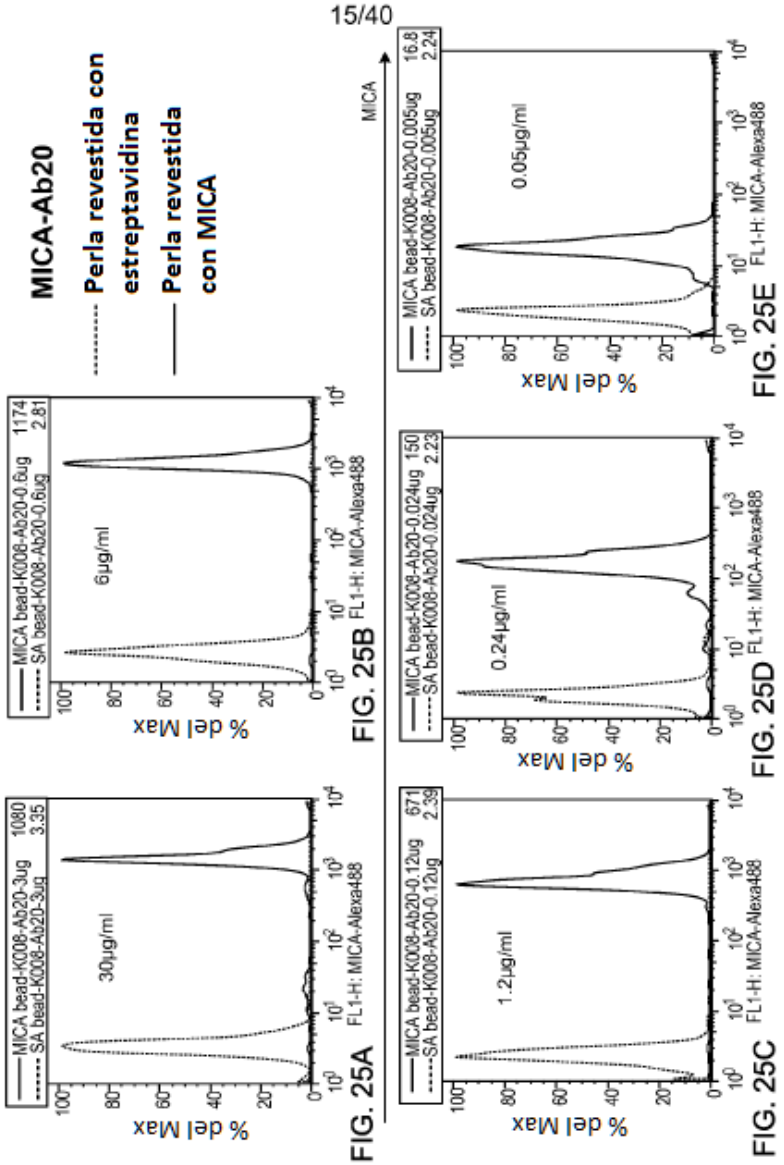


FIG. 25A FIG. 25B FIG. 25C FIG. 25D FIG. 25E

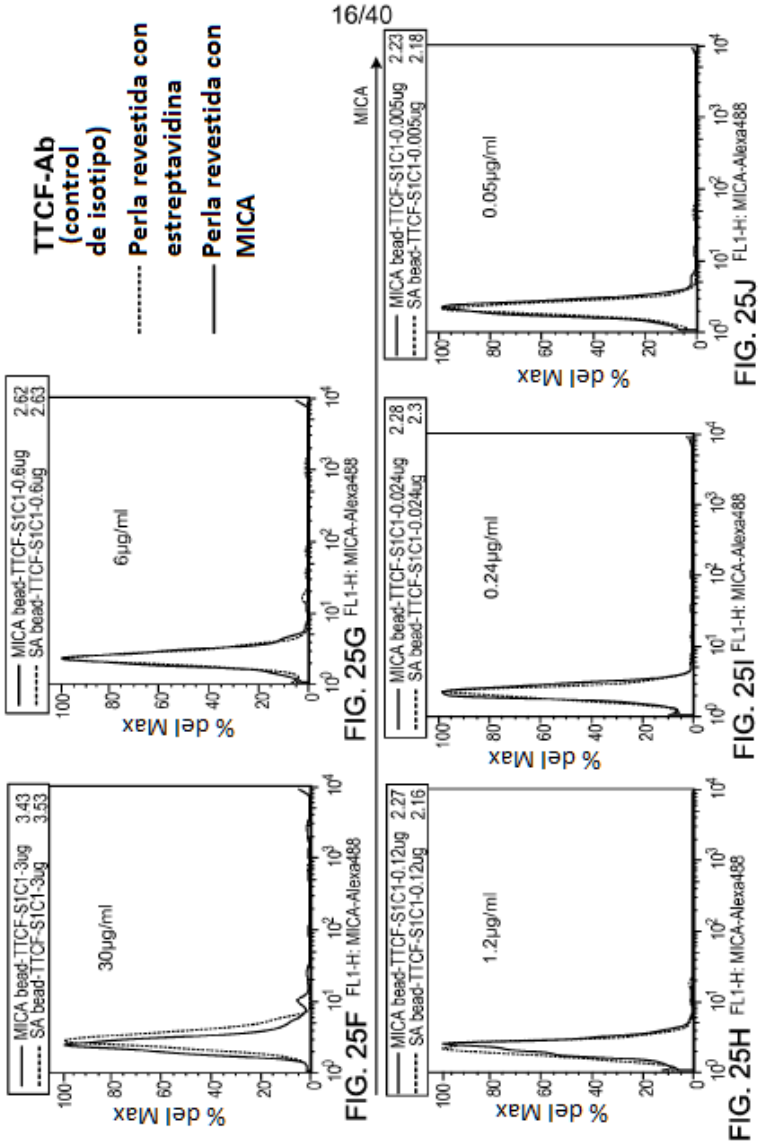


FIG. 25F FIG. 25G FIG. 25H FIG. 25I FIG. 25J

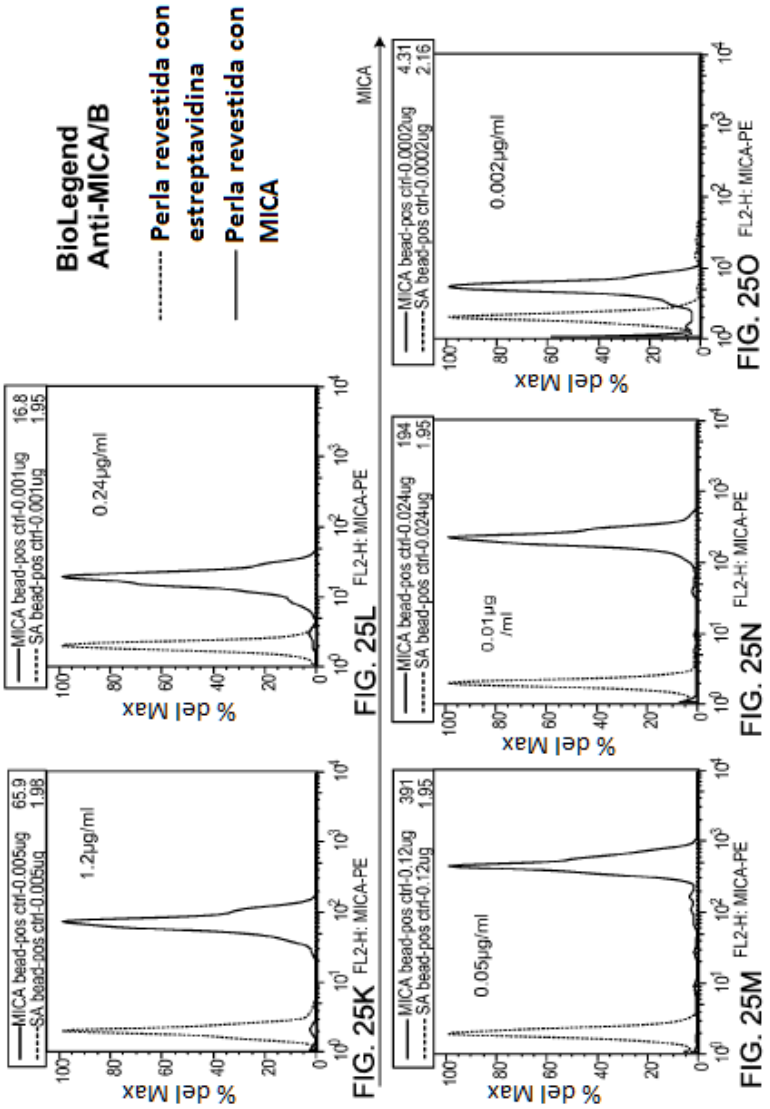


FIG. 25K FIG. 25L FIG. 25M FIG. 25N FIG. 25O

FIG. 26A

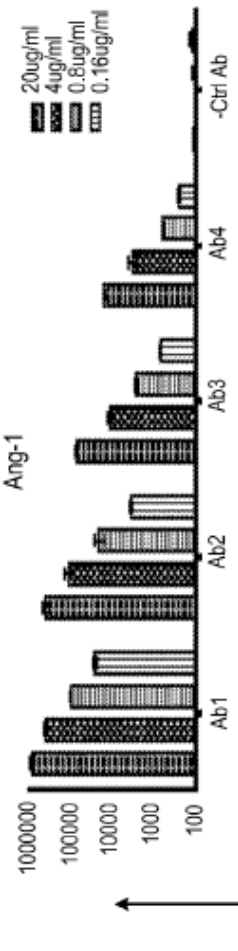


FIG. 26B

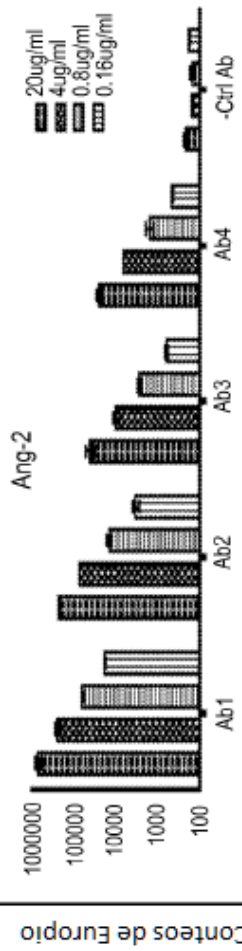
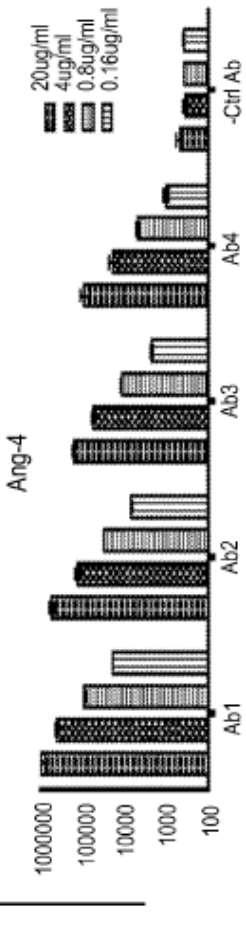
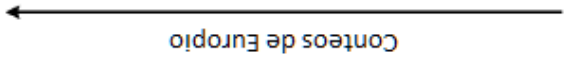


FIG. 26C





5

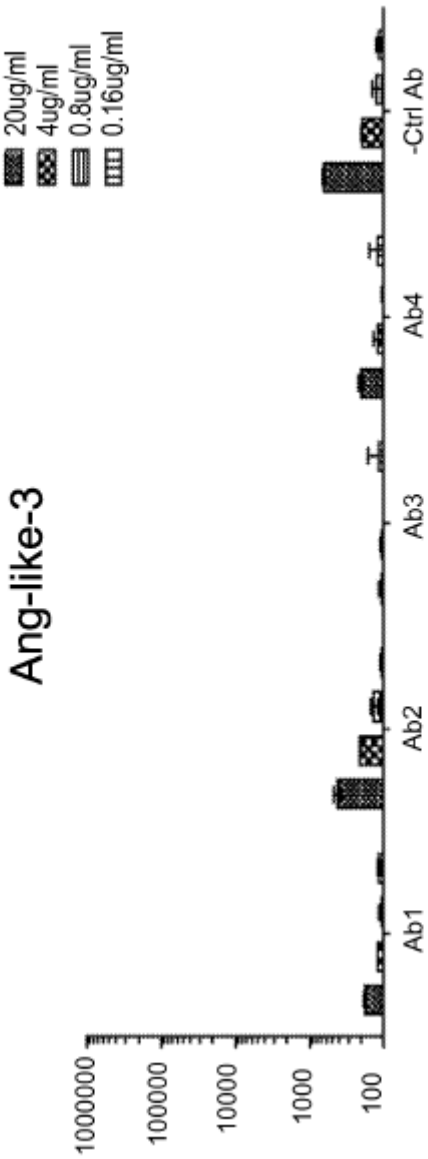

Ang-like-3
20ug/ml
4ug/ml
0.8ug/ml
0.16ug/ml
1000000
100000
10000
1000
100
Ab1
Ab2
Ab3
Ab4
-Ctrl Ab

FIG. 26D

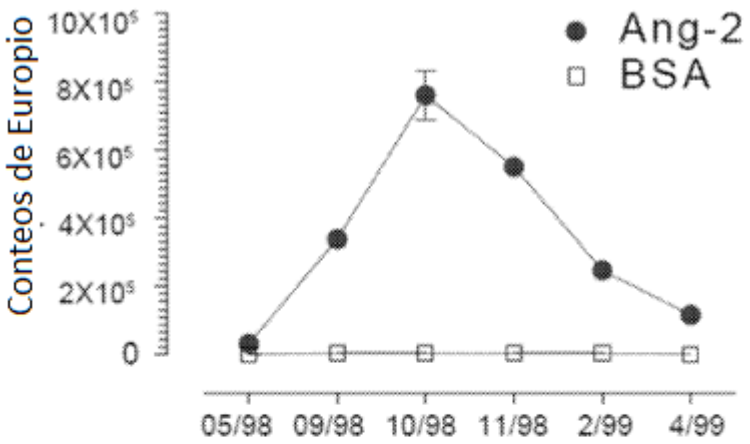


FIG. 27A

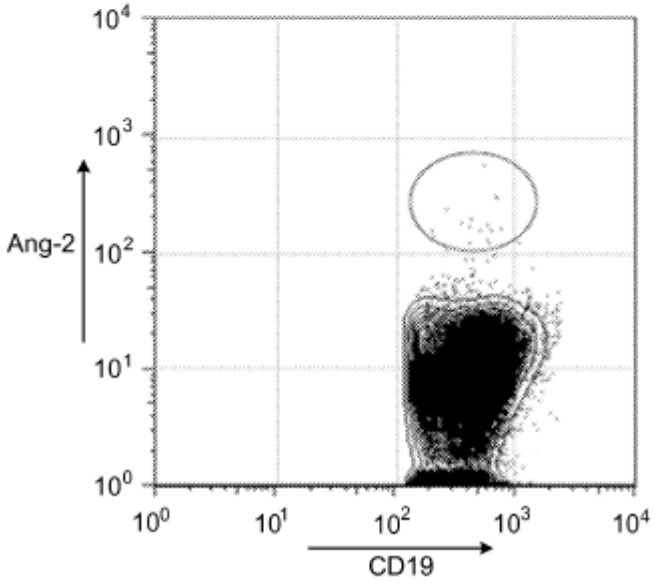


FIG. 27B

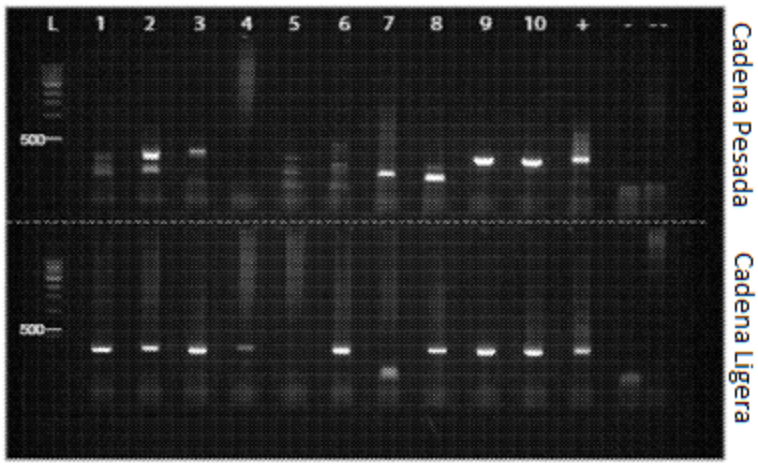


FIG. 27C

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGGAGCCTTCGGGGACCCTGTCCCT
CACCTGCACTGTGTCTGGTGGCTCCATCAGCAGGAGTAACTGGTGGAGTTGGGTCCGCC
AGCCCCCAGGGGAGGGGCTGGAATGGATTGGAGAAATCCATCACATTGGGAGGTCCAGC
TACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCTGTAGACAAGTCCCAGAACCAGTT
CTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAA
ATGGCTACTACGCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG
(SEQ ID NO. 148)

FIG. 28

QVQLQESGPGLVEPSGTLSLTCTVSGGSISRSNWWSWVRQPPGEGLEWIGEIHHIGRSS
YNPSLKSRVTMSVDKSQNQFSLRLTSVTAADTAVYYCAKNGYYAMDVWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 149)

FIG. 29

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCGACTTCCTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGCTACATCCTTCAGGGCCACTGGCATC
TCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCTCTCACCATCAACAGACT
GGAACCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACTATCGTAGTTCACCTCCGTGGT
ACACTTTTGCCCAGGGGACCAAGCTGGACATGAGACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC
(SEQ ID NO. 150)

FIG. 30

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSDFLAWYQQKPGQAPRLLIYATSFRATGI
SDRFSGSGSGTDFSLTINRLEPEDFAVYYCQHYRSSPPWYTFAQGTKLDMRRTVAAPSV
(SEQ ID NO. 151)

FIG. 31

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGGACCCTGTCCCTC
ACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCCTCCATTACCAATGGTGCCTGGTGGAGTTGGGTCCGCCAG
CCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGAAATCTATCTTAATGGGAACACCAACTCC
AACCCGTCCCTGAAGAGTCGAGTCATCATATCAGTGGACAAGTCCAAGAACCACTTCTCG
CTGACCCTGAACTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAGAACGGCT
GCCTACAACCTTGAGTTCTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
167)

FIG. 32

QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGASITNGAWWSWVRQPPGKGLEWIGEIYLNGNTNS
NPSLKSRVIISVDKSKNHFSLTLNSVTAADTAVYYCAKNAAYNLEFWGQGALVTVSS (SEQ
ID NO: 168)

FIG. 33

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC

CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTGTTAGCAGCCCCTACGTAGCCTGGTACCAGCAGAAA

CGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACCGGCATCCCAG

ACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGC

CTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGATAGATCATACTATTACACTTTT

GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 169)

FIG. 34

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTVSSPYVAWYQQKRGQAPRLLIYGASTRATGIPDR

FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRSYYYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 170)

FIG. 35

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAACCTGTCGCTC
ACCTGCACTGTCTCTGATGCCTCCATGAGTGATTATCACTGGAGCTGGATCCGGCAGGCC
GCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATGTACAGCACTGGGAGTCCCTACTACAA
ACCCTCCCTCAAAGGTCGGGTCACCATGTCAATAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCT
GAAGCTGGCCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCATCTATTATTGTGCGAGCGGGACAACA
TATTGGTGGCTGGGTCCCCCCTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC
A (SEQ ID NO: 185)

FIG. 36

QVQLQESGPGLVKPSENLSLTCTVSDASMSDYHWSWIRQAAGKGLEWIGRMYSTGSPYY
KPSLKGRVTMSIDTSKNQFSLKLASVTAADTAIYYCASGQHIGGWVPPDFWGQGTLVTVS
S (SEQ ID NO: 186)

FIG. 37

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCA
TCTCCTGCAGGTCTAGTGAAGGCCTCGTATATAGTGATGGAGACACCTACTTGAGTTGGT
TTCACCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTGATTTATAAAATTTCTAACCGGTTCT
CTGGGGTCCCCGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGCACAGATTTCACACTGAAAATCA
GCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTCGGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACACATTTTCGGT
GGACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAGTCAAACGT (SEQ ID NO: 187)

FIG. 38

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSEGLVYSDGDTYLSWFHQRPGQPPRLLIYKISNRFSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHFPWTFGQGTKVEVKR (SEQ ID NO:
188)

FIG. 39

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTTCATATGGCTTGACCTGGATACGCCAGGCT
CCGGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAAGTATCAGTGGCAGTGGCAATAACACATACTA
CGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAAGTCAAGAAGACACTATA
TCTACAAATGGACAGCCTGACAGTCGGAGACACGGCCGTCTATTACTGCTTAGGAGTCGG
TCAGGGCCACGGAATTCCGGTCATCGTCTCCTCA (SEQ ID NO. 203)

FIG. 40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGLTWIRQAPGKGLEWVSSISGSGNNTYYA
DSVKGRFTISRDKVKKTLYLQMDSLTVGDTAVYYCLGVGQGHGIPVIVSS (SEQ ID NO.
204)

FIG. 41

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCA

TCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCGTACACCGTGATGGAAACACCTACTTGAGTTGGT

TTCTGCAGAGGCCAGGCCAGGCTCCAAGACTCCTAATTTATCGGATTTCTAACCGGTTCT

CTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACGGATTTCACACTGAAAATC

AGCAGGGTGGAAGCTGAGGATGTCGGCGTTTACTACTGCATGCAAGCTACACAAATCCCC

AACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO. 205)

FIG. 42

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHRDGNTYLSWFLQRPGQAPRLLIYRISNRFSG

VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQIPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO.

206)

FIG. 43

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTAATCCAGCCGGGGGGGGTCCCTAAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCGGGCTTCCTCATCAGTAGTTATTTCATGAGCTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGGAAGGGGCCGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGATGGTAGTACATATTAC
GTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCACAGACAATTCCAAGAACACACTATA
TCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGATATTACTGTGCGACACGGC
ATTTGAATTATGACGGTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC
TCCACCAAG (SEQ ID NO: 221)

FIG. 44

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFLISSYFMSWVRQAPGKGPEWVSVIYSDGSTYY
VDSVKGRFTISTDNSKNTLYLQMNSLRAEDTARYYCATRHLNYDGDHWGQGTLVTVSSA
STK (SEQ ID NO: 222)

FIG. 45

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTC
CATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGACGGAAACACCTACTTGAATT
GGTTTCACCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAAGCGG
GACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGTAGTGATTTCACACTGAA
AATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTTGGAATTTATTACTGCATGCAAGGTACACATT
GGCCGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCA (SEQ
ID NO: 223)

FIG. 46

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFHQRPGQSPRRLIYKVSKR
DSGVPDRFSGSGSGSDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPTFGQGTKVEIKRTVAA
(SEQ ID NO: 224)

FIG. 47

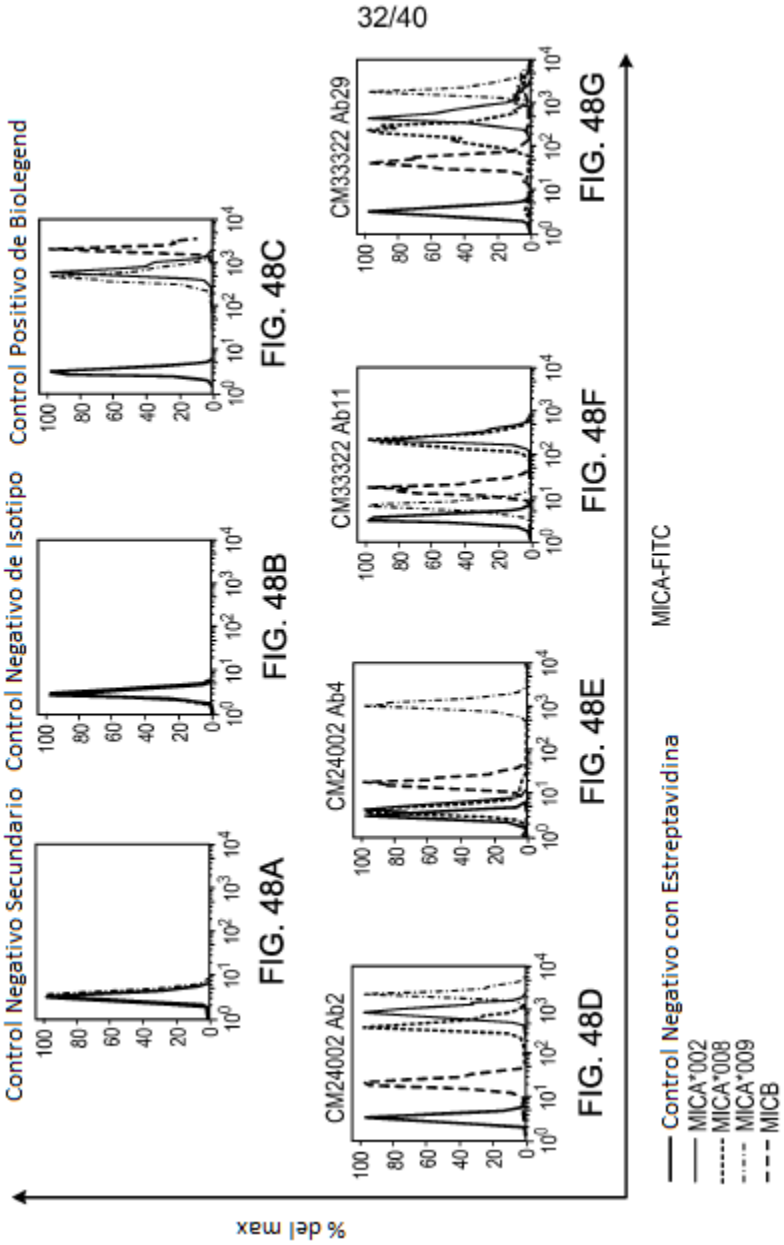


FIG. 48A FIG. 48B FIG. 48C

FIG. 48D FIG. 48E FIG. 48F FIG. 48G

5

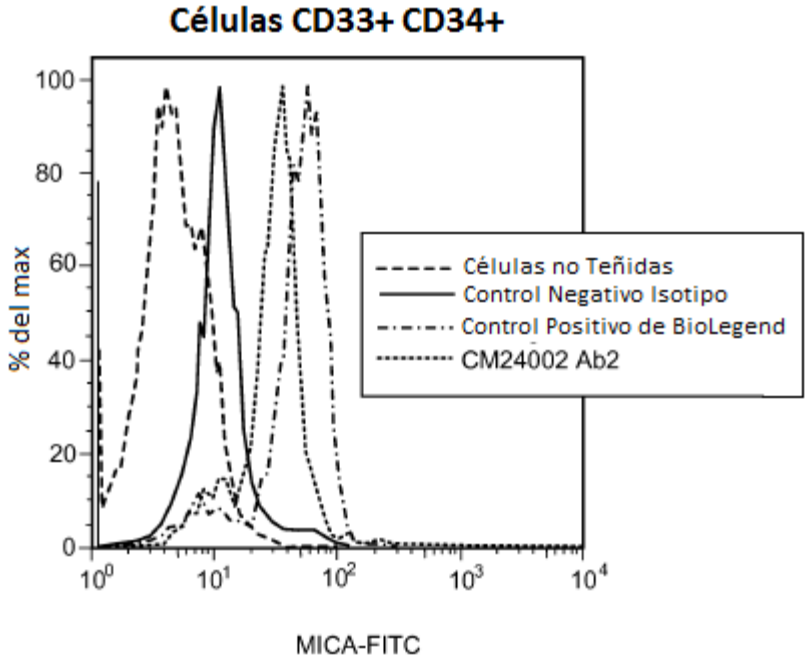

Células CD33+ CD34+
100
80
60
40
20
0
% del max
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
MICA-FITC
Células no Teñidas
Control Negativo Isotipo
Control Positivo de BioLegend
CM24002 Ab2

FIG. 49

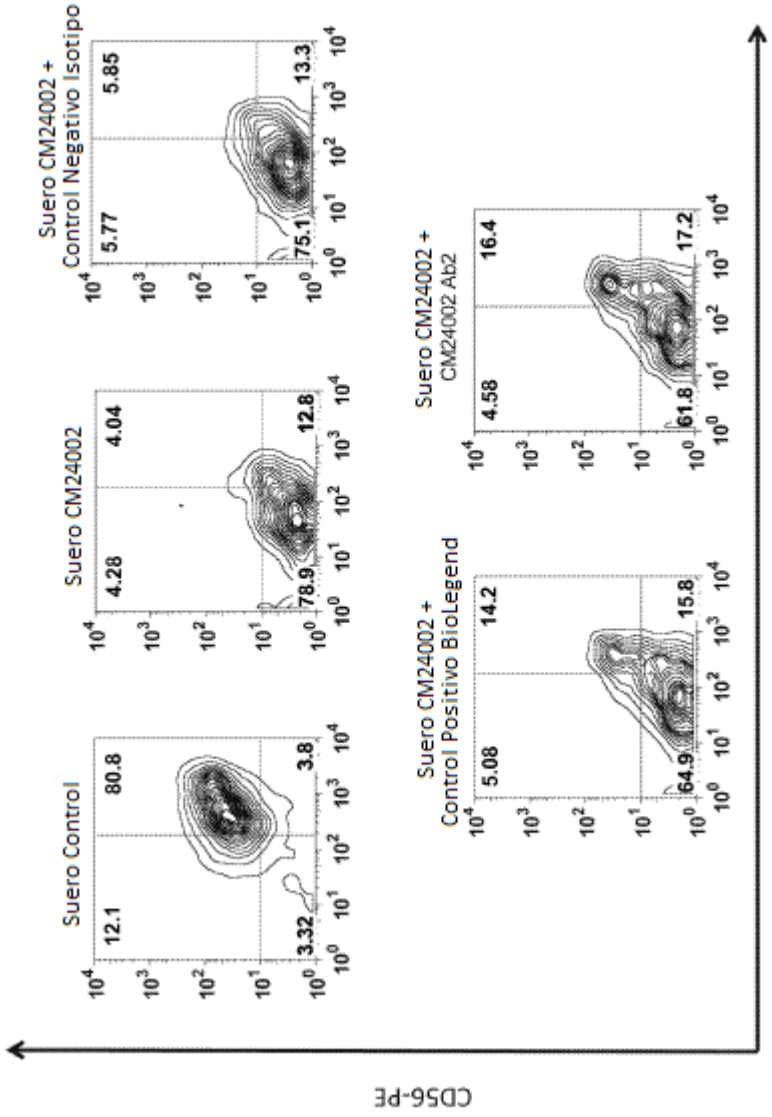

Suero Control
12.1
80.8
3.32
3.8
Suero CM24002
4.28
4.04
78.9
12.8
Suero CM24002 +
Control Negativo Isotipo
5.77
5.85
75.1
13.3
Suero CM24002 +
Control Positivo BioLegend
5.08
14.2
64.9
15.8
Suero CM24002 +
CM24002 Ab2
4.58
16.4
61.8
17.2
CD56-PE
NKG2D-APC

FIG. 50

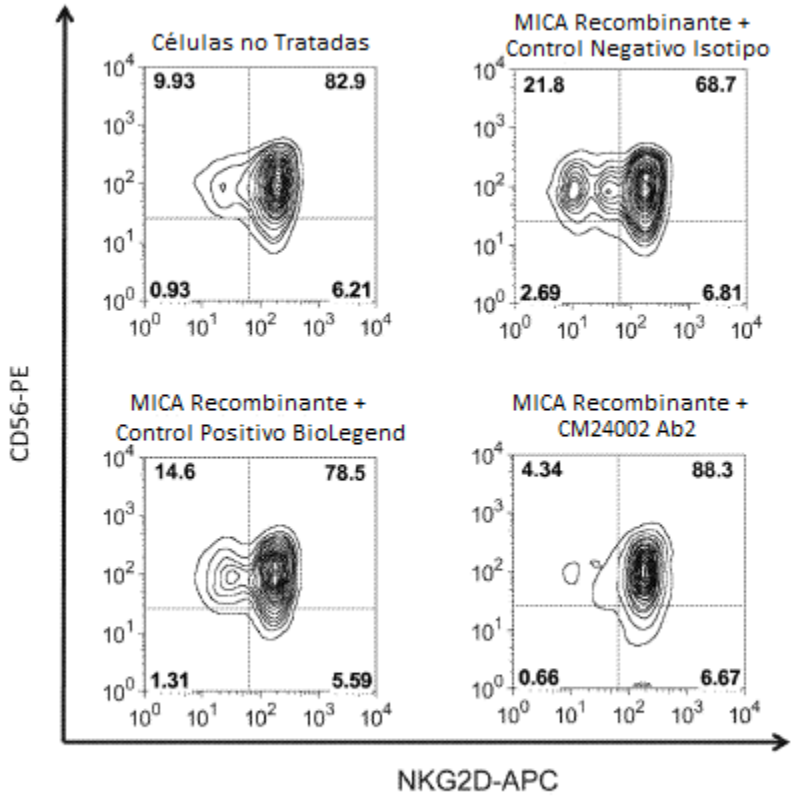

Células no Tratadas
9.93
82.9
0.93
6.21
MICA Recombinante + Control Negativo Isotipo
21.8
68.7
2.69
6.81
MICA Recombinante + Control Positivo BioLegend
14.6
78.5
1.31
5.59
MICA Recombinante + CM24002 Ab2
4.34
88.3
0.66
6.67
CD56-PE
NKG2D-APC

FIG. 51

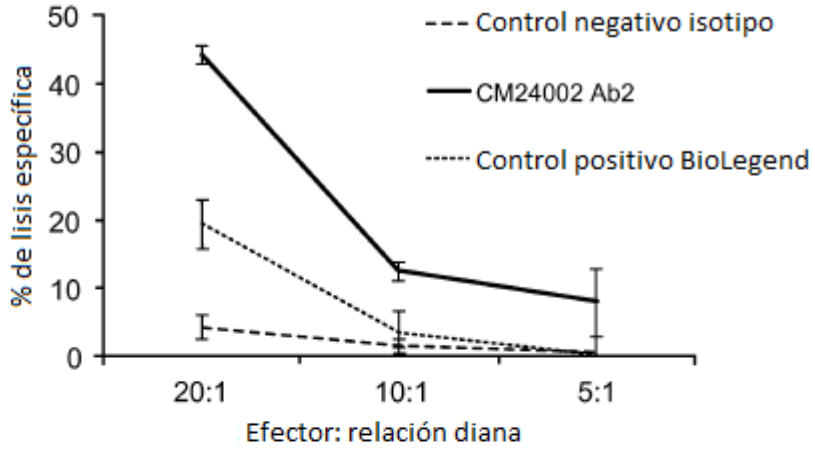


FIG. 52

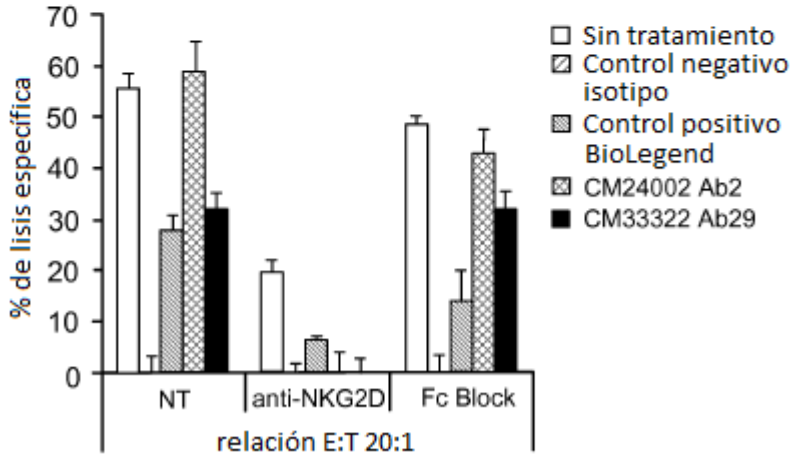


FIG. 53

5

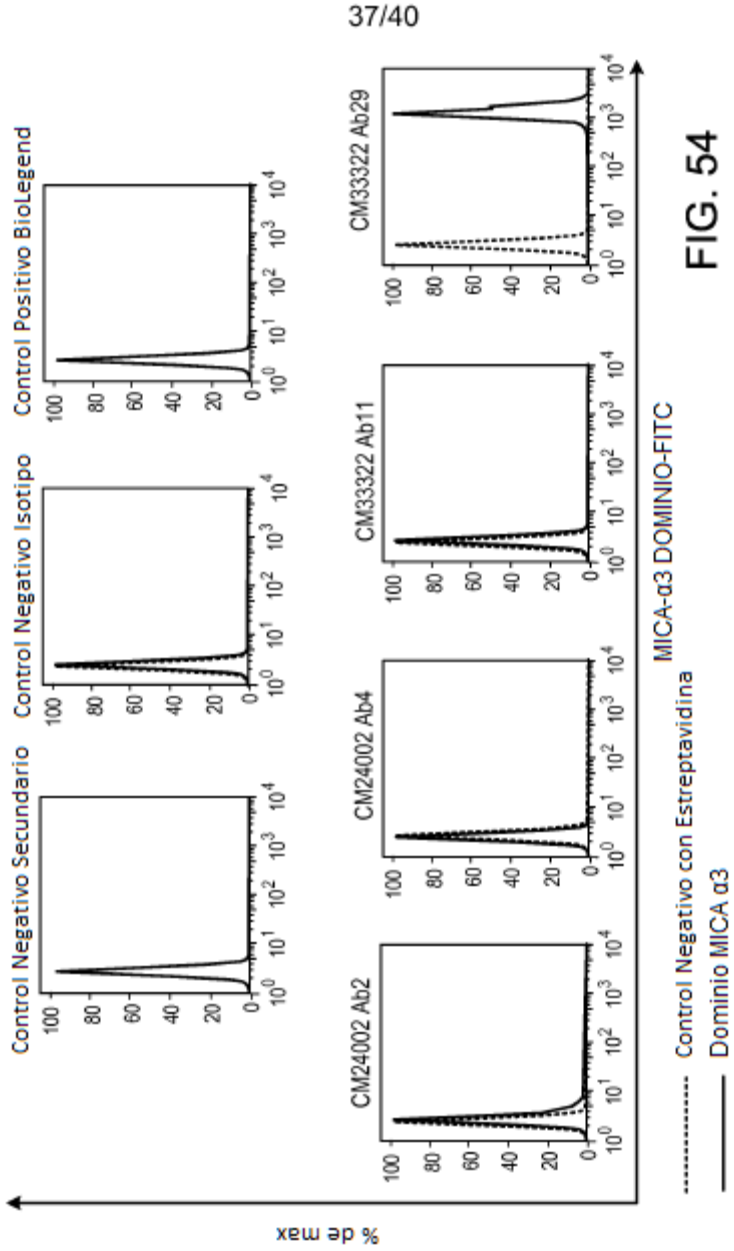

Control Negativo Secundario
Control Negativo Isotipo
Control Positivo BioLegend
CM24002 Ab2
CM24002 Ab4
CM33322 Ab11
CM33322 Ab29
% de max
MICA-α3 DOMINIO-FITC
Control Negativo con Estreptavidina
Dominio MICA α3

FIG. 54

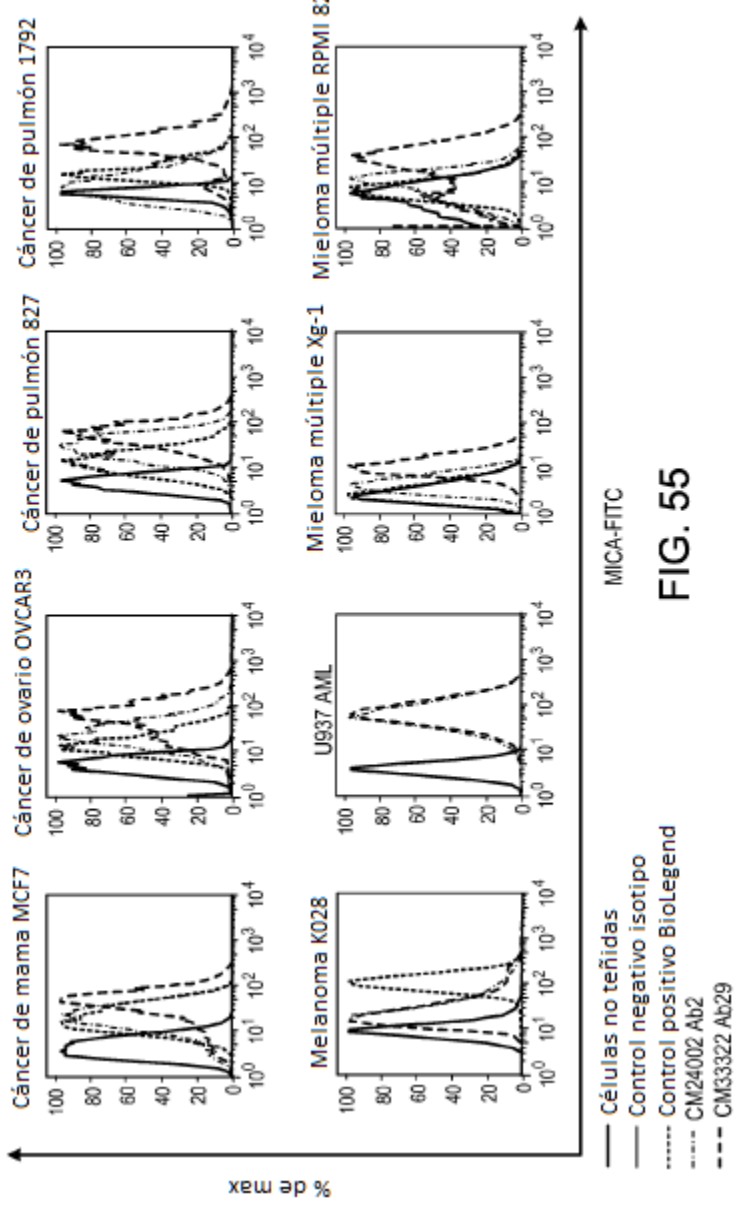

Cáncer de mama MCF7
Cáncer de ovario OVCAR3
Cáncer de pulmón 827
Cáncer de pulmón 1792
Melanoma K028
U937 AML
Mieloma múltiple Xg-1
Mieloma múltiple RPMI 8226
% de max
MICA-FITC
Células no teñidas
Control negativo isotipo
Control positivo BioLegend
CM24002 Ab2
CM33322 Ab29

FIG. 55

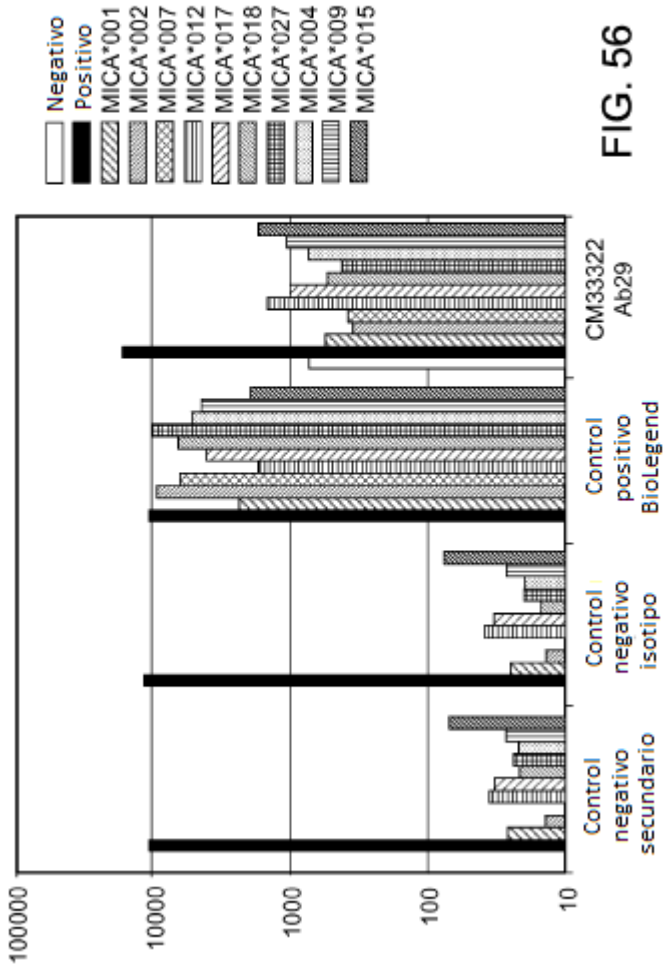

Negativo
Positivo
MICA*001
MICA*002
MICA*007
MICA*012
MICA*017
MICA*018
MICA*027
MICA*004
MICA*009
MICA*015
100000
10000
1000
100
10
Control negativo secundario
Control negativo isotipo
Control positivo BioLegend
CM33322 Ab29

FIG. 56

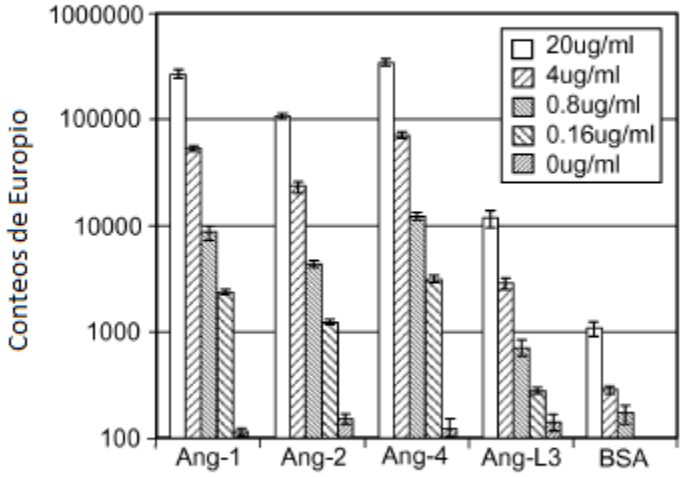

1000000
100000
10000
1000
100
Conteos de Europio
20ug/ml
4ug/ml
0.8ug/ml
0.16ug/ml
0ug/ml
Ang-1
Ang-2
Ang-4
Ang-L3
BSA

FIG. 57

SEQUENCE LISTING

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

<120> THERAPEUTIC PEPTIDES

<130> 00530-0293001

<150> PCT/US2012/057839
<151> 2012-09-28

<150> 61/541,921
<151> 2011-09-30

<160> 238

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 384
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 1
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctggccctc 60

acctgcgctg tctctggtgg gtccttcact gatcattact ggagttggat ccgtcaggcc 120

ccagggaagg ggctggagtg gattggagaa atcaatcata gtggagtcac caactacaac 180

ccgtccctca agagtcgact caccatatca gtagacacgt ccaagagcca gttctccctg 240

aggctgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctctgtact actgtgcgaa aactggcctg 300

tattatgatg acgtttgggg gacttttcgt ccacggggcg ggttcgactc ctggggccag 360

ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 2
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 2
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Phe Thr Asp His
20 25 30

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

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

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

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

Lys Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Asp Val Trp Gly Thr Phe Arg Pro Arg
100 105 110

Gly Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 3
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Thr Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 4
Gly Gly Ser Phe Thr Asp His Tyr
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 5
Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Glu

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 6
Ile Asn His Ser Gly Val Thr
1 5

<210> 7
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 7
Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
35

<210> 8
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 8
Ala Lys Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Asp Val Trp Gly Thr Phe Arg Pro
1 5 10 15

Arg Gly Gly Phe Asp Ser
20

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 9
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 10
gacatcgtga tgacccagtc tccggactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca agtccagcca gagtatttta tagctccg acaataagaa ttacttagct 120

tggtaccagc acaagccagg acagcctcct aagctcctct tttactgggc atctatccgg 180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc ggcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtcct 300

ccttgcagtt ttggccaggg gaccaagctg gagatccaa 339

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 11
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asp Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Phe Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Pro Pro Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Gln

<210> 12
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser
20 25

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 13
Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser Asp Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 14
Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Phe
1 5 10 15

Tyr

<210> 15
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 15
Trp Ala Ser
1

<210> 16
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 16
Ile Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17
Gln Gln Tyr Tyr Ser Pro Pro Cys Ser
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
1 5 10

<210> 19
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 19
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt atttattgga gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca tatccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agccgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggcgat 300

tactatggtt cgggggctca ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Tyr Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 22
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 23
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 24
Ile Tyr Trp Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 25
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 25
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile
1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 26
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 27
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 28
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 28
gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagcca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt atcagatttc taaccggttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aagctgagga tgtcggggtt tactactgca tgcaaggtac acaatttcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 29
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gln Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 30
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 30
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 31
Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 32
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 33
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 33
Gln Ile Ser
1

<210> 34
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 34
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 35
Met Gln Gly Thr Gln Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 36
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 37
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 37
gaggtgcagc tggtggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggggatc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctcagggtt cacctttagt aataactgga tgcactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg gatctcagag attagaagtg atgggaattt cacaaggtac 180

gcggactcca tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagag cacactgtat 240

ttgcaaatga acagtctgag agtcgaggac acgggtctgt attactgtgc aagagactac 300

ccctatagca ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 38
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 38
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Glu Ile Arg Ser Asp Gly Asn Phe Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Met
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Pro Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 40
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn Trp
1 5

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 41
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Glu

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 42
Ile Arg Ser Asp Gly Asn Phe Thr
1 5

<210> 43
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 43
Arg Tyr Ala Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp

20 25 30

Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys
35

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 44
Ala Arg Asp Tyr Pro Tyr Ser Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 45
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 46
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 46
gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca catctagtca aagcctcgta cacagtaatg gaaacaccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcccccaaga ctcctaattt atgagatttc taagcgggtc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aagctgagga tgtcggggtt tattactgca tgcaaggtaa acaacttcgg 300

actttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333

<210> 47
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 47
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Lys Arg Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Lys Gln Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 48
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser
20 25

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 49
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 50
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 51
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 51
Glu Ile Ser
1

<210> 52
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 52
Lys Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 53
Met Gln Gly Lys Gln Leu Arg Thr
1 5

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 54
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 55
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 55
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggctc cgtgagactg 60

tcttgtgcgg cctcaggctt cattcttagc aactttgcca tgagttgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggactg ggtctcaggt aattttggtg gtcgtgaaaa tacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca gttccaagag cacactgtat 240

ctgcaaatga acaatttgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgaggcgat 300

taccatggtt cgggggctca ctttgactac tggggccagg gaatactggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 56
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 56
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Leu Ser Asn Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ser Gly Asn Phe Gly Gly Arg Glu Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr His Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 57
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 58
Gly Phe Ile Leu Ser Asn Phe Ala
1 5

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 59
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 60
Asn Phe Gly Gly Arg Glu Asn Thr
1 5

<210> 61
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 61
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser
1 5 10 15

Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 62
Ala Arg Gly Asp Tyr His Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 63

<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 63
Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 64
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 64
gatattgtga tgacccagag tccactctcc tcacctgtca tccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctccta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120

cttcaccaga ggccaggcca gcctcctaga ctcctaattt atcagatttc taaccggttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt gggacaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aagctgagga tgccgggatt tattactgca tgcaaggtac agaatttcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 65
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 65
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val Ile Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gln Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr Glu Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 66
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 66
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val Ile Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 67
Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 68
Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 69
<211> 3

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 69
Gln Ile Ser
1

<210> 70
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 70
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Gly
20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys
35

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 71
Met Gln Gly Thr Glu Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 72
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 73

<211> 384
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 73
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttgatacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcaa cctctggatt cacctttaga acttcttcca tgagttgggt ccgtcgggct 120

ccagggaagg ggctggaatg ggtctcagct attggtgctg aaagtcatga cacgcactac 180

acagactccg cggagggccg gttcaccatc tccaaagact attcaaagaa cacagtatat 240

ctgcagatga acggcctgag agtcgacgac acggccatat attattgtgc ccatcactat 300

tactatggct cgcggcagaa acccaaagat tggggagatg cttttgatat gtggggccag 360

gggacaatgg tctccgtctc ttca 384

<210> 74
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Ser
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Ala Glu Ser His Asp Thr His Tyr Thr Asp Ser Ala
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Tyr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala His His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gln Lys Pro Lys Asp Trp Gly
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Ser Val Ser Ser

115 120 125

<210> 75
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser
20 25

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 76
Gly Phe Thr Phe Arg Thr Ser Ser
1 5

<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 77
Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Ala

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 78

Ile Gly Ala Glu Ser His Asp Thr
1 5

<210> 79
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 79
His Tyr Thr Asp Ser Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Tyr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Val Asp Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
35

<210> 80
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 80
Ala His His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gln Lys Pro Lys Asp Trp Gly
1 5 10 15

Asp Ala Phe Asp Met
20

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 81
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Ser Val Ser Ser
1 5 10

<210> 82
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 82
gacatccaga tgacccagtc tccatcttct gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca ggatattagc acctggttaa cctggtatca gcagagagca 120

gggaaggccc ctaacctcct gatctatggt gcatccactt tggaagatgg ggtcccatcc 180

aggttcagcg gcagtggatc cgggacagat ttcactctca ctatcgacag cctgcagcct 240

gacgattttg caacttacta ttgtcaacag tctcacagtt tcccctacac ttttggccag 300

gggacccagc tggggatctc a 321

<210> 83
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 83
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Gly Ile Ser
100 105

<210> 84
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 84
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 85
Gln Asp Ile Ser Thr Trp
1 5

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 86
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 87
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 87
Gly Ala Ser
1

<210> 88
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 88
Thr Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 89
Gln Gln Ser His Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 90
Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 91
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 91
taatacgact cactataggt tcggggaagt agtccttgac cagg 44

<210> 92
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 92
taatacgact cactataggg atagaagtta ttcagcaggc acac 44

<210> 93
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 93
taatacgact cactataggc gtcaggctca grtagctgct ggccgc 46

<210> 94
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 94
aatacgactc actataggtt cggggaagta gtccttgacc agg 43

<210> 95
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 95
taatacgact cactataggg atagaagtta ttcagcaggc acac 44

<210> 96
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 96
taatacgact cactataggc gtcaggctca grtagctgct ggccgc 46

<210> 97
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 97
tcaccatgga ctgsacctgg a 21

<210> 98
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 98
ccatggacac actttgytcc ac 22

<210> 99
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 99
tcaccatgga gtttgggctg agc 23

<210> 100
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 100
agaacatgaa acayctgtgg ttctt 25

<210> 101
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 101
atggggtcaa ccgccatcct 20

<210> 102
<211> 23

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 102
acaatgtctg tctccttcct cat 23

<210> 103
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 103
gctcagctcc tggggctcct g 21

<210> 104
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 104
ctggggctgc taatgctctg g 21

<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 105
ttcctcctgc tactctggct c 21

<210> 106
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 106
cagacccagg tcttcatttc t 21

<210> 107
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 107
cctctcctcc tcaccctcct 20

<210> 108
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 108
ctcctcactc agggcaca 18

<210> 109
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 109
atggcctgga ycsctctcc 19

<210> 110
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 110
gccaggggga agacsgatg 19

<210> 111
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 111
tttcaactgc tcatcagatg gcgg 24

<210> 112
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 112
agctcctcag aggagggygg 20

<210> 113
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 113
caggtscagc tggtrcagtc 20

<210> 114
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 114
cagrtcacct tgaaggagtc 20

<210> 115
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 115
saggtgcagc tggtggagtc 20

<210> 116
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 116
caggtgcagc tgcaggagtc 20

<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 117
gargtgcagc tggtgcagtc 20

<210> 118
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 118
caggtacagc tgcagcagtc 20

<210> 119
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 119
cgmcatccrg wtgacccagt 20

<210> 120
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 120
cgatrttgtg atgacycag 19

<210> 121
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 121
cgaaatwgtg wtgacrcagt ct 22

<210> 122
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 122
cgacatcgtg atgacccagt 20

<210> 123
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 123
ccagtctgtg ctgactcagc 20

<210> 124
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 124
ccagtctgcc ctgactcagc 20

<210> 125
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 125
ctcctatgag ctgacwcagc 20

<210> 126
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 126
gacsgatggg cccttggtgg a 21

<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 127
aagatgaaga cagatggtgc 20

<210> 128
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 128
gggaacagag tgaccg 16

<210> 129
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 129
tcactatgga ctggatttgg a 21

<210> 130
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 130
ccatggacay actttgytcc ac 22

<210> 131
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 131
gtaggagaca tgcaaatagg gcc 23

<210> 132
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 132
aacaaagcta tgacatatag atc 23

<210> 133
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 133
atggagttgg ggctgagctg ggtt 24

<210> 134
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 134
agttgttaaa tgtttatcgc aga 23

<210> 135
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 135
aggtaattca tggagaaata gaa 23

<210> 136

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 136
agaacatgaa gcayctgtgg ttctt 25

<210> 137
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 137
atggactgga cctggagcat c 21

<210> 138
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 138
cctctgctga tgaaaaccag ccc 23

<210> 139
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 139
caggtycagc tkgtgcagtc 20

<210> 140
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 140
caratgcagc tggtgcagtc 20

<210> 141
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 141
cagrtcacct tgarggagtc tggt 24

<210> 142
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 142
gargtgcagc tgktggagtc 20

<210> 143
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 143
gaggtacaac tggtggagtc 20

<210> 144
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 144
gaggatcagc tggtggagtc 20

<210> 145
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 145

caggtgcagc tacagcagtg 20

<210> 146
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 146
cagctgcagc tgcaggagtc 20

<210> 147
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 147
caggtgcagc tggtgcaatc 20

<210> 148
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 148
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtggagc cttcggggac cctgtccctc 60

acctgcactg tgtctggtgg ctccatcagc aggagtaact ggtggagttg ggtccgccag 120

cccccagggg aggggctgga atggattgga gaaatccatc acattgggag gtccagctac 180

aatccgtccc tcaagagtcg agtcaccatg tctgtagaca agtcccagaa ccagttctcc 240

ctgaggctga cctctgtgac cgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gaaaaatggc 300

tactacgcta tggacgtctg gggccaaggg accacggtca ccgtctcctc g 351

<210> 149
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 149
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Glu Pro Ser Gly

1 5 10 15

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

Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Glu Ile His His Ile Gly Arg Ser Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Lys Asn Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 150
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 150
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcgacttcc tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctac gctacatcct tcagggccac tggcatctca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttctctc tcaccatcaa cagactggaa 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cactatcgta gttcacctcc gtggtacact 300

tttgcccagg ggaccaagct ggacatgaga cgtacggtgg ctgcaccatc tgtc 354

<210> 151
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 151
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Thr Ser Phe Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Arg Ser Ser Pro
85 90 95

Pro Trp Tyr Thr Phe Ala Gln Gly Thr Lys Leu Asp Met Arg Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val
115

<210> 152
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 152
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Glu Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 153
Gly Gly Ser Ile Ser Arg Ser Asn Trp
1 5

<210> 154
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 154
Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Glu

<210> 155
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 155
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 156
Ile His His Ile Gly Arg Ser
1 5

<210> 157
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 157
Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Lys
1 5 10 15

Ser Gln Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr
35

<210> 158
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 158
Cys Ala Lys Asn Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp
1 5 10

<210> 159
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 159
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 160
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 160
Gln Ser Val Ser Ser Asp Phe
1 5

<210> 161
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 161

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 162
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 162
Ala Thr Ser
1

<210> 163
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 163
Phe Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr
35

<210> 164
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 164
Cys Gln His Tyr Arg Ser Ser Pro Pro Trp Tyr Thr Phe
1 5 10

<210> 165
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 165
Ala Gln Gly Thr Lys Leu Asp Met Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val

<210> 166
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 166
Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Lys
1 5 10 15

Ser Lys Asn His Phe Ser Leu Thr Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr
35

<210> 167
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 167
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggggac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctctggtgc ctccattacc aatggtgcct ggtggagttg ggtccgccag 120

cccccaggga aggggctgga gtggattgga gaaatctatc ttaatgggaa caccaactcc 180

aacccgtccc tgaagagtcg agtcatcata tcagtggaca agtccaagaa ccacttctcg 240

ctgaccctga actctgtgac cgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gaagaacgct 300

gcctacaacc ttgagttctg gggccaggga gccctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 168
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 168
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

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

Ala Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

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

Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn His Phe Ser
65 70 75 80

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

Ala Lys Asn Ala Ala Tyr Asn Leu Glu Phe Trp Gly Gln Gly Ala Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 169
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 169
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gactgttagc agcccctacg tagcctggta ccagcagaaa 120

cgtggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca ccagggccac cggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata gatcatacta ttacactttt 300

ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 327

<210> 170
<211> 109
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 170
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Ser Ser Pro
20 25 30

Tyr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Arg Ser Tyr
85 90 95

Tyr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 171
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 171
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 172

Gly Ala Ser Ile Thr Asn Gly Ala Trp
1 5

<210> 173
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 173
Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Glu

<210> 174
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 174
Ile Tyr Leu Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 175
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 175
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
1 5 10

<210> 176
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 176
Cys Ala Lys Asn Ala Ala Tyr Asn Leu Glu Phe Trp
1 5 10

<210> 177
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 177
Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 178
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 178
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 179
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 179
Gln Thr Val Ser Ser Pro Tyr
1 5

<210> 180
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 180
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 181
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 181
Gly Ala Ser
1

<210> 182
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 182
Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr
35

<210> 183
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 183
Cys Gln Gln Tyr Asp Arg Ser Tyr Tyr Tyr Thr Phe
1 5 10

<210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 184

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5

<210> 185
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 185
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagaa cctgtcgctc 60

acctgcactg tctctgatgc ctccatgagt gattatcact ggagctggat ccggcaggcc 120

gccgggaagg gactggagtg gattgggcgt atgtacagca ctgggagtcc ctactacaaa 180

ccctccctca aaggtcgggt caccatgtca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagctggcct ctgtgaccgc cgcagacacg gccatctatt attgtgcgag cggacaacat 300

attggtggct gggtcccccc tgacttctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 186
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 186
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Asn Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Ala Ser Met Ser Asp Tyr
20 25 30

His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Met Tyr Ser Thr Gly Ser Pro Tyr Tyr Lys Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Ser Gly Gln His Ile Gly Gly Trp Val Pro Pro Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 187
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 187
gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtga aggcctcgta tatagtgatg gagacaccta cttgagttgg 120

tttcaccaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctgattt ataaaatttc taaccggttc 180

tctggggtcc ccgacagatt cagtggcagt ggggcaggca cagatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgtcggggtt tattactgca tgcaagctac acattttccg 300

tggacgttcg gccaggggac caaagtggaa gtcaaacgt 339

<210> 188
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 188
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Glu Gly Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asp Thr Tyr Leu Ser Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
100 105 110

Arg

<210> 189
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 189
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Asn Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 190
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 190
Asp Ala Ser Met Ser Asp Tyr His
1 5

<210> 191
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 191
Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 192
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 192
Met Tyr Ser Thr Gly Ser Pro
1 5

<210> 193
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 193
Tyr Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Gly Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ala Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Tyr Tyr
35

<210> 194
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 194
Cys Ala Ser Gly Gln His Ile Gly Gly Trp Val Pro Pro Asp Phe Trp
1 5 10 15

<210> 195
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 195
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 196
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 196
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 197
Glu Gly Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asp Thr Tyr
1 5 10

<210> 198
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 198
Leu Ser Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 199
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 199
Lys Ile Ser
1

<210> 200
<211> 35
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 200
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr
35

<210> 201
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 201
Cys Met Gln Ala Thr His Phe Pro Trp Thr Phe
1 5 10

<210> 202
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 202
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg
1 5 10

<210> 203
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 203
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tcatatggct tgacctggat acgccaggct 120

ccggggaagg gcctggagtg ggtctcaagt atcagtggca gtggcaataa cacatactac 180

gcagactctg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca aagtcaagaa gacactatat 240

ctacaaatgg acagcctgac agtcggagac acggccgtct attactgctt aggagtcggt 300

cagggccacg gaattccggt catcgtctcc tca 333

<210> 204
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 204
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Leu Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Val Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Thr Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Leu Gly Val Gly Gln Gly His Gly Ile Pro Val Ile Val Ser Ser
100 105 110

<210> 205
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 205
gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctcgta caccgtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120

tttctgcaga ggccaggcca ggctccaaga ctcctaattt atcggatttc taaccggttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cggatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aagctgagga tgtcggcgtt tactactgca tgcaagctac acaaatcccc 300

aacacttttg gccaggggac caagctggag atcaag 336

<210> 206
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 206
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Thr Gln Ile Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 207
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 207
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 208
<211> 8

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 208
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 209
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 209
Leu Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Ser

<210> 210
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 210
Ile Ser Gly Ser Gly Asn Asn Thr
1 5

<210> 211
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 211
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys
1 5 10 15

Val Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Thr Val Gly Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr

35

<210> 212
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 212
Cys Leu Gly Val Gly Gln
1 5

<210> 213
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 213
Gly His Gly Ile Pro Val Ile Val Ser Ser
1 5 10

<210> 214
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 214
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 215
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 215
Gln Ser Leu Val His Arg Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 216
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 216
Leu Ser Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 217
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 217
Arg Ile Ser
1

<210> 218
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 218
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr
35

<210> 219
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 219
Cys Met Gln Ala Thr Gln Ile Pro Asn Thr Phe
1 5 10

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 220
Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5

<210> 221
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 221
gaggtgcagc tggtggagtc tggaggaggc ttaatccagc cgggggggtc cctaagactc 60

tcctgtgcag cctcgggctt cctcatcagt agttatttca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggccggagtg ggtctcagtt atttatagcg atggtagtac atattacgta 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc acagacaatt ccaagaacac actatatctt 240

cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gcccgatatt actgtgcgac acggcatttg 300

aattatgacg gtgaccactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc agcctccacc 360

aag 363

<210> 222
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 222
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Leu Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Thr Arg His Leu Asn Tyr Asp Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120

<210> 223
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 223
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgacg gaaacaccta cttgaattgg 120

tttcaccaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taagcgggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggta gtgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggaatt tattactgca tgcaaggtac acattggccg 300

acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaacgaactg tggctgca 348

<210> 224
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 224
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala
115

<210> 225
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 225
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 226
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 226
Gly Phe Leu Ile Ser Ser Tyr Phe
1 5

<210> 227
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 227
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Val

<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 228
Ile Tyr Ser Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 229
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 229
Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn
1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Arg Tyr Tyr
35

<210> 230
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 230
Cys Ala Thr Arg His Leu Asn Tyr Asp Gly Asp His Trp
1 5 10

<210> 231

<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 231
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 232
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 232
Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 233
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 233
Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 234
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 234
Lys Val Ser
1

<210> 235
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 235
Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Ile Tyr Tyr
35

<210> 236
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 236
Cys Met Gln Gly Thr His Trp Pro Thr Phe
1 5 10

<210> 237
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 237
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
1 5 10

<210> 238
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 238
Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 005300293WO1	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 12/57839	International filing date *(day/month/year)* 28 September 2012 (28.09.2012)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 30 September 2011 (30.09.2011)
Applicant DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 56

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/57839

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/57839

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 5-10 and 15-32
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-4, directed to a composition comprising a peptide that immunospecifically binds to MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA), wherein the peptide comprises complementarity determining region (CDR) 3 of the V.sub.H of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and CDR3 of the V.sub.L of antibody ID 1, 6, 7, 8 or 9 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions; wherein the first invention is limited to a peptide having a CDR3 comprising of V.sub.H and V.sub.L of antibody 1 (applicants may opt for additional antibodies to be searched by specifying the antibody and paying an additional invention search fee for each elected antibody).

- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-4, directed to antibodies having IDs: 1, 6 and 9 in Table 1

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/57839

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

Compositions comprising peptides immunospecifically binds to defined binding partners, wherein the peptides comprise at least complementarity determining regions relating to the complementarity regions that bind to human MICA or angiopoietin-2, are disclosed.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/57839

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 16/00; A61K 39/395 (2013.01)
USPC - 530/388.73, 424/153.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8): C07K 16/00; A61K 39/395 (2013.01)
USPC: 530/388.73, 424/153.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 424/141.1, 152.1
(keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase; Google; PubMed
Search terms: mica, mhc class i polypeptide-related sequence a, antibody, anti, monoclonal, SEQ ID NOs:8, 17, 212, 219, 158, 164

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0189711 A1 (DRANOFF et al.) 29 July 2010 (29.07.2010) para [0041], [0069], [0071], [0073]	1-4
A	US 2003/0099647 A1 (DESHPANDE et al.) 29 May 2003 (29.05.2003) SEQ ID NO:82	1-4
A	US 2006/0246071 A1 (GREEN et al.) 2 November 2006 (02.11.2006) SEQ ID NO:139	1-4
A	US 2008/0148432 A1 (ABAD) 19 June 2008 (19.06.2008) SEQ ID NO:31532	1-4
A	US 2005/0053608 A1 (WEBER et al.) 10 March 2005 (10.03.2005) SEQ ID NO:144	1-4
A	US 2009/0252729 A1 (FARRINGTON et al.) 8 October 2009 (08.10.2009) SEQ ID NO:51	1-4
A	US 2006/0024297 A1 (WOOD et al.) 2 February 2006 (02.02.2006) SEQ ID NO:608	1-4
A	US 2005/0233391 A1 (SPIES et al.) 20 October 2005 (20.10.2005)	1-4
A	US 2010/0111973 A1 (DRANOFF et al.) 6 May 2010 (06.05.2010)	1-4
A	US 2009/0226447 A1 (BOONE et al.) 10 September 2009 (10.09.2009)	1-4
A	GROH et al., Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 3 May 2005 (03.05.2005), Vol. 102, No. 18, pages 6461-6466. Entire document	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
3 March 2013 (03.03.2013)

Date of mailing of the international search report
13 MAR 2013

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:
Lee W. Young
PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/57839

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WONGSENA et al., Production and characterization of monoclonal antibodies against major histocompatibility complex class I chain-related gene A. Tissue Antigens, November 2008 (11.2008), Vol. 72, No. 5, pages 431-440. Entire document	1-4
A	ZWIRNER et al., Immunobiology of the human MHC class I chain-related gene A (MICA): from transplantation immunology to tumor immune escape. Immunologia, January-March 2006 (01-03.2006), Vol. 25, No. 1, pages 25-38. Entire document	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/57839

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Groups II+: claims 11-14, directed to a composition comprising a peptide that immunospecifically binds to angiopoietin, wherein the peptide comprises complementarity determining region (CDR) 3 of the V.sub.H of antibody ID 2, 3, 4, 5 or 10 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions, and CDR3 of the V.sub.L of antibody ID 2, 3, 4 or 5 shown in Table 1 having 5 or fewer conservative amino acid substitutions; wherein the first invention is limited to a peptide having a CDR3 comprising of V.sub.H and V.sub.L of antibody 2 (applicants may opt for additional antibodies to be searched by specifying the antibody and paying an additional invention search fee for each elected antibody).

Group III: claims 33-47, directed to a method of obtaining immune cells directed against a self antigen from a subject, the method comprising:
i) identifying a subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen;
ii) providing a multimeric form of the self antigen;
iii) contacting the multimeric form of the self antigen with a sample from the subject exhibiting a positive immune response towards the self antigen; and
iv) obtaining immune cells bound to the multimeric form of the self antigen.

The inventions listed as Groups I+, II+ and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the claims of Groups I+ is a composition comprising a peptide that immunospecifically binds to MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA), wherein the peptide comprises a V.sub.H CDR3 and a V.sub.L CDR3 - not required by the claims of Groups II+ or III. The special technical feature of the claims of Groups II+ claims is a composition comprising a peptide that immunospecifically binds to angiopoietin, wherein the peptide comprises a V.sub.H CDR3 and a V.sub.L CDR3 - not required by the claims of Groups I+ or III. Neither of these special technical features is common to any other group, nor do they correspond to a special technical feature in any other group.

Groups I+ and II+ share the common technical element of being related to compositions comprising binding proteins comprising V.sub.H and V.sub.L CDR3 regions. The claims of Groups I+ share the common technical element of being related to compositions comprising V.sub.H, and V.sub.L CDR3 domains of binding peptides that are specific for MICA. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2010/0189711 A1 to Dranoff et al., which teaches anti-MICA antibodies (para [0073]), wherein the antibodies comprise heavy and light chains (para [0069]), as well as CDR regions (para [0071]), and compositions comprising said antibodies (para [0041]). Although Dranoff does not specifically recite wherein the antibodies comprise CDR3 domains, one of each in a light and heavy chain variable region, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art to have understood Dranoff as disclosing antibodies comprising the known standard structure of light and heavy chains, wherein each chain comprises a variable region having three complementarity determining regions.

The claims of Groups II+ share the common technical element of being related to compositions comprising V.sub.H, and V.sub.L CDR3 domains of binding peptides that are specific for angiopoietin. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2009/0226447 A1 to Boone et al., which teaches ant-angiopoietin antibodies comprising light and heavy chains, as well as CDRs thereof (abstract), as well as compositions comprising said antibodies (para [0024]).

Therefore, the inventions of Groups I+, II+ and III lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.