(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112566940 B
(45)授权公告日 2025.06.13

(21)申请号 201980052601.8
(22)申请日 2019.07.05
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112566940 A
(43)申请公布日 2021.03.26
(30)优先权数据
62/694,339 2018.07.05 US
62/782,122 2018.12.19 US
62/797,772 2019.01.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.02.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/040687 2019.07.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/010308 EN 2020.01.09

(73)专利权人 瑟罗泽恩奥普瑞汀公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 李阳
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
(56)对比文件
US 2017306029 A1,2017.10.26
WO 2015063187 A1,2015.05.07
审查员 王芳

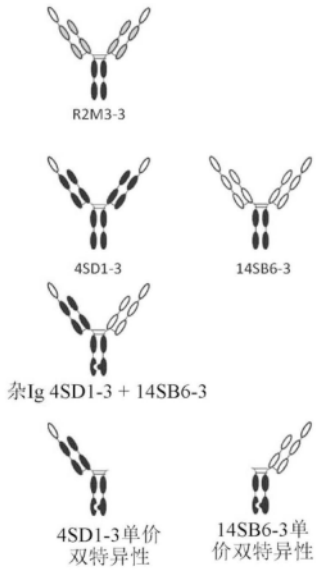
权利要求书2页 说明书124页
序列表（电子公布） 附图60页

(54)发明名称

多特异性WNT替代分子和其用途

(57)摘要

本公开提供了Wnt通路激动剂和相关组合物,所述Wnt通路激动剂和相关组合物可以在用于治疗疾病的各种治疗方法中的任一种治疗方法中使用。



CN 112566940 B

1.一种多特异性Wnt替代分子,其中所述Wnt替代分子包括:

各自与一个或多个卷曲蛋白Fzd受体表位的集合特异性结合的两个Fzd结合区,其中所述两个Fzd结合区与一个或多个Fzd受体表位的不同集合结合,

其中所述Wnt替代分子包含形成第一Fzd结合区的第一轻链和第一重链,以及形成第二Fzd结合区的第二轻链和第二重链,以及

各自与低密度脂蛋白LDL受体相关蛋白LRP5和/或LRP6特异性结合的两个LRP5/6结合区,

其中所述Wnt替代分子包含与第一轻链的N端或第一重链的N端相融合的第一LRP5/6结合区,以及与第二轻链的N端或第二重链的N端相融合的第二LRP5/6结合区,

其中:第一重链和第一轻链对和/或第二重链和第二轻链对选自:SEQ ID NO: 110和109, 112和111, 114和113, 116和115, 118和117, 120和119, 122和121, 130和129, 137和148, 150和149, 151和149, 154和153,156和155,130和152,以及130和157。

2.根据权利要求1所述的Wnt替代分子,其中所述两个Fzd结合区结合一种或多种FzD受体的不同集合,一种或多种FzD受体的同一集合内的一个或多个表位的不同集合,或其组合。

3.根据权利要求2所述的Wnt替代分子,其中每个Fzd结合区与以下中的一种或多种结合:卷曲蛋白Fzd1、卷曲蛋白Fzd2、卷曲蛋白Fzd3、卷曲蛋白Fzd4、卷曲蛋白Fzd5、卷曲蛋白Fzd6、卷曲蛋白Fzd7、卷曲蛋白Fzd8、卷曲蛋白Fzd9和卷曲蛋白Fzd10。

4.根据权利要求3所述的Wnt替代分子,其中至少一个Fzd结合区与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;或者(xi)Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8。

5.根据权利要求4所述的Wnt替代分子,其中:

(i)所述第一Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10中的至少一种结合,并且

(ii)所述第二Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10中的至少一种结合。

6.根据权利要求5所述的Wnt替代分子,其中所述多个Fzd结合区包括:

(i)第一Fzd结合区,所述第一Fzd结合区与一种或多种Fzd受体的集合内的一个或多个表位的第一集合结合,以及

(ii)第二Fzd结合区,所述第二Fzd结合区与一个或多个Fzd受体的同一集合内的一个或多个表位的第二不同集合结合。

7.根据权利要求6所述的Wnt替代物,其中:

a)所述第一Fzd结合区与诱导非典型的Wnt信号传导的至少一种Fzd受体结合;并且

b)所述第二Fzd结合区与诱导典型的Wnt信号传导的至少一种Fzd受体结合,并且

其中所述第一Fzd受体与所述第二Fzd受体的结合引起典型的Wnt信号传导或者非典型的Wnt信号传导。

8.根据权利要求7所述的Wnt替代分子,其中所述至少一个Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9或Fzd10单特异性结合,并且其中至少一个Fzd结合

区与Fzd受体的区结合,所述区:(i)不包含所述Fzd受体的半胱氨酸富集结构域CRD;或者(ii)包含少于所述FZD受体的整个CRD;或者(iii)与所述Fzd受体的所述CRD重叠。

9.根据权利要求8所述的Wnt替代分子,其中所述至少一个Fzd结合区与SEQ ID NO:98-107中所示的Fzd受体的铰链区结合。

10.根据权利要求8所述的Wnt替代分子,其中所述至少一个Fzd结合区与所述Fzd受体的所述CRD的上游的N端区结合,并且其中所述N端区包括SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列。

11.根据权利要求9所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区与所述LRP5/6结合区的以Fzd: LRP5/6表示的比率选自由以下组成的组:在具有两个不同的LRP结合体的情况下为2:1:1、在具有两个不同的Fzd结合体的情况下为1:1:2、在具有相同的Fzd和相同的LRP结合体的情况下为2:2、以及在具有Fzd和LRP结合体全部不同的情况下为1:1:1:1。

12.根据权利要求1所述的Wnt替代分子,其中所述第一重链包括第一CH3结构域,所述第二重链包括第二CH3结构域,并且所述第一CH3结构域和所述第二CH3结构域彼此连接/相互作用。

13.根据权利要求12所述的Wnt替代分子,其中所述第一CH3结构域和所述第二CH3结构域通过杵臼突变彼此连接。

14.根据权利要求1所述的Wnt替代分子,其调节细胞中的Wnt信号传导通路。

15.根据权利要求1所述的Wnt替代分子,其调节哺乳动物细胞中的Wnt信号传导通路。

16.一种药物组合物,其包括药学上可接受的赋形剂或载剂以及根据权利要求1至15中任一项所述的Wnt替代分子。

多特异性WNT替代分子和其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年7月5日提交的美国临时申请第62/694,339号、于2018年12月19日提交的美国临时申请第62/782,122号和于2019年1月28日提交的美国临时申请第62/797,772号的优先权,所述美国临时申请中的每个美国临时申请通过全文引用的方式并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本形式提供以代替纸质副本,并且特此通过引用并入本说明书中。含有序列表的文本文件的名称为SRZN_008_03WO_ST25.txt。文本文件为878KB,创建于2019年7月5日并且通过EFS-Web以电子方式提交。

技术领域

[0005] 本公开总体上涉及Wnt信号传导通路激动剂分子、组合物以及所述Wnt信号传导通路激动剂分子、组合物的使用方法。此类分子可用于例如调节Wnt信号传导通路。

背景技术

[0006] Wnt(“无翅相关整合位点”或“无翅和Int-1”或“无翅-Int”)配体和其信号在控制许多基本器官和组织(包含骨、肝、皮肤、胃、肠、肾、中枢神经系统、乳腺、味蕾、卵巢、耳蜗和许多其它组织)的发育、内稳态和再生中发挥了关键作用(例如,由Clevers、Loh和Nusse综述,2014;346:1248012)。对Wnt信号传导通路的调节具有治疗变性疾病和组织损伤的潜力。

[0007] 将调节Wnt信号传导作为治疗的挑战之一是存在多种Wnt配体和Wnt受体、卷曲蛋白1-10(Fzd1-10),其中许多组织表达多种Fzd和重叠的Fzd。典型的Wnt信号还涉及作为共受体的低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)或低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白6(LRP6),除了Fzd之外,所述共受体也在各种组织中广泛表达。Fzd与LRP结合部分的比率先前没有被探索过,以调节信号传导水平并且赋予组织和/或功能特异性。

[0008] Wnt信号传导通路细分为典型(β-连环蛋白依赖性的)和非典型(β-连环蛋白非依赖性的)通路。非典型通路可以进一步分为两个不同的分支—平面细胞极性(PCP)通路和Wnt/Ca^{2+}通路。某些Wnt配体与某些Fzd受体或Fzd受体的组合的结合可以触发不同的通路和/或赋予组织和功能特异性。

[0009] 因此,在本领域中显然需要与一种或多种Fzd、LRP5或LRP6特异性结合以调节不同的Wnt信号传导通路的结合部分。还需要产生具有一定比率的共受体(例如,Fzd和LRP受体)的结合部分,以调节信号传导水平并且赋予组织和/或功能特异性。本公开解决了这些需求。

发明内容

[0010] 在各个实施例中,本公开提供了Wnt替代分子和其相关用途。

[0011] 在一个方面,本公开提供了一种多特异性Wnt替代分子,其中所述Wnt替代分子包

括:(i)各自与一个或多个Fzd受体表位的集合特异性结合的多个区(Fzd结合区),其中至少两个Fzd结合区与一个或多个Fzd受体表位的相同或不同集合结合;以及(ii)与低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)和/或LDL受体相关蛋白6(LRP6)特异性结合的一个或多个区(LRP5/6结合区)。

[0012] 在一些实施例中,至少两个Fzd结合区与一种或多种Fzd受体的不同集合、一种或多种Fzd受体的同一集合内的一个或多个表位的不同集合或其组合结合。

[0013] 在一些实施例中,每个Fzd结合区与以下中的一种或多种结合:卷曲蛋白1(Fzd1)、卷曲蛋白2(Fzd2)、卷曲蛋白3(Fzd3)、卷曲蛋白4(Fzd4)、卷曲蛋白5(Fzd5)、卷曲蛋白6(Fzd6)、卷曲蛋白7(Fzd7)、卷曲蛋白8(Fzd8)、卷曲蛋白9(Fzd9)和卷曲蛋白10(Fzd10)。

[0014] 在一些实施例中,至少一个Fzd结合区与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;或者(xi)Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8。

[0015] 在一些实施例中,所述多个Fzd结合区包括:(i)第一Fzd结合区,所述第一Fzd结合区与一种或多种Fzd受体的第一集合结合;以及(ii)第二Fzd结合区,所述第二Fzd结合区与一种或多种Fzd受体的第二不同集合结合。在一些实施例中,所述第一Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10中的一种或多种结合,并且所述第二Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10中的一种或多种结合。在一些实施例中,所述第一Fzd结合区与Fzd4结合,并且所述第二Fzd结合区与Fzd9结合。

[0016] 在一些实施例中,所述多个Fzd结合区包括:(i)第一Fzd结合区,所述第一Fzd结合区与一种或多种Fzd受体的集合内的一个或多个表位的第一集合结合;以及(ii)第二Fzd结合区,所述第二Fzd结合区与一种或多种Fzd受体的同一集合内的一个或多个表位的第二不同集合结合。

[0017] 在一些实施例中,Wnt替代物与诱导非典型Wnt信号传导的至少一种Fzd受体结合;并且所述第二Fzd结合区与诱导典型Wnt信号传导的至少一种Fzd受体结合。在另外的实施例中,与第一Fzd受体和第二Fzd受体结合的所述Wnt替代物引起典型Wnt信号传导;或非典型Wnt信号传导。

[0018] 在一些实施例中,至少一个Fzd结合区与单个Fzd受体单特异性结合。在一些实施例中,所述至少一个Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9或Fzd10单特异性结合。

[0019] 在一些实施例中,至少一个Fzd结合区与Fzd受体的区结合,所述区:(i)不包含所述Fzd受体的半胱氨酸富集结构域(CRD);或者(ii)包含少于所述FZD受体的整个CRD;或者(iii)与所述FZD受体的所述CRD部分重叠。

[0020] 在一些实施例中,所述至少一个Fzd结合区与所述Fzd受体的铰链区结合。在一些实施例中,所述铰链区包括与SEQ ID NO:98-107中所示的任一个序列具有至少90%同一性、至少95%同一性或至少98%同一性的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施例中,所述至少一个Fzd结合区与所述Fzd受体的所述CRD上游的N端区结合。在一些实施例中,所述N端区包括与SEQ ID NO:108具有至少90%同一性、至少95%同

一性或至少98％同一性的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施例中,所述Fzd结合区中的至少一个Fzd结合区包括抗体的一个或多个抗原结合片段。在一些实施例中,所述一个或多个抗原结合片段选自由以下组成的组:IgG、scFv、Fab和VHH或sdAb。在一些实施例中,所述一个或多个抗原结合片段是人源化的。

[0023] 在一些实施例中,至少一个Fzd结合区包括与表1A、表1B、SEQ ID NO:1-73中所示的任一个序列具有至少90％同一性的氨基酸序列或其抗原结合片段。

[0024] 在一些实施例中,一个或多个LRP5/6结合区包括抗体的一个或多个抗原结合片段。在一些实施例中,所述一个或多个抗原结合片段选自由以下组成的组:IgG、scFv、Fab和VHH或sdAb。在一些实施例中,所述一个或多个抗原结合片段是人源化的。

[0025] 在一些实施例中,所述一个或多个LRP5/6结合区包括与表2A、表2B或SEQ ID NO:74-97中所示的任一个序列具有至少90％同一性的氨基酸序列或其抗原结合片段。

[0026] 在一些实施例中,所述Wnt替代分子包括两个或更多个LRP5/6结合区。

[0027] 在一些实施例中,所述Fzd结合区与所述LRP5/6结合区的比率以Fzd:LRP5/6表示。

[0028] 在一些实施例中,所述Fzd结合区与所述LRP5/6结合区的比率以Fzd_n:LRP5/6_n(F_n:L_n)表示,其中F和L是介于1与9之间的整数,包含端值,并且n是介于1与4之间的整数,包含端值。

[0029] 在一些实施例中,所述Fzd结合区与所述LRP5/6结合区的以Fzd:LRP5/6表示的比率选自由以下组成的组:1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、2:1、2:3、2:5、2:7、7:2、5:2、3:2、3:4、3:5、3:7、3:8、8:3、7:3、5:3、4:3、4:5、4:7、4:9、9:4、7:4、5:4、6:7、7:6、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、2:1(在具有两个Fzd结合体和一个LRP结合体的情况下)、1:2(在具有一个Fzd结合体和两个LRP结合体的情况下)、2:1:1(在具有两个不同的LRP结合体的情况下)、1:1:2(在具有两个不同的Fzd结合体的情况下)、1:1:1(在具有两个不同的Fzd结合体和一个LRP结合体或者一个Fzd结合体和两个不同的LRP结合体的情况下)以及1:1:1:1(在Fzd和LRP结合体全部不同的情况下)。

[0030] 在一些实施例中,Fzd结合区与LRP5/6结合区的比率(Fzd:LRP5/6)包括2个Fzd结合区和2个LRP5/6结合区;2个Fzd结合区和1个LRP5/6结合区;或1个Fzd结合区和2个LRP5/6结合区。

[0031] 在一些实施例中,Fzd结合区与LRP5/6结合区的比率(Fzd:LRP5/6)包括第一Fzd结合区、第二Fzd结合区和1个LRP5/6结合区;或第一Fzd结合区、第二Fzd结合区、第一LRP5/6结合区和第二LRP5/6结合区。在另外的实施例中,所述第一Fzd结合区和所述第二Fzd结合区与不同的Fzd受体结合或与不同区/表位上的同一Fzd受体结合,并且所述第一LRP5/6结合区和所述第二LRP5/6结合区与不同的表位或不同的LRP蛋白结合。

[0032] 在一些实施例中,所述LRP结合区包括第一LRP结合区和第二LRP结合区,所述第一LRP结合区与一种或多种LRP受体的第一集合结合,所述第二LRP结合区与一种或多种LRP受体的第二不同集合结合。

[0033] 在一些实施例中,所述Wnt替代分子包括选自由以下组成的组的结构形式:杂Ig、双功能抗体(DART)、串联双功能抗体(DART)、双功能抗体-Fc、串联Fab、串联Fab IgG(FIT-Ig)、Fv-IgG和串联scFv。

[0034] 在一些实施例中,所述Wnt替代分子包括:(i)形成第一Fzd结合区的第一轻链和第

一重链;以及(ii)形成第二Fzd结合区的第二轻链和第二重链,其中所述第一Fzd结合区和所述第二Fzd结合区与一个或多个Fzd受体表位的不同集合结合。

[0035] 在一些实施例中,所述Wnt替代分子包括第一LRP5/6结合区,所述第一LRP5/6结合区与所述第一轻链的N端、所述第一轻链的C端、所述第一重链的N端或所述第一重链的C端融合。在一些实施例中,所述Wnt替代分子包括第二LRP5/6结合区,所述第二LRP5/6结合区与所述第二轻链的N端、所述第二轻链的C端、所述第二重链的N端或所述第二重链的C端融合。

[0036] 在一些实施例中,所述第一重链和所述第二重链彼此连接。在一些实施例中,所述第一重链包括第一CH3结构域,所述第二重链包括第二CH3结构域,并且所述第一CH3结构域和所述第二CH3结构域彼此连接。在一些实施例中,所述第一CH3结构域和第二CH3结构域通过杵臼(knobs-into-holes)突变彼此连接。在一些实施例中,所述第一重链和/或所述第二重链包括与SEQ ID NO:110、112、114、116、118、120或122中所示(或如表5或表6A所示)的任一个序列具有至少90%同一性、至少95%同一性或至少98%同一性的氨基酸序列,并且(ii)所述第一轻链和/或所述第二轻链包括与SEQ ID NO:109、111、113、115、117、119或121中所示(或如表5或表6A所示)的任一个序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述Wnt替代分子包括与表5或表6A中公开的序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的一个或多个序列(例如,两个或三个序列)。在特定实施例中,所述Wnt替代分子包括表5或表6A中公开的针对任何Wnt替代分子阐述的序列,或与此类序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的序列。

[0037] 在另一个方面,所述Wnt替代分子具有如表6B中所示的结构。

[0038] 在一些实施例中,所述Wnt替代分子调节细胞,任选地哺乳动物细胞中的Wnt信号传导通路。在一些实施例中,所述Wnt替代分子通过所述细胞中的所述Wnt信号传导通路增强信号传导。在一些实施例中,所述Wnt信号传导通路是典型的Wnt信号传导通路。在一些实施例中,所述Wnt信号传导通路是非典型的Wnt信号传导通路。

[0039] 在另一个方面,本公开提供了一种药物组合物,其包括药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂以及根据本文实施例中的任一个实施例的Wnt替代分子。

[0040] 在另一个方面,本公开提供了一种用于激动细胞中的Wnt信号传导通路的方法,所述方法包括使所述细胞与根据本文实施例中的任一个实施例的Wnt替代分子接触,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。

[0041] 在另一个方面,本公开提供了一种用于治疗患有疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文实施例中的任一个实施例的药物组合物,其中Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。

[0042] 在一些实施例中,所述疾病或病症与Wnt信号传导减少或受损相关,和/或其中所述受试者将受益于Wnt信号传导增加。在一些实施例中,所述疾病或病症选自由以下组成的组:骨折、应力性骨折、椎体压缩性骨折、骨质疏松症、骨质疏松性骨折、未愈合性骨折、延迟愈合骨折、脊柱融合、脊柱外科手术的术前优化、骨坏死、植入物或矫形装置的骨整合、成骨不全症、骨移植、腱修复、腱-骨整合、牙齿生长和再生、颌面外科手术、牙种植、牙周病、颌面重建,颌、髋或股骨头坏死,无血管性坏死、脱发、听觉损失、前庭功能减退、黄斑变性、年龄相关性黄斑变性(AMD)、玻璃体视网膜病变、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、视网膜变性

疾病、富克斯氏营养不良(Fuchs'dystrophy)、角膜疾病、中风、创伤性脑损伤、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、多发性硬化症、肌肉萎缩症、由肌少症或恶病质引起的肌肉萎缩、影响血脑屏障(BBB)的疾病、脊髓损伤、脊髓疾病、口腔粘膜炎、短肠综合征、炎性肠病(IBD)、代谢综合征、糖尿病、血脂异常、胰腺炎、胰腺外分泌功能不全、伤口愈合、糖尿病足溃疡、褥疮、静脉性下肢溃疡、大疱表皮松解、皮肤发育不全、心肌梗塞、冠状动脉疾病、心力衰竭、造血细胞病症、免疫缺陷、移植物抗宿主病、急性肾损伤、慢性肾脏疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化、所有原因的急性肝衰竭、药品诱导的急性肝衰竭、酒精性肝病、所有原因的慢性肝衰竭、肝硬化、所有原因的肝纤维化、门脉高压、所有原因的慢性肝功能不全、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)(脂肪肝)、酒精性肝炎、丙型肝炎病毒诱导的肝病(HCV)、乙型肝炎病毒诱导的肝病(HBV)、其它病毒性肝炎(例如,甲型肝炎病毒诱导的肝病(HAV)和丁型肝炎病毒诱导的肝病(HDV))、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎、肝脏外科手术、肝损伤、肝移植、肝脏外科手术和移植中的"小肝(small for size)"综合征、先天性肝脏疾病和病症,由遗传疾病、变性、老化、药品和损伤引起的任何其它肝脏病症或缺陷。

[0043] 在一些实施例中,所述疾病或病症是骨骼疾病或病症。在一些实施例中,所述Wnt替代分子结合:(i)Fzd1、Fzd2和Fzd7;或者(ii)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8。

附图说明

[0044] 本专利或申请文件含有至少一幅彩色附图。在提出请求并支付必要费用后,将由专利局提供具有一或多张彩色附图的本专利或专利申请出版物的副本。

[0045] 图1.Wnt替代分子的说明性形式的示意图。含有针对不同Fzd受体和Lrp受体的不同VL和VH区的不同VHH、Fv或scFv、双功能抗体或Fab以不同比率结合。不同的颜色表示不同的结合体(所述结合体可以结合到相同的目标或不同的目标)。

[0046] 图2A.包含半胱氨酸富集结构域(CRD)、铰链区和N端区的Fzd受体的示意图。

[0047] 图2B.对Fzd受体铰链区具有结合特异性的Wnt替代分子的示意图。

[0048] 图2C.1791-3和1291-3Wnt替代分子的结合动力学。

[0049] 图2D.1791-3和1291-3Wnt替代分子的体外活性。

[0050] 图3A.单特异性和多特异性Wnt替代分子的示意图。

[0051] 图3B.Wnt替代分子在293STF细胞中的体外活性。

[0052] 图3C.Wnt替代分子在过度表达Fzd4的293STF细胞(293STF Fzd4OE)中的体外活性。

[0053] 图3D.Wnt替代分子在过度表达Fzd9的293STF细胞(293STF Fzd9OE)中的体外活性。

[0054] 图3C.Wnt替代分子在过度表达Fzd4和Fzd9的293STF细胞(293STF Fzd4OE+Fzd9OE)中的体外活性。

[0055] 图4A-4E示出了不同Fzd的铰链区的序列比对(SEQ ID NO:2251-2260)。

[0056] 图5A-5C示出了含有不同Fzd受体以及Lrp5的可溶性配体的异源分子的结构,以及其在293STF细胞中的体外活性。

[0057] 图6A-6E示出了具有不同的Fzd与Lrp结合体比率的Wnt替代分子的结构,以及其对

β-连环蛋白依赖性信号传导的Wnt3a激活的影响。

[0058] 图7A-7D示出了含有两种不同Lrp结合体与Fzd结合体的异源二聚化(heterodimerizion)的结构以及其在293STF细胞中的体外活性。

[0059] 图8A-8J示出了1:1二价双特异性L1/F1串联scFv分子未高效激活β-连环蛋白依赖性的WNT信号传导。(A)1:1二价双特异性L1/F1串联scFv构建体的图。每个圆圈表示scFv结构域,每个分子末端处的细黑线表示6xHis标签。(B)Ni树脂纯化的串联scFv分子在4-15%SDS-PAGE凝胶上分离。左图区,从左到右:在还原(R,泳道1-3)或非还原(NR,泳道4-6)条件下,具有5聚体、10聚体和15聚体接头的L1-F1串联scFv。右图区,从左到右,在还原(R,泳道1-3)或非还原(NR,泳道4-6)条件下,具有5聚体、10聚体和15聚体接头的F1-L1串联scFv。C)和D)Ni树脂纯化的串联scFv的剂量依赖性STF活性,其中L1与F1的N端融合(C),或F1与L1的N端融合(D)。E)来自尺寸排阻柱(SEC)精制的串联scFv的单体峰级分的剂量依赖性STF活性,其中L1与F1的N端融合。F)来自SEC精制的串联scFv的单体峰级分的剂量依赖性STF活性,其中F1与L1的N端融合。G)和H)不同串联scFv的SEC级分的STF活性。每个图区上的箭头指示单体串联scFv蛋白的位置。I)蛋白质标准品在SEC柱上的洗脱曲线,粗箭头指示串联scFv分子的单体形式的预期位置。J)向L1:5:F1添加抗His抗体诱导β-连环蛋白依赖性WNT信号传导的显著激活。

[0060] 图9.1:1二价双特异性L1/F1串联scFv分子未高效激活β-连环蛋白依赖性WNT信号传导。与重组WNT3A和替代物WNT、18R5-DKK1c相比,串联scFv的剂量依赖性STF活性,所述串联scFv单独从Ni柱纯化或另外地从SEC柱纯化,其中L1与F1的N端融合并且F1与L1的N端融合。除了包含阳性对照分子数据之外,这些数据与图1C-1F相同。

[0061] 图10A-10F.通过与Fc结构域融合来增加L1和F1串联scFv的化合价会显著增加Wnt信号的活性。A)F1和L1串联scFv与Fc结构域融合以产生2:2四价双特异性形式的图。B-C)串联scFv-Fc分子的SEC级分的STF活性。D)蛋白质标准品在SEC柱上的洗脱曲线,粗箭头指示串联scFv-Fc分子的单体形式的预期位置。E-F)来自蛋白质峰级分的串联scFv-Fc分子的剂量依赖性STF活性,所述蛋白质峰级分对应于来自SEC柱的分子的单体形式。

[0062] 图11A-11B.2:2四价双特异性F1/L1分子的STF活性和Octet结合曲线。A)与重组WNT3A和18R5-DKK1c相比,来自与单体形式相对应的蛋白质峰级分的F1/L1双价串联scFv分子的剂量依赖性STF活性。除了包含阳性对照分子数据之外,这些数据与图2E和2F相同。B)在Octet上测量的各种2:2四价双特异性串联scFv分子对FZD1和LRP6E1E2的结合亲和力。

[0063] 图12A-12E.由两个F1和两个L2结合臂组成的2:2四价双特异性分子在诱导Wnt信号传导方面高度强效。A)表示由FZD结合体F1和LRP6E3E4结合体L2组成的2:2四价双特异性分子形式的图。这些不同的2:2分子的SEC级分的STF活性在以下形式图示出。B-C)来自与来自SEC柱的每种分子的单体形式相对应的蛋白质峰级分、由在两个朝向上的F1和L2结合臂组成的2:2四价双特异性分子的剂量依赖性STF活性。D)来自F1与L2组合的2:2四价双特异性分子的活性需要FZD和LRP6结合臂的存在,因为任一结合臂被中性抗GFP scFv片段取代都会导致没有活性。E)通过Octet来确定来自D)的分子与其相应受体的相互作用。IgG1形式的结合体L1、L2和F1也作为比较物而包含在内。

[0064] 图13A-13B.1:1二价双特异性L2/F1串联scFv分子不能有效激活β-连环蛋白依赖性的WNT信号传导。A)在两个朝向上的F1/L2之间的1:1二价双特异性串联scFv分子的SEC级

分的STF活性。分子形式图也示出在顶部。每个图区中的箭头指示蛋白质的单体形式的位置。B)来自蛋白质峰级分的A)中所示的分子的剂量依赖性STF活性,所述蛋白质峰级分对应于来自SEC柱的每种分子的单体形式。

[0065] 图14A-14I.由两个F2和两个L1或L2结合臂组成的2:2四价双特异性分子激活Wnt信号传导。A)由F2和L1结合臂组成的2:2四价双特异性分子的分子形式图,以及这些不同的WNT替代分子在整个SEC柱上的STF活性。每个图区中的箭头指示蛋白质的单体形式的位置。B)来自与来自SEC柱的每种分子的单体形式相对应的蛋白质峰级分、由在两个朝向上的F2和L1结合臂组成的2:2四价双特异性分子的剂量依赖性STF活性。与WNT3A相比,这些替代WNT激动剂在激活Wnt信号方面具有更高的效价,但功效较低。C)和D)由在两个朝向上的F2和L2组合组成的分子的SEC柱级分的1:1二价双特异性分子形式和STF活性。在1:1形式中,F2-L2朝向似乎无活性,而反向的L2-F2朝向似乎有活性。每个图区中的箭头指示蛋白质的单体形式的位置。E)来自蛋白质峰级分的1:1二价双特异性L2-F2分子的剂量依赖性STF活性,所述蛋白质峰级分对应于来自SEC柱的每种分子的单体形式。F)和H)由在两个朝向上的F2和L2组合组成的分子的SEC柱级分的2:2四价双特异性分子形式和STF活性。每个图区中的箭头指示蛋白质的单体形式的位置。G)和I)来自蛋白质峰级分的F)和H)的2:2四价双特异性L2/F2分子的剂量依赖性STF活性,所述蛋白质峰级分对应于来自SEC柱的每种分子的单体形式。

[0066] 图15A-15B.F1、F2、F3的FZD特异性曲线以及1:1二价双特异性F2/L1分子的STF活性。A)在Octet上测量的F1、F2和F3对所有10个FZD的结合亲和力和特异性。B)在两个方向上的F2/L1之间的1:1二价双特异性串联scFv分子的SEC级分的STF活性。分子形式图也示出在顶部。每个图区中的箭头指示蛋白质的单体形式的位置。1:1二价双特异性形式在诱导Wnt/β-连环蛋白信号传导方面无效。

[0067] 图16A-16D.由两个F3和两个L1或L2结合臂组成的2:2四价双特异性分子激活Wnt信号传导。A)表示由FZD结合体F3和LRP6结合体L1或L2组成的2:2四价双特异性分子形式的图,其中FZD结合体附接到LRP结合体的N端。这两种2:2分子的SEC级分的STF活性在以下形式图示出。B)表示由FZD结合体F3和LRP6结合体L1或L2组成的2:2四价双特异性分子形式的图,其中LRP结合体附接到FZD结合体的N端,分子的反向朝向在A)中示出。这两种2:2分子的SEC级分的STF活性在以下形式图示出。C、D)来自蛋白质峰级分的2:2四价双特异性分子的剂量依赖性STF活性,所述蛋白质峰级分对应于来自SEC柱的每种分子的单体形式。C)和D)分别对应于来自A)和B)的分子。

[0068] 图17.1:1二价双特异性L1/F3或L2/F3串联scFv分子未高效激活β-连环蛋白依赖性WNT信号传导。在两个朝向上的F3/L1或F3/L2之间的1:1二价双特异性串联scFv分子的SEC级分的STF活性。分子形式图也示出在顶部。每个图区中的箭头指示蛋白质的单体形式的位置。1:1二价双特异性形式在诱导Wnt/β-连环蛋白信号传导方面无效。

[0069] 图18A-18B.2:2四价双特异性哑铃形式与2:2四价双特异性串联scFv-Fc形式具有类似的活性。A)与来自SEC柱的每种分子的单体形式相对应的蛋白质峰级分的剂量依赖性STF活性。这里测试的替代WNT激动剂是2:2四价双特异性哑铃形式的F1与L1的组合。这种形式是有效的,然而与WNT3A相比,其功效要低得多。L1优选地在Fc的N端上。B)与来自SEC柱的每种分子的单体形式相对应的蛋白质峰级分的剂量依赖性STF活性。这里测试的替代WNT激

动剂是2:2四价双特异性哑铃形式的F1与L2的组合。L2也优选地在Fc的N端上。

[0070] 图19A-19C.各种1:1二价双特异性串联scFv分子几乎没有显示出活性。A)FZD8顺序结合,然后是1:1二价双特异性串联scFv分子F3:5:L2和L2:5:F3,然后在Octet上添加LRP6E3E4表明1:1串联scFv分子可以同时与FZD和LRP接合。B)FZD与LRP结合体之间化学计量为1:1的各种分子的图。C)B)中的各种分子的剂量应答显示没有STF信号的诱导。

[0071] 图20A-20B.各种1:1双特异性scFv分子几乎没有显示出活性。F3/L2和F2/L2结合体对之间的1:1二价双特异性scFv分子的各种组合的图。B)A、B)中描绘的各种分子的剂量应答显示没有STF信号的诱导。

[0072] 图21A-21K.探索FZD和LRP结合体的不同化学计量,并且以2:2四价多特异性形式来组合不同受体特异性的结合体或表位。A、D)FZD和LRP结合体之间具有不同化学计量的分子的图,如2个FZD结合体和1个LRP结合体(2:1)或1个FZD和2个LRP结合体(1:2)。B、C)在STF报告基因测定中A)中分子的剂量应答。E、F)在STF报告基因测定中D)中分子的剂量应答。G)2:2四价三特异性分子的分子形式,其中两个FZD结合体具有不同的FZD特异性(1:1:2)。H)在STF报告基因测定中G)中分子的剂量应答。I)2:2四价三特异性分子的分子形式,其中两个FZD结合体具有不同的FZD特异性,以及仅一个LRP结合体(1:1:1:0)。J)在STF报告基因测定中I)中分子的剂量应答。K)2:2四价三特异性分子的分子形式,其中两个FZD结合体和两个LRP结合体都具有不同的FZD或LRP特异性(1:1:1:1)。H)在STF报告基因测定中K)中分子的剂量应答。

具体实施方式

[0073] 本公开涉及多特异性Wnt替代分子,所述多特异性Wnt替代分子与多个不同的Fzd受体和表位以及LRP5和/或LRP6特异性结合,以便调节Wnt信号传导通路。在特定实施例中,所述Wnt替代分子激活Wnt信号传导通路或增加通过Wnt信号传导通路的信号传导。在某些方面,本公开的Wnt替代分子具有:(i)多个区,所述多个区各自与一种或多种卷曲蛋白(Fzd)受体和/或一个或多个表位的集合特异性结合、在本文中称为“Fzd结合区”;以及(ii)一个或多个区,所述一个或多个区与LRP5和/或LRP6特异性结合、在本文中称为“LRP5/6结合区”。某些实施例涵盖Fzd结合区和LRP5/6结合区的特定结构形式或布置,所述特定结构形式或布置有利于调节Wnt信号传导通路和相关的生物学效应,例如,用于治疗与Wnt信号传导相关联的疾病和病症。

[0074] 在特定实施例中,本文公开的Wnt替代分子包含对不同的Fzd受体和/或表位具有结合特异性的多个Fzd结合区。例如,Wnt替代分子可以包含至少两个Fzd结合区,所述至少两个Fzd结合区各自与一种或多种Fzd受体的不同集合、一种或多种Fzd受体的同一集合内的一个或多个表位的不同集合或其组合结合。对于不同的Fzd受体表位或多个Fzd受体表位,每个Fzd结合区可以是单特异性的、双特异性的、三特异性的等。这种多特异性Wnt替代分子能够选择性地激活Fzd受体的特定组合,同时减少或消除非靶向Fzd受体的激活。本公开的实施例有利于例如通过减少脱靶效应来选择性地调节靶细胞类型中的Wnt信号传导和/或治疗特定疾病或病症。

[0075] 本发明的实施例涉及Wnt替代分子在诊断、评定和治疗与Wnt信号传导通路相关的疾病和病症中的用途。在某些实施例中,主题Wnt替代分子用于调节细胞或组织中的Wnt信

号传导通路。在某些实施例中,主题Wnt替代分子用于治疗或预防与Wnt信号传导异常或失调(例如,减少)相关的疾病和病症或针对其调节(例如,增加)Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病和病症。

[0076] 除非特别相反地指出,否则本公开的实践将采用本领域的技术人员范围内的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法,其中许多方法在下文中出于说明的目的而描述。此类技术在文献中得到充分解释。参见例如《当前分子生物学方案(Current Protocols in Molecular Biology)》或《当前免疫学方案(Current Protocols in Immunology)》,约翰·威利父子公司(John Wiley&Sons),纽约,(2009);Ausubel等人,《精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology)》,第3版,约翰·威利父子出版公司,1995;Sambrook和Russell,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(第3版,2001);Maniatis等人,《分子克隆:实验室手册》,(1982);《DNA克隆:一种实用方法(DNA Cloning:A Practical Approach)》,第I和II卷(D.Glover编辑);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(N.Gait编辑,1984);《核酸杂交(Nucleic Acid Hybridization)》(B.Hames和S.Higgins编辑,1985);《转录和转译(Transcription and Translation)》(B.Hames和S.Higgins编辑,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.Freshney编辑,1986);Perbal,《分子克隆实用指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)》(1984)以及其它类似参考文献。

[0077] 如在本说明书和所附权利要求中所使用的,除非文中另外明确指明,否则单数形式“一个/一种(a/an)”以及“所述(the)”包含复数指代。

[0078] 如本文所用,“A和/或B”涵盖A或B中的一个或多个以及其组合,如A和B。

[0079] 贯穿本说明书,除非上下文另外要求,否则词语“包括”或如“包括了”或“包括着”等变体应当理解为意指包含一个所述的要素或整体、或多个要素或整体的组,但不排除任何其它一个要素或整体、或多个要素或整体的组。

[0080] 除非另外明确地说明,否则本说明书中的每个实施例在进行必要的修改后适用于所有其它实施例。

[0081] 可以将标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质体转染)。可以根据制造商的说明书或者如本领域通常实现那样或如本文所描述那样执行酶促反应和纯化技术。这些技术和程序以及相关技术和程序通常可以根据本领域熟知的常规方法并且如在整个本说明书中引用和讨论的各种一般的和更具体的参考文献中所描述那样执行。除非提供具体的定义,否则与本文所描述的分子生物学、分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学结合使用的命名以及所述分子生物学、分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学的实验室程序和技术是本领域中熟知和常用的命名和实验室程序和技术。标准技术可以用于重组技术、分子生物学、微生物学、化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及受试者的治疗。

[0082] 本公开的实施例涉及与一种或多种Fzd受体结合的抗体和其抗原结合片段。SEQ ID NO:1-73、表1A和1B以及表5示出了说明性抗体或其抗原结合片段或其互补决定区(CDR)的序列。

[0083] 本公开的实施例涉及与LRP5和/或LRP6结合的抗体和其抗原结合片段。SEQ ID NO:74-97、表2A和2B以及表5示出了说明性抗体或其抗原结合片段或其互补决定区(CDR)的

序列。

[0084] 如本领域众所周知的,抗体是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个表位识别位点特异性结合如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等靶标的免疫球蛋白分子。如本文所使用的,所述术语不仅涵盖完整多克隆或单克隆抗体,而且涵盖其片段(如dAb、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv)、单链(scFv)、Nanobodies® (Nabs;也称为VHH或单结构域抗体(sdAb))、其合成变体、天然存在的变体、包括抗体或其抗原结合片段的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体以及包括具有所需特异性的抗原结合位点或片段(表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰构型。"双功能抗体"(通过基因融合构建的多价或多特异性片段(WO94/13804;P.Holliger等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》90 6444-6448,1993))也是本文所设想的抗体的特定形式。本文还包含包括与CH3结构域连接的scFv的迷你抗体(S.Hu等人,《癌症研究(Cancer Res.)》,56,3055-3061,1996)。参见例如Ward,E.S.等人,《自然(Nature)》341,544-546(1989);Bird等人,《科学(Science)》242,423-426,1988;Huston等人,《美国国家科学院院刊(PNAS USA)》,85,5879-5883,1988);PCT/US92/09965;WO94/13804;P.Holliger等人,《美国国家科学院院刊》90 6444-6448,1993;Y.Reiter等人,《自然生物技术(Nature Biotech)》,14,1239-1245,1996;S.Hu等人,《癌症研究》,56,3055-3061,1996。

[0085] 如本文所使用的术语"抗原结合片段"是指含有与关注的抗原,特别是一种或多种Fzd受体或LRP5或LRP6受体结合的免疫球蛋白重链和/或轻链或VHH或sdAb的至少一个CDR的多肽片段。在这方面,本文所描述的抗体的抗原结合片段可以包括本文所示的来自结合一种或多种Fzd受体或LRP5和/或LRP6的抗体的VH和VL序列的1个、2个、3个、4个、5个或所有6个CDR。在特定实施例中,抗原结合片段可以包括所有三个VH CDR或所有三个VL CDR。类似地,其抗原-结合片段可以包括VHH或sdAb的所有三个CDR。Fzd特异性抗体的抗原结合片段能够与Fzd受体结合。LRP5/6特异性抗体的抗原结合片段能够与LRP5和/或LRP6受体结合。如本文所使用的,所述术语不仅涵盖分离的片段,而且涵盖包括本文所公开的抗体的抗原结合片段的多肽,例如,包括本文所公开的抗体的抗原结合片段的融合蛋白,例如,包括结合一种或多种Fzd受体的VHH或sdAb和结合LRP5和/或LRP6的VHH或sdAb的融合蛋白。

[0086] 术语"抗原"是指能够由如抗体等选择性结合体结合并且另外能够在动物中使用以产生能够结合所述抗原的表位的抗体的分子或分子的一部分。在某些实施例中,当结合体(例如,Wnt替代分子或其结合区)在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其靶抗原时,所述结合体被认为与抗原特异性结合。在某些实施例中,当平衡解离常数$\leq 10^{-7}$M或$\leq 10^{-8}$M时,Wnt替代分子或其结合区(例如,抗体或其抗原结合片段)被认为与抗原特异性结合。在一些实施例中,平衡解离常数可以$\leq 10^{-9}$M或$\leq 10^{-10}$M。

[0087] 在某些实施例中,如本文所描述的抗体和其抗原结合片段包含分别插入重链框架区(FR)组与轻链FR组之间的重链和轻链CDR组,所述重链和轻链FR组向CDR提供支撑并且限定CDR相对于彼此的空间关系。如本文所使用的,术语"CDR组"是指重链或轻链V区的三个超变区。从重链或轻链的N端出发,这些区分别表示为"CDR1"、"CDR2"和"CDR3"。因此,抗原结合位点包含六个CDR,其包括来自重链和轻链V区中的每个的CDR组。包括单个CDR(例如,CDR1、CDR2或CDR3)的多肽在本文中被称为"分子识别单元"。对多种抗原-抗体复合物的晶体学分析已经表明,CDR的氨基酸残基形成与所结合抗原的广泛接触,其中最广泛的抗原接

触是与重链CDR3的抗原接触。因此,分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0088] 如本文所使用的,术语“FR组”是指框住重链或轻链V区的CDR组中的CDR的四个侧翼氨基酸序列。一些FR残基可以与所结合抗原接触;然而,FR主要负责将V区折叠成抗原结合位点,特别是直接邻近CDR的FR残基。在FR内,某些氨基酸残基和某些结构特征是非常高度保守的。在这方面,所有V区序列均含有由约90个氨基酸残基构成的内部二硫环。当V区折叠成结合位点时,CDR被展示为形成抗原结合表面的突出环基序。通常认识到存在FR的保守结构区,所述保守结构区将CDR环的折叠形状变成某些“典型”结构——无论精确的CDR氨基酸序列如何。进一步地,已知某些FR残基参与非共价域间接触,所述非共价域间接触使抗体重链和轻链的相互作用稳定。

[0089] 免疫球蛋白CDR和可变结构域的结构和位置可通过参考目前可在因特网(immuno.bme.nwu.edu)上获得的Kabat,E.A.等人,《具有免疫学益处的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》.第4版.美国卫生与公众服务部(US Department of Health and Human Services).1987和其更新来确定。来自分布式生物公司(Distributed Bio)(加利福尼亚州南旧金山(South San Francisco,CA))的Abgenesis软件用于绘制本文所公开的抗体的特异性决定区,所述特异性决定区包含CDR的Kabat定义。(Padlan等人,《美国实验生物学会联合会期刊(FASEB J.)》9,133-139(1995))。

[0090] “单克隆抗体”是指均匀抗体群,其中单克隆抗体包括表位的选择性结合中涉及的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一表位。术语“单克隆抗体”不仅涵盖完整单克隆抗体和全长单克隆抗体,而且涵盖其片段(如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv)、单链(scFv)、VHH或sdAb、其变体、包括单克隆抗体的抗原结合片段的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体以及包括具有所需特异性的抗原结合片段(表位识别位点)和结合表位的能力的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰构型,包含本文公开的Wnt替代分子。不旨在限制关于抗体的源或其形成的方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)。术语包含整个免疫球蛋白以及以上在“抗体”定义下描述的片段等。

[0091] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割IgG分子以产生若干片段,所述片段(F(ab)片段)中的两个各自包括包含完整抗原结合位点的共价异二聚体。胃蛋白酶能够切割IgG分子以提供若干片段,包含包括两个抗原结合位点的$F(ab')_2$片段。可以通过对IgM以及很少的IgG或IgA免疫球蛋白分子进行优先蛋白水解切割来产生用于根据本公开的某些实施例使用的Fv片段。然而,Fv片段更一般地使用本领域已知的重组技术衍生。Fv片段包含非共价$V_H::V_L$异二聚体,其包含保留天然抗体分子的许多抗原识别和结合能力的抗原结合位点。Inbar等人(1972)《美国国家科学院院刊》69:2659-2662;Hochman等人(1976)《生物化学(Biochem)》15:2706-2710;以及Ehrlich等人(1980)《生物化学》19:4091-4096。

[0092] 在某些实施例中,设想单链Fv或scFV抗体。例如,κ体(Ill等人,《蛋白质工程(Prot.Eng.)》10:949-57(1997));迷你抗体(Martin等人,《欧洲分子生物学组织杂志(EMBO J)》13:5305-9(1994));双功能抗体(Holliger等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》90:6444-8(1993));或Janusins(Traunecker等人,《欧洲分子生物学组织杂志》10:3655-59(1991)以及Traunecker等人,《国际癌症杂志增刊(Int.J.Cancer Suppl.)》7:51-52(1992))可以使用标准分子生物学技术根据本申请中关于选择具有期望特异性的抗体的教导来制备。在其它实施例中,可以制备涵盖本公开的配体的双特异性或嵌合抗体。例如,嵌

合抗体可以包括来自不同抗体的CDR和框架区,同时可以产生通过一个结合结构域与一种或多种Fzd受体特异性结合并通过第二结合结构域与第二分子特异性结合的双特异性抗体。这些抗体可以通过重组分子生物学技术来产生或者可以物理地缀合在一起。

[0093] 单链Fv(scFv)多肽是共价连接的V_H::V_L异二聚体,其由包含通过肽编码接头连接的V_H-和V_L-编码基因的基因融合表达。Huston等人(1988)《美国国家科学院院刊》85(16):5879-5883。已经描述了用于辨别用于将来自抗体V区的天然聚集但是化学分离的轻多肽链和重多肽链转换成scFv分子的化学结构的多种方法,所述scFv分子将折叠成与抗原结合位点的结构基本上类似的三维结构。参见例如授权给Huston等人的美国专利第5,091,513号和第5,132,405号;以及授权给Ladner等人的美国专利第4,946,778号。

[0094] 在某些实施例中,如本文所描述的抗体采用双功能抗体的形式。双功能抗体是由多肽形成的多聚体,每个多肽包括第一结构域和第二结构域,所述第一结构域包括免疫球蛋白轻链的结合结构域,所述第二结构域包括免疫球蛋白重链的结合结构域,所述两个结构域(例如,通过肽接头)连接但是不能彼此缔合以形成抗原结合位点:通过将多聚体内的一个多肽的第一结构域与多聚体内的另一个多肽的第二结构域缔合来形成抗原结合位点(WO94/13804)。

[0095] 抗体的dAb片段由VH结构域组成(Ward,E.S.等人,《自然》341,544-546(1989))。

[0096] 当要使用双特异性抗体时,所述抗体抗体可以是可以以各种方式(Holliger,P.和Winter G.,《生物技术新见(Current Opinion Biotechnol.)》4,446-449(1993))制造,例如以化学方法制备或由杂交杂交瘤制备的常规双特异性抗体,或者可以是上文提到的双特异性抗体片段中的任何双特异性抗体片段。可以仅使用可变结构域来构建没有Fc区的双功能抗体和scFv,从而潜在地减少抗独特型反应的影响。

[0097] 与双特异性完整抗体形成对照,双特异性双功能抗体也可以是特别有用的,因为所述双特异性双功能抗体可以容易地构建并且表达于大肠杆菌(E.coli.)中。可以使用噬菌体展示(WO94/13804)来从文库中容易地选择具有合适结合特异性的双功能抗体(和许多其它多肽,如抗体片段)。如果要使双功能抗体的一个臂保持恒定,例如,对抗原X具有特异性,则可以产生另一个臂得以改变的文库并且选择具有合适特异性的抗体。双特异性完整抗体可以通过杵臼工程化方法来产生(J.B.B.Ridgeway等人,《蛋白质工程》,9,616-621(1996))。

[0098] 在某些实施例中,本文所描述的抗体可以以UniBody®形式提供。UniBody®是去除了铰链区的IgG4抗体(参见GenMab Utrecht,荷兰;还参见例如,US20090226421)。此专利抗体技术产生具有比当前小抗体形式预期更长的治疗窗的稳定更小抗体形式。IgG4抗体被认为是惰性的,并且因此不与免疫系统相互作用。完全人IgG4抗体可以通过消除抗体的铰链区进行修饰以获得相对于相应的完整IgG4具有不同稳定性性质的半分子片段(乌德勒支GenMab)。二等分IgG4分子使得仅将一个区域留在可以与同源抗原(例如,疾病靶标)结合的UniBody®上,并且UniBody®因此与靶细胞上的仅一个位点单价地结合。

[0099] 在某些实施例中,本公开的抗体可以采用VHH或sdAb的形式。VHH或sdAb技术最初是在发现和鉴定骆驼科(例如,骆驼和美洲驼)具有仅由重链组成并且因此缺乏轻链的全功能抗体后才开发的。这些仅有重链的抗体含有单个可变结构域(V_{HH})和两个恒定结构域(C_H2、C_H3)。克隆和分离的单个可变结构域具有完整的抗原结合能力并且非常稳定。具有其

独特的结构和功能性质的这些单个可变结构域形成“VHH或sdAb”的基础。VHH或sdAb由单个基因编码并且在几乎所有原核和真核宿主中有效地产生,例如,大肠杆菌(参见例如,美国专利第6,765,087号)、霉菌(例如,曲霉菌(Aspergillus)或木霉菌(Trichoderma))和酵母菌(例如,酵母属(Saccharomyces)、克鲁维酵母(Kluyvermyces)、汉逊酵母(Hansenula)或毕赤酵母(Pichia))(参见例如美国专利第6,838,254号)。生产工艺是可放大的,并且已经产生多个千克量的VHH或sdAb。可以将VHH或sdAb配制为具有长保质期的即用型溶液。Nanoclone®方法(参见例如,WO 06/079372)是一种用于基于B细胞的自动化高吞吐量选择,针对期望靶标来产生VHH或sdAb的专利方法。VHH或sdAb是骆驼科特异性的仅有重链的抗体的单结构域抗原结合片段。VHH或sdAb通常具有大约15kDa的小尺寸。

[0100] 在某些实施例中,本文公开的抗体或其抗原结合片段是人源化的。这涉及通常使用重组技术制备的嵌合分子,所述嵌合分子具有衍生自来自非人类物种的免疫球蛋白的抗原结合位点以及分子的基于人类免疫球蛋白的结构和/或序列的剩余免疫球蛋白结构。抗原结合位点可以包括融合到恒定结构域上的完整可变结构域或者仅移植到可变结构域中的适当框架区上的CDR。表位结合位点可以是野生型的或可以由一个或多个氨基酸取代修饰。这消除了作为人类个体中的免疫原的恒定区,但是仍然存在对外源可变区产生的免疫应答的可能性(LoBuglio,A.F.等人,(1989)《美国国家科学院院刊》,86:4220-4224;Queen等人,《美国国家科学院院刊》(1988)86:10029-10033;Riechmann等人,《自然》,(1988)332:323-327)。用于人源化本文公开的抗Fzd抗体的说明性方法包含美国专利第7,462,697号中描述的方法。

[0101] 另一种方法不仅着重于提供人源性恒定区,还着重于修饰可变区,以尽可能地将其重塑为人形式。已知的是,重链和轻链两者的可变区均含有侧翼是四个框架区(FR)的三个互补决定区(CDR),所述三个CDR响应于所讨论的表位而变化并且决定结合能力,所述四个FR区在给定物种中相对保守并且推定地为CDR提供支架。当关于特定表位制备非人类抗体时,可以通过将衍生自非人类抗体的CDR接枝到存在于待修饰的人类抗体中的FR上来对可变区进行“重塑”或“人源化”。已经通过以下报道了将此方法应用于各种抗体:Sato,K.等人,(1993)《癌症研究》53:851-856;Riechmann,L.等人,(1988)《自然》332:323-327;Verhoeyen,M.等人,(1988)《科学》239:1534-1536;Kettleborough,C.A.等人,(1991)《蛋白质工程》4:773-3783;Maeda,H.等人,(1991)《人类抗体杂交瘤(Human Antibodies Hybridoma)》2:124-134;Gorman,S.D.等人,(1991)《美国国家科学院院刊》88:4181-4185;Tempest,P.R.等人,(1991)《生物技术(Bio/Technology)》9:266-271;Co,M.S.等人,(1991)《美国国家科学院院刊》88:2869-2873;Carter,P.等人,(1992)《美国国家科学院院刊》89:4285-4289;以及Co,M.S.等人,(1992)《免疫学杂志(J Immunol)》148:1149-1154。在一些实施例中,人源化抗体保留所有CDR序列(例如,含有来自小鼠抗体的所有六个CDR的人源化小鼠抗体)。在其它实施例中,人源化抗体具有关于原始抗体改变的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),也称为“衍生自”来自原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0102] 在某些实施例中,本公开的抗体可以是嵌合抗体。在这方面,嵌合抗体包括抗体的可操作地连接或以其它方式融合到不同抗体的异源Fc部分的抗原结合片段。在某些实施例中,异源Fc结构域是人源的。在其它实施例中,异源Fc结构域可以来自来源于亲本抗体的不

同Ig类别,包含IgA(包含子类别IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(包含子类别IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)以及IgM。在另外的实施例中,异源Fc结构域可以包含来自不同Ig类中的一类或多类的CH2和CH3结构域。如上文关于人源化抗体所述,嵌合抗体的抗原结合片段可以仅包括本文所描述的抗体的CDR中的一个或多个CDR(例如,本文所描述的抗体的1个、2个、3个、4个、5个或6个CDR),或者可以包括整个可变结构域(VL、VH或两者)。

[0103] Wnt替代物

[0104] 在某些方面,本公开提供了结合以下两者的Wnt替代分子:一种或多种Fzd受体;以及LRP5和/或LRP6中的一种或两种。Wnt替代分子也可以被称为"Wnt替代物"或"Wnt模拟物"。在特定实施例中,Wnt替代分子结合:一种或多种人Fzd受体;以及人LRP5和/或人LRP6中的一种或两种。

[0105] 在某些实施例中,Wnt替代分子能够调节或调节与Wnt替代分子接触的细胞中的Wnt信号传导事件。在某些实施例中,Wnt替代分子增加例如通过典型的Wnt/β-连环蛋白通路的Wnt信号传导。在某些实施例中,Wnt替代分子特异性地调节人Wnt信号传导通路的生物学活性。

[0106] 本公开的Wnt替代分子在与一种或多种Fzd受体以及LRP5和LRP6中的一种或多种结合方面以及在Wnt信号传导的激活方面具有生物学活性,即,Wnt替代分子是Wnt激动剂。术语"Wnt激动剂活性"是指激动剂模拟Wnt蛋白与Fzd受体和/或LRP5或LRP6结合的作用或活性的能力。本文公开的Wnt替代分子和其它Wnt激动剂模拟Wnt活性的能力可以通过多种测定法来证实。Wnt激动剂通常引发与受体的天然配体引发的反应或活性类似或相同的反应或活性。具体地,本文公开的Wnt激动剂激活、增强或增加典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导通路。如本文所使用的,术语"增强"是指Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平与不存在Wnt激动剂(例如,本文公开的Wnt替代分子)的情况下的水平相比的可测量增加。在特定实施例中,例如,在相同细胞类型中,与不存在Wnt激动剂的情况下的Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平相比,Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平的增加为至少10%、至少20%、至少50%、至少两倍、至少五倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍。测量Wnt/β-连环蛋白信号传导的方法是本领域已知的并且包含本文所述的方法。本文公开的Wnt替代分子是多特异性的,即其特异性结合两个或更多个不同的表位。至少一个表位位于一个或多个Fzd受体内,并且至少一个表位与LRP5和/或LRP6结合。在特定实施例中,多特异性Wnt替代分子对Fzd受体结合具有多特异性,即其特异性结合两种或更多种不同类型的Fzd受体、单一类型Fzd受体内的两个或更多个不同表位或其组合。例如,多特异性Wnt替代分子可以结合Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10中的两种或更多种。在某些实施例中,多特异性Wnt替代分子与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;或者(xi)Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8。

[0107] 在某些实施例中,对Fzd结合具有多特异性的Wnt替代分子包含至少一个Fzd结合区,所述至少一个Fzd结合区结合多个不同的Fzd受体表位,例如不同Fzd受体内的表位、同一Fzd受体内的不同表位或其组合。例如,Wnt替代分子可以包含至少一个Fzd结合区,所述至少一个Fzd结合区结合两种或更多种Fzd受体,例如Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、

Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10中的两种或更多种。作为另一个实例,Wnt替代分子可以包含至少一个Fzd结合区,所述至少一个Fzd结合区与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;或者(xi)Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8。

[0108] 可替代地或组合地,在某些实施例中,对Fzd结合具有多特异性的Wnt替代物包含至少两个Fzd结合区,所述至少两个Fzd结合区各自与一个或多个Fzd受体表位的不同集合,例如不同Fzd受体内的表位、同一Fzd受体内的不同表位或其组合结合。一个或多个Fzd受体表位的集合可以包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个Fzd受体表位,使得每个Fzd结合区可以是单特异性的、双特异性的、三特异性的、四特异性的等。

[0109] 在某些实施例中,多特异性Wnt替代物包含两个或更多个Fzd结合区,其中这些Fzd结合区中的一个或多个Fzd结合区仅特异性结合一种Fzd受体或一个受体表位。在某些实施例中,多特异性Wnt替代物中的两个或更多、三个或更多个、或四个或更多个Fzd结合区各自仅特异性结合一种Fzd受体或一个受体表位,其中至少两个或更多个、至少三个或更多个、或至少四个或更多个Fzd结合区特异性结合不同的Fzd受体和/或受体表位。

[0110] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含与一个或多个Fzd受体表位的第一集合结合的第一Fzd结合区,以及与一个或多个Fzd受体表位的第二不同集合结合的第二Fzd结合区。例如,第一Fzd结合区可以与一种或多种Fzd受体的第一集合结合,并且第二Fzd结合区可以与一种或多种Fzd受体的第二不同集合结合。可替代地或组合地,第一Fzd结合区可以与一种或多种Fzd受体的集合内的一个或多个表位的第一集合结合,并且第二Fzd结合区可以与一种或多种Fzd受体的同一集合内的一个或多个表位的第二不同集合结合。在某些实施例中,第一Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10中的一种或多种结合。在某些实施例中,第二Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10中的一种或多种结合。

[0111] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一Fzd结合区和第二Fzd结合区,其中:第一Fzd结合区结合Fzd1,并且第二Fzd结合区结合Fzd2;第一Fzd结合区结合Fzd1,并且第二Fzd结合区结合Fzd3;第一Fzd结合区结合Fzd1,并且第二Fzd结合区结合Fzd4;第一Fzd结合区结合Fzd1,并且第二Fzd结合区结合Fzd5;第一Fzd结合区结合Fzd1,并且第二Fzd结合区结合Fzd6;第一Fzd结合区结合Fzd1,并且第二Fzd结合区结合Fzd7;第一Fzd结合区结合Fzd1,并且第二Fzd结合区结合Fzd8;第一Fzd结合区结合Fzd1,并且第二Fzd结合区结合Fzd9;或者第一Fzd结合区结合Fzd1,并且第二Fzd结合区结合Fzd10。

[0112] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一Fzd结合区和第二Fzd结合区,其中:第一Fzd结合区结合Fzd2,并且第二Fzd结合区结合Fzd3;第一Fzd结合区结合Fzd2,并且第二Fzd结合区结合Fzd4;第一Fzd结合区结合Fzd2,并且第二Fzd结合区结合Fzd5;第一Fzd结合区结合Fzd2,并且第二Fzd结合区结合Fzd6;第一Fzd结合区结合Fzd2,并且第二Fzd结合区结合Fzd7;第一Fzd结合区结合Fzd2,并且第二Fzd结合区结合Fzd8;第一Fzd结合区结合Fzd2,并且第二Fzd结合区结合Fzd9;或者第一Fzd结合区结合Fzd2,并且第二Fzd结合区结合Fzd10。

[0113] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一Fzd结合区和第二Fzd结合区,其中:第一Fzd结合区结合Fzd3,并且第二Fzd结合区结合Fzd4;第一Fzd结合区结合Fzd3,并且第二Fzd结合区结合Fzd5;第一Fzd结合区结合Fzd3,并且第二Fzd结合区结合Fzd6;第一Fzd结合区结合Fzd3,并且第二Fzd结合区结合Fzd7;第一Fzd结合区结合Fzd3,并且第二Fzd结合区结合Fzd8;第一Fzd结合区结合Fzd3,并且第二Fzd结合区结合Fzd9;或者第一Fzd结合区结合Fzd3,并且第二Fzd结合区结合Fzd10。

[0114] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一Fzd结合区和第二Fzd结合区,其中:第一Fzd结合区结合Fzd4,并且第二Fzd结合区结合Fzd5;第一Fzd结合区结合Fzd4,并且第二Fzd结合区结合Fzd6;第一Fzd结合区结合Fzd4,并且第二Fzd结合区结合Fzd7;第一Fzd结合区结合Fzd4,并且第二Fzd结合区结合Fzd8;第一Fzd结合区结合Fzd4,并且第二Fzd结合区结合Fzd9;或者第一Fzd结合区结合Fzd4,并且第二Fzd结合区结合Fzd10。

[0115] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一Fzd结合区和第二Fzd结合区,其中:第一Fzd结合区结合Fzd5,并且第二Fzd结合区结合Fzd6;第一Fzd结合区结合Fzd5,并且第二Fzd结合区结合Fzd7;第一Fzd结合区结合Fzd5,并且第二Fzd结合区结合Fzd8;第一Fzd结合区结合Fzd5,并且第二Fzd结合区结合Fzd9;或者第一Fzd结合区结合Fzd5,并且第二Fzd结合区结合Fzd10。

[0116] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一Fzd结合区和第二Fzd结合区,其中:第一Fzd结合区结合Fzd6,并且第二Fzd结合区结合Fzd7;第一Fzd结合区结合Fzd6,并且第二Fzd结合区结合Fzd8;第一Fzd结合区结合Fzd6,并且第二Fzd结合区结合Fzd9;或者第一Fzd结合区结合Fzd6,并且第二Fzd结合区结合Fzd10。

[0117] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一Fzd结合区和第二Fzd结合区,其中:第一Fzd结合区结合Fzd7,并且第二Fzd结合区结合Fzd8;第一Fzd结合区结合Fzd7,并且第二Fzd结合区结合Fzd9;或者第一Fzd结合区结合Fzd7,并且第二Fzd结合区结合Fzd10。

[0118] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一Fzd结合区和第二Fzd结合区,其中:第一Fzd结合区结合Fzd8,并且第二Fzd结合区结合Fzd9;或者第一Fzd结合区结合Fzd8,并且第二Fzd结合区结合Fzd10。在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一Fzd结合区和第二Fzd结合区,其中第一Fzd结合区结合Fzd9,并且第二Fzd结合区结合Fzd10。

[0119] 对于以上公开的Fzd受体的组合中的每种组合,应当理解,在某些实施例中,第一结合区或第二结合区可以仅特异性结合指定的Fzd,或者其也可以结合另外的Fzd。例如,其中第一Fzd结合区与Fzd1结合,并且第二Fzd结合区与Fzd2结合,第一Fzd结合区可以仅特异性结合Fzd1,或者其也可以结合除Fzd1之外的一个或多个其它Fzd。类似地,第二Fzd结合区可以仅特异性结合Fzd2,或者其也可以结合除Fzd2之外的一个或多个其它Fzd。然而,第一Fzd结合区和第二Fzd结合区与Fzd受体的不同集合结合。

[0120] 在某些实施例中,第一结合区和第二结合区可以特异性结合同一Fzd受体内的不同表位。例如,第一结合区可以结合Fzd1中的第一表位,并且第二结合区可以结合Fzd1中的不同的第二表位。第一结合区可以结合Fzd2中的第一表位,并且第二结合区可以结合Fzd2中的不同的第二表位。第一结合区可以结合Fzd3中的第一表位,并且第二结合区可以结合Fzd3中的不同的第二表位。第一结合区可以结合Fzd4中的第一表位,并且第二结合区可以结合Fzd4中的不同的第二表位。第一结合区可以结合Fzd5中的第一表位,并且第二结合区

可以结合Fzd5中的不同的第二表位。第一结合区可以结合Fzd6中的第一表位,并且第二结合区可以结合Fzd6中的不同的第二表位。第一结合区可以结合Fzd7中的第一表位,并且第二结合区可以结合Fzd7中的不同的第二表位。第一结合区可以结合Fzd8中的第一表位,并且第二结合区可以结合Fzd8中的不同的第二表位。第一结合区可以结合Fzd9中的第一表位,并且第二结合区可以结合Fzd9中的不同的第二表位。第一结合区可以结合Fzd10中的第一表位,并且第二结合区可以结合Fzd10中的不同的第二表位。

[0121] 对于以上公开的Fzd受体表位的组合中的每种组合,应当理解,在某些实施例中,第一结合区或第二结合区可以仅特异性结合指定的表位,或者也可以结合另外的表位。例如,其中第一结合区结合Fzd1中的第一表位,并且第二结合区结合Fzd1中的不同的第二表位,第一结合区可以仅特异性结合Fzd1中的第一表位,或者其也可以结合Fzd1或其它Fzd受体中的一个或多个其它表位。类似地,第二Fzd结合区可以仅特异性结合Fzd1中的第二表位,或者其也可以结合Fzd1或其它Fzd受体中的一个或多个其它表位。在其中第一结合区和第二结合区特异性结合一个或多个相同Fzd受体的实施例中,第一结合区和第二结合区结合一个或多个相同受体内的不同表位。

[0122] 在特定实施例中,多特异性Wnt替代分子对LRP5/6结合具有多特异性,即其特异性结合LRP5和/或LRP6内的两个或更多个不同表位。在某些实施例中,多特异性Wnt替代分子包含与LRP5和/或LRP6内的第一表位结合的第一LRP5/6结合区,以及与LRP5和/或LRP6内的不同的第二表位结合的第二LRP5/6结合区。

[0123] 对于LRP受体表位的组合中的每种组合,应当理解,在某些实施例中,第一结合区或第二结合区可以仅特异性结合指定的表位,或者也可以结合另外的表位。例如,其中第一结合区结合LRP5E1E2中的第一表位,并且第二结合区结合LRP5E1E2中的不同的第二表位,第一结合区可以仅特异性结合LRP5E1E2中的第一表位,或者其也可以结合LRP5E1E2或其它LRP受体中的一个或多个其它表位。类似地,第二LRP结合区可以仅特异性结合LRP5E1E2中的第二表位,或者其也可以结合LRP5E1E2或其它LRP受体中的一个或多个其它表位。在其中第一结合区和第二结合区特异性结合一个或多个相同LRP受体的实施例中,第一结合区和第二结合区结合一个或多个相同受体内的不同表位。对于LRP5E3E4、LRP6E1E2和LRP6E3E4,可能发生类似的表位结合。在特定实施例中,多特异性Wnt替代分子对Fzd结合和LRP5/6结合具有多特异性。例如,Wnt替代分子可以包含各自与一种或多种Fzd受体的不同集合结合的多个Fzd结合区以及各自与LRP5和/或LRP6内的不同表位特异性结合的多个LRP5/6结合区。应当理解,本文公开的Fzd结合区和LRP5/6结合区的各个实施例可以以许多方式组合,以产生具有Fzd和LRP5/6结合特异性的任何期望组合的多特异性Wnt替代分子。

[0124] 在特定实施例中,本文公开的Wnt替代分子是多价的,例如,其包括各自与相同的表位特异性结合的两个或更多个区,例如,与一种或多种Fzd受体内的表位结合的两个或更多个区和/或与LRP5和/或LRP6内的表位结合的两个或更多个区。在特定实施例中,本文公开的Wnt替代分子包括与一种或多种Fzd受体内的表位结合的两个或更多个区以及与LRP5和/或LRP6内的表位结合的两个或更多个区。

[0125] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括Fzd结合区和LRP5/6结合区,其比率以Fzd_n:$LRP5/6_n$(F_n:L_n)表示,其中F和L是介于1与9之间的整数,包含端值,并且n是介于1与4之间的整数,包含端值。

[0126] 在某些实施例中,Wnt替代分子的结合一种或多种Fzd受体的区的数目与结合LRP5和/或LRP6的区的数目的比率为或约为:1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、2:1、2:3、2:5、2:7、7:2、5:2、3:2、3:4、3:5、3:7、3:8、8:3、7:3、5:3、4:3、4:5、4:7、4:9、9:4、7:4、5:4、6:7、7:6、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、2:1(在具有两个Fzd结合体和一个LRP结合体的情况下)、1:2(在具有一个Fzd结合体和两个LRP结合体的情况下)、2:1:1(在具有两个不同的LRP结合体的情况下)、1:1:2(在具有两个不同的Fzd结合体的情况下)、1:1:1(在具有两个不同的Fzd结合体和一个LRP结合体或者一个Fzd结合体和两个不同的LRP结合体的情况下)以及1:1:1:1(在Fzd和LRP结合体全部不同的情况下)。改变Fzd结合部分与LRP5/6结合部分的比率可以赋予组织和/或功能特异性并调节信号传导水平。在某些实施例中,Wnt替代分子是多特异性且多价的。

[0127] 本文公开的Wnt替代分子可以具有各种不同结构形式或构型中的任一种结构形式或构型。Wnt替代分子可以包括多肽和/或非多肽结合部分,例如小分子。在特定实施例中,Wnt替代分子包括多肽区和非多肽结合部分两者。在某些实施例中,Wnt替代分子可以包括单一多肽,或者Wnt替代分子可以包括两个或更多个、三个或更多个或四个或更多个多肽。在某些实施例中,Wnt替代物包括例如彼此连接或结合或彼此融合的一个、两个、三个或四个多肽。

[0128] 当Wnt替代分子包括单个多肽时,其可以是包括一个或多个Fzd结合区(本文也称为“Fzd结合结构域”)和一个或多个LRP5/6结合区(本文也称为“LRP5/6结合结构域”)的融合蛋白。结合区可以直接融合,或者所述结合区通过接头(例如,多肽或化学接头,包含但不限于本文公开的多肽或化学接头中的任一种多肽或化学接头)连接。

[0129] 当Wnt替代分子包括两个或更多个多肽时,多肽可以通过共价键(例如,二硫键)和/或非共价相互作用连接。例如,人免疫球蛋白IgG的重链直接在其CH3结构域的水平处相互作用,而在其CH2结构域的水平处,所述重链通过附接到DE弯曲部中的天冬酰胺(Asn)N84.4的碳水化合物相互作用。

[0130] 可以工程化Wnt替代多肽以促进两个多肽之间的结合。例如,可以将杵臼氨基酸修饰引入两个不同多肽中以促进它们的结合。杵臼氨基酸(AA)变化是在抗体工程化中开发的用于双特异性IgG抗体生产中重链异源二聚化的合理设计策略。工程化AA变化,以便在第一抗体的重链的CH3上产生杵(knob),并且在第二抗体的重链的CH3上产生臼(hole)。杵可以由属于AA的‘非常大’IMGT体积类别的酪氨酸(Y)表示,而臼可以由属于‘小’IMGT体积类别的苏氨酸(T)表示。将修饰引入多肽中以促进其结合的其它手段是本领域已知的和可用的。例如,可以引入特定氨基酸并且将其用于交联,如引入半胱氨酸以形成分子间二硫键。

[0131] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括衍生自抗体或其抗原结合片段(例如,抗体重链或抗体轻链或其片段)的一个或多个结合区。在某些实施例中,Wnt替代分子的一个或多个多肽是抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,Wnt替代物包括两种抗体或其抗原结合片段,例如,一种抗体或其抗原结合片段结合一种或多种Fzd受体并且另一种抗体或其抗原结合片段结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,Wnt替代物包括三种抗体或其抗原结合片段,例如,一种抗体或其抗原结合片段结合一个或多个Fzd受体表位的第一集合,一种抗体或其抗原结合片段结合一个或多个Fzd受体表位的第二不同集合,并且一种抗体或其抗原结合片段结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,Wnt替代物包括四种抗体或其抗原结合片

段,例如,一种抗体或其抗原结合片段结合一个或多个Fzd受体表位的第一集合,一种抗体或其抗原结合片段结合一个或多个Fzd受体表位的第二不同集合,一种抗体或其抗原结合片段结合LRP5和/或LRP6内的第一表位,并且一种抗体或其抗原结合片段结合LRP5和/或LRP6内的不同的第二表位。

[0132] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含多肽,所述多肽包括通过一个或多个二硫键结合在一起的两个抗体重链区(例如,铰链区)。在某些实施例中,Wnt替代分子包含多肽,所述多肽包括通过一个或多个二硫键结合在一起的抗体轻链区(例如,C_L区)和抗体重链区(例如,C_H1)。

[0133] Wnt替代分子可以具有各种不同的结构形式,包含但不限于图1中所示出的结构形式。

[0134] 在一个实施例中,Wnt替代分子包括与VHH或sdAb或其抗原结合片段融合的scFv或其抗原结合片段。在某些实施例中,scFv特异性结合一个或多个Fzd受体表位,并且VHH或sdAb特异性结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,scFv特异性结合LRP5和/或LRP6,并且VHH或sdAb特异性结合一个或多个Fzd受体表位。在特定实施例中,scFv或其抗原结合片段与VHH或sdAb或其抗原结合片段直接融合,而在其它实施例中,两个结合区通过接头部分融合。在特定实施例中,VHH或sdAb与scFV的N端融合,而在其它实施例中,VHH或sdAb与scFv的C端融合。在特定实施例中,scFv在本文中描述或包括本文所述的CDR组中的任一个CDR组。在特定实施例中,VHH或sdAb在本文中描述或包括本文公开的CDR组中的任一个CDR组。

[0135] 在各个实施例中,包含但不限于图1所描绘的那些,Wnt替代分子包括一个或多个Fab或其抗原结合片段以及一个或多个VHH或sdAb或其抗原结合片段(或可替代地,一个或多个scFv或其抗原结合片段)。在某些实施例中,Wnt替代物包括两个或更多个Fab,所述Fab中的每个特异性结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合,并且VHH或sdAb(或scFv)特异性结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,Wnt替代物包括特异性结合LRP5和/或LRP6的Fab以及各自特异性结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合的两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)。在某些实施例中,VHH或sdAb(或scFv)与Fab的N端融合,而在一些实施例中,VHH或sdAb(或scFv)与Fab的C端融合。在特定实施例中,Fab以完整IgG形式存在,并且VHH或sdAb(或scFv)与IgG轻链的N端和/或C端融合。在特定实施例中,Fab以完整IgG形式存在,并且VHH或sdAb(或scFv)与IgG重链的N端和/或C端融合。在特定实施例中,两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)在这些位置的任何组合处与IgG融合,其中两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)中的每一个结合Fzd的不同集合。

[0136] 可以例如使用基因工程以产生包括与Fc区融合的Fab的融合多肽来将Fab转化成包含Fab和Fc片段两者的完整IgG形式,即,Fab以完整IgG形式存在。完整IgG形式的Fc区可以衍生自各种不同的Fc中的任一种,包含但不限于野生型或经修饰的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其它同种型,例如野生型或经修饰的人IgG1、人IgG2、人IgG3、人IgG4、人IgG4Pro(包括防止IgG4半分子的形成的核心铰链区中的突变)、人IgA、人IgE、人IgM或被称为IgG1 LALAPG的经修饰的IgG1。已经表明L234A、L235A、P329G(LALA-PG)变体消除鼠IgG2a和人IgG1两者中的补体结合和固定以及Fc-γ依赖性抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。这些LALA-PG取代允许在小鼠和灵长类动物之间更准确地翻译用“无效应子”抗体框架支架产生的结果。在本文公开的IgG中的任一种的特定实施例中,IgG包括以下氨基酸取代中的

一个或多个:N297G、N297A、N297E、L234A、L235A或P236G。

[0137] 对一个或多个Fzd受体表位和LRP5和/或LRP6均为二价的二价和双特异性Wnt替代分子的非限制性实例被提供为图1所描绘的前四个结构,其中VHH或sdAb或scFv被描绘为红色、蓝色或黄色的单个实心椭圆形,并且Fab或IgG被描绘为蓝色。如所示出的,VHH或sdAb(或scFv)可以与两条轻链的N端、两条重链的N端、两条轻链的C端或两条重链的C端融合。进一步设想的是,例如,VHH或sdAb(或scFv)可以与重链和/或轻链的N端和C端、轻链和重链的N端、重链和轻链的C端、重链的N端和轻链的C端,或重链的C端和轻链的N端融合。在其它相关实施例中,两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)可以任选地通过接头部分融合在一起,并且在这些位置中的一个或多个位置处与Fab或IgG融合。在特定实施例中,两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)可以各自结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合。

[0138] 在相关实施例中,Wnt替代分子具有杂Ig形式,而Fab以半抗体的形式存在,并且一个或多个VHH或sdAb(或scFv)与Fc的N端、Fab的N端、Fc的C端或Fab的C端中的一个或多个融合。在特定实施例中,两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)与Fc的N端、Fab的N端、Fc的C端或Fab的C端融合,其中VHH或sdAb(或scFv)中的每一个结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合。在图1C、1D、1E、1F中描述了这种形式的对于每种受体具有双特异性但单价的版本,可以对所述版本进行修饰以包含两个或更多个Fzd结合区,其中Fzd结合区中的至少两个Fzd结合区结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合。在某些实施例中,Fab或其抗原结合片段(或IgG)与VHH或sdAb(或scFv)或其抗原结合片段直接融合,而在其它实施例中,结合区通过接头部分融合。在特定实施例中,Fab在本文中描述或包括本文所述的CDR组中的任一个CDR组。在特定实施例中,VHH或sdAb或scFv在本文中描述或包括本文公开的CDR组中的任一个CDR组。

[0139] 在各个实施例中,包含但不限于图1V、1W、1X、1AA中描绘的那些,Wnt替代分子包括结合一个或多个Fzd受体表位的一个或多个Fab或其抗原结合片段以及结合LRP5和/或LRP6的一个或多个Fab或其抗原结合片段。在某些实施例中,Wnt替代分子包括结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合的两个Fab或其抗原结合片段和/或结合LRP5和/或LRP6的两个Fab或其抗原结合片段。在特定实施例中,Fab中的一个或多个以完整IgG形式存在,并且在某些实施例中,两个Fab均以完整IgG形式存在。在某些实施例中,完整IgG形式的Fab特异性结合一个或多个Fzd受体表位,而另一个Fab特异性结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,Fab特异性结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合,并且完整IgG形式的Fab特异性结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,Fab特异性结合LRP5和/或LRP6,并且完整IgG形式的Fab特异性结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合。在某些实施例中,Fab任选地通过接头与IgG的N端(例如,重链或轻链N端)融合。在某些实施例中,Fab与IgG的重链的N端融合并且不与轻链融合。在特定实施例中,两条重链可以直接融合或通过接头融合在一起。对两种受体具有这种双特异性且二价的实例在图1V、1W、1X和1AA中示出。在其它相关实施例中,两个或更多个VHH或sdAb可以任选地通过接头部分融合在一起,并且在这些位置中的一个或多个位置处与Fab或IgG融合。在相关实施例中,Wnt替代分子具有杂IgG形式,而Fab中的一个Fab以半抗体的形式存在,并且另一Fab与Fc的N端、Fab的N端、Fc的C端中的一个或多个融合。图1D中描述了这种形式的对于每种受体具有双特异性但单价的版本,可以对所述版本进行修饰以包含一个或多个另外的Fab,其中两个或更多个Fab结合Fzd受体表位的不同集合。在某些实施

例中,Fab或其抗原结合片段与另一Fab或IgG或其抗原结合片段直接融合,而在其它实施例中,结合区通过接头部分融合。在特定实施例中,两个Fab中的一个或两个在本文中描述或包括本文描述的CDR组中的任一个CDR组。

[0140] 在某些实施例中,Wnt替代分子具有PCT申请公布第WO2017/136820号中所述的形式,例如,串联Fab IgG(FIT-IG)形式。Shiyong Gong、Fang Ren、Danqing Wu、Xuan Wu& Chengbin Wu(2017)。FIT-IG还包含"串联Fab免疫球蛋白是一种用于接合多个治疗靶标的新颖且通用双特异性设计(Fabs-in-tandem immunoglobulin is a novel and versatile bispecific design for engaging multiple therapeutic targets)"《单克隆抗体(mAbs)》,9:7,1118-1128,DOI:10.1080/19420862.2017.1345401中所公开的形式。在某些实施例中,FIT-IG通过将两种亲本单克隆抗体的DNA序列重新排列成两种或三种构建体并将它们在哺乳动物细胞中共表达来将两种抗体的功能组合到一个分子中。在PCT申请公布第WO2017/136820号的图1A和1B以及图2A和2B中提供了FIT-IG形式和构建体的实例。在某些实施例中,FIT-IG不需要Fc突变,并且不需要scFv要素,并且不需要接头或肽连接体。每个臂中的Fab结构域"串联"工作,从而形成具有四个活性且独立的抗原结合位点的四价双特异性抗体,所述四个活性且独立的抗原结合位点保留了其亲本抗体的生物学功能。在特定实施例中,Wnt替代物包括Fab和IgG。在某些实施例中,Fab结合体LC例如通过其间各种长度的接头与IgG的HC融合。在各个实施例中,Fab结合体HC可以与IgG的LC融合或不融合。此形式的变体被称为串联Fab IgG(或FIT-Ig)。在某些实施例中,FIT-Ig包括两个或更多个Fzd结合结构域,其中至少两个或Fzd结合区结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合,例如一种或多种Fzd受体的不同集合或一个或多个相同Fzd受体内的一个或多个表位的不同集合。

[0141] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括两个或更多个VHH或sdAb(或scFv),包含结合一个或多个Fzd受体表位的至少一个VHH或sdAb(或scFv)以及结合LRP5和/或LRP6的至少一个VHH或sdAb(或scFv)。在某些实施例中,结合区中的一个结合区是VHH或sdAb,并且另一个结合区是scFv。在特定实施例中,Wnt替代分子包括三个或更多个VHH或sdAb(或scFv),包含结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合的至少两个VHH或sdAb(或scFv)以及结合LRP5和/或LRP6的至少一个VHH或sdAb(或scFv)。包括两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)的Wnt替代分子可以以各种构型形式化,包含但不限于图1K、1L、1M、1N、1O、1P、1Q、1S、1T中所描绘的那些。在某些双特异性二价形式中,两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)任选地通过一个或多个接头与Fc的两个不同端串联融合或融合。在存在接头的情况下,接头和其长度在VHH或sdAb(或scFv)与其它VHH或sdAb(或scFv)之间或在VHH或sdAb与Fc之间可以相同或不同。例如,在某些实施例中,VHH或sdAb与IgG重链的N端和/或C端融合。在特定实施例中,两个或更多个VHH或sdAb在这些位置的任何组合处与IgG融合。这种形式的二价和双特异性Wnt替代分子的非限制性实例被描绘为如图1K、1L、1M、1N、1O、1P、1Q中所描绘的结构,其中第一VHH或sdAb以蓝色描绘,Fc或IgG以蓝色描绘,并且第二VHH或sdAb被描绘为红色。在各个实施例中,VHH或sdAb均可以与Fc的N端、Fc的C端融合,或者一个或多个VHH或sdAb可以与Fc的N端或C端中的任一个或两个融合。在相关实施例中,Wnt替代分子具有杂IgG形式,而一个VHH或sdAb以半抗体的形式存在,并且另一VHH或sdAb与Fc的N端或Fc的C端融合。图1E中描绘了这种形式的对于每种受体具有双特异性但单价的版本。在某些实施例中,VHH或sdAb与另一

VHH或sdAb直接融合,而在其它实施例中,结合区通过接头部分融合。在特定实施例中,VHH或sdAb在本文中描述或包括本文描述的CDR组中的任一个CDR组。在各个实施例中,这些形式中的任一种形式可以包括一个或多个scFv来代替一个或多个VHH或sdAb。

[0142] 在某些实施例中,Wnt替代分子被形式化为双功能抗体。如图1R所示,针对Fzd和LRP的结合体也可以以双功能抗体(或DART)构型连接在一起。双功能抗体也可以呈单链构型。如果双功能抗体与Fc融合,则将产生二价双特异性形式。在不与Fc融合的情况下,这将是单价双特异性形式。在某些实施例中,双功能抗体是由通过小肽接头连接的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)组成的非共价二聚体scFv片段。双功能抗体的另一种形式是单链(Fv)2,其中两个scFv片段彼此共价连接。在特定实施例中,双功能抗体包括两个或更多个Fzd结合区,其中Fzd结合区中的至少两个结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合。

[0143] 在某些实施例中,两个或更多个双功能抗体、scFv和/或VHH或sdAb可以在与Fc融合或不与其融合的情况下以多价形式串联融合(图1A、1B、1F、1U)。在特定实施例中,双功能抗体、scFv和/或VHH或sdAb中的至少一个结合一个或多个Fzd受体表位,并且双功能抗体、scFv和/或VHH或sdAb中的至少一个结合LRP5和/或LRP6。

[0144] 在各个实施例中,包含但不限于图1G或1H中描述的那些,Wnt替代分子包括各自结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合的两个或更多个Fab或其抗原结合片段,以及例如结合LRP5/6的一个或多个VHH或sdAb或其抗原结合片段(或者,可替代地或组合地,一个或多个scFv或其抗原结合片段)。在某些实施例中,第一Fab特异性结合一个或多个Fzd受体表位的第一集合,第二Fab特异性结合一个或多个Fzd受体表位的第二不同集合,并且VHH或sdAb(或scFv)特异性结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,VHH或sdAb(或scFv)与Fab的N端融合,而在一些实施例中,VHH或sdAb(或scFv)与Fab的C端融合。在特定实施例中,Wnt替代分子具有杂Ig形式,如图1G、1H、1AG所描绘的,其中第一和第二Fab各自作为半抗体存在,并且一个或多个VHH或sdAb(或scFv)与Fc的N端、Fab的N端、Fc的C端(例如,图1Y)或Fab的C端中的一个或多个融合。第一和第二Fab可以通过其相应Fc中(例如,CH3结构域内)的杵臼突变彼此连接。

[0145] 如所讨论的,在各个实施例中,Wnt替代分子包括本文公开的一种或多种抗体或其抗原结合片段。因此,在特定实施例中,Wnt替代物包括两个多肽,其中每个多肽包括结合LRP5/6的VHH或sdAb或scFv以及结合一个或多个Fzd受体表位的VHH或sdAb或scFv,任选地,其中结合结构域中的一个结合结构域是scFv并且另一个结合结构域是VHH或sdAb。在特定实施例中,每个多肽包括结合一个或多个Fzd受体表位的不同集合的Fzd结合区。在某些实施例中,Wnt替代物包括三个多肽,其中第一多肽包括抗体重链并且第二多肽包括抗体轻链,其中抗体重链和轻链结合LRP5/6或一个或多个Fzd受体表位,并且其中第三多肽包括与重链Fc区融合的VHH或sdAb,其中VHH或sdAb与LRP5/6或一个或多个Fzd受体表位结合。在其它实施例中,Wnt多肽包括四个多肽,所述四个多肽包含两个重链多肽和两个轻链多肽,其中两个重链和两个轻链结合LRP5/6或一个或多个Fzd受体表位;并且进一步包括与重链和/或轻链中的一个或多个融合的一个或多个VHH或sdAb或scFv,其中VHH或sdAb或scFv与LRP5/6或一个或多个Fzd受体表位结合。在另一个说明性实施例中,Wnt替代物包括至少四个多肽,所述至少四个多肽包含结合LRP5/6或一个或多个Fzd受体表位的两个重链多肽和两个轻链多肽,其中Wnt替代物进一步包括结合LRP5/6或一个或多个Fzd受体表位的Fab。例

如,Fab可以包括各自与两个重链多肽之一融合的两个多肽以及各自与两个轻链多肽之一融合的两个多肽,或者Fab可以包括各自与两个重链多肽之一融合的两个多肽以及各自结合与重链多肽融合的两个多肽之一的两个另外的多肽,从而形成第二Fab。其它构型可以用于产生本文公开的Wnt替代物。在这些形式中的任一种形式的特定实施例中,其包括各自结合Fzd受体表位的不同集合的至少两个或更多个Fzd结合区。

[0146] 在一些实施例中,Fzd结合区与LRP结合区的不同比率(Fzd:LRP)在图1AB、1AC、1AD、1AE、1AF、1AG、1AH、1AI、1AJ、1AK、1AL、1AM中表示。在特定实施例中,一个或多个Fab与一种或多种Fzd受体或同一Fzd受体中的不同表位结合,并且一个或多个VHH或sdAb(或scFv)与一种或多种LRP受体或同一LRP受体中的不同表位结合。

[0147] 在特定实施例中,Wnt替代分子包含形成第一Fzd结合区的第一轻链和第一重链,以及形成第二Fzd结合区的第二轻链和第二重链,其中第一Fzd结合区和第二Fzd结合区与一个或多个Fzd受体表位的不同集合结合。在某些实施例中,所述第一和第二重链彼此连接。例如,第一重链可以包含第一CH3结构域,第二重链可以包含第二CH3结构域,并且第一CH3结构域和第二CH3结构域可以例如通过杵臼突变彼此连接。在某些实施例中,第一重链和/或第二重链包括与SEQ ID NO:110、112、114、116、118、120和122中所示的任一个序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在某些实施例中,第一轻链和/或第二轻链包括与SEQ ID NO:109、111、113、115、117、119和121中所示的任一个序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,一个或多个重链包括与表5中公开的任一个序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,一个或多个轻链包括与表5中公开的任一个序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0148] 在某些实施例中,Wnt替代分子包含第一LRP5/6结合区和/或第二LRP5/6结合区,所述结合区中的每一个结合区可以是或包含Fab或scFv。第一和第二LRP5/6结合区可以结合LRP5/6内的同一表位,或者可以结合LRP5/6内的不同表位。第一LRP5/6结合区可以与第一轻链的N端、第一轻链的C端、第一重链的N端或第一重链的C端融合。第二LRP5/6结合区可以与第二轻链的N端、第二轻链的C端、第二重链的N端或第二重链的C端融合。

[0149] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括与特异性结合一种或多种Fzd受体的多肽融合或结合的Fzd结合区,例如,抗Fzd抗体或其抗原结合片段。在特定实施例中,与一种或多种Fzd受体特异性结合的多肽是抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,其是本文公开的或在于2017年12月19日提交的题为“抗卷曲蛋白抗体和使用方法(Anti-Frizzled antibodies and Methods of Use)”、代理人案卷号为SRZN-004/00US的美国临时专利申请第62/607,877号中公开的抗体或其抗原结合片段,所述美国临时专利申请通过全文引用的方式并入本文。

[0150] 在特定实施例中,Wnt替代分子的至少一个Fzd结合区包含抗体的一个或多个抗原结合片段。例如,一个或多个抗原结合片段可以是或衍生自IgG、scFv、Fab、VHH或sdAb。在某些实施例中,一个或多个抗原结合片段是人源化的。

[0151] 在特定实施例中,Fzd结合区包括针对表1A中提供的与一种或多种Fzd受体结合的说明性抗体或其片段中的任一种抗体或其片段公开的三个重链CDR和/或三个轻链CDR。在特定实施例中,Fzd结合区包括针对表1A中提供的与一种或多种Fzd受体结合的说明性抗体

或其片段中的任一种抗体或其片段公开的三个重链CDR和/或三个轻链CDR,其中CDR共同包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸修饰,例如,取代、缺失或添加。在某些实施例中,Fzd结合区是VHH或sdAb或衍生自VHH或sdAb,因此表1A仅包含三个重链CDR。在特定实施例中,Fzd结合区包括表1A中提供的三个CDR HC序列或变体,其中CDR共同包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸修饰。

[0152] 在特定实施例中,Fzd结合区包括表1B或SEQ ID NO:1-73中提供的与一种或多种Fzd受体结合的说明性抗体或其片段中的任一种抗体或其片段的重链片段和/或轻链片段(或任一者的抗原结合片段或变体)。在某些实施例中,Fzd结合区是Fab或衍生自Fab,因此表1B的重链包含VH和CH1序列,但不包含CH2或CH3序列。在某些实施例中,Fzd结合区是VHH或sdAb或衍生自VHH或sdAb,因此表1B包含VHH结构域。在某些实施例中,Fzd结合区是与这些抗体中的任一种抗体竞争与一种或多种Fzd受体结合的多肽,例如,抗体或其抗原结合片段。

[0153] 在特定实施例中,Fzd结合区包含与表1A、表1B或SEQ ID NO:1-73中所示的任一个序列具有至少90％、至少95％、至少98％、至少99％同一性的氨基酸序列或其抗原结合片段。测定了表1B中列出的克隆的结合特性,并在表1B中示出。重链CDR被指定为CDRH1、CDRH2和CDRH3,并且轻链CDR被指定为CDRL1、CDRL2和CDRL3。

[0154] 表1A:抗Fzd抗体克隆ID和CDR序列

[0155]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
001S-A01	Fzd1	YTFTSYGIS	391	GWISAYNGNTNYA	570	CARASAWTPYGAFDIW	752
001S-B01	Fzd1	GSISSGGYSWS	283	GSIYHSGSTYYN	547	CARFYYDILTGYSYFDYW	818
001S-E01	Fzd1	GSISNYYWS	282	GEIDRSGDTNYN	488	CARVRARRFLVSDRSAFDIW	945
001S-F01	Fzd1	GSISGNNYYZG	281	GSIYFTGGTYYN	546	CARVMLITDAFDIW	942
001S-G01	Fzd1	GSISSSSYYWG	285	GYIYYSGSTYYN	589	CARATYGGDAFDIW	760
001S-H01	Fzd1	GSISSGGYYWS	284	GYIYYSGSTYYN	589	CARHAGFYGLADYFDYW	875
001S-A02	Fzd1	GSISSGGYYWS	284	GYIYYSGSTYYN	589	CARGKGYSYGYGKDWFDPW	845
001S-E02	Fzd1	GSISGNNYYWG	280	GSIYFTGGTYYN	546	CARVMLITDAFDIW	942
001S-G02	Fzd1	GAISGTSYFWG	266	GSIYYTGNTYYN	548	CARIGIAVAAPVDHW	882
001S-H02	Fzd1	GSISSSSYYWG	285	GYIYYSGSTYYN	589	CARATYGGDAFDIW	760
001S-A03	Fzd1	GSISSGGYYWS	284	GYIYYSGSTYYN	589	CARVRDYYDSSGYYYDYFDYW	946
001S-B03	Fzd1	ASFSGHYWT	158	GEIDHTGSTNYE	487	CARGGQGGYDWGHYHGLDVW	835
001S-H08	Fzd5	RAFTDNVMA	329	ATISGGGGSTFDD	466	CAAASSLTSTPYDLW	678
001S-A09	Fzd5	RSFRTNALG	333	AAISWTGGSTYYA	422	CNTVTYTGGSYKNYW	1005
001S-B09	Fzd5	SIDSINAMA	356	AALTSGGITYHA	428	CNVITIVRGMGPRAYW	1006
001S-C09	Fzd5	SIFSINAMG	357	ATIQSGGRTNYA	465	CNVITIVRGMGPRAYW	1006
001S-C07	Fzd8	YTFTSYGIS	391	GWISAYNGNTNYA	570	CARDGTPFYSGSYYGSW	772
001S-D07	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CARVPTSPYDILTGPFDYW	944
001S-E07	Fzd8	ASVSSNSAAWN	159	GRTYYRSKWYNDYA	542	CARWKNYFDPW	953
001S-H07	Fzd8	FTFSSYAMS	228	STISGGGGSTYYA	646	CAKDLVPWGSSAFNIW	704
004S-E05	Fzd5	FTFSTYEMN	243	SGVSWNGSRTHYV	618	CARGQSEKWWSGLYGMDVW	856
004S-E03	Fzd5	GTFSTYAIS	298	GWINSGNGNTKYS	565	CWTGLLWFGESTDAFDIW	1031
004S-G06	Fzd5	GTFTYRYLH	307	GGIIPIFGTGNYA	501	CASSMVRVPYYYGMDVW	964
001S-D09	Fzd8	GPFNLFAMG	272	AGISRTGGNTGYA	445	CASKTTINSGWSREYHYW	958
001S-E09	Fzd8	GPFNLFAMG	272	AGISRTGGNTGYA	445	CASKTTINSGWSREYHYW	958
001S-F09	Fzd8	GFFSSFTMG	268	AAISRNGVYTRFA	409	CNALAPGVRGSW	987
001S-G09	Fzd8	SLFRLNGMG	360	ATISTRGTTHYA	467	CTDEESW	1011
001S-H09	Fzd8	GPFNLLAMG	273	AGISRTGGNTGYA	445	CASKTTINSGWSREYHYW	958
001S-A10	Fzd8	SVVNFVVMG	364	AAITSGGSTNYA	425	CNRVGSREYSYW	1001

[0156]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
001S-B10	Fzd8	RTSDLYTMG	352	AAIGYKVKWNGERTYYL	404	CNAVTYNGYTIW	994
001S-G12	Fzd1	SIFSSNTIY	359	ALITTSGNTNYA	455	CNAGAPAWTYRMGTYYPQFGSW	986
002S-A01	Fzd1	STFSTYAMG	362	AAISGSGENTYYA	408	CVKFGMNLGYSGYDYW	1028
002S-B01	Fzd1	STFSNYAMG	361	AAISWGGGSTFYS	411	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-C01	Fzd1	RMFSNYAMG	331	AAISSGGSGTYYS	410	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-D01	Fzd1	RTDGGYVMG	337	ATVTWRTGTTYYA	469	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-E01	Fzd1	RTFSSAAMG	345	AAISWSGSTAYYA	421	CATLTPYGTVASY	974
002S-F01	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAVNWSGGSTYYA	430	CAAVFLSRNYEIQEYYRYQ	689
002S-G01	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-H01	Fzd1	RSFSTYPMG	336	TVISGSGGSTYYS	676	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-A02	Fzd1	RRFTTYGMG	332	AAVTWRSGSTYYA	436	CYLEGPLDVYW	1032
002S-B02	Fzd1	RTFNRHVMG	341	AAISWSGDSTYYA	415	CAKLGGSSWLREYDYW	724
002S-C02	Fzd1	RTFRAYAMG	342	SAISWSGGSTYYA	603	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-D02	Fzd1	RTFSEYAMG	343	AAISWSGGSTHYA	417	CNADSLRGIDYW	984
002S-E02	Fzd1	FTFREYAMT	199	SGISRDGGRTSYS	613	CAPRVLVTAPSGGMDYW	734
002S-F02	Fzd1	GDFTNYAMA	267	AAVNWRGDGTYYS	429	CAAVFLSRNYEIQEYYRYQ	689
002S-G02	Fzd1	RTFGTWAMG	340	AAISYNGFSTYYS	424	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-H02	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-D03	Fzd1	RTFGSYAMG	339	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-E03	Fzd1	SIFSIYAMG	358	AVVATGGATNYA	481	CNMRGNWYREGRPAEFLSW	1000
002S-F03	Fzd1	RTSSSYAMG	353	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-G03	Fzd1	RTFGSYAMG	339	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-H03	Fzd1	QTFTAYAMG	327	AAISWSGSATHYA	420	CNAWVLVAGSRGTSADYW	996
002S-A04	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAISWSGRSTYYA	419	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
002S-B04	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPNYSWFMPSSSRLIW	682
002S-C04	Fzd1	RRFTTYGMG	332	AAVTWRAGSTYYA	435	CSADKLDYLDDQPFKTWDYW	1010
002S-D04	Fzd1	GTSSTYAMG	309	AAINRSGGSTYYA	405	CAAVFLSRNYEIQEYYRYQ	689
002S-E04	Fzd1	GTFSTYAMG	300	AAISWSGDSTYYL	416	CAAGPIARWYRGDMDYW	681
004S-H04	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GWISTYNGATNYA	577	CARGGAGRFGEGMDVW	826
001S-A04	Fzd5	YTFTSYGIS	391	GWISAYNGNTNYA	570	CASSKEKATYYYGMDVW	963

[0157]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
001S-D03	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CARLDPGYYYGMDVW	886
001S-F03	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GGIIPIFGTANYA	499	CARVIFSTVTTTNDIW	939
004S-E04	Fzd5	YTFSGYYLH	374	GTVTPILGTANYA	549	CARVDGSGYYGIDYW	933
004S-A06	Fzd5	GSFSNYAIS	278	GRIIPILGSANYA	530	CARTYLKAFDIW	930
004S-F04	Fzd5	YTFTNNFMH	383	GRINPNSGGTNYA	537	CARDRFDNWFDPW	788
001S-C03	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CAREGRSRVYGGNSFDYW	808
003S-A01	Fzd1	YIFTDYYMH	368	GGIIPIFGTANYA	499	CARMSSDYYDSSGYYRRGMDVW	895
003S-E01	Fzd1	YIFTDYYMH	368	GGIIPIFGTANYA	499	CARAWKGLWFGEGTFDYW	761
003S-F01	Fzd1	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARLAFDIW	885
003S-A02	Fzd1	YTFTGYYMH	379	GWINAGNGNTTYA	558	CAKDRGNYGDYLDYW	707
003S-C02	Fzd1	FTFSNSDMN	214	ALISYDGSHTYYA	454	CTRGSRIGWFDPW	1015
003S-E02	Fzd1	GTFSSYTIS	296	GGIIPISGKTDYA	505	CARARGGDSPLSL	749
003S-F02	Fzd1	GTFRSYAIN	292	GGIIPIFGTANYA	499	CARGGWRPDYYGSGSYYSFDYW	840
003S-G02	Fzd1	FTFGTYWVT	196	SGITGSGGRTFYA	616	CARMKDWFGAFDIW	894
003S-C03	Fzd1	FTFSRYAMS	220	SYISGDSGYTNYA	658	CARGLVIATNWFDPW	849
003S-D03	Fzd1	YTFTSYYMH	392	GWINTYNGNTNYP	567	CAESLTSTADW	691
003S-E03	Fzd1	YIFTDYYMH	368	GWVNPTTGNTGYA	586	CARNVEGATSFPEFDYW	898
003S-H03	Fzd1	GTFSSYAIS	295	GGIIPIFGTANYA	499	CAKDIGSSWYYYMDVW	701
003S-A04	Fzd1	FTFGTYWVT	196	SGITGSGGRTFYA	616	CARMKDWFGAFDIW	894
003S-C04	Fzd1	FAVSSSYMS	168	ASIWFDGSNQDYA	463	CAPNESGNVDYW	733
003S-D04	Fzd1	FTFSSYAMH	227	SAISGSGGSTYYA	600	CARDHGSSWYQNTDAFDIW	774
003S-G04	Fzd1	FRFISHPIH	177	GRVIPILGVTNYA	545	CASSSDYGDYLKEPNYGMDVW	966
003S-D05	Fzd2	FTFSNYAMT	216	SAIGTGGGTYYA	595	CATAYRRPGGLDVW	969
003S-E05	Fzd2	FTFSSYTMS	236	GRIKSKANGGTTDYA	535	CARGSSSWYDW	863
003S-A06	Fzd2	FTFADYGMH	188	SYISSGSYTIYYS	659	CARGTFDWLLSPSYDYW	865
003S-C06	Fzd2	FTFSNYGMH	217	SAISNSGGSTYYA	601	CTSSFLTGSQPSGYW	1018
003S-G06	Fzd2	FTFSDYGMH	207	SSTSGSGGNSKYS	642	CARHNPGYMGYYYGMDVW	877
003S-H06	Fzd2	GTFSSYTIS	296	GLVDPEDGETIYA	520	CTILPAAAAGTYYYYGMDVW	1012
003S-B07	Fzd2	FTFSDHYMS	205	SSITRTPSGGTTEYA	639	CARDGGYW	768
003S-D07	Fzd2	YTFTNNFMH	383	GIINPSGGSTSYA	513	CARATSLGRRYCSSTSCYPRDAFDIW	759
003S-E07	Fzd2	YTFTNNFMH	383	GWINPNSGGTKYA	563	CARSVGEVGATMLGIGVWYWFDPW	926
003S-A08	Fzd2	FTFSNYAMT	216	SAIGTGGGTYYA	595	CATAYRRPGGLDVW	969
003S-C08	Fzd2	LTVSTNFMS	324	AGIGWDSTNIGYA	440	CARDLVAARPSNWDYW	782
003S-E08	Fzd2	FTFRNSAMH	201	STISGSGGSTYYS	647	CARGGGYSSSW	829
003S-G09	Fzd4	FTFDHNPMN	194	SAIGAGGGTYYA	593	CASPTVTRR	960
003S-C10	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880
003S-D10	Fzd4	FNFGIYSMT	172	SYISGDSGYTNYA	658	CARVGPGGWFDPW	936
003S-E10	Fzd4	FTFSSYAMH	227	AGISASGGSTYYA	442	CARPSTTGTKAFDIW	901
003S-A11	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880
003S-G11	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GRIIPIFGTVNYA	528	CARGARLDYW	820
003S-H11	Fzd4	YTFTGYYMH	379	GGIIPIFGTPHYA	502	CASTDPSSGLDYW	967
003S-C12	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINPNSGGTNYA	564	CARGGSSDVR	838
003S-F12	Fzd4	FTFSSYAMH	227	SVISTSGDTVLYT	652	CARGGSSDVR	838

[0158]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
004S-B01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GIINPSGGSTSYA	513	CAKDGVVR	698
004S-C01	Fzd4	FTFSNHYTS	213	STISSSGGRTFYA	650	CARASRIDGGWPIIDHL	754
004S-D01	Fzd4	FTFTNYAMS	248	SAISGSGGSTYYA	600	CARATGFGTVVFDYW	757
004S-E01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880
004S-F01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARDGVE	773
004S-H01	Fzd4	FTFSNYAMH	215	ALMSPDGTIIYYA	456	CAKGIVGDYGAFDIW	717
004S-B02	Fzd4	FTFSSYGMH	230	SSINNSSRTVFYA	630	CAKDHLAVADAHGR	700
004S-E02	Fzd4	FTFSSYAMH	227	AVISYDGSNEYYA	474	CAGGEVYEL	692
004S-F02	Fzd4	FTFSTYAMH	242	AVISSDGNNKYYT	473	CAAPDVVVTADGYYW	685
004S-G02	Fzd4	FTFANYAMN	190	ALISYDGGTKYYA	453	CAKTLVTSHALHIW	728
004S-H02	Fzd4	FTFANYAMH	189	ALISYDGGNKYYA	452	CAKTLVTSHALHIW	728
001S-E03	Fzd5	GSFSGYYWH	276	GEINHSGSTNYN	489	CARGRRLVRFTVTSAFDIW	858
001S-B05	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GGIIPILGIANYA	504	CARIPKPRGYSYGDNGSW	883
004S-A07	Fzd6	GNFKNYGIT	271	GRIIPALGTANYA	525	CARQYCSGGSCYPDAFDIR	908
004S-B07	Fzd6	FTFSSYSMN	233	GVISKDGDNKYYA	553	CASSRDGYNRLAFDIW	965
004S-A08	Fzd6	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CARDGGDYGMDVW	767
004S-B08	Fzd6	YTFTNNFMH	383	GRINPNSGGTNYA	537	CASQNYYGSGSYPGFDYW	961
004S-D08	Fzd6	YTFTYRYLH	394	GGIIPIFGTANYA	499	CATHDSSGYYSFDYW	973
004S-E08	Fzd6	FSVSSNYMN	187	SAIGTGGGTYYA	595	CTTRTYDSSGYYETQNYYMDVW	1024
004S-G08	Fzd6	FTFSDYYMS	208	AAISYDESNKFYA	423	CARSAVAGAFDIW	916
004S-A09	Fzd6	FTFRDYAMN	198	SGISWNSGSIGYA	615	CARRSGYSGSVYYYYGMDVW	913
004S-B09	Fzd6	FTFSSFGMH	221	AGINWNGGSVVYA	441	CARGPSHQHTFDIW	854
004S-C09	Fzd6	YTFTNNFMH	383	GGFDPEDGETIYA	492	CARVGRGYSFDYW	937
004S-E09	Fzd6	DTFSNYVIS	163	GRISAYNGYKSYA	538	CARSSGYVGWFDPW	924
004S-F09	Fzd6	FTFSNYYTS	218	SYISGAGGSTEYA	657	CARLPRRSGKGSAFDIW	888
004S-H09	Fzd6	GTFSSYTIS	296	GWMNPNSGNTGYA	583	CARVGATSAGGMDVW	935
004S-C10	Fzd6	YIFTDYYMH	368	GLVDPEDGETIYA	520	CAHSDFFSGLSFGDW	693
004S-D10	Fzd6	FTFSNSDMN	214	SSISTSGGSTYYA	637	CARGSYW	864
004S-E10	Fzd6	TTLNKYAIS	365	GRITPVVGVTNYA	539	CALSSSWYGGFDYW	731
004S-F10	Fzd6	GFTFSDHY	269	ALVGYDGSQQFYG	458	CNTGIPMLYW	1003
004S-G10	Fzd6	FTFSDYYMS	208	SAISGSGFTYYA	599	CARVSRGFAFDYW	948
004S-A11	Fzd6	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CARESVNNYYYMDVW	813
004S-C11	Fzd6	FTFSSYAMH	227	ALTSYDGSKKFYA	457	CAKTGRGYAFDIW	726
004S-E11	Fzd6	FTFSSYNMN	232	GRIKSKANGGTTDYA	535	CAKAGQQLDW	696
004S-H11	Fzd6	FTFTSSAMQ	249	GGIIPIFGTANYA	499	CATVQTNYYDSSGRFSYRAHYFDYW	977
004S-A12	Fzd6	YTFTNNFMH	383	GRINPNSGGTNYA	537	CARGQGYSSGWYRGDAFDIW	855
004S-D12	Fzd6	FAFDDYAMH	165	GFIRSKAYGGTTEYA	490	CAKDRGYSSGWYLDYW	708
005S-H01	Fzd7	FNFSSYTMR	173	SVIYGGGNTNYA	653	CARGGSGGNLSYW	836
005S-A02	Fzd7	GTFSSYAIS	295	GMIIPFLGITNYA	521	CTRPYDAFDIW	1016
005S-C02	Fzd8	YTFASYGMH	373	GWINAGNGNTTYA	558	CARLSVWKWEQVTNWFDPW	890
005S-E02	Fzd8	GTFTSYAIS	305	GWINAGNGNTKYS	557	CTTGLFPYYRYNWNNDAFDIW	1022
005S-A03	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWMNPNSGNTGYA	583	CAKWHIGATGNWFDPW	729

[0159]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
005S-H03	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GGIFPIYGISTYA	494	CARDRPTSSWYAFDYW	792
005S-F04	Fzd8	FSFSSTAMS	181	SYISSSGSITHYA	670	CARYGDYGDYW	954
005S-H04	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GWINAGNGNTTYA	558	CARVATGNAFDIW	932
005S-B05	Fzd8	FTFSSYWMH	239	AGISGSGKTTFYA	444	CARGGLLFDYW	831
005S-F05	Fzd8	FTFTSSAVQ	251	GWMNPNSGNTGYA	583	CARRTAVAGTIDYW	914
005S-G05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISPYNGNTNYA	573	CARGGWTNYGGNLDYW	841
005S-H05	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GRINPNSGGTNYA	537	CARVPDFWSGYLDYW	943
005S-D06	Fzd8	YTFTYRYLH	394	GGIIPIFGTANYA	499	CARDSYPYGMDVW	800
005S-F06	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GRVIPILGVTNYA	545	CAREYLGSFDIW	815
005S-A07	Fzd9	FTFTGSAVQ	247	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGFDYW	822
005S-B07	Fzd9	FTFTSSAVQ	251	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGRGQQWLTGYYGMDVW	857
005S-C07	Fzd9	FTFSSYSMN	233	SYIENDGSITTYA	654	CARAPYYYGSGSLFRLDYW	748
005S-D07	Fzd9	GTFNSYAIA	291	GGIIPIFGTANYA	499	CARAGSGYYNFDYW	740
005S-F07	Fzd9	FSFSSYGMH	182	AYINSRGSLMYYA	483	CAKTKLPIW	727
005S-G07	Fzd9	GSFSGYAIN	274	GGIIPIFGTANYA	499	CATGYYYDYYFDYW	972
005S-H07	Fzd9	GTFTNNFMH	303	GLVDPEDGETIYA	520	CARTYRIVGATPRYYYYGMDVW	931
005S-B08	Fzd9	YIFTDYYMH	368	GWINPNSGGTIYA	562	CARGPRDSGYYPGGAFDIW	853
005S-D08	Fzd9	FAFSSHWMH	166	SAIDGSGGSTYYA	592	CARDRQLGWAHWYFDLW	794
005S-G08	Fzd9	YTFTGYYMH	379	GWINAGNGNTTYA	558	CARDRDYW	787
005S-C09	Fzd9	FTFSSYGMH	230	SAIGTGGGTYYA	595	CALLVGAARGISYYYYYGMDVW	730
005S-D09	Fzd9	YTFTSYAMH	389	GWINAGNGNTTYA	558	CARDRPYSSGWYYPAFDIW	793
005S-E09	Fzd9	FNLRRYNMN	175	SRISNSGSLVYYA	627	CARDADSSGYYRYDAFDIW	762
005S-A10	Fzd9	YTFTDYYMH	376	GIINPSGGSTSYA	513	CARHVYGSGTYNNWFDPW	878
005S-D10	Fzd9	YTFTSYYMH	392	GWMSPNSANTGYA	583	CARGGPIHYYYYYYMDVW	834
005S-H10	Fzd9	GAFSTSSIS	265	GRIIPVLGTANYA	534	CAKGGWRSSFDPW	715
005S-B11	Fzd9	YTFTSYDIN	390	GGFDPEDGETIYA	492	CAKAGDWGLYGMDVW	695
005S-C11	Fzd9	FTFTGSAVQ	247	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGFDYW	822
005S-D11	Fzd9	YTFTNNFMH	383	GWINPNSGDTKFA	561	CAREANYDILTGYIRPDAFDIW	806
005S-E11	Fzd9	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTKYS	557	CTTTEYSSSPDYYYGMDVW	1025
005S-G11	Fzd9	GTFTRNSIS	304	GGIIPIFGTANYA	499	CARSSDLRIFDYW	922
005S-H11	Fzd10	YTFASYDIH	372	GWINAGNGNTTYA	558	CARDGIWDIFDYW	769
005S-E12	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GVIFPVYPTPDYA	551	CARGGSTGYYGMDVW	839
005S-F12	Fzd10	GTFSSYAIS	295	GRIVPIVDVVKYA	541	CARDTCSSTSCSPDYW	801
006S-A01	Fzd10	FTFSSYSMN	233	SAIGTGGGTYYA	595	CAREGWFGESPFGMDVW	810
006S-F01	Fzd10	YTFTRYAVH	385	GWISTFNDNTNYA	576	CASPTGMTTNFDYW	959
006S-H01	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GGIIPIFGTANYA	499	CAKGSYYYDSSGYYWDAFDIW	723
006S-A02	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GGIIPLFGTTDYA	507	CARDITGADGMDVW	775
006S-D02	Fzd10	GTFSSYAIS	295	GRIIPTVGTANYA	533	CARDVCSGGSCSPDVW	802
006S-E02	Fzd10	FTFTSSATQ	250	GGIIPIFGTANYA	499	CARDGSSGWYSPNAFDIW	770

[0160]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
006S-H02	Fzd10	FTFRMYGMH	200	SRISPDGRTTTYA	628	CARSPRWYDAFDIW	920
006S-A03	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GWINAGNGNTTYA	558	CARDPIMFGDQPGWFDPW	784
006S-B03	Fzd10	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTKYA	556	CAREGYDFWSGPYAFDIW	811
006S-C03	Fzd10	GTFSSNVIS	293	GGIIPIFGTANYA	499	CARGGYYYGMDVW	843
014S-B01	Fzd1	YIFTDYYMH	368	GGIIPIFGTANYA	499	CARMSSDYYDSSGYYRRGMDVW	895
014S-D01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880
014S-E01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880
014S-G01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWMNPNNGNTTYA	581	CARHYYGSGNYRDW	879
014S-A02	Fzd4	FTFSSNAMH	223	SGISGSGGSTYYA	608	CAKPGIAAAGTNNWFDPW	725
014S-B02	Fzd4	FTFSSYAMH	227	SGISGSGSSTYYA	611	CARPSTTSFGMDVW	902
014S-C02	Fzd5	YTFTSYYMH	392	GRINPNSGGTNYA	537	CARVPDFWSGYLDYW	943
014S-D02	Fzd5	GTFSTYAIS	299	GIINPSGGSTSYA	513	CARAKGSGWYVGSAFDIW	744
014S-E02	Fzd5	FTFSDSYMS	206	GFIRSKAYGGTTEYA	490	CARATQELLLPYGMDVW	758
014S-F02	Fzd5	YTFTSYYMH	392	GRINPNSGGTNYA	537	CARVPDFWSGYLDYW	943
014S-G02	Fzd6	YTFTSYYMN	392	GIISPSGGSTSYA	516	CARWGDYGDLYYFDYW	951
014S-H02	Fzd6	YIFTDYYMH	368	GRINPNSGGTNYA	537	CARARSSGWTDAFDIW	751
014S-A03	Fzd6	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880
014S-B03	Fzd6	FTFSSYNMN	232	GRIKSKANGGTTDYA	535	CARAGDSPDYW	739
014S-E03	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISPYNGYTKYA	574	CARAMWSYGQQNAFDIW	745
014S-G03	Fzd8	FTFTSSAVQ	251	GWMNPNSGNTGYA	583	CARRTAVAGTIDYW	914
014S-H03	Fzd8	YTFTSSAIH	387	GRINPNSGGTNYA	537	CARVKWELAIDYW	940
014S-B04	Fzd8	YIFTDYYMH	368	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGGSRYDFWSGHWYFDLW	837
014S-E04	Fzd8	YTFTGYYMH	379	GRINPNSGGTNYA	537	CARDVPKLVTRGVAYGMDVW	804
014S-F04	Fzd8	YSFTTYGMN	371	GWINAGNGNTTYA	558	CARAAAGSYGGGYW	736
014S-G04	Fzd8	FTFSSYGMS	231	SAISGSGGSTYYA	600	CARDLTPFTQQQLVLGLL	780
014S-H04	Fzd8	FTFTSSAVQ	251	GRIVPAIGFTQYA	540	CARSGYNRRGYFDYW	919
014S-A05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GGIIPIFGTANYA	499	CARVTLGASVDAFDIW	949
014S-B05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWVSPNTGNTVYA	587	CTTDRRYSTYFDLW	1021
014S-C05	Fzd8	YTFASYGMH	373	GWINAGNGNTTYA	558	CARLSVWKWEQVTNWFDPW	890
014S-D05	Fzd8	GTFTSYAIS	305	GWINAGNGNTKYS	557	CTTGLFPYYRYNWNNDAFDIW	1022
014S-F05	Fzd9	FTFTGSAVQ	247	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGCDYW	821
014S-G05	Fzd9	FTFSSSWMH	226	SAIGTGGGTYYA	595	CARKVKGYCSGGSCYGYW	884
014S-H05	Fzd9	FTFSNYAMT	216	STISGSGVSTFYA	648	CARHGRIAADIW	876
014S-A06	Fzd9	FTFZZSZVQ	254	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGFDYW	822
014S-B06	Fzd9	FTFSSYSMN	233	SYIENDGSITTYA	654	CARAPYYYGSGSLFRLDYW	748
014S-C06	Fzd10	FTFTGSAVQ	247	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGFDYW	822
014S-D06	Fzd10	FTFSRYAMH	219	SGIGVGGGTYYA	605	CARDAYNWFDPR	763
014S-F06	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GVIFPVYPTPDYA	551	CARGGSTGYYGMDVW	839
014S-G06	Fzd10	FTFSSYAMH	227	SAIGAGGGTYYA	593	CARDAYNWFDPW	764

[0161]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
014S-H06	Fzd10	FTFSSYDMN	229	SAIGTGGGTYYA	595	CARDAYNWFDPW	764
014S-A07	Fzd10	FTFSNAQMS	210	SAIGTGGGTYYA	595	CAREGSYYDWYFDLW	809
017S-E08	Fzd8	IIFSPNDMG	313	ALISSGGSTSYA	450	CHFGVASVGLNYW	980
017S-H08	Fzd8	RTFSSFVMG	346	AAVSASGGYTWYA	432	CNLAQRGETYW	998
017S-A09	Fzd8	LAFNGYTMG	317	AAISWSDNTYYA	414	CAAGFPTVFVVDGEYDYW	680
017S-B09	Fzd8	FTLDYYAIS	255	ADITSGGSTNYA	437	CNAVTYNGYTIW	994
017S-C09	Fzd8	LTFSDYTVG	319	ASSTGGGVFENYA	464	CNAVTYNGYTIW	994
018S-D06	Fzd4	RIFSSYAQA	330	PRIPSDSTTFYA	590	CEVHNFGATYW	979
018S-E06	Fzd4	RTFSNYVMG	344	AVISRSGGNTYYT	472	CNAVSTDWTTDYW	992
018S-F06	Fzd4	RTFSTYGMG	349	AAISWSDNTYYA	414	CNSFPLRLHDW	1002
018S-G06	Fzd5	LAIDDYYMV	318	SYISTSDGSTYYA	673	CNAVTYNGYSIW	993
018S-H06	Fzd5	LAFNGYTMG	317	AQISWTGGSTDYA	460	CNADYGTWYGIGW	985
018S-A07	Fzd5	LAFNGYTMG	317	AAISWMSNTYYA	412	CNMGLGYSEYRPLGYW	999
018S-B07	Fzd5	SAFSNYAMG	355	AAITWSGARTYYA	426	CNAVWKFGTTHW	995
018S-C07	Fzd7	LTIDDYYVV	323	SYISAGDGFTYYA	656	CNAVTYNGYTIW	994
017S-F09	Fzd4	GSFSGYYWS	277	GEINHSGSTNYN	489	CARDLRFYSSSWRRVGMDVW	778
017S-G09	Fzd4	YTITTYAIH	396	GWINADTGDTAYS	555	CARGWTTISSLGVW	872
017S-H09	Fzd5	NIFRIYAIA	326	AALTGQRTTNYA	427	CNTVTYNAGCYKKYW	1004
017S-A10	Fzd5	LAFNGYTMG	317	ASITWNGRYTYYA	462	CNARLDAVYGHSRYDSW	988
017S-B10	Fzd5	NFFSNYPLG	325	GAISRTGSGTFYA	484	CAAGVTGSWRYW	684
017S-C10	Fzd8	RSFSNYRVA	335	AVSWSVGMTYYA	479	CNAVTYNGYTIW	994
017S-D10	Fzd8	GTFGSYAVG	288	GLISRNAGNTLYA	518	CNAVNGRLNYW	991
017S-E10	Fzd8	RTFSSYSLA	348	AAVSASGANTYYA	431	CAAPQSPNMYIRTDQLWWYKYW	687
018S-D07	Fzd1	RSFSTYPMG	336	TVISGSGGSTYYA	675	CAAGPTLPFRYW	683
018S-E07	Fzd1	RAFSNYAMG	328	AAINWSGDSAYYA	406	CNARLSFAGGMGYW	989
018S-F07	Fzd1	IKSMFDMNFMG	314	AFITRGGTTRYG	438	CNAVSTDWTRDYW	992
018S-G07	Fzd1	LTIDDYYMV	322	SYIGTSDGTTYYA	655	CNAVTYNGYTIW	994
018S-H07	Fzd4	RVFSSYAQA	354	AGIASDSTTFYA	439	CKVHNFGATYW	983
018S-A08	Fzd4	RIFSSYAQA	330	ASIPSDGTTFYA	461	CKVHNFEATYW	982
018S-B08	Fzd4	LTFSTYGMG	321	AAINWSGRSTVYA	407	CNSFPLRLHDW	1002
018S-C08	Fzd4	RTLSSYVVG	351	ALISLSGASTYYA	449	CNAVSTDWTTDYW	992
018S-D08	Fzd5	IKSMFDMNFMG	314	AFITRGGTTRYG	438	CNAVSTDWTRDYW	992
018S-E08	Fzd5	RTDGMQAMG	338	GAITWSLGSAFYA	486	CNVLAQNDGDYRTYG	1007
018S-F08	Fzd5	RTFSSFVMG	346	AAVSASGGYTWYA	432	CNAVWKFGTTHW	995
018S-G08	Fzd5	RTFSSFVMG	346	AAVSASGGYTWYA	432	CNAVCKFGTTHW	990
018S-H08	Fzd5	RTFSSFVMG	346	AAVTASGGYAWYA	434	CNAVWKFGTTHW	995
018S-A09	Fzd8	ITFSFNSVG	316	AVFIAGYGAYYA	470	CNGVTYNGYTIW	997
018S-B09	Fzd8	HDFSSTYGVG	310	ATISWGGTNIA	468	CAAQKPYYNGHFYADDKHYDHW	688
018S-C09	Fzd8	ITFGFDSVG	315	AVFNAGYRAYYA	471	CNAVTYNGYTIW	994
018S-D09	Fzd8	RTFSWYSMG	350	AAVSWSGVSTYYP	433	CNAVTYNGYTIW	994
018S-E09	Fzd8	ITFSFNSVG	316	AVFIAGYGAYYA	470	CIGVTYNGYTIG	981
018S-F09	Fzd8	RTDGMQAMG	338	GAITWSLGIAFYA	485	CNVLAQNDGDYRTYW	1008
018S-G09	Fzd8	HDFSSTYGVG	311	AAISWRGTNIA	413	CAAQKPYYNGHFYADDKHYDHW	688
021S-A01	Fzd8	DSVSSNSAAWN	160	GRAYYKSRWYYDYA	524	CVRDLRPSGDLNFDYW	1029
021S-C01	Fzd1	GSISSGGYSWS	283	GSIYHSGSTYYN	547	CARFYYDILNGYSYFDYW	817

[0162]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
021S-D01	Fzd1	FTFSSYGMH	230	AVISYDGSNKYYA	475	CAKGSVFGLKAGGYADYW	721
021S-E02	Fzd8	YTFTSYGIS	391	GWISAYNGNTNYA	570	CARDGTPFYSGSYYGSW	772
021S-G02	Fzd8	DSVSSNSGAWN	162	GRTYYRSKYYNGYA	544	PRLDYW	1034
021S-A03	Fzd8	DSVSSNSAAWN	160	GRTYYRSKWYNDYA	542	CARSQATGERFDYW	921
022S-H06	Fzd4	FTFSSYAMS	228	SVISTSGGTVLYT	652	CADGSGTSHR	690
022S-A11	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GGIFPIFGTANYA	493	CAKGSYYYDNSGYYWDAFDIW	722
OMP-18R5		GFTFSHYTLS	270	VISGDGSYTYYADSVKG	677	NFIKYVFAN	1033
027S-H02	Fzd5	FTFSSYAMS	228	SAISGSGGSTYYA	600	CAKGLWGPLLNW	718
027S-B03	Fzd8	DSVSSNSATWN	161	GRTYYRSKWYSDYA	543	CTRGNWNVGLANW	1014
027S-E01	Fzd5	RSFSIYNTA	334	AAISWSGGSTYYA	418	CNVITIVRGMGPRAYW	1006
004S-D05	Fzd5	LTFSIYAMH	320	SAISGDGALTYYA	597	CARGVYPYSSKHKPSYYYGMDVW	870
004S-D04	Fzd5	YDFTTYGIH	367	GGVIPAFGATDYS	511	CARGYYYGMDVW	874
004S-B05	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CASGLGYFDYW	957
004S-G03	Fzd5	YTFTNNFMH	383	GGIIPIFGTPHYA	502	CARTLTTPPYYYGMDVW	929
004S-F03	Fzd5	FTFSNSDMN	214	SAIGTGGDTYYA	594	CTRDLYGGYRDYW	1013
004S-C04	Fzd5	YIFTGYYMH	369	GRINPNSGGTNYA	537	CARGGEYSSGWTYYYYYGMDVW	827
004S-B06	Fzd5	YTFTYRYLH	394	GMINPIGGSINYA	522	CARDVMDVW	803
004S-F06	Fzd5	FSVGSNYMT	186	SSISSGNSYIYYA	634	CARGPKTMWEDRPDYW	851
004S-A04	Fzd5	FTFSTYSMI	245	GFIRSKDYGGTTEYA	491	CARLTGGAVAGTHRDYW	892
004S-A05	Fzd5	FTFSSYVMS	237	SAIGTGGGTYYA	595	CARGSSGYYVAW	862
004S-F05	Fzd5	FTFSNHYMS	212	AGVSIDANKKYYA	447	CARDQNDSWYRSDYW	785
003S-C01	Fzd1	GTFSSYAIS	295	GRINPNSGGTNYA	537	CARGSGYDFFDYGMDVW	861
003S-H01	Fzd1	DTFSNYVLS	164	GLVDPEDGETIYA	520	CAKASTPMVQGAPDYW	697
003S-H02	Fzd1	GTFNRYAIT	289	GGIIPIFGTANYA	499	CATTQGVYSSSWYGGGRAFDIW	976
003S-H04	Fzd1	YTFTYRYLH	394	GRINPNSGGTNYA	537	CWGGSYYGDYW	1030
003S-A05	Fzd2	FTFSSYAMH	227	SSISWNSGRVDYA	638	CARGSGIAASGSYW	860
003S-B05	Fzd2	FTFSNAWMS	211	STIAGSGGRTYYS	643	CAKDSIGRRGRGAPQPYYYYGMDVW	709
003S-F05	Fzd2	FSFSTYTMS	184	SRINGDGSSTRYA	624	CARAIVGATGLNRFKAFDIW	743
003S-G05	Fzd2	STFTNAWMS	363	SAIGTGGGTYYA	595	CARDRVTLRGGYSYGTDAFDIW	796
003S-H05	Fzd2	FTLSTYNMN	257	SRINYDGSATTYA	626	CARDRDIVVVPAQRGEGGFDPW	786
003S-A07	Fzd2	FTFSSYAMS	228	SAISGSGGSTYYA	600	CAKGGRDGYKGYFDYW	714
003S-C07	Fzd2	FSFRSYSMS	178	SAIGTGGGTYYA	595	CTTTTVTTSW	1026
003S-F07	Fzd2	FSFSSYGMS	183	SHISSGGATIDYA	619	CARDGGYW	768
003S-G07	Fzd2	FTFSSYWMH	239	SYISGDSGYTNYA	658	CARDNGYCSGGSCYATYYGMDVR	783
003S-B08	Fzd2	FTFSSZZMH	240	AVISYDGSNRZYA	476	CARSYYDSSGYPRKDAF	927

[0163]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
						DIW	
003S-F08	Fzd2	ZSVSSNYMS	401	SRINSDGSTISYA	625	CARARLLGGYYTPDRMDVW	750
003S-H08	Fzd2	FTFNRHALS	197	ALISSNGDHKYYT	451	CARDLMVGRNKLDYW	777
003S-A09	Fzd2	FTFSSSNMN	225	SGISGSGSSTYYA	611	CARGRVWSSRDYW	859
003S-B09	Fzd2	FNIRRZNMZ	174	SAIGTGGGTYYA	595	CARGDSGSYRDYW	823
003S-C09	Fzd2	FTFSSSAMH	224	SGISGSGTTTYYR	612	CARRLIAVAGAEFDPW	912
003S-F09	Fzd4	FTFSNSDMN	214	GRIKSKAYGGTTEYA	536	CARQYYFDYW	909
003S-H09	Fzd4	FTFSSFGMH	221	SVISSGGSPYYA	651	CATASGDFDYW	968
003S-A10	Fzd4	FTFDDYAMH	191	AIVSYDGTYKYYS	448	CARQTRGGTTDGW	907
003S-B10	Fzd4	FTFSSHSTH	222	SAISASGDSTFYA	596	CARPIVGATAFDIW	900
003S-G10	Fzd4	FTZSSYSMN	264	SYSSGNSGYTNYA	674	CARGVVGSGAFDIW	868
003S-B11	Fzd4	FTFSDYYMS	208	SAIDGAGRTYYT	591	CARAIPGDYDYW	742
003S-C11	Fzd4	FTFTSYAMH	252	GGIIPIFGIANYA	496	CARTGRGYYGMDVW	928
003S-D11	Fzd4	FTFSSYSMS	234	SYISGDSGYTNYA	658	CARAGVATIAFDYW	741
003S-F11	Fzd4	FTFDDYGMH	192	SAISGSGGSTYYA	600	CTTPNYYDSR	1023
003S-E12	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880
004S-A01	Fzd4	FTFSTYGMH	244	SYISSSSSAIYYA	671	CARGGLDGPIDYR	830
004S-G01	Fzd4	FTVSSHSMG	260	SLVSFDGSKEHYA	621	CARLGSTPDYW	887
004S-C02	Fzd4	FTFSSYGMH	230	AVISYDGSNKYYA	475	CASDPVTAATR	956
004S-D02	Fzd4	FSFSSYGMS	183	SGISGSGRSTYYA	610	CAKDGYW	699
004S-A03	Fzd4	FTFSSYAMH	227	SGINWNGGSTGYA	606	CARPAGSAQNWFDPW	899
004S-B03	Fzd4	FSFSRYGMS	180	SGVGGSGGSTZYA	617	CARDGSW	771
004S-C03	Fzd4	YTFTSYAIS	388	GIINPSGGSTSYA	513	CARQIGWELMPDIW	906
004S-C05	Fzd5	ZZZTDYYZQ	403	GGMNZNRGNTGYA	510	CANGSYAQHLW	732
004S-G05	Fzd5	FTFSSYWMH	239	STISPSGLYIYQA	649	CAKDKVPYSYGPNFDYW	703
004S-E06	Fzd5	FFFSGYWMS	169	ANIKQDGSEKYYV	459	CARVFPLHDYW	934
004S-C06	Fzd5	FPFSTFSMN	176	AGISWNSGTIDYA	446	CARSGPAAMVYYYYGMDVW	918
004S-E07	Fzd6	FTLSSHHMN	256	SAIGTGGGTYYA	595	CAAPDYW	686
004S-F07	Fzd6	FSFSKKYMT	179	SSIDGNGDHVFYA	629	CARPYYYDSSGYDPMGDYW	904
004S-C08	Fzd6	FTVSSNYMN	261	SAIGTGGGTYYA	595	CAQGTYW	735
004S-F08	Fzd6	FTFDDYYMN	193	SAVSGNGGGTFYA	604	CARGGNYGSGDYW	833
004S-G09	Fzd6	GTLNNHTLS	308	GRIIPIFGTANYA	526	CARDRRGYGMDVW	795
004S-B10	Fzd6	FTFSDYYMS	208	SGINWNSAKIGYV	607	CARIGAGGAFDIW	881
004S-H10	Fzd6	FIFSDYYMS	170	AVITSGGTFKYYA	477	CARNGIAAAEDYW	896
004S-B11	Fzd6	FTFSSSWMH	226	SGISWNSGSIGYA	615	CARYSSGGSLDYW	955
004S-D11	Fzd6	YZFZZZYMH	400	GRINPNSGGTNYA	537	CARARSSGWTDAFDIW	751
004S-F11	Fzd6	FTFSSYAMS	228	SSISGGGRHTYYA	632	CARPYSSSRQGDYW	903
004S-G11	Fzd6	YIFTDYYMH	368	GWINPNSGGTNYA	564	CARDRPGFDPW	790
004S-B12	Fzd6	FTFSSYWIH	238	SYISGDSGYTNYA	658	CAKGIRWFDPW	716
004S-C12	Fzd6	YIFTDYYMH	368	GWMNPNSGNTGYA	583	CASSHYAPGMDVW	962
004S-F12	Fzd7	FTVGNNYMS	258	SSITTTSTLYA	640	CARGKEGRYSNYEAAW	844
005S-B01	Fzd7	FTFRSYGMH	202	SLISGSGDNTNYA	620	CARREPLYSSRRGAFDIW	910
005S-C01	Fzd7	FTFSSYSMS	234	SAISGSGGSTYYA	600	CTRTIVGATPHYW	1017
005S-F01	Fzd7	FTVSSNYMS	262	SAISGSGATTTYA	598	CAKGAGYGSGSWQAAW	711
005S-B02	Fzd8	YSFTNYAMH	370	GRIIPIFGTAZYA	527	CARGTFLEWLLTNYGMDVW	866
005S-D02	Fzd8	GTFSSYVIS	297	GWIGPHNGNTNYA	554	CATGWPRYYYGMDVW	971
005S-G02	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GGIIPIFGTAZYA	500	CARLPYYDFWSGYYGG	889

[0164]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
						RTGFDYW	
005S-H02	Fzd8	YTFTYRYLH	394	GWINAGNGNTTYA	558	CARASLYYDYVWGSYRHYYFDYW	753
005S-B03	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GIINPSGGRTTYA	512	CATSFGGGWIVVDTSLWYW	975
005S-C03	Fzd8	GSFSGYAIS	275	GGIIPIFGTANYA	499	CRVDAFDIW	1009
005S-E03	Fzd8	FTFTSSAVQ	251	GGIIPIFGTANYA	499	CARSSGWQNRFAFDIW	923
005S-F03	Fzd8	YTFTYRYLH	394	GWINAGNGNTKYS	557	CATDLPVRKGFTYYDILTGSYGMDVW	970
005S-B04	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GGIIPIFGTANHA	498	CARGLRYFDWPQGIYYYYGMDVW	848
005S-C04	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GRINPNSGGTNYA	537	CARGGLLFDYW	831
005S-D04	Fzd8	FTFSTYSMS	246	STIGTGGGTYYA	645	CARVGWLRFLDYW	938
005S-G04	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWMSPSSGNAGYA	585	CARNNFLRAFDIW	897
005S-A05	Fzd8	FAFSSYAMS	167	SRIDTDGSTTVYA	622	CARAPSYSSGWYVRW	747
005S-C05	Fzd8	YTFTYYAMH	395	GIINPSGGSTSYA	513	CARELLPMTTVTSPFIW	812
005S-E05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GGIIPIFGTANYA	499	CAIRAFDIW	694
005S-C06	Fzd8	ZTFSZYDMH	402	SSISSSSHYKYYA	635	CARVRSKAVAGTLPKRLFDIW	947
005S-E06	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGNPTSGHIVVVPAATFSDYW	850
005S-G06	Fzd8	GTFSZZTIS	302	GWMNPDSGKTGYA	579	CARWAFPIPNAFDIW	950
005S-H06	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GGIFPIYGISTYA	494	CARDRPSSSWYAFDYW	791
005S-A08	Fzd9	GTFSZYAIS	301	GGIIPIFGTANYA	499	CARGGLLRFGDGWGMGMDVW	832
005S-C08	Fzd9	YTFTDYHMH	375	GWINAGNGNTTYA	558	CARASSWYLHYYYGMDVW	755
005S-E08	Fzd9	FIFSZYAMS	171	SSISAAGAYKYYA	631	CARRGYSSGWRDAFDIW	911
005S-F08	Fzd9	YTFTSYYMH	392	GWINAGNGNTTYA	558	CAKDVNYW	710
005S-H08	Fzd9	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGTPNYA	531	CARDRLAFDYW	789
005S-A09	Fzd9	FAFSSHWMH	166	SAISVSGGTTFYA	602	CARWGKRLRGSPYYFDYW	952
005S-F09	Fzd9	FTFSIYGMH	209	SGISWNSGNIGYA	614	CARGPLPTKIGGHYMDVW	852
005S-B10	Fzd9	FTFSTXWMS	241	AVMYSGGTTYYA	478	CARLSYYYDSSGPKGDAFDIW	891
005S-C10	Fzd9	FSLSSYGMH	185	SSISSSSSYIYYA	636	CARSGMVKWLRSFDYW	917
005S-E10	Fzd9	FTFTSSAMQ	249	GVINPGSGGTSYN	552	CARGYGDYVWGENYFDYW	873
005S-F10	Fzd9	YTLSNYGIS	397	GWISAYNGDTKYA	568	CARFDYFGGMDVW	816
005S-G10	Fzd9	YTFTRYAVH	385	GGIIPFFNTVNYA	495	CAADRSPYYYDSSGYYPDAFDIW	679
005S-A11	Fzd9	FTFSSYDMN	229	SGISWNSGYIGYA	615	CAKGSLLLGYYGMDVW	720
005S-B12	Fzd10	FTZSSYDMH	263	SSISGLGGSTYZA	633	CAREAGTTGGWFDPW	805
005S-D12	Fzd10	FTFSDHYMD	204	STIGPAGDTYYP	644	CARASTSGDYSLW	756
006S-B01	Fzd10	YTFTNYCTR	384	GLVCPSDGSTSYA	519	CARRTSASDIW	915
006S-C01	Fzd10	FTFTZSAVQ	253	GGFDPEDGETIYA	492	CTTDPLELPWYW	1020
006S-E01	Fzd10	YTFTGYYMH	379	GIINPSSGRTDYA	514	CARDLTYYYDSSGHSPLGAFDIW	781
006S-G01	Fzd10	FTFSDFGMN	203	AGISGGGGSTDYA	443	CARDSDFWYYYGMDVW	797
006S-B02	Fzd10	VSFSGYAMH	366	AYINSGSSEMNYA	482	CAREEWELFGMDVW	807

[0165]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
006S-G02	Fzd10	YTVTSYAMH	399	GGIIPIFGTAKYA	497	CAKGGQWLYGMDVW	713
014S-A01	Fzd1	YTFTSYYMH	392	GWVSPSSGNTAYA	588	CARDEGAGYYYYYMDVW	766
014S-C01	Fzd2	FTFSNYAMT	216	SAIGTGGGTYYA	595	CATAYRRPGGLDVW	969
014S-F01	Fzd4	FTFSSYAMH	227	SVISTSGDTVLYT	652	CARGGSSDVR	838
014S-H01	Fzd4	FTFSNYGMH	217	SYISSSSSTIYYA	672	CARAALGYCTGGVCPPVDYW	737
014S-C03	Fzd7	YTFTNNFMH	383	GIIZPGGGRTIYA	517	CAKGDYGALDYW	712
014S-D03	Fzd7	FNFSSYTMR	173	SVIYGGGNTNYA	653	CARGGSGGNLSYW	836
014S-F03	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GGIIPLFGTANYA	506	CARLVVRGGYGMDVW	893
014S-A04	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISSFNGNTKYA	575	CARADDYYDSSGYYYGFDYW	738
014S-C04	Fzd8	FTFSSYTMN	235	SRINGDGSNTNYA	623	CARGWAGFDYW	871
014S-D04	Fzd8	HTFSGYHIH	312	GWINAGNGNTTYA	558	CARDLSPMVRGVISGMDVW	779
014S-E05	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GIISPGGGRTIYA	515	CAKGDYGALDYW	712
014S-E06	Fzd10	FTFGNYDMN	195	SSLSWNSGTIVYA	641	CARDSSSGWYASYYGMDVW	798
027S-C02	Fzd5	YTLTTWYMX	398	GWMNPNSGNTAYA	582	CARGALGMDVW	819
027S-E03	Fzd8	YTFTGHYMH	378	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGTGGFDYW	867
027S-F03	Fzd8	YTFTGHYIH	377	GWMNPISGNTGYA	580	CARSTPFDPW	925
027S-G03	Fzd8	YTFTHSYIH	380	GWINAKSGGTFYA	559	CARGDYDFWSGYHEYYYYGMDVW	824
027S-H03	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GWINPNSGGTNYA	564	CARAPLDGSGSYYVDW	746
027S-A04	Fzd8	YTFTNHFMH	382	GWISPNRGGTNYA	571	CARDCSGGSCYSHFDYW	765
027S-B04	Fzd8	FTVGSWYMS	259	SAIGTGGGTYYA	595	CAKDITPYGDYSILSHW	702
027S-C04	Fzd8	YTFTSHWMH	386	GGIIPIFGTTNYA	503	CARDSSSWYSYYYYYMDVW	799
027S-D04	Fzd8	YTFTTYFMH	393	GWIYPNSGGTKYA	578	CTTDLRYDSSGPAAFDIW	1019
027S-E04	Fzd8	FTFSDHYMS	205	SGISGSGGTTYYA	609	CATYGDFGYFDLW	978
027S-C05	Fzd8	GSFSTSVFG	279	GRIIPLFGTTNYA	532	CVKDRAWGFDYW	1027
027S-D05	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GWINPKSGGTNYA	560	CARGGFVFDYW	828
027S-E05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GMINPSGGSTTYA	523	CARQAGLHCSSTSCYLGNWFDPW	905
027S-F05	Fzd8	GTFNRYGIS	290	GGIIPRLGATDYA	508	CAKGNWAFDIW	719
027S-G05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISPYNGNTKYA	572	CARGVWTTPMGGGGNWFDPW	869
027S-H05	Fzd8	GTFGNYGIN	286	GWINPNSGGTNYA	564	CARETTDYYYGMDVW	814
027S-A06	Fzd8	GTFSSYAIN	294	GVIDPSTGGTNYA	550	CARVLPGDSSGWYRGYYYYYGMDVW	941
027S-C06	Fzd8	GTFTSYPIS	306	GWINTYNGNTIYA	566	CARDLDSGFDLW	776
027S-D06	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISAYNGHTNYA	569	CARGGYSYGTVFDYW	842
027S-E06	Fzd8	YTFTKDYMH	381	GGIIPIFGTANYA	499	CARGLPPAAGGGGYFQHW	847
027S-F06	Fzd8	FTFSSYAMH	227	AVTWYDGSNKYYA	480	CAKDLVPYCSGGSCPPSGW	705
027S-G06	Fzd5	YTFTDYYMH	376	GWMSPNSGNAGFA	584	CARGKSGSFDYW	846
027S-H06	Fzd5	YTFTGHYIH	377	GIINPSGGSTSYA	513	CARGFCSGGSCLWYGMDVW	825
027S-A07	Fzd5	GTFGSYAIT	287	GGIIPIFGTANYA	499	CAKDNGWYFDLW	706
029S-B01	Fzd1	GTFSSYAIS	295	GRINPHNGNTNYA	1461	CARATRVSAAGTVHFQHW	1472
029S-D01	Fzd2	YTFTRYYIH	1452	GWMNPNSGNTGYA	583	CARVRFLEEMDVW	1494

[0166]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
029S-C02	Fzd2	GTFSSYGIS	1457	GIINPSGGSTSYA	513	CARGDIVATMGMKKVDYYYYMDVW	1478
029S-F02	Fzd2	YTFTRYYLH	1453	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGIGYW	1481
029S-H02	Fzd2	GTFSTYAIS	298	GDIIPIFGSANYA	1458	CARELGLGWFDPW	1476
030S-A02	Fzd7	YTFTDYYMH	1449	GWMNPNSGSTGYA	1467	CARGDINYGNFDYW	1477
030S-B02	Fzd3	YTFTDYYMH	1449	GWMNPNSGNTGYA	583	CARQGGSYSMGLDPW	1488
029S-E03	Fzd3	YTFTGYYMH	379	GWINPNSGNTGYA	1463	CARSYYGVIDAFDIW	1492
029S-G03	Fzd3	YTFTNYYMH	1451	GWMNPNSGNTGYA	583	CAREDDFWSGGGMDVW	1474
030S-E03	Fzd3	FTFSDYYMS	1438	SAISGSGHSTYYA	1468	CAREGLRGWSIFDIW	1475
029S-D05	Fzd3	YTFTDHYFH	1447	GWANPSSGNTGTA	1462	CARSRLRWDWYFDLW	1491
030S-H03	Fzd3	FSFSSHAMS	1437	SAIGTGGGTYYA	595	CANPKHYW	1470
029S-B06	Fzd3	YTFSRHYIH	1446	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGGHTGYSSGWYNHW	1479
029S-E06	Fzd3	YWFTASYMH	1455	GWMKPDSGNTGYA	1465	CARRSSSWGWYFDLW	1489
029S-H06	Fzd3	YTFAKYYIH	1444	GWMNPNSGNTGYA	583	CARHKRHTPYAFDIW	1487
029S-G07	Fzd3	YTFTDSYIH	1448	GWISAYNGNTNYA	570	CARGSGYFDLW	1486
029S-H08	Fzd3	YTFTGHYMH	378	GWMNPNSGNTGYA	583	CARVGDYDRFNWYFDLW	1493
029S-F09	Fzd3	GTFSSYAIT	1456	GWISAYNGNTNYA	570	CARANRGLRKNYYYGMDVW	1471
030S-F04	Fzd3	YTFTSSYIH	1454	GIINPSGGGAVYA	1459	CARWTTVVTGAAFDIW	1495
029S-A10	Fzd3	YSFTGYYLH	1442	GWINPNSGGTNYA	564	CARDHGTMIAVAGTFDYYYYMDVW	1473
029S-B11	Fzd3	YTFNGYYMH	1445	GIVNPSGGGTNYA	1460	CARGGNYGRWLQPWYFDLW	1480
029S-D11	Fzd3	HTFTSHYMH	1440	GWMNPNSANAGYA	1466	CARGLGYFDLW	1483
030S-H05	Fzd7	YSFTNYYMH	1443	GWMNPNSGNTGYA	583	CARSPDFWSGEGYFDLW	1490
030S-A06	Fzd7	YMFTGHDMH	1441	GRIIPILGIANYA	529	CARGIHGDYGLDYYYMDVW	1482
029S-C12	Fzd7	YTFTGYYMH	379	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGMEYW	1484
030S-C06	Fzd7	YTFTGYYIH	1450	GWMDPNSGYTGYA	1464	CARGPADFWSGYKNDYFDFW	1485
4A12	Fzd5	GYTFTNYDIN	1439	WIYPRDGSTKYNEKFKG	1469	CVRSAWGFAY	1496
1791	Fzd7	TYAMH	2190	RIRSKSNNYAKNYDDSVKD	2193	ENYGGRFDY	2196
1291	Fzd7	SYAMS	2191	TISDGGSYTRYPDKLKG	2194	VGGRRDYFDY	2197
18R5	Fzd7	GFTFSHYTLS	2192	VISGDGSYTYYADSVKG	2195	NFIKYVFAN	2198

[0167] 表1A,续

[0168]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
001S-A01	Fzd1	SGSSSNIGSHTVS	1156	SNYQRPS	1256	CAAWDGSLFGHWVF	1265
001S-B01	Fzd1	RSSRSLLDTDDGNTYLD	1142	TLSHRAS	1259	CMQSIQLPWTF	1295
001S-E01	Fzd1	SGNTLGSHYVS	1155	QDSKRPS	1246	CQVWDSSTVVF	1431
001S-F01	Fzd1	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSNRAS	1237	CMQGTHWPYTF	1289
001S-G01	Fzd1	TRSSSNIGAGYDVH	1161	GNSIRPS	1220	CGTWDSSLSAWVF	1267
001S-H01	Fzd1	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSKRAS	1236	CMQALQIPPTF	1280
001S-A02	Fzd1	QASQDIGKYLN	1041	DASNLET	1185	CQQNDYLPLTF	1332

[0169]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
001S-E02	Fzd1	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSNRAS	1237	CMQGTHWPYTF	1289
001S-G02	Fzd1	RASQSVGTYLT	1110	DASNRAT	1188	CMQATQFPLTF	1284
001S-H02	Fzd1	TRSSSNIGAGYDVH	1161	GNSIRPS	1220	CGTWDSSLSAWVF	1267
001S-A03	Fzd1	RASRSISSYFN	1128	AASSLQS	1175	CQQADTFPPTF	1314
001S-B03	Fzd1	SGDKVGHKYAS	1154	EDSQRPS	1199	CQAWDSSTDVVF	1301
001S-H08	Fzd5						
001S-A09	Fzd5						
001S-B09	Fzd5						
001S-C09	Fzd5						
001S-C07	Fzd8	QGDSLRTYYAS	1052	GKNNRPS	1219	CNSRDNSGKHKVF	1300
001S-D07	Fzd8	RSSQSLLHSNGFNYVD	1136	FGSYRAS	1206	CMQNLQTPWTF	1291
001S-E07	Fzd8	RASQGIRSDLA	1070	AASTLES	1177	CLQDYSYPRTF	1273
001S-H07	Fzd8	RASQSVSSYLA	1121	GASSRAT	1213	CQQYGSSPPTF	1410
004S-E05	Fzd5	RASQGISSALA	1076	AASALQS	1165	CQQTYSTPRTF	1394
004S-E03	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G06	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
001S-D09	Fzd8						
001S-E09	Fzd8						
001S-F09	Fzd8						
001S-G09	Fzd8						
001S-H09	Fzd8						
001S-A10	Fzd8						
001S-B10	Fzd8						
001S-G12	Fzd1						
002S-A01	Fzd1						
002S-B01	Fzd1						
002S-C01	Fzd1						
002S-D01	Fzd1						
002S-E01	Fzd1						
002S-F01	Fzd1						
002S-G01	Fzd1						
002S-H01	Fzd1						
002S-A02	Fzd1						
002S-B02	Fzd1						
002S-C02	Fzd1						
002S-D02	Fzd1						
002S-E02	Fzd1						
002S-F02	Fzd1						
002S-G02	Fzd1						
002S-H02	Fzd1						
002S-D03	Fzd1						
002S-E03	Fzd1						
002S-F03	Fzd1						
002S-G03	Fzd1						
002S-H03	Fzd1						
002S-A04	Fzd1						
002S-B04	Fzd1						
002S-C04	Fzd1						
002S-D04	Fzd1						
002S-E04	Fzd1						
004S-H04	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
001S-A04	Fzd5	GLSSGSVSTNYYPS	1035	YTNTRSS	1263	CLLYLGRGIWVF	1271
001S-D03	Fzd5	TGTSSDVGGYNSVS	1159	DVTKRPS	1196	CFSYAGSRF	1266
001S-F03	Fzd5	TRSSGSIASNYVQ	1160	ENDKRPS	1202	CQSYDYDHRWVF	1430
004S-E04	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0170]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
004S-A06	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F04	Fzd5	RASQGISSALA	1076	AASTLQS	1179	CQQSYNTPWTF	1351
001S-C03	Fzd5	RSSQSLLRRNGHNYVD	1139	MGSNRAP	1238	CMHGLHPPFTF	1279
003S-A01	Fzd1	RASQGISNNLN	1072	GASTLQS	1215	CQQADSFPPTF	1312
003S-E01	Fzd1	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-F01	Fzd1	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-A02	Fzd1	RASQGISNYLA	1074	EVSSVQG	1204	CQQSYSTPLAF	1370
003S-C02	Fzd1	RASQSIGRWLA	1084	AASRLQS	1171	CQQGFNFPLTF	1325
003S-E02	Fzd1	RASQGISNNLN	1072	TASSLQS	1258	CLQDYSYPYTF	1274
003S-F02	Fzd1	RASQSVSSDLA	1115	GASTRAT	1217	CQQYETWPVLTF	1405
003S-G02	Fzd1	RASESVSSSSFA	1056	GASTRAT	1217	CQQYNNWPPNYTF	1420
003S-C03	Fzd1	QANQDISNYLN	1038	AASSLQS	1175	CQQTYNPPRTF	1389
003S-D03	Fzd1	RASQGISNNLN	1072	AASSLQR	1174	CQQSYSTPFTF	1368
003S-E03	Fzd1	RASQGISNNLN	1072	SASNLQS	1252	CQQSYSPPPYTF	1364
003S-H03	Fzd1	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-A04	Fzd1	RTSERSSISSFA	1148	GASTRAT	1217	CQQYNNWPRNYTF	1420
003S-C04	Fzd1	RASQGISNNLN	1072	KASSLEN	1225	CQQSYSTPHTF	1369
003S-D04	Fzd1	QASQDIGNYLN	1042	DVSNLER	1195	CQHLNSYPPGDTF	1304
003S-G04	Fzd1	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-D05	Fzd2	RSSQSLLHSDGKTYLY	1134	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTR	1293
003S-E05	Fzd2	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTR	1293
003S-A06	Fzd2	RASQGISNNLN	1072	AASRLES	1170	CQQSYSTPLTF	1372
003S-C06	Fzd2	RASQDISSYLA	1065	AASSLQS	1175	CQQSYRTPLTF	1353
003S-G06	Fzd2	RASQSVSSNLA	1116	DASNRAT	1188	CQHRTSWPLTF	1307
003S-H06	Fzd2	RASQRVGNNLA	1083	DASIRAT	1184	CQQYKDWPTF	1415
003S-B07	Fzd2	RASQSVGSYLA	1109	GSSNRAA	1221	CQQYGTSLLTF	1414
003S-D07	Fzd2	QASQGISNNLN	1049	LGSDRAS	1233	CQQSYSTPFTF	1368
003S-E07	Fzd2	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPFTF	1368
003S-A08	Fzd2	RSSQSLLHSDGKTYLY	1134	LGFNRAS	1232	CMQNTHWPLTR	1293
003S-C08	Fzd2	RASQGIRNDLG	1069	GASTLQR	1214	CQQSYSTPRVTF	1374
003S-E08	Fzd2	RSSRSLLHSDGKTYLY	1143	LGSNRAS	1237	CMQSSHWPKTF	1298
003S-G09	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-C10	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-D10	Fzd4	RASQGISSYLA	1076	AASNLLG	1167	CQQTYSTPWTF	1396
003S-E10	Fzd4	RASQSIGSNLD	1085	AASTLET	1178	CQQSYSVPDTF	1380
003S-A11	Fzd4	RASQSISZYZN	1103	ZASSLQS	1264	CQQSYSTPLTF	1372
003S-G11	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-H11	Fzd4	RASQSIGSNLD	1085	DASSLES	1189	CQQSFIMPLTF	1341
003S-C12	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-F12	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-B01	Fzd4	RAIQSISSYLN	1054	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-C01	Fzd4	RASQDIRDELA	1062	AASTLQS	1179	CQQADSFPLTF	1311
004S-D01	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E01	Fzd4	ZACLRIISYLN	1163	FASSLQS	1205	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F01	Fzd4	RASQGISNWLA	1073	DASSLQS	1190	CQQSHITPYTF	1344
004S-H01	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-B02	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E02	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F02	Fzd4	RASQGISSALA	1076	AASTLQS	1179	CQQANTVPFTF	1322
004S-G02	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-H02	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
001S-E03	Fzd5	TGSSSNIGAGFGVH	1158	SDRNRPS	1255	CQSYDSSLRASVF	1429
001S-B05	Fzd5	RSSQSLLHSNGNTYLD	1137	LGSDRTS	1234	CMQSLQTPYTF	1297
004S-A07	Fzd6	RASQDIRSALA	1063	QASSLIS	1245	CQQSYSMPQTF	1361
004S-B07	Fzd6	QASQDIRNYLN	1043	AASSLQS	1175	CQQSSRFWTF	1347

[0171]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
004S-A08	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-B08	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D08	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E08	Fzd6	RSSRSLLHSNGNTYLQ	1144	LGSNRAS	1237	CVQTTQSPLTF	1434
004S-G08	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A09	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-B09	Fzd6	RASQGISSALA	1076	AASSLQS	1175	CQQSYSHTAFTF	1357
004S-C09	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E09	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F09	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-H09	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-C10	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D10	Fzd6	RASQNINNYLA	1081	RASTLQS	1249	CQQYSSYPYTI	1425
004S-E10	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F10	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G10	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A11	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-C11	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E11	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-H11	Fzd6	RASQSISRWLA	1094	AASSLQS	1175	CQQYVSYPLTF	1426
004S-A12	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D12	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-H01	Fzd7	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-A02	Fzd7	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-C02	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-E02	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-A03	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-H03	Fzd8	RASQGISNNLN	1072	DASTLQT	1193	CQQSFSAPITF	1342
005S-F04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-H04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-B05	Fzd8	QASQDISNYLN	1046	KASSLES	1226	CQQSYSTPRTF	1373
005S-F05	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-G05	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-H05	Fzd8	RASQGISRTLZ	1075	AASSLQS	1175	CQQTYSMPITF	1392
005S-D06	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-F06	Fzd8	RASQSVGSNLA	1108	GASSRAT	1213	CQQYGSSPPFTF	1409
005S-A07	Fzd9	RASQSVSRNLA	1114	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
005S-B07	Fzd9	RASQGISSALA	1076	GASTLQS	1215	CLQDYNYPFTF	1272
005S-C07	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D07	Fzd9	RASQSINRWLA	1090	AASSLQS	1175	CQQTYNIPITF	1388
005S-F07	Fzd9	RASQSINRNYLG	1089	AASSRVT	1176	CQQYDSWPPTF	1402
005S-G07	Fzd9	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CQHYYNLPLTF	1309
005S-H07	Fzd9	RASQTINNQLA	1125	KASNLET	1224	CQQANSFPVTF	1318
005S-B08	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D08	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-G08	Fzd9	QTSQDINNNLN	1053	KASSLES	1226	CQQSYSSPPTF	1366
005S-C09	Fzd9	QASQDISNYLN	1046	AASTLQS	1179	CLQHKSFPTF	1276
005S-D09	Fzd9	RASQSVSSNQLA	1117	GASTRAT	1217	CQQRYNWPPSITF	1339
005S-E09	Fzd9	RASQSVSSNLA	1116	DASNRAT	1188	CQQRNNWLYTF	1334
005S-A10	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D10	Fzd9	RASQGISNNLN	1072	AASTLQS	1179	CQQTNLFPYTF	1385
005S-H10	Fzd9	RASQSVSSNLA	1116	GASTRAT	1217	CQQYNSWPLTF	1421
005S-B11	Fzd9	RASQSISRWLA	1094	AASSLQS	1175	CQQTNTFPFTF	1386
005S-C11	Fzd9	RASQSVSRKLA	1113	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
005S-D11	Fzd9	RASQSLRSKLA	1106	GASTRAT	1217	CQQYANSPWTF	1401

[0172]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
005S-E11	Fzd9	QASQDISNYLN	1046	GASTLQS	1215	CQQLSRYPSLF	1331
005S-G11	Fzd9	RASQSVSSNLA	1116	GASNRPT	1209	CQQYGSSPYTF	1413
005S-H11	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-E12	Fzd10	RASQSVGRWMA	1107	AASSLQS	1175	CQQANTFPFTF	1321
005S-F12	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-A01	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-F01	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-H01	Fzd10	RASQGISNNLN	1072	AASNLET	1166	CQQTSSTPLTF	1387
006S-A02	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-D02	Fzd10	RASQGISNNLN	1072	DASSLES	1189	CQQTYNTPRTF	1390
006S-E02	Fzd10	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CLQHNGYPITF	1277
006S-H02	Fzd10	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	RVSSRFS	1251	CMQGTHWPPTF	1288
006S-A03	Fzd10	RASESVSSNLA	1055	GASSRAT	1213	CQQYNKSPSF	1419
006S-B03	Fzd10	RASQTISRYLN	1126	EVSSLQG	1203	CQQSYSTPWTF	1378
006S-C03	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-B01	Fzd1	RASQGISNNLN	1072	GASTLQS	1215	CQQADSFPPTF	1312
014S-D01	Fzd4	RASQSISSHZN	1096	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-E01	Fzd4	RASQSIZZYZN	1105	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-G01	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPFTF	1368
014S-A02	Fzd4	RASQGISSALA	1076	GASTVES	1218	CQQSYSTPRTF	1373
014S-B02	Fzd4	RASQSVSSNLA	1116	GASTRAT	1217	CQQYDTPLRTF	1403
014S-C02	Fzd5	RASQGISSALA	1076	AASSLQS	1175	CQQTYSMPITF	1392
014S-D02	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-E02	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-F02	Fzd5	RASQGVSTZLS	1079	AASSLQS	1175	CQQTYSMPITF	1392
014S-G02	Fzd6	RASQGISSALA	1076	ATSTLQS	1183	CQQVNSYPPTF	1399
014S-H02	Fzd6	RASQSVSSWLA	1120	AASTLQT	1180	CQQSYSTPTF	1376
014S-A03	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-B03	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-E03	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-G03	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-H03	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-B04	Fzd8	RASQGISNYLA	1074	AASSLQS	1175	CQQSYSTPFTF	1368
014S-E04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-F04	Fzd8	RASQGISNNLN	1072	EASSVAS	1197	CQQSYTSTPLNSF	1381
014S-G04	Fzd8	RASQSVSGYLA	1112	GASTRAA	1216	CQQYNYWPPAF	1423
014S-H04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A05	Fzd8	RASQGISNNLN	1072	DASSLES	1189	CLQHNSLPFTF	1278
014S-B05	Fzd8	RASQSVSSNLA	1116	GVSNRAT	1223	CQQYNIWPRTF	1418
014S-C05	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-D05	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-F05	Fzd9	RASQZVSRZZA	1127	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
014S-G05	Fzd9	RVSQGISSALA	1151	AASSLQS	1175	CQQTFSVPWTF	1384
014S-H05	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A06	Fzd9	RASQSVSRNLA	1114	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
014S-B06	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-C06	Fzd10	RASQSVSRNLA	1114	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
014S-D06	Fzd10	RASQSISRYLN	1095	AASSLQS	1175	CQQRYSTPLTF	1340
014S-F06	Fzd10	RASQSVGRWMA	1107	AASSLQS	1175	CQQANTFPFTF	1321
014S-G06	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-H06	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A07	Fzd10	RASQNIGSRLA	1080	GASNRAS	1208	CQQYNHWPPLFTF	1417
017S-E08	Fzd8						
017S-H08	Fzd8						
017S-A09	Fzd8						

[0173]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
017S-B09	Fzd8						
017S-C09	Fzd8						
018S-D06	Fzd4						
018S-E06	Fzd4						
018S-F06	Fzd4						
018S-G06	Fzd5						
018S-H06	Fzd5						
018S-A07	Fzd5						
018S-B07	Fzd5						
018S-C07	Fzd7						
017S-F09	Fzd4	RSSRSLLHTSGYNYLD	1147	LGSNRAS	1237	CMQGTRWPTF	1290
017S-G09	Fzd4	RSSRSLLHTNGYNYLD	1146	LGSNRAS	1237	CMQALQTPLTF	1281
017S-H09	Fzd5						
017S-A10	Fzd5						
017S-B10	Fzd5						
017S-C10	Fzd8						
017S-D10	Fzd8						
017S-E10	Fzd8						
018S-D07	Fzd1						
018S-E07	Fzd1						
018S-F07	Fzd1						
018S-G07	Fzd1						
018S-H07	Fzd4						
018S-A08	Fzd4						
018S-B08	Fzd4						
018S-C08	Fzd4						
018S-D08	Fzd5						
018S-E08	Fzd5						
018S-F08	Fzd5						
018S-G08	Fzd5						
018S-H08	Fzd5						
018S-A09	Fzd8						
018S-B09	Fzd8						
018S-C09	Fzd8						
018S-D09	Fzd8						
018S-E09	Fzd8						
018S-F09	Fzd8						
018S-G09	Fzd8						
021S-A01	Fzd8	RASQSIGSSLH	1087	YASQSVS	1260	CHQSGRVPVTF	1268
021S-C01	Fzd1	RSSRSLLDTDDGNTYLD	1142	TLSHRAS	1259	CMQSIQLPWTF	1295
021S-D01	Fzd1	RSSQSLVHSDGNTYLS	1140	KISNRFS	1230	CMQATQFPHTF	1283
021S-E02	Fzd8	QGDSLRTYYAS	1052	GKNNRPS	1219	CNSRDNSGKHKVF	1300
021S-G02	Fzd8	RSSQSLLDSDDGNTYLD	1133	MLSSRAP	1240	CMQRLEFPYTF	1294
021S-A03	Fzd8	RSSQNIFQSLN	1131	SASSLQS	1254	CQQSYNSPITF	1349
022S-H06	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
022S-A11	Fzd10	RASQGISNNIN	1071	AASNLET	1166	CQQTYSIPFTF	1391
OMP-18R5		SGDKLGKKYAS or SGDNIGSFYVH	1152 or 1153	EKDNRPSG or DKSNRPSG	1200 or 1201	SSFAGNSLE or QSYANTLSL	1435 or 1436
027S-H02	Fzd5	RASQSVSSNYLS	1118	GASSRAP	1212	CQQRTNWPPRVTF	1337
027S-B03	Fzd8	SGTSSNIGAGYDVH	1157	GNNNRPS	1219	CSAWDDNLNGVVF	1432
027S-E01	Fzd5						
004S-D05	Fzd5	QASQDISNYLN	1046	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLFTF	1371
004S-D04	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0174]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
004S-B05	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G03	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F03	Fzd5	KSSQSLLHSDGYTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQGLQTPWTF	1286
004S-C04	Fzd5	RATQTISTYLN	1129	AASRLQS	1171	CQQYYSYPWTS	1427
004S-B06	Fzd5	RASQGISNNLN	1072	AASALQS	1165	CQHLNNFPLTF	1303
004S-F06	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A04	Fzd5	RASQGISNNLN	1072	GASSLQS	1211	CQQSHSSPRTF	1346
004S-A05	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F05	Fzd5	RSSQSLLHSDGYTYLY	1135	LGSHRAS	1235	CMQGLQTPHTF	1285
003S-C01	Fzd1	RASQSISNNLN	1092	AASSLQS	1175	CQQSYNTPFTF	1350
003S-H01	Fzd1	RASQSIGSNLD	1085	AASTLQS	1179	CQQNYATPRTF	1333
003S-H02	Fzd1	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-H04	Fzd1	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CQQANSFPITF	1316
003S-A05	Fzd2	TSSQSLLHSDGKTYLY	1162	LGSNRAS	1237	CMQGTHWPYTF	1289
003S-B05	Fzd2	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQSLQSPLTF	1296
003S-F05	Fzd2	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTR	1293
003S-G05	Fzd2	RSSRSLLHSNGNTYLR	1145	LASRRAS	1231	CIQNTHWPLTR	1270
003S-H05	Fzd2	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	MGSYRAS	1239	CMQGTHWPLTF	1287
003S-A07	Fzd2	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTL	1292
003S-C07	Fzd2	RTSQSVSSNLA	1150	DASNRAS	1187	CQQYGSSPYNF	1412
003S-F07	Fzd2	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-G07	Fzd2	RASQAISSYLA	1060	KASTLDT	1228	CQQADTFPFTF	1313
003S-B08	Fzd2	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQTLKAPLTF	1299
003S-F08	Fzd2	RSSQYLSSAYLA	1141	GASSRAT	1213	CQQYGSSPTF	1411
003S-H08	Fzd2	QASQGISNNLN	1049	AASSLQS	1175	CQQSYSTPAFTF	1367
003S-A09	Fzd2	RSSQSLLHSDGYTYLY	1135	LGSNRAS	1237	CMQGTHWPLTF	1287
003S-B09	Fzd2	RSSESLLHSDGKTYLY	1130	LGSNRAS	1237	CTQTVQFPITF	1433
003S-C09	Fzd2	RASQGISNNLN	1072	SASNLQS	1252	CQQSYSTPWTF	1378
003S-F09	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-H09	Fzd4	RASQSIGSNLN	1086	RASTLES	1248	CQQTYTTPRF	1398
003S-A10	Fzd4	RASQGISNNLN	1072	YASSLQS	1262	CQQSHSPPGTF	1345
003S-B10	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-G10	Fzd4	RASQSIVSYLN	1104	DASNLQS	1186	CQQGYSAPWTF	1329
003S-B11	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-C11	Fzd4	RASQSIGSNLD	1085	AASTLQS	1179	CQQSYSTPRTF	1373
003S-D11	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-F11	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-E12	Fzd4	ZPZQTZZSHLN	1164	PASSLQS	1242	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A01	Fzd4	RASQGISNNLN	1072	AASTLQS	1179	CQQGNNFPFTF	1326
004S-G01	Fzd4	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CQQYYTYPYTF	1428
004S-C02	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D02	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A03	Fzd4	RASQGISNNLN	1072	DASNLET	1185	CHQSYSIPRTF	1269
004S-B03	Fzd4	RASQDVDTWLA	1066	DASTLET	1191	CQQGYNIPWTF	1328
004S-C03	Fzd4	QASQDISSYLN	1047	AASTLQS	1179	CQQAISFPLTF	1315
004S-C05	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G05	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E06	Fzd5	QASQDISNYLN	1046	KASSLES	1226	CQQANSFPYTF	1319
004S-C06	Fzd5	RSSQNVSSYLA	1132	GASTRAT	1217	CQHRANWPQTF	1305
004S-E07	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F07	Fzd6	QASQDITNYLN	1048	KASTLES	1229	CQQSYSAPYTF	1356
004S-C08	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F08	Fzd6	RASQSISZWLA	1102	EASTLQS	1198	CQQTYTPPFTF	1397
004S-G09	Fzd6	RASQAISNSLA	1058	DASNLET	1185	CQQAYSFPWTF	1324
004S-B10	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0175]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
004S-H10	Fzd6	RASQSISTYLS	1101	GASSLES	1210	CQQSYSPPFTF	1362
004S-B11	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D11	Fzd6	RASQSVSSWLA	1120	AASTLQT	1180	CQQSYSTPTF	1376
004S-F11	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G11	Fzd6	RASQSVSSYLA	1121	GASSRAT	1213	CQQYAISYTF	1400
004S-B12	Fzd6	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-C12	Fzd6	RASQGISSYLA	1076	RTSTLES	1250	CQQSYSTPWTF	1378
004S-F12	Fzd7	RASQSISSYLN	1098	AASTLQT	1180	CQQSYSIPFTF	1358
005S-B01	Fzd7	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-C01	Fzd7	RASQGISNNLN	1072	KASSLQS	1227	CQQSYSLPYTF	1360
005S-F01	Fzd7	RASQSVSSSYLS	1119	GASSRAT	1213	CQQRYKSYTF	1338
005S-B02	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D02	Fzd8	RASQSVSSNLA	1116	NTSNRAT	1241	CQHYNNWPFTF	1308
005S-G02	Fzd8	RASQSVSTNLA	1122	DASNRAT	1188	CQQRSNWPPQITF	1336
005S-H02	Fzd8	QASQDISHYLN	1044	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-B03	Fzd8	RASQSINSNLA	1091	GASSRAT	1213	CQQYGSSPYTF	1413
005S-C03	Fzd8	RASQSVSSSYLS	1119	DTSNRAT	1194	CQQYGSSPITF	1408
005S-E03	Fzd8	RTSQSISSYLN	1149	AASTSQS	1181	CQQSFSSWTF	1343
005S-F03	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-B04	Fzd8	QASHDINIALN	1039	AASSLQS	1175	CQQSYSSPLTF	1365
005S-C04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-G04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-A05	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-C05	Fzd8	RASQGISNNLN	1072	RASSLQS	1247	CQQANSYPLTF	1320
005S-E05	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-C06	Fzd8	RASQSVSSSYLS	1119	AASRRAT	1172	CQQYSNWPFTF	1424
005S-E06	Fzd8	QASQDISNRLN	1045	SASRLQI	1253	CQQSYRTPRTF	1354
005S-G06	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-H06	Fzd8	RASQGISNNLN	1072	DASTLQT	1193	CQQSFSAPITF	1342
005S-A08	Fzd9	RASQSISSKSLA	1097	GASTRAT	1217	CQQYGIAPTF	1407
005S-C08	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-E08	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-F08	Fzd9	QASQGISNYLN	1050	AASSLQS	1175	CQQTYSTPTTF	1395
005S-H08	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-A09	Fzd9	RASQSIGSNLD	1085	RASTLQS	1249	CQQSYSTPSF	1375
005S-F09	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-B10	Fzd9	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CQQGNNFPLTF	1327
005S-C10	Fzd9	RASQDIGSFLA	1061	AASSLQS	1175	CQKYNRAPFTF	1310
005S-E10	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-F10	Fzd9	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-G10	Fzd9	RASQGISNNLN	1072	QASSLDS	1244	CQQSYNVPYTF	1352
005S-A11	Fzd9	RASQSISNNLN	1092	DASTLKR	1192	CQQSYNTPRTF	1350
005S-B12	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D12	Fzd10	RASQSVSTSYLA	1123	GASTRAT	1217	CQQYGASPWTF	1406
006S-B01	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-C01	Fzd10	RASQGISSALA	1076	SASNLQS	1252	CQQAISFPLTF	1315
006S-E01	Fzd10	RASQSVTSSLA	1124	GASTRAT	1217	CQQYNDWPPTF	1416
006S-G01	Fzd10	KSSQSVLYSSNNKNYLA	1037	STNTRSS	1257	CQHRNFF	1306
006S-B02	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-G02	Fzd10	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A01	Fzd1	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-C01	Fzd2	RSSQSLLHSDGKTYLY	1134	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTR	1293
014S-F01	Fzd4	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-H01	Fzd4	RASQGISNNLN	1072	AASRLQS	1171	CQQSYSPPLTF	1363

[0176]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
014S-C03	Fzd7	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-D03	Fzd7	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-F03	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-C04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-D04	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-E05	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-E06	Fzd10	RASQSISRYLN	1095	AASSLQS	1175	CLQHHSYPFTF	1275
027S-C02	Fzd5	QASQDISNYLN	1046	AASSLHT	1173	CQESYSSPYTF	1302
027S-E03	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPYTF	1379
027S-F03	Fzd8	RASHDIGTFLA	1057	AASTLQS	1179	CQQSYRTPYTF	1355
027S-G03	Fzd8	QATQNIKKYLN	1051	KASTLES	1229	CQQSYSTPLTF	1372
027S-H03	Fzd8	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSNRAS	1237	CMQALQTPQTF	1282
027S-A04	Fzd8	RASQSISRSLA	1093	AASNLQS	1169	CQQAYSFPQTF	1323
027S-B04	Fzd8	RASQAISNYLN	1059	AASSLQS	1175	CQQTFSPPLTF	1383
027S-C04	Fzd8	RASQGINNYLA	1067	QASNLES	1243	CQQTYSSPLTF	1393
027S-D04	Fzd8	QASQDIDNYLN	1040	AASSLQS	1175	CQQSYSTPVTF	1377
027S-E04	Fzd8	RASQGIRNDLG	1069	AASTLQS	1179	CQQAYSFPWTF	1324
027S-C05	Fzd8	RASQGIRNDLA	1068	AASSLQR	1174	CQQSYSKPTF	1359
027S-D05	Fzd8	QASQDISNYLN	1046	ASSTLQT	1182	CQQSYSAPYTF	1356
027S-E05	Fzd8	RASQGITKSLA	1077	AASNLQL	1168	CQQYNTFPITF	1422
027S-F05	Fzd8	RASQSISTYLA	1100	GASTRAT	1217	CQQYGSSPTF	1411
027S-G05	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	YASSLQN	1261	CQQSYSTPFTF	1368
027S-H05	Fzd8	RASQSIGTYLN	1088	DASNLET	1185	CQQANSFPLTF	1317
027S-A06	Fzd8	RASQGISNNLN	1072	KASSLES	1226	CQQANSFPITF	1316
027S-C06	Fzd8	RASQGVGDYLA	1078	DASNLQS	1186	CQQHNAYPLTF	1330
027S-D06	Fzd8	RASQDISSWLA	1064	KASTLES	1229	CQQSYGAPLTF	1348
027S-E06	Fzd8	RASQNVNDWLA	1082	SASNLQS	1252	CQQSYSTPFTF	1368
027S-F06	Fzd8	RASQSISSYLN	1098	GASNLQS	1207	CQQSYSTPLTF	1372
027S-G06	Fzd5	RASQSVNNTYVA	1111	GTSTRAT	1222	CQQYDTSPPTF	1404
027S-H06	Fzd5	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYTTPFTF	1382
027S-A07	Fzd5	RASQSISTNVN	1099	AASSLQS	1175	CQQSYSTPYTF	1379
029S-B01	Fzd1	KSSQSVLHSSNNKNYLA	1498	STNTRSS	1257	CQQYYSTPFTF	1544
029S-D01	Fzd2	RASQSLSSWLA	1512	DASTLQS	1520	CQQAISFPLTF	1315
029S-C02	Fzd2	RASQDISNNLN	1500	GASHLQT	1522	CQQANSFPVTF	1318
029S-F02	Fzd2	RASQGISNYLA	1074	AASRLQT	1515	CLQYNTYPWTF	1528
029S-H02	Fzd2	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSSRAS	1525	CMQALQTPLTF	1281
030S-A02	Fzd7	RASQSISSYLN	1098	KASTLHN	1523	CQQAISFPLTF	1315
030S-B02	Fzd3	RASQSITTYLN	1511	KTSSLQS	1524	CQQGDSFPYTF	1531
029S-E03	Fzd3	RASQSISSYLN	1098	AASSLQT	1516	CQQSFRLPLTF	1532
029S-G03	Fzd3	RASQSIISYLN	1509	AASSLQS	1175	CQQSWRFPYTF	1535
030S-E03	Fzd3	KSSQSVLYSSNNKNYLA	1037	WASTRES	1526	CQQYYSTPPTF	1545
029S-D05	Fzd3	RASQTISSYLN	1513	DASNLET	1185	CQQSYSIPLTF	1536
030S-H03	Fzd3	RASQGVSTYLA	1505	AASSLQS	1175	CQQYYSSPQTF	1543
029S-B06	Fzd3	RASQSVSSWLA	1120	AASSLQS	1175	CQQAFRFPPTF	1529
029S-E06	Fzd3	RASQNINSWLA	1506	AASSLQS	1175	CQQYYSFPLTF	1542
029S-H06	Fzd3	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSHSTPLTF	1533
029S-G07	Fzd3	RASQSISKWLA	1510	GASTLQS	1215	CQQAYSFPWTF	1324
029S-H08	Fzd3	RASRTVYNFLA	1514	DASNLRT	1519	CQQSYSTPPTF	1537
029S-F09	Fzd3	RASQSIARYLN	1507	GASSLQS	1211	CQQSYNTPWTF	1351
030S-F04	Fzd3	RASQGIRNDLN	1502	DASNLGT	1518	CQQSSRIPPTF	1534
029S-A10	Fzd3	RASQGISKYLA	1503	AASSLQS	1175	CQQSYSTPWTF	1538
029S-B11	Fzd3	QASQDISNYLN	1046	GASALRS	1521	CQQTKSFPLTF	1540
029S-D11	Fzd3	RASQDISRGLG	1501	AASTLYR	1517	CQQAYSFPWTF	1324
030S-H05	Fzd7	RASQSIGNYLN	1508	AASSLQS	1175	CQQANSFPLTF	1530

[0177]

克隆 ID	初始结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
030S-A06	Fzd7	RASQAIGRRLA	1499	AASSLQS	1175	CQQYDTYWTF	1541
029S-C12	Fzd7	RASQGISSYLA	1076	AASTLQS	1179	CLQYNTYPWTF	1528
030S-C06	Fzd7	RASQGISSWLA	1504	DASSLQS	1190	CQQSYSTPYSF	1539
4A12	Fzd5	KASQDVGTAVA	1497	WASTRHT	1527	QQYSTYPLT	1546
1791	Fzd7	KASENVLNYVS	2199	GASNRYT	2202	GQSYRYP	2205
1291	Fzd7	KSSQSLLYSSNQKNYLAW	2200	WASTRES	2203	QQYYSY	2206
18R5	Fzd7	SGDNIGS FYVH	2201	DKSNRPSG	2204	QSYA NTLSL	2207

[0178] 表1B:抗Fzd抗体克隆ID、重链(HC)和轻链(LC)Seq ID No以及结合特性

[0179]

克隆 ID	HC SID NO	LC SID NO	确认的结合
001S-B01	1	38	Fzd1,2,7,9
001S-E02	2	39	Fzd1,2,7
001S-G02	3	40	Fzd1,2,7
001S-H02	4	41	Fzd1,2,7
001S-A03	5	42	Fzd1,2,7,9
001S-B03	6	43	Fzd1,2,7
004S-G06	7	44	Fzd5,8
002S-B01	8		Fzd1
002S-C02	9		Fzd1
002S-E02	10		Fzd1
002S-G02	11		Fzd1
002S-F03	12		Fzd1
002S-A04	13		Fzd1
002S-B04	14		Fzd1
002S-D04	15		Fzd1
004S-H04	16	45	Fzd5
001S-A04	17	46	Fzd1,2,5,7,8
003S-E07	18	47	Fzd2
003S-D10	19	48	Fzd4
004S-B08	20	49	Fzd6
004S-D08	21	50	Fzd6
004S-C09	22	51	Fzd6
004S-F10	23	52	Fzd6
004S-A11	24	53	Fzd6
004S-A12	25	54	Fzd6
005S-B07	26	55	Fzd9
005S-D08	27	56	Fzd9
005S-E09	28	57	Fzd9
005S-H10	29	58	Fzd9
005S-B11	30	59	Fzd9
005S-D11	31	60	Fzd9
014S-G02	32	61	Fzd6
014S-B04	33	62	Fzd8
014S-B06	34	63	Fzd9
014S-G06	35	64	Fzd10
014S-A07	36	65	Fzd10

[0180]

克隆 ID	HC SID NO	LC SID NO	确认的结合
017S-B09	37		Fzd8
004S-D01	66	67	Fzd4
004S-E09	68	69	Fzd6
抗-FZD7-1791	70	71	Fzd7
抗-FZD7-1291	72	73	Fzd7
004S-B10			Fzd6
004S-C10			Fzd6
004S-F10			Fzd6
004S-G10			Fzd6
004S-A11			Fzd6
004S-B11			n.b.
004S-D11			Fzd6
004S-E11			n.b.
004S-F11			Fzd6
004S-G11			Fzd6
004S-A12			Fzd6
004S-B12			Fzd6
004S-C12			n.b.
004S-D12			n.b.
004S-F12			n.b.
004S-F12			n.b.
004S-G12			n.b.
005S-B02			n.b.
005S-C02			n.b.
005S-D02			Fzd5,8
005S-E02			Fzd5,8
005S-H02			Fzd5,8
005S-A03			Fzd5,8
005S-C03			n.s.
005S-E03			n.s.
005S-F03			Fzd8
005S-B04			Fzd5,8
005S-F04			n.b.
005S-G04			Fzd5,8
005S-H04			n.b.
005S-E05			n.b.
005S-G05			Fzd5,8
005S-H05			Fzd5,8
005S-D06			Fzd8
005S-F06			n.b.
005S-G06			n.b.
005S-A07			Fzd9,10
005S-B07			Fzd9
005S-A08			Fzd9
005S-B08			Fzd9
005S-D08			Fzd9
005S-E08			Fzd9
005S-F08			n.b.
005S-C09			Fzd9

[0181]

克隆 ID	HC SID NO	LC SID NO	确认的结合
005S-D09			Fzd9
005S-E09			Fzd9
005S-F09			Fzd9
005S-A10			Fzd9
005S-B10			Fzd9
005S-E10			Fzd9
005S-H10			Fzd9
005S-B11			Fzd9
005S-D11			Fzd9
005S-G11			n.b.
005S-H11			n.b.
005S-E12			Fzd10
006S-A01			Fzd10
006S-H01			n.b.
006S-A02			Fzd10
006S-D02			n.b.
006S-H02			Fzd10
006S-A03			n.b.
006S-B03			n.b.
006S-C03			n.b.
014S-A01			Fzd1,2,7
014S-B02			n.b.
014S-G02			Fzd6
014S-B03			n.b.
014S-C03			Fzd1,2,7
014S-A04			n.b.
014S-B04			Fzd8
014S-B05			Fzd5,8
014S-B06			Fzd9
014S-F06			n.s.
014S-G06			Fzd10
014S-A07			Fzd10
017S-E08			Fzd8
017S-H08			n.b.
017S-A09			n.b.
017S-B09			Fzd8
018S-F06			Fzd4
018S-H06			n.b.
018S-B07			n.b.
017S-A10			n.b.
017S-B10			n.b.
017S-D10			n.b.
018S-H08			n.b.
018S-B09			Fzd5,8
021S-A01			n.b.
021S-E02			Fzd5,8
021S-G02			n.s.
021S-A03			n.b.
029S-B01			n.b.

[0182]

克隆 ID	HC SID NO	LC SID NO	确认的结合
029S-D01			Fzd1,2,7
029S-C02			Fzd1,2,7
029S-H02			Fzd1
030S-A02			Fzd7
029S-E06			Fzd2, 6, 3
030S-F04			Fzd3
030S-H05			Fzd7
030S-A06			Fzd1,2,7,5
029S-C12			Fzd7
030S-C06			Fzd1
001S-A01			Fzd1,2,7
001S-H01			Fzd1,2,7

[0183] 在某些实施例中,Fzd结合区可以选自以例如为以下的K_D的亲和力结合Fzd受体表位的任何结合结构域:至少约1×10^{-4}M、至少约1×10^{-5}M、至少约1×10^{-6}M、至少约1×10^{-7}M、至少约1×10^{-8}M、至少约1×10^{-9}M、至少约1×10^{-10}M、至少约1×10^{-11}M、至少约1×10^{-12}M、至少约1×10^{-13}M、至少约1×10^{-14}M或至少约1×10^{-15}M。在某些实施例中,Fzd结合区可以选自以例如为以下的K_D的高亲和力结合一个或多个Fzd受体表位的任何结合结构域:小于约1×10^{-7}M、小于约1×10^{-8}M、小于约1×10^{-9}M、小于约1×10^{-10}M、小于约1×10^{-11}M、小于约1×10^{-12}M、小于约1×10^{-13}M、小于约1×10^{-14}M或小于约1×10^{-15}M。在某些实施例中,在Wnt替代分子的上下文中,Fzd结合区可以选自以例如为以下的K_D的高亲和力结合Fzd受体表位的任何结合结构域:小于或等于约1×10^{-4}M、小于或等于约1×10^{-5}M、小于或等于约1×10^{-6}M、小于或等于约1×10^{-7}M、小于或等于约1×10^{-8}M、小于或等于约1×10^{-9}M、小于或等于约1×10^{-10}M、小于或等于约1×10^{-11}M、小于或等于约1×10^{-12}M、小于或等于约1×10^{-13}M、小于或等于约1×10^{-14}M,或小于或等于约1×10^{-15}M。

[0184] 适合的Fzd结合区包含但不限于从头设计的Fzd结合蛋白、抗体衍生的结合蛋白(例如,scFv、Fab等)以及与一种或多种Fzd蛋白特异性结合的抗体的其它部分、VHH或sdAb衍生的结合结构域、基于打结素(knottin)的工程化支架、norrin和由其衍生的工程化结合片段、天然存在的Fzd结合结构域等。Fzd结合结构域可以是亲和力选择的,以增强与期望的Fzd蛋白或多种Fzd蛋白的结合以例如提供组织选择性。

[0185] 在一些实施例中,Fzd结合区与一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同的卷曲蛋白,例如人卷曲蛋白Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和Fzd10中的一种或多种人卷曲蛋白结合。在一些实施例中,Fzd结合区与Fzd1、Fzd2和Fzd7结合。在一些实施例中,Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8结合。在其它实施例中,Fzd结合区对关注的一种或多种卷曲蛋白具有选择性,例如相对于其它卷曲蛋白,对一种或多种期望的卷曲蛋白具有至少10倍、25倍、50倍、100倍、200倍或更多倍的特异性。

[0186] 在某些实施例中,Fzd结合区包括泛特异性卷曲蛋白抗体OMP-18R5(万替妥单抗(vantictumab))的六个CDR区。在某些实施例中,Fzd结合区是包括泛特异性卷曲蛋白抗体OMP-18R5(万替妥单抗)的六个CDR区的scFv。参见例如通过引用的方式具体并入本文中的美国专利第8,507,442号。例如,OMP-18R5的CDR序列包含:(i)包括GFTFSHYTLS(SEQ ID NO:270)的重链CDR1、包括VISGDGSYTYYADSVKG(SEQ ID NO:677)的重链CDR2和包括NFIKYVFAN(SEQ ID NO:1033)的重链CDR3;以及(ii)包括SGDKLGKKYAS(SEQ ID NO:1152)或

SGDNIGSFYVH(SEQ ID NO:1153)的轻链CDR1、包括EKDNRPSG(SEQ ID NO:1200)或DKSNRPSG(SEQ ID NO:1201)的轻链CDR2和包括SSFAGNSLE(SEQ ID NO:1435)或QSYANTLSL(SEQ ID NO:1436)的轻链CDR3。在特定实施例中,Fzd结合区是抗体或其衍生物,包含但不限于scFv、迷你抗体、VHH或sdAb以及包括这些CDR序列中的任一个的各种抗体模拟物。在某些实施例中,这些CDR序列包括一个或多个氨基酸修饰。

[0187] 在某些实施例中,Fzd结合区包括抗FZD7-1791或抗FZD7-1291的六个CDR区。抗FZD7-1791和抗FZD7-1291是结合Fzd7的铰链区内的不同表位的抗体,如PCT专利公布第WO2016/205551号和第WO2016/205566号中所述,所述专利公布通过引用具体并入本文。在某些实施例中,Fzd结合区是包括抗FZD7-1791或抗FZD7-1291的六个CDR区的scFv。例如,抗FZD7-1791的CDR序列包含:(i)包括TYAMH(SEQ ID NO:2190)的重链CDR1、包括RIRSKSNNYAKNYDDSVKD(SEQ ID NO:2193)的重链CDR2和包括ENYGGRFDY(SEQ ID NO:2196)的重链CDR3;以及(ii)包括KASENVLNYVS(SEQ ID NO:2199)的轻链CDR1、包括GASNRYT(SEQ ID NO:2202)的轻链CDR2和包括GQSYRYP(SEQ ID NO:2205)的轻链CDR3。抗FZD7-1791的重链序列包含SEQ ID NO:70,并且抗FZD7-1791的轻链序列包含SEQ ID NO:71。作为另一个实例,抗FZD7-1291的CDR序列包含(i)包括SYAMS(SEQ ID NO:2191)的重链CDR1、包括TISDGGSYTRYPDKLKG(SEQ ID NO:2194)的重链CDR2和包括VGGRRDYFDY(SEQ ID NO:2197)的重链CDR3,以及(ii)包括KSSQSLLYSSNQKNYLAW(SEQ ID NO:2200)的轻链CDR1、包括WASTRES(SEQ ID NO:2203)的轻链CDR2和包括QQYYSYP(SEQ ID NO:2206)的轻链CDR3。抗FZD7-1291的重链序列包含SEQ ID NO:72,并且抗FZD7-1291的轻链序列包含SEQ ID NO:73。在一些实施例中,在特定实施例中,Fzd结合区是抗体或其衍生物,包含但不限于scFv、迷你抗体、VHH或sdAb以及包括这些CDR序列中的任一个的各种抗体模拟物。在某些实施例中,这些CDR序列包括一个或多个氨基酸修饰。

[0188] 在其它实施例中,Fzd结合区包括来自多种卷曲蛋白特异性抗体中的任一种卷曲蛋白特异性抗体的可变区序列或其CDR,所述多种卷曲蛋白特异性抗体是本领域中已知的并且可商购获得或者可以从头产生。卷曲蛋白多肽中的任一种卷曲蛋白多肽可以用作免疫原或在筛选测定法中用于开发抗体。卷曲蛋白结合结构域的非限制性实例包含:可从Biolegend公司获得的抗体,例如,对人卷曲蛋白4具有特异性的克隆CH3A4A7(CD344)、对人Fzd9具有特异性的克隆W3C4E11(CD349);可从艾博抗公司(Abcam)获得的抗体,例如对Fzd7具有特异性的ab64636;对人Fzd4具有特异性的ab83042;对人Fzd7具有特异性的ab77379;对人Fzd8具有特异性的ab75235;对人Fzd9具有特异性的ab102956;等。适合的抗体的其它实例尤其描述于以下中:美国专利申请第20140105917号;美国专利申请第20130230521号;美国专利申请第20080267955号;美国专利申请第20080038272号;美国专利申请第20030044409号;等,所述专利申请各自通过引用具体并入本文。

[0189] Wnt替代分子的Fzd结合区可以是被选择用于与Wnt蛋白的卷曲蛋白结合区的结构同源的工程化蛋白。此类蛋白质可以通过筛选结构数据库的同源性来鉴别。由此鉴别出初始蛋白,例如微生物Bh1478蛋白。然后,天然蛋白被工程化以提供增加亲和力的氨基酸取代,并且可以通过亲和力成熟进行进一步的选择以便在与期望的卷曲蛋白结合时具有增加的亲和力和选择性。卷曲蛋白结合部分的非限制性实例包含Fz27和Fz27-B12蛋白。

[0190] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括与特异性结合一个或多个Fzd受体表位的多肽

融合的LRP5/6结合区,例如,抗LRP5/6抗体或其抗原结合片段。在特定实施例中,与LRP5/6特异性结合的多肽是抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,其是于2017年12月19日提交的题为“抗LR5/6抗体和使用方法(Anti-LR5/6Antibodies and Methods of Use)”、代理人案卷号为SRZN-005/00US的美国临时专利申请第62/607,879号中公开的抗体或其抗原结合片段,所述美国临时专利申请通过全文引用的方式并入本文。

[0191] 在特定实施例中,Wnt替代分子的至少一个LRP5/6结合区包含抗体的一个或多个抗原结合片段。例如,一个或多个抗原结合片段可以是或衍生自IgG、scFv、Fab、VHH或sdAb。在某些实施例中,所述一个或多个抗原结合片段是人源化的。

[0192] 在特定实施例中,LRP5/6结合区包括针对表2A中提供的与LRP5和/或LRP6结合的说明性抗体或其片段中的任一种抗体或其片段公开的三个重链CDR和/或三个轻链CDR。在特定实施例中,LRP5/6结合区包括针对表2A中提供的与LRP5和/或LRP6结合的说明性抗体或其片段中的任一种抗体或其片段公开的三个重链CDR和/或三个轻链CDR,其中CDR共同包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸修饰,例如,取代、缺失或添加。在某些实施例中,LRP5/6结合区是VHH或sdAb或衍生自VHH或sdAb,因此表2A仅包含三个重链CDR。在某些实施例中,LRP5/6结合区包括表2A中所示的三个重链CDR或变体,其中CDR共同包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸修饰。在特定实施例中,LRP5/6结合区包括表2B或SEQ ID NO:74-97中提供的与LRP5和/或LRP6结合的说明性抗体或其片段中任一种抗体或其片段的重链片段和/或轻链片段(或任一者的抗原结合片段或变体)。在某些实施例中,LRP5/6结合区是Fab或衍生自Fab,因此表2B包含VH和CH1序列,但不包含CH2或CH3序列。在某些实施例中,LRP5/6结合区是VHH或sdAb或衍生自VHH或sdAb,因此表2B包含VHH结构域。在某些实施例中,LRP5/6结合区是与这些抗体之一竞争与LRP5和/或LRP6结合的多肽,例如,抗体或其抗原结合片段。

[0193] 在特定实施例中,LRP5/6结合区包含与表2A、表2B或SEQ ID NO:74-97中所示的任一个序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或其抗原结合片段。测定了表2B中列出的克隆的结合特性,并在表2B中示出。

[0194] 表2A:抗LRP5/6抗体克隆ID和CDR序列。

[0195]

克隆 ID	确认的结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
001S-C08	LRP6e1e2	YTISNYYIH	1682	GMINPSGGSTTYA	1762	CAIVRGKKWYFDLW	1842
001S-C10	LRP6e1e2	RTFGTYPNG	1632	AAISWGGRTAYA	1700	CYARTVIGGFGAFRAHW	2061
001S-D10	LRP6e1e2	RTFSRYAMA	1642	AAIRWSGGGTYYA	1689	CAASMEAMNSLRVNKERYYQSW	1836
001S-E10	LRP6e1e2	LTFSNAAMA	1614	AAISRSGANTAYS	1696	CTLVNEIKTWW	2039
001S-F10	LRP6e1e2	RTFSSYAMA	1645	AAIKWSGTNTYYA	1684	CAASMEAMNSLRVNKERYYQSW	1834
001S-G10	LRP6e1e2	RTFSRYVMG	1644	AAITWRGGSTYYA	1706	CATGPNSIY	1987
001S-A11	LRP6e1e2	RTFGNYDMG	1630	AGIRWSGSTLYA	1709	CYARTVIGGFGAFRAHW	2062
001S-B11	LRP6e1e2	RRFTTYGMG	1623	AAVTWRSGSTYYA	1708	CAAGSTVVAEFNYW	1828
001S-C11	LRP6e1e2	SISSFNTMG	1659	AVITTGGDTSYS	1741	CNKVNAITKL	2025
001S-E11	LRP6e1e2	RTLSRYSMG	1651	AAISRSGDRIYYS	1697	CTLVNEIKTWW	2040
001S-F11	LRP6e1e2	RTFSSYAMS	1646	AVIGRSGGIKYYA	1736	CATRRPFNSYNTEQSYDSW	1989
001S-G11	LRP6e1e2	SIFRLGTMY	1655	ASIGKSGSTNYA	1719	CKQHPNGYR	2005
001S-H11	LRP6e1e2	RTLSSFAMG	1652	ATISRSGGNTYYA	1732	CNLREWNNSGAGYW	2026
001S-A12	LRP6e1e2	IAFRYYDMG	1608	AAITWNGRSSDYA	1704	CAAVFTGRFYGRPPREKYDYW	1838
001S-B12	LRP6e1e2	RLLSYYALA	1622	AAISRNGDKSHY	1694	CTLVNEIKTWW	2038

[0196]

克隆 ID	确认的结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
				S			
001S-C12	LRP6e1e2	RTFSNYAVG	1641	AAISRFGGSTYYV	1693	CAADRIENYLGRYYDPSEYEYW	1824
001S-D12	LRP6e1e2	RTFSRYAMG	1643	GAISRSGNNTYYA	1744	CTLVNEIKTWW	2041
001S-F12	LRP6e1e2	RTFRSYTMG	1637	AAISGSGGSTTYA	1690	CNADIKTTTYSPLRNYW	2009
008S-B01	LRP5	TIFSINTMG	1664	ATMTSGGNTNYA	1734	CYRRQWASSWGARNYEYW	2064
008S-C01	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CHGRDYGSNAPQYW	2001
008S-D01	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CYVKLRDDDYVYR	2065
008S-E01	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CNAVTYNGYTIR	2023
008S-G01	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CYARTQRMGVVNSYW	2060
008S-A02	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CNAVTFGGNTIR	2021
008S-C02	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CNAVTYDGY	2022
008S-D02	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CAAQFRNDYGLRYQSTNNYW	1832
008S-E02	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CNANYRGNRYW	2019
009S-C01	LRP6e3e4	GSFSGYYWT	1595	GEINHSGATNYN	1745	CVRYAWPEFDHW	2053
009S-B02	LRP6e3e4	GSLSGYYWS	1596	GEINHSGSTNYN	1746	CVRYAWPEFDHW	2055
009S-C02	LRP6e3e4	GSFSDYYWS	1594	GEINHSGSTNYN	1746	CVRYAWPEFDHW	2054
009S-D02	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GGIIPIFGTANYA	1749	CVYGRDFDYW	2056
010S-A02	LRP6e1e2	HTFSSYAMG	1607	AAISQSGYVRYYA	1691	CKIYGLNGQPLGSW	2003
010S-B02	LRP6e1e2	RTFNSGTMG	1634	AAITWRGGITYYA	1705	CNADGYSWDGRSGRRLELW	2008
010S-D02	LRP6e1e2	RTFSSYAVG	1647	AAISYSGGSTKYA	1702	CAASVYISRRDSDYGYW	1837
010S-E02	LRP6e1e2	LSSGRPFSSYVMG	1612	AAISWSGGSTKYA	1701	CKLQVRPIGYSSAYSRNYW	2004
010S-F02	LRP6e1e2	RSFNSYVIG	1625	AAIRWSGDNTYYA	1688	CAASMEAMNSLRVNKERYYQSW	1835
009S-E02	LRP6e1e2	RRFTTYGMG	1623	AAVTWRSGSTYYA	1708	CAAGSTVVAEFNYW	1829
009S-F02	LRP6e1e2	RTFSYYAMG	1649	AAISRSGGIYYA	1698	CNTVRPLWAW	2029
009S-G02	LRP6e1e2	SIFSIYAMG	1658	AVITSGGKTVYA	1740	CYADSRSSWYDEYLEHW	2058
009S-H02	LRP6e1e2	SIVRSLPMA	1660	ATINDAQRYYA	1727	CNTSPYMHDVW	2027
009S-A03	LRP6e1e2	RTFSVYGVG	1648	AAVSASGGYTWYA	1707	CKAAPRWGGATAYW	2002
010S-G02	LRP6e1e2	SIVRSLPMA	1660	ATINDAQRYYA	1727	CNTSPYMHDVW	2028
010S-A03	LRP6e1e2	RTFRRYAMG	1636	ATISASGGNTAYA	1731	CNAPAWLYDDDYW	2020
009S-B03	LRP6e1e2	RTFSNYAVG	1641	AAISRFGGSTYYV	1693	CAADRIENYLGRYYDPSEYEYW	1825
010S-B03	LRP6e1e2	RTFSNYAVG	1641	AAISRFGGSTYYA	1692	CHAKQLRNGQMYTYW	1999
010S-D03	LRP6e1e2	ISSVYGMG	1609	AAIQWSADNTFYA	1686	CAARTSGGLFHYRRSDHWDTW	1833
009S-C03	LRP6e1e2	LPFSRYAMA	1610	AGMSGEGRNTKYR	1713	CSSRGYW	2034
009S-D03	LRP6e1e2	SIFSDGAMG	1656	AVISGGRTGYA	1737	CNTYPFPIYKKGYPFW	2030
009S-E03	LRP6e1e2	RRFTTYGMG	1623	AAVTWRSGSTYY	1708	CAAGSTVVAEFNYW	1830

克隆 ID	确认的结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
				A			
009S-F03	LRP6e1e2	RTFSSYAMS	1646	AVIGRSGGIKYYA	1736	CATRRPFNSYNTEQSYDSW	1990
010S-E03	LRP6e1e2	RSVSIYPMG	1628	AAINWSGDSTKYA	1685	CNAVVVGLSRRIDNIW	2024
010S-F03	LRP6e1e2	RTFSRYVMG	1644	AAITWRGGSTYYA	1706	CATGPNSIY	1988
009S-G03	LRP6e1e2	RSVSSYNMG	1629	AAISRRGGIIEYG	1695	CHAVENILGRFVDYW	2000
009S-H03	LRP6e1e2	SIFSINTMG	1657	AVITSGGKTVYA	1740	CYADSRSSWYDEYLEHW	2057
009S-A04	LRP6e1e2	RTLSAYDMG	1650	GGIRWSGGTTLYP	1753	CYARTVIGGFGAFRAHW	2063
009S-B04	LRP6e3e4	SIFMINTMA	1654	ATIRPVVSETTYA	1728	CNAKRPWGTRDEYW	2018
010S-G03	LRP6e3e4	RSFNSYTTT	1624	AAIRGSSGSTFYA	1687	CNAASTVTAWPYYGPDYW	2006
009S-C04	LRP6e3e4	FRFSISTMG	1553	AYITGGGRTMDG	1743	CNAFVRSDFDRYYDYW	2011
009S-D04	LRP6e3e4	TIVSIYRIN	1665	AGITSSGRTIYA	1712	CNAASTVTAWPYYGPDYW	2007
010S-H03	LRP6e3e4	RIFSIYDMG	1621	SGIRWSGGTSYA	1789	CSSRGYW	2035
009S-E04	LRP6e3e4	RIFAIYDIA	1618	AMIRPVVTEIDYA	1715	CNAKRPWGSRDEYW	2012
010S-A04	LRP6e3e4	SLFSFNAVG	1662	ASISSGGRTNYA	1722	CSKGGVYGGTYVPDSW	2032
009S-F04	LRP6e3e4	RSLSSFAMG	1627	ARISRGDGYTDEA	1718	CAAVQAVIGGTLTTAYDYW	1839
010S-B04	LRP6e3e4	RVLSYYAMA	1653	AGITRGGATTYYS	1711	CAAGPNWSTRNREYDYW	1827
009S-G04	LRP6e3e4	GTFSRYHMG	1601	SAITWSGGRTYYA	1788	CALTWAPTPTNRRSDYAYW	1872
[0197] 009S-H04	LRP6e3e4	RIFAIYDMA	1619	ATIRPVVSETTYA	1728	CNAKRPWGTRDEYW	2017
010S-C04	LRP6e3e4	SLFSFNAMG	1661	ASISSGSRTNYA	1723	CSKGGVYGGTYVPDSW	2033
010S-D04	LRP6e3e4	RIFAIYDIA	1618	ATIRPVVTQIDYA	1730	CNAKRPWGSRDEYW	2015
010S-E04	LRP6e3e4	RTFGSDVMG	1631	ALTGWGDGSTTYYE	1714	CAAARRSGTYDIGQYLRESAYVFW	1820
010S-F04	LRP6e3e4	RTFSRYAMG	1643	AAITRSGSNTYYA	1703	CAADPRGVTLPRATAYEYW	1823
009S-A05	LRP6e3e4	RTFSDYSMG	1639	AGISWIADNRYYA	1710	CTAGRSRYLYGSSLNGPYDYW	2036
010S-G04	LRP6e3e4	VIFALYDIA	1666	ATIRPVVTETDYA	1729	CNAKRPWGSRDEYW	2014
010S-H04	LRP6e3e4	RSFSDFFMG	1626	ATISWSGSSANYE	1733	CAAAYSYSQYGSSYSYW	1821
010S-A05	LRP6e3e4	LSFSSYAMG	1611	AAISRSGVSTYYA	1699	CAAKFGVLATTESRHDYW	1831
010S-C05	LRP6e3e4	RTFNIDDMG	1633	ASIRWSGQSPYYA	1720	CNAETYSGNTIW	2010
010S-D05	LRP6e3e4	RTFSDYSMA	1638	AGISWIADNRYYA	1710	CAGDRSRYLYGDSLRGPYGYW	1841
010S-E05	LRP6e3e4	SVFTTFAKG	1663	ASITASSDRTFYA	1725	CAAYSTFNTDVASMKPDYW	1840
010S-F05	LRP6e3e4	RIFSIYDIA	1620	ATIRPVVTETDYA	1729	CNAKRPWGSRDEYW	2013
013S-G04	LRP6e3e4	RIFAIYDIA	1618	ATIRPVVSETTYA	1728	CNAKRPWGTRDEYW	2016
013S-H04	LRP6e3e4	RTFSMYDMG	1640	ASIRWSSGNTWYA	1721	CYANIYYTRRAPEEYW	2059
013S-A05	LRP6e3e4	RTFNTYAMG	1635	ASVSWRYDRTYYT	1726	CAADTNWRAGPRVGIDEYAYW	1826
013S-B05	LRP6e3e4	FAFSTTAMS	1549	STINPGGLSKSYA	1806	CTKGGIQ	2037
013S-C05	LRP6e3e4	NIFPIDDMS	1616	ATVTSGGRINYA	1735	CNVDRTLYGKYKEYW	2031
013S-D05	LRP6e3e4	RIFSIYDMG	1621	SGIRWSGGTSYA	1789	CGSRGYW	1998
013S-E05	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTADYA	1748	CARDWELYGMDVW	1907

[0198]

克隆 ID	确认的结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
013S-F05	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GIINPSGGSTSYA	1761	CARAGYYDSSGYYAFDIW	1882
013S-G05	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGVIPIFGTADYA	1755	CASDIVVDDAFDTW	1969
010S-G06	LRP6e3e4	FSFETYGMS	1555	SGISGSGGRTHYA	1792	CARDLDYW	1897
009S-B05	LRP6e3e4	FTFDAYAMH	1560	STLSGDANNAYYA	1811	CARGGSGWSNYYGMDVW	1931
009S-C05	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPVLKITNYA	1768	CAVVDDAFDIW	1996
009S-D05	LRP6e3e4	FTLRNHWLS	1591	SAISGSGGSTYYA	1786	CATRTGYSYGFNFWAFDIW	1991
009S-E05	LRP6e3e4	YTFTNNFMH	1676	GHVDPGDGETIYA	1756	CARDWGIAAAGDYYYYGMDVW	1908
009S-F05	LRP6e3e4	FTFDDYGMS	1561	SAIGTGGGTYYA	1781	CARLGSYGSPYYYYGMDVW	1959
009S-G05	LRP6e3e4	FTFSDYYMS	1568	SGVSWNGSRTHYA	1799	CAKDSGLV	1852
009S-C06	LRP6e3e4	YTFASYDIH	1671	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARATGSGWYTDLGYW	1883
009S-D06	LRP6e3e4	FTFSSHSTH	1573	STISDTNSGTYYA	1807	CAKAQATGWSGYYTFDYW	1843
009S-E06	LRP6e3e4	FTFTDYGLH	1587	AVISYGGSNKYYA	1739	CASGYSYGLYYYGMDVW	1973
009S-F06	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATEAALDAFDIW	1985
009S-G06	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GWINPNSGGTNYA	1774	CARDFLGSTGDYW	1892
009S-H06	LRP6e3e4	FTFSSSAMH	1574	SAIGTGGSTYYA	1783	CAKGGDYFYYYYGMDVW	1856
009S-A07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATAYGSSSLNIDYW	1980
009S-B07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWINPNSGGTNYA	1774	CVKDGGSFPLAYAFDIW	2049
009S-D07	LRP6e3e4	FPFRYYGMS	1551	ARIGWNGGSIVYA	1717	CARDYSDRSGIDYW	1910
009S-F07	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GIINPSGGSTSYA	1761	CARAAGNFWSGYYTFDYW	1876
009S-G07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGSYGMDVW	1947
009S-H07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWMNPNSGNTGYA	1776	CASSVVPAGPAGVYAFDIW	1975
009S-A08	LRP6e3e4	GTFSSHAIN	1602	GWISANNGNTDYA	1775	CARDQDYGDYGWYYYGMDVW	1902
011S-C01	LRP6e3e4	LTFTSHGMS	1615	SYVSDSGSSVYYA	1818	CARHPGSFGGYSYAWYYYYGMDVW	1956
009S-C08	LRP6e3e4	FSFNTFGIH	1556	AVISYDGSNKYYA	1738	CAKSIAAAGTGYYGMDVW	1868
009S-D08	LRP6e3e4	YTFTSYDIN	1679	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGPYYFDYW	1939
011S-F01	LRP6e3e4	FSFSDYYMS	1558	SGISESGGRTYYA	1790	CASAADFDYW	1966
009S-E08	LRP6e3e4	YGFTGYYIH	1668	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARGYGDYDLW	1951
009S-F08	LRP6e3e4	DTFANYGFS	1547	GXVNAGNGNTTYA	1777	CAKGWLDFDYW	1866
009S-G08	LRP6e3e4	FTFSDFAMT	1566	SYISGDSGYTNYA	1813	CARLGSYPGPYYYYMDVW	1961
009S-H08	LRP6e3e4	YTFTDYFMN	1673	GIINPSGDSTRFA	1758	CARDDGLGGMDVW	1888
009S-A09	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPILGSTNYA	1767	CTTDLWDYW	2047
011S-F02	LRP6e3e4	FTFSTYGMH	1584	SSISVSSGTTHYA	1804	CARGGSGSYYYAFDIW	1929
011S-G02	LRP6e3e4	YTFTSYAMN	1678	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDASGGSTGWYYFDSW	1886
011S-A03	LRP6e3e4	FTFSSYWMH	1580	STISGSGGRTYYA	1808	CATSPYGVFTLDYW	1993

[0199]

克隆 ID	确认的结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
011S-C03	LRP6e3e4	YTFSYRYLH	1672	GGIIPIFGTANYA	1749	CASTVTTDAFDIW	1977
011S-D03	LRP6e3e4	FSFDDYGMS	1554	SVISSGGTIYYA	1812	CARHLSSGYLSYYGMDVW	1954
011S-F03	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1859
011S-C04	LRP6e1e2	GTFNSNAIS	1598	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARDYYGSGSYNYGMDVW	1912
011S-D04	LRP6e1e2	YTFTSYDIN	1679	GIINPSGGSTSYA	1761	CAREAYYYYYGMDVW	1915
011S-H04	LRP6e1e2	YIFTDYYMH	1669	GRIIPILGRANYA	1765	CARGGYSTLDYW	1932
008S-F02	LRP5	YTFTNYCMH	1677	GIINPSDGSTSHA	1757	CAKDMVHLIVALAIDYW	1851
010S-C06	LRP6e1e2	FTFNSYSMD	1563	SSISPRGGSTYYA	1802	CAPYYYDKSAKPLRSYFDHW	1875
010S-E06	LRP6e3e4	LTVSSNYMS	1615	SGISWNSGSIGYA	1796	CARGSDCSGGSCYYSFDYW	1944
010S-F06	LRP6e3e4	FTFSSSWMH	1575	SAIGTGGGTYYA	1781	CAREVAVKDYYYYYMDVW	1921
010S-H06	LRP6e3e4	YTFTSYDIN	1679	GRIIPILGRTNYA	1766	CAREERGATGRAFDIW	1918
010S-A07	LRP6e3e4	FTFSSYAMH	1576	ASISSTSGSKYYA	1724	CAKTYYDFWSGYYTFDYW	1870
010S-B07	LRP6e3e4	FTFSDYYMS	1568	SMISYNGGRAFYA	1800	CARGNPYYFDYW	1937
010S-C07	LRP6e3e4	FTFSKTDMH	1569	STITTDSRGTYYA	1810	CAKGGDYYYYYYGMDVW	1858
010S-D07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CANGLEDAYAFDIW	1873
009S-D05	LRP6e3e4	FTLRNHWLS	1591	SAISGSGGSTYYA	1786	CATRTGYSYGFNFWAFDIW	1992
009S-E05	LRP6e3e4	YTFTNNFMH	1676	GHVDPGDGETIYA	1756	CARDWGIAAAGDYYYYGMDVW	1909
010S-E07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CAKDDFSLYGMDVW	1845
009S-F05	LRP6e3e4	FTFDDYGMS	1561	SAIGTGGGTYYA	1781	CARLGSYGSPYYYYGMDVW	1960
010S-F07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARLDYGETEGNGDW	1958
010S-G07	LRP6e3e4	FTFSSYAMH	1576	STISGSGGSTYYA	1809	CARAGYGRYYYGMDVW	1880
009S-G05	LRP6e3e4	FTFSDYYMS	1568	SGVSWNGSRTHYA	1799	CAKDSGLV	1853
010S-H07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDDSMGAFDIW	1890
010S-A08	LRP6e3e4	HTFLTYDIN	1606	GRITPRLGIANYA	1770	CASYFGVMDVW	1979
009S-A07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATAYGSSSLNIDYW	1981
009S-B07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWINPNSGGTNYA	1774	CVKDGGSFPLAYAFDIW	2050
009S-B06	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CAPALTDAGSFDYW	1874
010S-B08	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPVFGTADYA	1751	CARDREQQILDYW	1904
010S-C08	LRP6e3e4	FTFSTFGMH	1582	STITSSGGSTYYA	1809	CARAGIAAAPGSRNYYGMDVW	1878
009S-C06	LRP6e3e4	YTFASYDIH	1671	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARATGSGWYTDLGYW	1884
009S-D06	LRP6e3e4	FTFSSHSTH	1573	STISDTNSGTYYA	1807	CAKAQATGWSGYYTFDYW	1844
010S-D08	LRP6e3e4	FTFSSSWMH	1575	SAIGTGGGTYYA	1781	CAKEDYDSSGYYYYYFQHW	1855
009S-E06	LRP6e3e4	FTFTDYGLH	1587	AVISYGGSNKYYA	1739	CASGYSYGLYYYGMDVW	1974
010S-E08	LRP6e3e4	YSFTRTDMH	1670	GYISAYTGHTSYA	1778	CARDLGGTADYW	1898

[0200]

克隆 ID	确认的结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
010S-F08	LRP6e3e4	LTFDDHAMH	1613	SYISSSGRTIFYA	1815	CVRGDSGWGILYYVMDVW	2052
009S-F06	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATEAALDAFDIW	1986
010S-G08	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GGFDPEDGETIYA	1747	CARGGGPNEHDYYFDYW	1927
010S-H08	LRP6e3e4	FTFZNAWMS	1590	SGISGSGGSTYYA	1793	CARGRGKKNYYYGMDVW	1942
010S-A09	LRP6e3e4	FTFSTYYMS	1586	SGISWNGGKTHYV	1794	CARGGDFDYW	1925
010S-B09	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GWINPNSGDTNYA	1773	CARGEQWLVWGFDPW	1924
009S-G06	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GWINPNSGGTNYA	1774	CARDFLGSTGDYW	1893
010S-C09	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDEVEGGMDVW	1891
009S-H06	LRP6e3e4	FTFSSSAMH	1574	SAIGTGGSTYYA	1783	CAKGGDYFYYYYGMDVW	1857
010S-D09	LRP6e3e4	GTFSSYTIS	1603	GGIVPAYRRANYA	1754	CAKGGYELDYW	1865
010S-E09	LRP6e3e4	GDLSIYTIN	1593	GWINAGNGNTTYA	1772	CARGGDSSGYYYYAFDIW	1926
009S-A07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATAYGSSSLNIDYW	1982
009S-B07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWINPNSGGTNYA	1774	CVKDGGSFPLAYAFDIW	2051
009S-D08	LRP6e3e4	YTFTSYDIN	1679	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGPYYFDYW	1940
010S-F09	LRP6e3e4	FTFDEYAMH	1562	STISGSGGSTYYA	1809	CASAKNDFWSGYFAFDYW	1968
010S-G09	LRP6e3e4	GTFNTHTIT	1599	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARGNLDFDYW	1936
010S-H09	LRP6e3e4	FTFSDHYMS	1567	SAISSGSDRTYYA	1787	CARYSGYDFDYW	1965
010S-A10	LRP6e3e4	FSFSSYSMN	1559	SYISSSSSTIYYA	1816	CARGSGYYGPGYYGMDVW	1946
009S-D07	LRP6e3e4	FPFRYYGMS	1551	ARIGWNGGSIVYA	1717	CARDYSDRSGIDYW	1911
010S-B10	LRP6e3e4	FAFKDYYMT	1548	SAIGAGGGTYYA	1779	CARESALYSSSWYYYYYGMDVW	1920
010S-C10	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1860
009S-E07	LRP6e3e4	YTFTGYYIH	1674	ZHVDPEDGETIYA	1819	CARGPAAIGILGWFDPW	1938
010S-D10	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARTLSGYSSSWYVFDYW	1964
010S-E10	LRP6e3e4	FTFSSYSMN	1579	SGISWNSGTTGYS	1797	CARDHSSGWRHYFDYW	1895
010S-F10	LRP6e3e4	FTFSNSDMN	1570	SYISGNSGYTNYA	1814	CASGSYYSDFDYW	1971
010S-G10	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GRINPNGGGTIYA	1769	CAREGGYYFDYW	1919
009S-F07	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GIINPSGGSTSYA	1761	CARAAGNFWSGYYTFDYW	1877
009S-G07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGSYGMDVW	1948
010S-H10	LRP6e3e4	YTFTSYYMH	1680	GWINPNSGGTNYA	1774	CAREAAEIPVGAFDIW	1914
010S-A11	LRP6e3e4	FTFSNSDMN	1570	SYISGNSGYTNYA	1814	CASGSYYSDFDYW	1972
010S-B11	LRP6e3e4	FTFRNYAIH	1564	SAIGTGGDTYYA	1780	CARDGGIRDFDYW	1894
010S-C11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CAADDLGLELHYW	1822
009S-H07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWMNPNSGNTGYA	1776	CASSVVPAGPAGVYAFDIW	1976
009S-A08	LRP6e3e4	GTFSSHAIN	1602	GWISANNGNTDYA	1775	CARDQDYGDYGWYYYGMDVW	1903
010S-D11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPVFGTANYA	1752	CATDEYSSSYAFDIW	1983

[0201]

克隆 ID	确认的结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
010S-E11	LRP6e3e4	FTFSAHGMH	1565	SGISESGGSTYYA	1791	CARGRGYSYGYYAFDIW	1943
010S-F11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDSDWGVVDPW	1905
010S-G11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPVLKITNYA	1768	CAVVDDAFDIW	1997
010S-H11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CAKDGTDGRFDPW	1846
009S-B08	LRP6e3e4	FTFTSSAVQ	1589	GWINAGNGNTTYA	1772	CARRGGDVTVPAAYYAMDVW	1963
010S-A12	LRP6e3e4	VTFSRYPIS	1667	GGIIPIFGTANYA	1749	CAKDSGNYGYYGMDVW	1854
010S-B12	LRP6e3e4	FTFSSYDMH	1578	SGITSNGGATYYA	1798	CARGTTGKGYYYYGMDVW	1949
010S-C12	LRP6e3e4	FTFSNYWIH	1571	SAIGTGGGTYYA	1781	CTTAGYKAARRSVYPRIFNFDYW	2044
010S-D12	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPIFGTANYA	1763	CAREEGVGGMDVW	1917
010S-E12	LRP6e3e4	FTFSSYAMH	1576	SAIGAGGGTYYA	1779	CARGVSSGYYYYYGMDVW	1950
010S-F12	LRP6e3e4	FTVSSNYMS	1592	SAIGTGGGTYYA	1781	CARAGTNWGGWYFDLW	1879
010S-G12	LRP6e3e4	FALSGYYMS	1550	SSISSSSTYIRYA	1803	CATVTGYSSAGAFDIW	1995
011S-A01	LRP6e3e4	FTFSTHAFH	1583	SAIRGSGERTYYA	1784	CARDLRNWGSPYWYFDLW	1901
011S-B01	LRP6e3e4	GTFSHYTIS	1600	GWINAGNGNTKYS	1771	CAKGGSLDMDVW	1864
011S-C01	LRP6e3e4	LTFTSHGMS	1615	SYVSDSGSSVYYA	1818	CARHPGSFGGYSYAWYYYYGMDVW	1957
011S-D01	LRP6e3e4	GTISDYTVS	1605	GIINPSGGSTSYA	1761	CARGYYDFDYW	1953
009S-C08	LRP6e3e4	FSFNTFGIH	1556	AVISYDGSNKYYA	1738	CAKSIAAAGTGYYGMDVW	1869
011S-E01	LRP6e3e4	FPFZYYSMN	1552	SAISGRDGRTYYA	1785	CAKDLGIQLPDYYFDYW	1847
009S-D08	LRP6e3e4	YTFTSYDIN	1679	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGPYYFDYW	1941
011S-F01	LRP6e3e4	FSFSDYYMS	1558	SGISESGGRTYYA	1790	CASAADFDYW	1967
009S-E08	LRP6e3e4	YGFTGYYIH	1668	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARGYGDYDLW	1952
009S-F08	LRP6e3e4	DTFANYGFS	1547	GXVNAGNGNTTYA	1777	CAKGWLDFDYW	1867
011S-G01	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPLFGTANYA	1750	CTTDDYGDQYGMDVW	2046
011S-H01	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CTTDDYGDLTHLDYW	2045
011S-A02	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARDKGYAFDIW	1896
011S-B02	LRP6e3e4	YSFTRTDMH	1670	GYISAYTGHTSYA	1778	CARDLGGTADYW	1899
011S-C02	LRP6e3e4	FTFSTYSMN	1585	SGISWNSGRIGYA	1795	CARDVGAFDIW	1906
009S-G08	LRP6e3e4	FTFSDFAMT	1566	SYISGDSGYTNYA	1813	CARLGSYPGPYYYYMDVW	1962
011S-D02	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SSISGSGGVTYYA	1801	CARGGNTYYYYYGMDVW	1928
009S-H08	LRP6e3e4	YTFTDYFMN	1673	GIINPSGDSTRFA	1758	CARDDGLGGMDVW	1889
011S-E02	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATDYGDYYYGMDVW	1984
009S-A09	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPILGSTNYA	1767	CTTDLWDYW	2048
011S-F02	LRP6e3e4	FTFSTYGMH	1584	SSISVSSGTTHYA	1805	CARGGSGSYYYAFDIW	1930
011S-G02	LRP6e3e4	YTFTSYAMN	1678	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDASGGSTGWYYFDSW	1887
011S-H02	LRP6e3e4	YTFTNNFMH	1676	GIINPSGGSTSYA	1761	CARGLYKRYSYGYGMDVW	1935
009S-B09	LRP6e3e4	FSFNTYAMN	1557	AVTSYDGGKKNY	1742	CARDAGGDYDYW	1885

克隆 ID	确认的结合	CDRH1	SID NO.	CDRH2	SID NO.	CDRH3	SID NO.
				A			
009S-C09	LRP6e3e4	GTFHTYGLS	1597	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGSGWSGLDYW	1945
011S-A03	LRP6e3e4	FTFSSYWMH	1580	STISGSGGRTYYA	1808	CATSPYGVFTLDYW	1994
011S-B03	LRP6e3e4	GTFSZYAIS	1604	GIINPSGGSTNYA	1760	CARAGYWSGYGYYGMDVW	1881
011S-C03	LRP6e3e4	YTFSYRYLH	1672	GGIIPIFGTANYA	1749	CASTVTTDAFDIW	1978
011S-D03	LRP6e3e4	FSFDDYGMS	1554	SVISSGGTIYYA	1812	CARHLSSGYLSYYGMDVW	1955
009S-F09	LRP6e3e4	YSFTRTDMH	1670	GYISAYTGHTSYA	1778	CARDLGGTADYW	1900
011S-E03	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1861
009S-G09	LRP6e3e4	FTFSRHSMN	1572	SYSSGNSGYTNYA	1817	CARGDLEFDYW	1923
011S-F03	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1862
009S-H09	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1863
011S-G03	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPIHGIANYA	1764	CAREYSYGYFRYW	1922
009S-A10	LRP6e3e4	FTFTSSAMQ	1588	GIINPSGGSTIYA	1759	CASGDTYDLYSLDVW	1970
009S-B10	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GWINAGNGNTTYA	1772	CAKVASGWSWPFDIW	1871
011S-B04	LRP6e1e2	YTFTSYDIN	1679	GIINPSGGSTSYA	1761	CTREHSYYYYGMDVW	2042
011S-C04	LRP6e1e2	GTFNSNAIS	1598	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARDYYGSGSYNYGMDVW	1913
011S-D04	LRP6e1e2	YTFTSYDIN	1679	GIINPSGGSTSYA	1761	CAREAYYYYYGMDVW	1916
011S-E04	LRP6e1e2	FTFSSZZMH	1581	SAIGTGGGTZYA	1782	CAKDLGRAAAGSMDVW	1850
011S-F04	LRP6e1e2	YIFTDYYMH	1669	GRIIPILGRANYA	1765	CARGGYSTLDYW	1933
011S-H04	LRP6e1e2	YIFTDYYMH	1669	GRIIPILGRANYA	1765	CARGGYSTLDYW	1934
011S-A05	LRP6e1e2	FTFSSYAMH	1576	SAIGTGGGTYYA	1781	CAKDLGRAAAGSMDVW	1848
011S-B05	LRP6e1e2	YZFTDYYMH	1683	GWMNPNSGNTGYA	1776	CTRVAWGLDYW	2043
011S-C05	LRP6e1e2	FTFSSYAMH	1576	SAIGTGGGTYYA	1781	CAKDLGRAAAGSMDVW	1849
1115.3	LRP6e1e2	GFSFSTS	2208	NLNGGS	2211	ELAGYGTPFAY	2214
421.1	LRP6e1e2	GYTFTTY	2209	FPGNVNT	2212	EELQYYFDY	2215
YW211.31.57	LRP6e3e4	GFTFTSY	2210	SPYSGS	2213	RARPPIRLHPRGSVMDY	2216

[0202]

[0203] 表2A,续

[0204]

克隆 ID	确认的结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
001S-C08	LRP6e1e2	RASQYISNYLN	2098	AASSLQS	2110	CQQSYITPLTF	2160
001S-C10	LRP6e1e2						
001S-D10	LRP6e1e2						
001S-E10	LRP6e1e2						
001S-F10	LRP6e1e2						
001S-G10	LRP6e1e2						
001S-A11	LRP6e1e2						
001S-B11	LRP6e1e2						
001S-C11	LRP6e1e2						
001S-E11	LRP6e1e2						
001S-F11	LRP6e1e2						
001S-G11	LRP6e1e2						
001S-H11	LRP6e1e2						
001S-A12	LRP6e1e2						
001S-B12	LRP6e1e2						
001S-C12	LRP6e1e2						
001S-D12	LRP6e1e2						
001S-F12	LRP6e1e2						
008S-B01	LRP5						
008S-C01	LRP5						
008S-D01	LRP5						
008S-E01	LRP5						
008S-G01	LRP5						
008S-A02	LRP5						
008S-C02	LRP5						
008S-D02	LRP5						
008S-E02	LRP5						
009S-C01	LRP6e3e4	RASQRVSNYLN	2089	AASSLQG	2110	CQQSYSVPYTF	2178
009S-B02	LRP6e3e4	RASQSISNYLN	2090	AASSLQS	2110	CQQSYSLPLTF	2170
009S-C02	LRP6e3e4	RASQSISNYLN	2090	AASSLQS	2110	CQQSYSMPLTF	2171
009S-D02	LRP6e3e4	SGSSSNVGNNYVS	2105	DNDKRPS	2122	CESWDSSLSSEVF	2139
010S-A02	LRP6e1e2						
010S-B02	LRP6e1e2						
010S-D02	LRP6e1e2						
010S-E02	LRP6e1e2						
010S-F02	LRP6e1e2						
009S-E02	LRP6e1e2						
009S-F02	LRP6e1e2						
009S-G02	LRP6e1e2						
009S-H02	LRP6e1e2						
009S-A03	LRP6e1e2						
010S-G02	LRP6e1e2						
010S-A03	LRP6e1e2						
009S-B03	LRP6e1e2						
010S-B03	LRP6e1e2						

[0205]

克隆 ID	确认的结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
010S-D03	LRP6e1e2						
009S-C03	LRP6e1e2						
009S-D03	LRP6e1e2						
009S-E03	LRP6e1e2						
009S-F03	LRP6e1e2						
010S-E03	LRP6e1e2						
010S-F03	LRP6e1e2						
009S-G03	LRP6e1e2						
009S-H03	LRP6e1e2						
009S-A04	LRP6e1e2						
009S-B04	LRP6e3e4						
010S-G03	LRP6e3e4						
009S-C04	LRP6e3e4						
009S-D04	LRP6e3e4						
010S-H03	LRP6e3e4						
009S-E04	LRP6e3e4						
010S-A04	LRP6e3e4						
009S-F04	LRP6e3e4						
010S-B04	LRP6e3e4						
009S-G04	LRP6e3e4						
009S-H04	LRP6e3e4						
010S-C04	LRP6e3e4						
010S-D04	LRP6e3e4						
010S-E04	LRP6e3e4						
010S-F04	LRP6e3e4						
009S-A05	LRP6e3e4						
010S-G04	LRP6e3e4						
010S-H04	LRP6e3e4						
010S-A05	LRP6e3e4						
010S-C05	LRP6e3e4						
010S-D05	LRP6e3e4						
010S-E05	LRP6e3e4						
010S-F05	LRP6e3e4						
013S-G04	LRP6e3e4						
013S-H04	LRP6e3e4						
013S-A05	LRP6e3e4						
013S-B05	LRP6e3e4						
013S-C05	LRP6e3e4						
013S-D05	LRP6e3e4						
013S-E05	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
013S-F05	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
013S-G05	LRP6e3e4	RASQDISNYLN	2079	AASTLQS	2113	CQQGNSFPYTF	2152
010S-G06	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	AASSLQS	2110	CQQSYRIHWTF	2163
009S-B05	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-C05	LRP6e3e4						
009S-D05	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-E05	LRP6e3e4	RASQGINSYLA	2081	DAKGLHP	2114	CQQSYSAPLSF	2166
009S-F05	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0206]

克隆 ID	确认的结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
009S-G05	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	AASTLQR	2112	CQQSYSAPLTF	2167
009S-C06	LRP6e3e4	RASRNINRYLN	2099	AASSLLS	2109	CQQSYNVPFTF	2162
009S-D06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-E06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-F06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-G06	LRP6e3e4	RASQNIGLYLN	2088	DASSLQR	2121	CQQSYSTPYTF	2176
009S-H06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D07	LRP6e3e4	RSSQSLLHSNGYNYLD	2102	LGSNRAS	2131	CMQATQFPLTF	2146
009S-F07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-G07	LRP6e3e4	RASQGISNYLA	2083	DASNLET	2115	CLQDFSFPWTF	2140
009S-H07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A08	LRP6e3e4	RASQGISNYLA	2083	GSSTLQS	2127	CQQTYSIPPTF	2181
011S-C01	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-C08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D08	LRP6e3e4	RASQGISNNLN	2082	DASSLES	2120	CLQHNSYPFTF	2143
011S-F01	LRP6e3e4	RASQDISNYLN	2079	AASSLQS	2110	CLQDYSYPRTF	2141
009S-E08	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYRYPTF	2165
009S-F08	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYSTSITF	2177
009S-G08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-H08	LRP6e3e4	QASQDISNYLA	2076	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A09	LRP6e3e4	QASQGITNYLN	2078	AASSLQS	2110	CLQDYTDPFTF	2142
011S-F02	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-G02	LRP6e3e4	RASQGISSYLA	2087	AASSLQS	2110	CQQAYSFPWTF	2150
011S-A03	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-C03	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYSFPPFTF	2168
011S-D03	LRP6e3e4	RASQSISSYLA	2093	AASTLQS	2113	CQQSYSTPLTF	2174
011S-F03	LRP6e3e4	KSSQSVLYTTTNRNHIA	2073	WASSRKS	2135	CQQYYSTPYTF	2189
011S-C04	LRP6e1e2	GASQSVPRNSLA	2066	GASQRAT	2124	CQQYHNWPPEYTF	2184
011S-D04	LRP6e1e2	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-H04	LRP6e1e2	QASQDISNYLN	2077	AASTLQS	2113	CQQSFSTPRTF	2156
008S-F02	LRP5	RSSQSLLHSDGYTYLY	2101	TLSYRAS	2134	CMQALEALFTF	2144
010S-C06	LRP6e1e2	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-E06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-H06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-A07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-B07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-C07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-D07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D05	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-E05	LRP6e3e4	RASQGINSYLA	2081	DAKGLHP	2114	CQQSYSAPLSF	2166
010S-E07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0207]

克隆 ID	确认的结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
009S-F05	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F07	LRP6e3e4	RASQSVYSNLA	2097	DTSNRAT	2123	CQQYNNWPPITF	2185
010S-G07	LRP6e3e4	RVSQGISSYLN	2103	AASSLQS	2110	CQQTYTIPFTF	2182
009S-G05	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	AASTLQR	2112	CQQSYSAPLTF	2167
010S-H07	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	GTSNLQS	2128	CQQSYSTPYTF	2176
010S-A08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B06	LRP6e3e4	RVSQSISSYLN	2103	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-B08	LRP6e3e4	RASQGISNNLN	2082	DASNLET	2115	CQQSYTSRLTF	2179
010S-C08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-C06	LRP6e3e4	RASRNINRYLN	2099	AASSLLS	2109	CQQSYNVPFTF	2162
009S-D06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-D08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-E06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-E08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	ZASSLQS	2137	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-F06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-G08	LRP6e3e4	RASQSVRSSDLA	2096	GSSSRAT	2126	CQQYGRSPRYSF	2183
010S-H08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-A09	LRP6e3e4	QASQDIANYLN	2075	AASSLQS	2110	CQQSYSTPYTF	2176
010S-B09	LRP6e3e4	RASQSISRYLN	2092	KASSLES	2130	CQQSYDSPWTF	2159
009S-G06	LRP6e3e4	RASQNIGLYLN	2088	DASSLQR	2121	CQQSYSTPYTF	2176
010S-C09	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-H06	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-D09	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	AASSLQS	2110	CQQIHSYPLTF	2155
010S-E09	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D08	LRP6e3e4	RASQGISNNLN	2082	DASSLES	2120	CLQHNSYPFTF	2143
010S-F09	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-G09	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	DASNLET	2115	CQQSYSTPLTF	2174
010S-H09	LRP6e3e4	RASQGISNYLN	2084	AASTLQS	2113	CQQGYGTPPMF	2153
010S-A10	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D07	LRP6e3e4	RSSQSLLHSNGYNYLD	2102	LGSNRAS	2131	CMQATQFPLTF	2146
010S-B10	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	GTSSLHT	2129	CQQANSFPFTF	2148
010S-C10	LRP6e3e4	KSSQSILSSSSNRDSLA	2072	WASSRKS	2135	CQQYYNIPYSF	2187
009S-E07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-D10	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-E10	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F10	LRP6e3e4	RASQSISNYLN	2090	AASTLES	2111	CQQANSFPPTF	2148
010S-G10	LRP6e3e4	RASQGISNYLA	2083	AASSLQS	2110	CQQSYSTPWTF	2175
009S-F07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0208]

克隆 ID	确认的结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
009S-G07	LRP6e3e4	RASQGISNYLA	2083	DASNLET	2115	CLQDFSFPWTF	2140
010S-H10	LRP6e3e4	KSSHSLLYSSD NKNYLA	2071	WSSTRES	2136	CQQYYSTPQTF	2188
010S-A11	LRP6e3e4	RASQSIZNYLN	2095	ZASTLES	2138	CQQANSFPPTF	2148
010S-B11	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	AASTLQS	2113	CQQSYSTPLTF	2174
010S-C11	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-H07	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A08	LRP6e3e4	RASQGISNYLA	2083	GSSTLQS	2127	CQQTYSIPPTF	2181
010S-D11	LRP6e3e4	RASQSVSSNLA	2097	GASTRAT	2125	CQQFDRSPLTF	2151
010S-E11	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F11	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-G11	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-H11	LRP6e3e4	RASQDISSYLA	2080	SASTLQS	2133	CQQSNSFPYTF	2157
009S-B08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	ZASSLQS	2137	CQQSYSTPLTF	2174
010S-A12	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-B12	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-C12	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-D12	LRP6e3e4	RPSQSIGSWLA	2100	DASNLQS	2116	CQQSSSTPYTF	2158
010S-E12	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F12	LRP6e3e4	RASQGISRDLA	2085	AASTLQS	2113	CQQSYSPPFTF	2172
010S-G12	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-A01	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-B01	LRP6e3e4	RASQGISNYLA	2083	AASSLHS	2108	CQQSYRTPLTF	2164
011S-C01	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-D01	LRP6e3e4	RASQGISNYLA	2083	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-C08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-E01	LRP6e3e4	RASQGISSALA	2086	AASTLQS	2113	CQQSYSSPPTF	2173
009S-D08	LRP6e3e4	RASQGISNNLN	2082	DASSLES	2120	CLQHNSYPFTF	2143
011S-F01	LRP6e3e4	RASQDISNYLN	2079	AASSLQS	2110	CLQDYSYPRTF	2141
009S-E08	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYRYPTF	2165
009S-F08	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYSTSITF	2177
011S-G01	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-H01	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-A02	LRP6e3e4	RSSQSLLHSNG YNYLD	2102	AASSLQS	2110	CMQALQTPITF	2145
011S-B02	LRP6e3e4	RZSQSZSZYLN	2104	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-C02	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	AASILQS	2107	CQQSYSIPFTF	2169
009S-G08	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-D02	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-H08	LRP6e3e4	QASQDISNYLA	2076	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-E02	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A09	LRP6e3e4	QASQGITNYLN	2078	AASSLQS	2110	CLQDYTDPFTF	2142
011S-F02	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-G02	LRP6e3e4	RASQGISSYLA	2087	AASSLQS	2110	CQQAYSFPWTF	2150
011S-H02	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B09	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	AASSLQS	2110	CQQSYNTPRTF	2161
009S-C09	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	DASNLET	2115	CQQSYTTPFTF	2180
011S-A03	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0209]

克隆 ID	确认的结合	CDRL1	SID NO.	CDRL2	SID NO.	CDRL3	SID NO.
011S-B03	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-C03	LRP6e3e4	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYSFPPFTF	2168
011S-D03	LRP6e3e4	RASQSISSYLA	2093	AASTLQS	2113	CQQSYSTPLTF	2174
009S-F09	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-E03	LRP6e3e4	KSSHSLLSTSTNRNQLA	2070	WASSRKS	2135	CQQYNNWPYTF	2186
009S-G09	LRP6e3e4	RASQGISNYLA	2083	SASSLQS	2132	CQQGYNTPRTF	2154
011S-F03	LRP6e3e4	KSSQSVLYTTTNRNHIA	2074	WASSRKS	2135	CQQYYSTPYTF	2189
009S-H09	LRP6e3e4	KSSHSLLSTSTNRNHLA	2069	WASSRKS	2135	CQQYYNIPYSF	2187
011S-G03	LRP6e3e4	RASQGISSYLA	2087	DASNLET	2115	CQQANSLFTF	2149
009S-A10	LRP6e3e4	RASQSISRWLA	2091	AASSLQS	2110	CQQAYSFPWTF	2150
009S-B10	LRP6e3e4	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-B04	LRP6e1e2	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-C04	LRP6e1e2	GASQSVPRNSLA	2066	GASQRAT	2124	CQQYHNWPPEYTF	2184
011S-D04	LRP6e1e2	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-E04	LRP6e1e2	WASQSVRGNYVA	2106	DASNRAA	2117	CQHRSNWPLTF	2147
011S-F04	LRP6e1e2	HGSQDISNYLN	2067	DASNRQS	2119	CQQSFSTPRTF	2156
011S-H04	LRP6e1e2	QASQDISNYLN	2077	AASTLQS	2113	CQQSFSTPRTF	2156
011S-A05	LRP6e1e2	WASQSVRGNYVA	2106	DASNRAG	2118	CQHRSNWPLTF	2147
011S-B05	LRP6e1e2	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-C05	LRP6e1e2	WASQSVRGNYVA	2106	DASNRAA	2117	CQHRSNWPLTF	2147
1115.3	LRP6e1e2	KASQSISYNLH	2217	YTSQSIS	2220	QQSNSWPLT	2223
421.1	LRP6e1e2	SANSSVRFMF	2218	RTSNLAS	2221	QQYHSYPWT	2224
YW211.31.57	LRP6e3e4	RASQDVSTAVA	2219	SASFLYS	2222	QQSYTTPPT	2225

[0210] 表2B.抗LRP5/6抗体克隆ID、重链(HC)Seq ID No以及结合特性。

[0211]

克隆 ID	HC Seq ID NO	确认的结合
001S-F11	74	LRP6e1e2
009S-G02	75	LRP6e1e2
009S-A03	76	LRP6e1e2
009S-D03	77	LRP6e1e2
009S-F03	78	LRP6e1e2
009S-H03	79	LRP6e1e2
009S-A04	80	LRP6e1e2
009S-B04	81	LRP6e3e4
009S-D04	82	LRP6e3e4
009S-E04	83	LRP6e3e4
009S-F04	84	LRP6e3e4
009S-G04	85	LRP6e3e4
009S-H04	86	LRP6e3e4

[0212]

009S-A05	87	LRP6e3e4
013S-G04	88	LRP6e3e4
013S-H04	89	LRP6e3e4
013S-C05	90	LRP6e3e4
013S-D05	91	LRP6e3e4
013S-G04	92	LRP6e3e4
013S-H04	93	LRP6e3e4
013S-A05	94	LRP6e3e4
013S-C05	95	LRP6e3e4
013S-D05	96	LRP6e3e4
008S-D01	97	LRP5

[0213] 在某些实施例中,在Wnt替代分子的上下文中,LRP5/6结合区可以选自以为以下的K_D与LRP5或LRP6结合的任何结合结构域:小于或等于约1×10^{-4}M、小于或等于约1×10^{-5}M、小于或等于约1×10^{-6}M、小于或等于约1×10^{-7}M、小于或等于约1×10^{-8}M、小于或等于约1×10^{-9}M、小于或等于约1×10^{-10}M、小于或等于约1×10^{-11}M、小于或等于约1×10^{-12}M、小于或等于约1×10^{-13}M、小于或等于约1×10^{-14}M,或小于或等于$1x10^{-15}$M。在某些实施例中,在Wnt替代分子的上下文中,LRP5/6结合区可以选自以为以下的K_D与LRP5或LRP6结合的任何结合结构域:大于或等于约1×10^{-4}M、大于或等于约1×10^{-5}M、大于或等于约1×10^{-6}M、大于或等于约1×10^{-7}M、大于或等于约1×10^{-8}M、大于或等于约1×10^{-9}M、大于约1×10^{-10}M、大于或等于约1×10^{-11}M、大于或等于约1×10^{-12}M、大于或等于约1×10^{-13}M、大于或等于约1×10^{-14}M,或大于或等于1×10^{-15}M。在某些实施例中,LRP5/6结合区可以选自以例如K_D为以下的高亲和力与LRP5或LRP6结合的任何结合结构域:小于约1×10^{-7}M、小于约1×10^{-8}M、小于约1×10^{-9}M或小于约1×10^{-10}M。

[0214] 其它适合的LRP5/6结合区包含但不限于:重新设计的LRP5/6结合蛋白、抗体衍生的结合蛋白(例如scFv、Fab等)以及与一种或多种Fzd蛋白特异性地结合的抗体的其它部分;VHH或sdAb衍生的结合结构域;基于打结素的工程化支架;天然存在的LRP5/6,包含但不限于DKK1、DKK2、DKK3、DKK4、骨硬化蛋白;Wise;包括上述中的任何一种的融合蛋白;上述中任何一种的衍生物;上述中任何一种的变体;以及上述中任何一种的生物活性片段等。可以亲和选择LRP5/6结合区以增强结合。

[0215] Dickkopf(DKK)基因家族的成员(参见Krupnik等人(1999)《基因(Gene)》238(2):301-13)包含DKK-1、DKK-2、DKK-3和DKK-4以及DKK-3相关蛋白Soggy(Sgy)。hDKK 1-4含有两个不同的半胱氨酸富集结构域,其中10个半胱氨酸残基的位置在家族成员之间高度保守。人Dkk基因和蛋白质的示例性序列是可公开获得的,例如Genbank登录号:NM_014419(soggy-1);NM_014420(DKK4);AF177394(DKK-1);AF177395(DKK-2);NM_015881(DKK3);以及NM_014421(DKK2)。在本公开的一些实施例中,LRP6结合部分是DKK1肽,包含但不限于人DKK1的C端结构域。C端结构域可以包括以下序列:KMYHTKGQEGSVCLRSSDCASGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLEIFQRCYCGEGLSCRIQKDHHQASNSSRLHTCQRH(SEQ ID NO:2249)(参见Genbank登录号NP_036374)或其生物活性片段。

[0216] 例如在以下中讨论了DKK蛋白与LRP5/6的结合:Brott和Sokol《分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》22(17),6100-6110(2002);以及Li等人《生物化学期刊(J.Biol.Chem.)》277(8),5977-5981(2002),所述文献各自通过引用明确并入本文中。人DKK2(Genbank参考

NP_055236)的对应区可以包括以下序列:KMSHIKGHEGDPCLRSSDCIEGFCCARHFWTKICKPVLHQGEVCTKQRKKGSHGLEIFQRCDCAKGLSCKVWKDATYSSKARLHVCQK(SEQ ID NO:2250)或其生物活性片段。

[0217] 与LRP5或LRP6特异性地结合的抗体是本领域中已知的并且可商购获得或者可以从头产生。LRP5、LRP6或其片段可以用作免疫原或用于筛选测定法以开发抗体。已知抗体的实例包含但不限于以下中描述的那些:Gong等人(2010)《公共科学图书馆综合版(PLoS One)》。5(9):e12682;Marvin等人(2010)《美国国家科学院院刊》107(35):15473-8;以及可从例如以下商购的那些:圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz biotechnology)抗体克隆1A12,所述抗体克隆是针对人类来源的合成LRP5/6产生的并且与小鼠和人类来源的LRP6和LRP5的全长和蛋白水解片段两者结合;所述单克隆抗体2B11;对目录号为5731的LRP5(D80F2)具有特异性的信号传导技术公司(Cell Signaling Technology)抗体;等。

[0218] 在某些实施例中,本文公开的Wnt替代分子包括一个或多个多肽,所示一个或多个多肽包括两个或更多个结合区。例如,两个或更多个结合区可以是两个或更多个Fzd结合区或两个或更多个LRP5/6结合区,或者所述两个或更多个结合区可以包括一个或多个Fzd结合区和一个或多个LRP5/6结合区。结合区可以直接连接或邻接或者可以被接头(例如,多肽接头或非肽接头等)分开。接头的长度以及因此结合结构域之间的间隔可以用于调节信号强度并且可以根据Wnt替代分子的期望用途进行选择。结合结构域之间的加强距离可以有所变化,但在某些实施例中可以小于约100埃、小于约90埃、小于约80埃、小于约70埃、小于约60埃或小于约50埃。在一些实施例中,接头是刚性接头,在其它实施例中,接头是柔性接头。在某些实施例中,在接头是肽接头的情况下,接头在长度上可以为约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个氨基酸,并且具有足够的长度和氨基酸组成来加强结合结构域之间的距离。在一些实施例中,接头包括一个或多个甘氨酸和/或丝氨酸残基或由其组成。

[0219] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括与SEQ ID NO:109-124或125-157中任一个所公开的多肽序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性或与SEQ ID NO:109-124或125-157中任一个所公开的多肽序列的抗原结合片段具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的多肽序列。在某些实施例中,Wnt替代分子包括SEQ ID NO:109-124或125-147中任一个所示的多肽序列或其抗原结合片段或由其组成。在特定实施例中,抗原结合片段结合一种或多种Fzd受体并且还结合LRP5和/或LRP6。

[0220] Wnt替代分子可以例如通过Fc结构域、借助于级联、卷曲螺旋、多肽拉链、生物素/抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素多聚化等来进行多聚化。Wnt替代分子还可以与本领域中已知的如PEG、Fc等部分连接以增强体内稳定性。

[0221] 在某些实施例中,Wnt替代分子通过与一种或多种Fzd蛋白和LRP5/6结合,特别是通过与细胞表面(例如,人类细胞的表面)上的这些蛋白结合而直接激活典型的Wnt信号传导。Wnt替代分子对Wnt信号传导的直接激活与Wnt信号传导的加强相反,其仅在存在天然Wnt蛋白时才增强活性。

[0222] Wnt替代分子例如通过模拟Wnt蛋白与卷曲蛋白结合的作用或活性来激活Wnt信号传导。本公开的Wnt替代分子模拟Wnt活性的能力可以通过多种测定法来证实。Wnt替代分子

通常引发与受体的天然配体引发的反应或活性类似或相同的反应或活性。具体地,本公开的Wnt替代分子增强了典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导通路。如本文所使用的,术语“增强”是指Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平与不存在本公开的Wnt替代分子的情况下的水平相比的可测量增加。

[0223] 在本领域中已知多种用于测量典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导水平的方法。这些方法包含但不限于测量以下的测定法:Wnt/β-连环蛋白靶基因表达;TCF报告基因基因表达;β-连环蛋白稳定;LRP磷酸化;Axin从细胞质向细胞膜转运并与LRP结合。典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导通路最终通过转录因子TCF7、TCF7L1、TCF7L2和LEF引起基因表达的变化。在许多细胞和组织中已经表征了对Wnt激活的转录应答。由此,通过本领域众所周知的方法进行的全局转录谱可以用于评定Wnt/β-连环蛋白信号传导激活或抑制。

[0224] Wnt应答性基因表达的变化通常由TCF和LEF转录因子介导。TCF报告基因测定法评定TCF/LEF控制基因的转录变化以确定Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平。TCF报告基因测定法最早由Korinek,V.等人,1997描述。此方法也称为TOP/FOP,其涉及使用位于最小c-Fos启动子驱动荧光素酶表达上游的最佳TCF基序CCTTTGATC的三个拷贝或突变基序CCTTTGGCC的三个拷贝(分别为pTOPFI_ASH和pFOPFI_ASH),以确定内源性p-连环蛋白/TCF4的反式激活活性。这两个报告基因活性的较高比率(TOP/FOP)指示较高的β-连环蛋白/TCF4活性,而这两个报告基因活性的较低比率指示较低的β-连环蛋白/TCF4活性。

[0225] 对Wnt信号进行应答的各种其它报告基因转基因在动物中完整存在,并且因此有效地反映了内源性Wnt信号传导。这些报告基因基于多聚化的TCF结合位点,所述多聚的TCF结合位点驱动LacZ或GFP的表达,这可通过本领域已知的方法容易地检测。这些报告基因包含:TOP-GAL、BAT-GAL、ins-TOPEGFP、ins-TOPGAL、LEF-EGFP、Axin2-LacZ、Axin2-d2EGFP、Lgr5tm1(cre/ERT2)、TOPdGFP。

[0226] 在某些情况下,由与TCF转录因子和TNIK形成复合物介导的去磷酸化β-连环蛋白向膜的募集、β-连环蛋白的稳定化和磷酸化状态以及β-连环蛋白向细胞核的易位(Klapholz-Brown Z等人,《公共科学图书馆期刊》2(9)e945,2007)是Wnt信号传导通路中的关键步骤。稳定化由抑制“破坏”复合物的Disheveled家族蛋白介导,因此减少了细胞内β-连环蛋白的降解,并且此后β-连环蛋白易位到细胞核。因此,测量细胞中β-连环蛋白的水平和位置很好地反映了Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平。这种测定法的非限制性实例是“Biolmageβ-连环蛋白重分布测定法”(赛默科技(Thermo Scientific)),其提供稳定表达与增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的C端融合的人β-连环蛋白的重组U2OS细胞。利用荧光显微镜或HCS平台执行成像和分析,从而允许EGFP-β-连环蛋白的水平和分布可视化。

[0227] 抑制破坏复合物的另一种方式是通过将Axin募集到Wnt共受体LRP的细胞质尾区来去除Axin。Axin已经表现出优先结合LRP尾区的磷酸化形式。因此,例如用GFP-Axin融合蛋白可视化Axin易位是用于评定Wnt/β-连环蛋白信号传导水平的另一种方法。

[0228] 在某些实施例中,如在上述测定法中测量的,例如在TOPFIash测定法中测量的,与中性物质诱导的β-连环蛋白信号传导或阴性对照相比,Wnt替代分子将典型的Wnt通路信号传导(例如,β-连环蛋白信号传导)增强或增加至少30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、150%、200%、250%、300%、400%或500%。阴性对照可以包含在这些测定法中。在特定实施例中,在上述测定法中测量时,例如

在TOPFIash测定法或本文提及的其它测定法中的任一种测定法中测量时,与不存在Wnt替代分子的情况下的活性相比,Wnt替代分子可以将β-连环蛋白信号传导增强2倍、5倍、10倍、100倍、1000倍、10000倍或更多倍。

[0229] 当在本文中使用时,"Wnt基因产物"或"Wnt多肽"涵盖天然序列Wnt多肽、Wnt多肽变体、Wnt多肽片段和嵌合Wnt多肽。在特定实施例中,Wnt多肽是天然人全长成熟Wnt蛋白。

[0230] 例如,本申请中关注的人天然序列Wnt蛋白包含以下:Wnt-1(GenBank登录号NM_005430);Wnt-2(GenBank登录号NM_003391);Wnt-2B(Wnt-13)(GenBank登录号NM_004185(同种型1)、NM_024494.2(同种型2))、Wnt-3(RefSeq.:NM_030753)、Wnt3a(GenBank登录号NM_033131)、Wnt-4(GenBank登录号NM_030761)、Wnt-5A(GenBank登录号NM_003392)、Wnt-5B(GenBank登录号NM_032642)、Wnt-6(GenBank登录号NM_006522)、Wnt-7A(GenBank登录号NM_004625)、Wnt-7B(GenBank登录号NM_058238)、Wnt-8A(GenBank登录号NM_058244)、Wnt-8B(GenBank登录号NM_003393)、Wnt-9A(Wnt-14)(GenBank登录号NM_003395)、Wnt-9B(Wnt-15)(GenBank登录号NM_003396)、Wnt-1 OA(GenBank登录号NM_025216)、Wnt-10B(GenBank登录号NM_003394)、Wnt-11(GenBank登录号NM_004626)、Wnt-16(GenBank登录号NM_016087))。尽管每个成员与家族具有不同程度的序列同一性,但是所有成员均对含有间距高度保守的23-24个保守半胱氨酸残基的较小(即,39-46kD)、酰化、棕榈酰化、分泌的糖蛋白进行编码(McMahon,A P等人、《遗传学趋势(Trends Genet.)》1992;8:236-242;Miller,J R.,《基因组生物学(Genome Biol.)》2002;3(1):3001.1-3001.15)。关注的其它天然序列Wnt多肽包含来自任何哺乳动物的上述直系同源物,所述哺乳动物包含家养和农场动物以及动物园、实验室或宠物动物,如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔、大鼠、小鼠、青蛙、斑马鱼、果蝇、蠕虫等。

[0231] 本文使用的"Wnt通路信号传导"或"Wnt信号传导"指代生物活性Wnt通过其对细胞施加其作用以调节细胞的活性的机制。Wnt蛋白通过与Wnt受体结合来调节细胞活性,所述Wnt受体包含来自蛋白质的卷曲蛋白(Fzd)家族的蛋白质、来自蛋白质的ROR家族的蛋白质、来自蛋白质的LRP家族的蛋白LRP5、LRP6、蛋白FRL1/crypto和蛋白Derailed/Ryk。一旦通过Wnt结合激活,一种或多种Wnt受体就将激活一个或多个细胞内信号传导级联。这些包含典型的Wnt信号传导通路;Wnt/平面细胞极性(Wnt/PCP)通路;Wnt-钙(Wnt/Ca^{2+})通路(Giles、RH等人(2003)《生物化学与生物物理学报(Biochim Biophys Acta)》1653,1-24;Peifer,M.等人(1994)《发育(Development)》120:369-380;Papkoff,J.等人(1996)《分子与细胞生物学(Mol.Cell Biol.)》16:2128-2134;Veeman,M.T.等人(2003)《发育细胞(Dev.Cell)》5:367-377);以及如本领域所公知的其它Wnt信号传导通路。

[0232] 例如,典型的Wnt信号传导通路的激活引起细胞内蛋白β-连环蛋白的磷酸化的抑制,从而导致β-连环蛋白在细胞溶质中积累,并随后易位到细胞核,在所述细胞核处,β-连环蛋白与转录因子(例如,TCF/LEF)相互作用以激活靶基因。Wnt/PCP通路的激活会激活RhoA、c-Jun N端激酶(JNK)和nemo样激酶(NLK)信号传导级联,以控制如组织极性和细胞运动等生物过程。通过结合Wnt-4、Wnt-5A或Wnt-11激活Wnt/Ca^{2+}引起细胞内钙离子的释放,这激活了钙敏感酶,如蛋白激酶C(PKC)、钙-钙调素依赖性激酶II(CamKII)或钙调磷酸酶(CaCN)。通过测定上述信号传导通路的活性,可以容易地确定抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代分子)的生物学活性。

[0233] 在某些实施例中,Wnt替代分子的功能性质可以使用技术人员已知的多种方法来评定,所述多种方法包含例如使用体外或体内模型(包含但不限于本文所述的任何体外或体内模型)应答于Wnt、癌细胞和/或肿瘤生长抑制的亲和力/结合测定法(例如,表面等离子体共振、竞争性抑制测定法)、细胞毒性测定法、细胞活力测定法、细胞增殖或分化测定法。还可以测试本文所述的Wnt替代分子对Fzd受体内在化、体外和体内功效等的影响。可以使用技术人员已知的公认的方案或可商购的试剂盒执行此类测定(参见例如《现代分子生物学实验指南》(格林出版联合公司(Greene Publ.Assoc.Inc.)和纽约州纽约市约翰·威利父子公司(John Wiley&Sons,Inc.));《当前免疫学方案》(由纽约州纽约市约翰·威立父子公司的John E.Coligan、Ada M.Kruisbeek、David H.Margulies、Ethan M.Shevach、Warren Strober 2001编辑);或商业上可获得的试剂盒。

[0234] 在某些实施例中,Wnt替代分子的Fzd结合区(例如,抗Fzd抗体的抗原结合片段)包括本文所述的抗Fzd抗体的CDR中的一个或多个CDR。在某些实施例中,Wnt替代分子的LRP5/6结合区(例如,抗LRP5/6抗体的抗原结合片段)包括本文所述的抗LRP5/6抗体的CDR中的一个或多个CDR。在这方面,已经表明,在一些情况下,可以仅转移抗体的VHCDR3,同时仍保留所期望的特异性结合(Barbas等人,《美国国家科学院院刊》(1995)92:2529-2533)。还参见McLane等人,《美国国家科学院院刊》(1995)92:5214-5218、Barbas等人,《美国化学会志(J.Am.Chem.Soc)》(1994)116:2161-2162。

[0235] 本文还公开了一种用于获得对Fzd受体具有特异性的抗体或抗原结合结构域的方法,所述方法包括通过氨基酸序列中的一个或多个氨基酸的添加、缺失、取代或插入来提供本文所示的VH结构域或作为VH结构域的氨基酸序列变体的VH结构域;任选地将由此提供的VH结构域与一个或多个VL结构域组合;以及测试VH结构域或一个或多个VH/VL组合以鉴定特异性结合成员或对一种或多种Fzd受体具有特异性并任选地具有一种或多种期望性质的抗体抗原结合结构域。VL结构域可以具有基本上如本文所示的氨基酸序列。可以采用类似的方法,其中将本文公开的VL结构域的一个或多个序列变体与一个或多个VH结构域组合。

[0236] 在特定实施例中,Wnt替代分子是水溶性的。“水溶性”意指在不存在清洁剂的情况下可溶于水性缓冲液,通常以提供生物有效剂量的多肽的浓度可溶的组合物。水溶性的组合物形成基本上均质的组合物,所述基本上均质的组合物的比活性为所述基本上均质的组合物从其纯化的起始材料的比活性的至少约5%,通常为起始材料的比活性的至少约10%、20%或30%,更通常为起始材料的比活性的约40%、50%或60%,并且可以为约50%、约90%或更大。本文所公开的Wnt替代分子通常形成浓度为至少25μM或更高,例如,至少25μM、40μM或50μM,通常至少60μM、70μM、80μM或90μM,有时多达100μM、120μM或150μM的基本上均质的水溶液。换句话说,本文所公开的Wnt替代分子通常形成浓度为约0.1mg/ml、约0.5mg/ml、约1mg/ml或更大的基本上均质的水溶液。

[0237] 与抗体或其抗原结合片段“特异性结合”或“优先结合”(在本文中可互换使用)的抗原或表位是本领域中公知的术语,并且用于确定这种特异性或优先结合的方法也是本领域中公知的。如果分子(例如,Wnt替代分子)与特定细胞或物质比其与替代性细胞或物质更频繁地、更快速地、持续时间更长地和/或亲和力更大地反应或缔合,则所述分子被称为展现出“特异性结合”或“优先结合”。如果分子或其结合区(例如,Wnt替代分子或其结合区)比其与其它物质亲和力更大地、亲合性更高地、更容易地和/或持续时间更长地结合,则所述

分子或其结合区与靶抗原(例如,Fzd受体)“特异性结合”或“优先结合”。例如,与Fzd1受体特异性结合或优先结合的Wnt替代分子或其结合区是比其结合其它Fzd受体或非Fzd蛋白亲和力更大地、亲合性更高地、更容易地和/或持续时间更长地结合Fzd1受体的抗体。通过阅读此定义还应理解,例如特异性或优先结合第一靶标的Wnt替代分子或其结合区可以或可以不特异性或优先结合第二靶标。如此,“特异性结合”或“优先结合”不一定需要(尽管其可以包含)排他结合。通常,但不是必然地,提及结合意指优先结合。

[0238] 在一些实施例中,Wnt替代分子的一个或多个Fzd结合区中的任一个Fzd结合区与一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同的卷曲蛋白受体,例如人卷曲蛋白受体Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9、Fzd10中的一种或多种人卷曲蛋白受体结合。在一些实施例中,Fzd结合区中的任一个Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8结合。在各个实施例中,Fzd结合区中的任一个Fzd结合区与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;或者(xi)Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8。

[0239] 在一些实施例中,Fzd结合区对关注的一种或多种Fzd受体具有选择性,例如相对于其它Fzd受体,针对一种或多种期望的Fzd受体具有至少10倍、25倍、50倍、100倍、200倍或更多倍的特异性。在一些实施例中,Wnt替代分子的一个或多个Fzd结合区中的任一个Fzd结合区是多特异性的并且与多种Fzd受体(例如,Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9或Fzd10中的两种或更多种)结合或特异性结合。例如,一个或多个Fzd结合区中的任一个可以是双特异性的、三特异性的、四特异性的等。在一些实施例中,Wnt替代分子的一个或多个Fzd结合区中的任一个Fzd结合区是单特异性的并且结合或特异性结合单一Fzd受体,例如仅与以下之一结合或特异性结合:Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9或Fzd10。

[0240] 在一些实施例中,单特异性Fzd结合区与Fzd受体的区结合,所述区:不包含所述Fzd受体的半胱氨酸富集结构域(CRD);或者包含少于FZD受体的整个CRD。如图2A所展示的,CRD内的序列在10种Fzd受体之间显示出很强的同源性,其中亚家族成员之间的同源性甚至更高。因此,本文公开的单特异性Fzd结合区的某些实施例不结合CRD,或仅结合CRD的子集。

[0241] 在一些实施例中,Fzd结合区(例如,单特异性Fzd结合区)与包括CRD后胞外结构域的至少一部分的表位结合,所述表位在本文中称为Fzd受体的“铰链区”(参见图2A)。在特定实施例中,至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的表位存在于Fzd受体的铰链区内。如图4A-4E所展示的,Fzd受体的胞外结构域的铰链区显示出高度趋异的序列。SEQ ID NO:98-107和下表3中示出了说明性Fzd受体铰链区的序列。在某些实施例中,所述铰链区包括与SEQ ID NO:98-107中所示的任一个序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0242] 表3:Fzd铰链区序列

[0243]

SID NO.	Fzd	铰链区序列
98	Fzd1	CVGQNTSDKGTPTPSLLPEFWTSNPQHGGGGHRGGFPGGAGASERGKFSC
99	Fzd2	CVGQNHSEDGAPALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHC
100	Fzd3	CDEPYPRLVDLNLAGEPTEGAPVAVQRDYGFWC
101	Fzd4	CMEGPGDEEVPLPHKTPIQPGEEC
102	Fzd5	CMDYNRSEATTAPPRPFPAKPTLPGPPGAPASGGEC
103	Fzd6	CDETVPVTFDPHTEFLGPQKKTEQVQRDIGFWC
104	Fzd7	CVGQNTSDGSGGAGGSPTAYPTAPYLPDPPFTAMSPSDGRGRLSFPFSC
105	Fzd8	CMDYNRTDLTTAAPSPPRRLPPPPPGEQPPSGSGHGRPPGARPPHRGGGRGGGGGDAAAPPARGGGGGGKARPPGGGAAPC
106	Fzd9	CMEAPENATAGPAEPHKGLGMLPVAPRPARPPGDLGPGAGGSGTC
107	Fzd10	CMEAPNNGSDEPTRGSGLFPPLFRPQRPHSAQEHPLKDGGPGRGGC

[0244] 在一些实施例中,单特异性Fzd结合区结合包括Fzd受体的CRD的上游的N端区的至少一部分的表位(图2A)。在特定实施例中,至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的表位存在于Fzd受体的N端区内。SEQ ID NO:108和下表4示出了说明性N端区的序列。在某些实施例中,N端区包含与SEQ ID NO:108具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0245] 表4:Fzd N端区序列

[0246]

SEQ ID NO	Fzd	铰链区序列
108	Fzd1	QAAGQGPGQGPGPGQQPPPPPQQQQSGQQYN

[0247] 在一些实施例中,Wnt替代分子的一个或多个LRP5/6结合区中的任一个结合区与LRP5/6中的一个或两个结合。为了方便起见,术语“LRP5/6”用于共同地指代LRP5和/或LRP6中的任一个或两个。

[0248] 免疫结合通常是指在免疫球蛋白分子与免疫球蛋白对其具有特异性的抗原之间例如举例来说但不限于由于静电、离子、亲水和/或疏水吸引或排斥、位阻力、氢键结合、范德华力和其它相互作用而发生的类型的非共价相互作用。可以在相互作用的解离常数(K_d)方面表达免疫结合相互作用的强度或亲和力,其中更小的K_d表示更大的亲和力。可以使用本领域中公知的方法对所选多肽的免疫结合性质定量。一种此类方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力并且取决于在两个方向上同等地影响速率的几何参数。因此,可以通过计算缔合和解离的浓度和实际速率来确定“缔合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})。K_{off}/K_{on}的比率实现消除与亲和力无关的所有参数,并且因此等于解离常数K_d。通常参见Davies等人(1990)《生物化学年评(Annual Rev.Biochem.)》59:439-473。

[0249] 在某些实施例中,本文所述的Wnt替代分子或其结合区具有小于约10,000nM、小于约1000nM、小于约100nM、小于约10nM、小于约1nM、小于约0.1nM、小于约0.01nM、小于约0.001nM、小于约0.0001nM、小于约0.00001nM、或小于约0.000001nM的亲和力,并且在一些实施例中,抗体可以具有对一个或多个Fzd受体表位或LRP5或LRP6受体的甚至更高的亲和力。

[0250] 免疫球蛋白的恒定区表现出比可变区少的序列多样性,并且负责结合许多天然蛋白以引发重要的生化事件。在人类中,存在五种不同类别的抗体,包含IgA(其包含亚类IgA1

和IgA2)、IgD、IgE、IgG(其包含亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)和IgM。这些抗体类别之间的区别特征是其恒定区,但是V区可以存在细微差异。

[0251] 抗体的Fc区与许多Fc受体和配体相互作用,从而赋予一系列重要的被称为效应子功能的功能能力。对于IgG,Fc区包括Ig结构域CH2和CH3以及通向CH2的N端铰链。IgG类别的Fc受体的重要家族是Fcγ受体(FcγR)。这些受体介导抗体与免疫系统的细胞免疫部分(cellular arm)之间的通讯(Raghavan等人,1996,《细胞和发育生物学年度评论(Annu Rev Cell Dev Biol)》12:181-220;Ravetch等人,2001,《免疫学年度评论(Annu Rev Immunol)》19:275-290)。在人类中,这种蛋白质家族包含:FcγRI(CD64),其包含同种型FcγRIa、FcγRIb和FcγRIc;FcγRII(CD32),其包含同种型FcγRIIa(包含同种异型H131和R131)、FcγRIIb(包含FcγRIIb-1和FcγRIIb-2)和FcγRIIc;以及FcγRIII(CD16),其包含同种型FcγRIIIa(包含同种异型V158和F158)和FcγRIIIb(包含同种异型FcγRIIIb-NA1和FcγRIIIb-NA2)(Jefferis等人,2002,《免疫学快报(Immunol Lett)》82:57-65)。这些受体通常具有介导与Fc结合的细胞外结构域、跨膜区和可以介导细胞内的一些信号传导事件的细胞内结构域。这些受体在各种免疫细胞中表达,所述免疫细胞包含单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、B细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞和T细胞。Fc/FcγR复合物的形成将这些效应细胞募集到结合抗原的位点,从而通常产生细胞内的信号传导事件和重要的后续免疫应答,如炎症介质的释放、B细胞激活、内吞作用、吞噬作用和细胞毒性攻击。

[0252] 介导细胞毒性和吞噬效应子功能的能力是抗体破坏靶细胞的潜在机制。其中表达FcγR的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞裂解的细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)(Raghavan等人,1996,《细胞和发育生物学年度评论》12:181-220;Ghetie等人,2000,《免疫学年度评论》18:739-766;Ravetch等人,2001,《免疫学年度评论》19:275-290)。其中表达FcγR的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞吞噬作用的细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。所有FcγR在Cg2(CH2)结构域和之前的铰链的N端末端处结合Fc上的相同区。这种相互作用在结构上得到了很好的表征(Sondermann等人,2001,《分子生物学杂志》309:737-749),并且已经解决了与人FcγRIIIb细胞外结构域结合的人Fc的若干种结构(pdb登录码1E4K)(Sondermann等人,2000,《自然》406:267-273)。(pdb登录码1IIS和1IIX)(Radaev等人,2001,《生物化学杂志》276:16469-16477)。

[0253] 不同的IgG亚类对FcγR具有不同的亲和力,与IgG2和IgG4相比,IgG1和IgG3通常明显更好地与受体结合(Jefferis等人,2002,《免疫学快报》82:57-65)。所有FcγR与IgG Fc上的相同区结合,但亲和力不同:高亲和力结合体FcγRI对IgG1的K_d为$10^{-8}M^{-1}$,而低亲和力受体FcγRII和FcγRIII通常分别以10^{-6}和10^{-5}结合。FcγRIIIa和FcγRIIIb的细胞外结构域96%相同;然而,FcγRIIIb不具有细胞内信号传导结构域。此外,虽然FcγRI、FcγRIIa/c和FcγRIIIa是免疫复合物触发激活的正调节物(所述正调节物的特征在于具有细胞内结构域,所述细胞内结构域具有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)),但是FcγRIIb具有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)并且因此是抑制性的。因此,前者被称为激活受体并且FcγRIIb被称为抑制受体。受体在不同免疫细胞上的表达方式和水平也不同。复杂性的另一个层次是人类蛋白质组中存在许多FcγR多态性。具有临床意义的特别相

关的多态性是V158/F158 Fc γ RIIIa。人IgG1与V158同种异型的结合亲和力大于与F158同种异型的结合亲和力。亲和力的这种差异以及可假定地其对ADCC和/或ADCP的影响已表明是抗CD20抗体利妥昔单抗(rituximab)(Rituxan®,IDEC药物公司(IDEC Pharmaceuticals Corporation)的注册商标)的功效的重要决定因素。V158同种异型受试者对利妥昔单抗治疗反应良好;然而,具有较低亲和力F158同种异型的受试者反应较差(Cartron等人,2002,《血液(Blood)》99:754-758)。大约10-20%的人是V158/V158纯合子,45%的人是V158/F158杂合子,并且35-45%的人是F158/F158纯合子(Lehrnbecher等人,1999,《血液》94:4220-4232;Cartron等人,2002,《血液》99:754-758)。因此,80-90%的人是较差应答者,也就是说,他们具有F158 Fc γ RIIIa的至少一个等位基因。

[0254] Fc区也参与补体级联的激活。在经典的补体通路中,C1利用其C1q亚基结合已与一个或多个抗原形成复合物的IgG或IgM的Fc片段。在本公开的某些实施例中,对Fc区的修饰包括改变(增强或降低)本文所述的Fzd特异性抗体激活补体系统的能力的修饰(参见例如美国专利第7,740,847号)。为了评估补体活化,可以进行补体依赖性细胞毒性(CDC)测定(参见例如,Gazzano-Santoro等人,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》,202:163(1996))。

[0255] 因此,在某些实施例中,本公开提供了具有经修饰的Fc区的抗Fzd抗体,其具有改变的功能性质,如降低或增强的CDC、ADCC或ADCP活性或增强的对特定Fc γ R的结合亲和力或增加的血清半衰期。在以下中描述了本文设想的其它修饰的Fc区,例如,发布的美国专利第7,317,091号;第7,657,380号;第7,662,925号;第6,538,124号;第6,528,624号;第7,297,775号;第7,364,731号;公开的美国申请第US2009092599号;第US20080131435号;第US20080138344号;以及公开的国际申请第WO2006/105338号;第WO2004/063351号;第WO2006/088494号;第WO2007/024249号。

[0256] 在某些实施例中,Wnt替代分子包括具有期望结合特异性的与免疫球蛋白恒定结构域序列融合的抗体可变结构域。在某些实施例中,融合是与包括铰链区、C_H2和C_H3区的至少部分的Ig重链恒定结构域融合。在特定实施例中,含有轻链键合所必需的位点的第一重链恒定区(C_H1)存在于融合中的至少一个融合中。将对免疫球蛋白重链融合和(如果需要)免疫球蛋白轻链进行编码的DNA插入单独的表达载体中,并且共转染到适合的宿主细胞中。当在构建中使用的三个多肽链的不相等比率提供期望双特异性抗体的最佳得率时,这在调节实施例中的三个多肽片段的相互比例方面提供了更大的灵活性。然而,当至少两个多肽链以相等的比率表达引起高得率时或者当比率对期望的链组合的得率没有明显影响时,可以将两个或全部三个多肽链的编码序列插入单个表达载体中。

[0257] 还可以修饰本文公开的Wnt替代分子以包含例如用于纯化或诊断应用的表位标签或标记。存在许多本领域已知的用于制备抗体缀合物的连接基团,包含例如在美国专利第5,208,020号或欧洲专利0 425 235 B1和Chari等人,《癌症研究》52:127-131(1992)中公开的连接基团。如上述专利中所公开的,连接基团包含二硫基、硫醚基、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团或酯酶不稳定基团,优选二硫基和硫醚基。

[0258] 在某些实施例中,存在于Wnt替代分子内的抗LRP5/6抗体和其抗原结合片段和/或抗Fzd抗体和其抗原结合片段是单克隆的。在某些实施例中,其是人源化的。

[0259] 在某些实施例中,本公开进一步提供了一种对存在于本文公开的Wnt替代分子中

的多肽进行编码的分离的核酸。核酸包含DNA和RNA。这些和相关的实施例可以包含对结合本文所述的一种或多种Fzd受体和/或LRP5或LRP6的抗体片段进行编码的多核苷酸。如本文所使用的术语“分离的多核苷酸”应意指基因组、cDNA或合成来源的多核苷酸或其某种组合,由于其来源,分离的多核苷酸:(1)不与多核苷酸的全部或一部分缔合,其中在自然界中发现所述分离的多核苷酸;(2)与其在自然界中不与之连接的多核苷酸连接;或者(3)在自然界中不作为更大序列的一部分出现。分离的多核苷酸可以包含天然存在的序列和/或人工序列。

[0260] 术语“可操作地连接”意指所述术语所应用的组分处于允许它们在适当条件下执行其固有功能的关系。例如,将与蛋白质编码序列“可操作地连接”的转录控制序列连接到其上,从而在与控制序列的转录活性相容的条件下实现蛋白质编码序列的表达。

[0261] 如本文所使用的术语“控制序列”是指可以影响与其连接或可操作地连接的编码序列的表达、加工或细胞内定位的多核苷酸序列。此类控制序列的性质可以取决于宿主生物体。在特定实施例中,原核生物的转录控制序列可以包含启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。在其它特定实施例中,真核生物的转录控制序列可以包含启动子,所述启动子包括针对转录因子、转录增强子序列、转录终止序列和聚腺苷酸化序列的一个或多个识别位点。在某些实施例中,“控制序列”可以包含前导序列和/或融合配偶体序列。

[0262] 本文所提及的术语“多核苷酸”意指单链或双链核酸聚合物。在某些实施例中,包括多核苷酸的核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一种核苷酸类型的经修饰形式。所述修饰包含碱基修饰,如溴尿嘧啶核苷、核糖修饰,如阿拉伯糖苷和2',3'-二脱氧核糖以及核苷酸间键合修饰,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、硫代苯胺磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phoshoraniladate)和氨基磷酸酯。术语“多核苷酸”具体包含DNA的单链和双链形式。

[0263] 术语“天然存在的核苷酸”包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“经修饰的核苷酸”包含具有经修饰的或取代的糖基等的核苷酸。术语“寡核苷酸键”包含寡核苷酸键,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、硫代苯胺磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等。参见例如,LaPlanche等人,1986,《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》,14:9081;Stec等人,1984,《美国化学会志》,106:6077;Stein等人,1988,《核酸研究》,16:3209;Zon等人,1991,《抗癌药物研制(Anti-Cancer Drug Design)》,6:539;Zon等人,1991,《寡核苷酸和类似物:实用方法(OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES:A PRACTICAL APPROACH)》,第87-108页(F.Eckstein编辑),英国牛津大学,牛津大学出版社;Stec等人,美国专利第5,151,510号;Uhlmann和Peyman,1990,《化学评论(Chemical Reviews)》,90:543,出于任何目的其公开内容通过引用并入本文中。寡核苷酸可以包含可检测的标记,以使得能够检测寡核苷酸或其杂化。

[0264] 术语“载体”用于指代用于将编码信息转移到宿主细胞的任何分子(例如,核酸、质粒或病毒)。术语“表达载体”是指适合于转化宿主细胞并含有引导和/或控制插入的异源核酸序列的表达的核酸序列的载体。如果存在内含子,则表达包含但不限于如转录、翻译和RNA剪接等过程。

[0265] 如本领域技术人员将理解的,多核苷酸可以包含表达或可以适于表达蛋白质、多肽、肽等的基因组序列、基因组外和质粒编码的序列以及较小的工程化基因节段。此类节段

可以是天然分离的或者由本领域技术人员合成修饰。

[0266] 如本领域技术人员还将认识到的,多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链的,并且可以是DNA(基因组、cDNA或合成的)或RNA分子。RNA分子可以包含含有内含子并以一对一方式对应于DNA分子的HnRNA分子,以及不含有内含子的mRNA分子。另外的编码或非编码序列可以但不必存在于根据本公开的多核苷酸内,并且多核苷酸可以但不必连接到其它分子和/或支持材料。多核苷酸可以包括天然序列或可以包括对此序列的变体或衍生物进行编码的序列。

[0267] 本领域的普通技术人员应理解,由于遗传密码的简并性,存在许多对本文所述的抗体进行编码的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些多核苷酸与对Wnt替代分子内的多肽进行编码的天然或原始多核苷酸序列的核苷酸序列具有最小的序列同一性。然而,本公开明确设想了由于密码子使用的差异而变化的多核苷酸。在某些实施例中,具体设想了已经针对哺乳动物表达进行了密码子优化的序列。

[0268] 因此,在本公开的另一个实施例中,如位点特异性诱变等诱变方法可以用于制备本文所述的多肽的变体和/或衍生物。通过这种方法,多肽序列的特异性修饰可以通过诱变对其进行编码的基础多核苷酸来进行。这些技术提供了一种用于通过将一个或多个核苷酸序列改变引入多核苷酸中来制备和测试序列变体(例如,包括了上述考虑因素中的一个或多个考虑因素)的直接方法。

[0269] 位点特异性诱变允许通过以下来产生突变体:使用对期望突变的DNA序列进行编码的特异性寡核苷酸序列以及足够数量的相邻核苷酸,以提供具有足够大小和序列复杂性的引物序列,从而形成在遍历的缺失连接部两侧的稳定双链体。可以在所选的多核苷酸序列中采用突变以改善、改变、减少、修饰或以其它方式改变多核苷酸本身的性质和/或改变所编码多肽的性质、活性、组成、稳定性或一级序列。

[0270] 在某些实施例中,本发明人设想了诱变对存在于Wnt替代分子中的多肽进行编码的多核苷酸序列,以改变编码的多肽的一种或多种性质,如结合亲和力或特定Fc区的功能或Fc区对特定Fc γR的亲和力。位点特异性诱变技术是本领域中公知的,并且广泛用于产生多肽和多核苷酸的变体。例如,位点特异性诱变通常用于改变DNA分子的特定部分。在此类实施例中,采用在长度上通常包括约14个到约25个核苷酸左右的引物,其中在序列的连接部的两侧上约5个到约10个残基被改变。

[0271] 如本领域技术人员将理解的,位点特异性诱变技术通常采用以单链和双链形式存在的噬菌体载体。可用于定点诱变的典型载体包含如M13噬菌体等载体。这些噬菌体可以容易地商购获得,并且其用途通常是本领域技术人员公知的。双链质粒还通常用于消除了将目的基因从质粒转移到噬菌体的步骤的定点诱变。

[0272] 使用定点诱变制备所选的编码肽的DNA节段的序列变体提供了一种产生潜在有用物种的手段,但并不意味着进行限制,因为还存在可以获得肽和对其进行编码的DNA序列的序列变体的其它方法。例如,可以用如羟胺等诱变剂处理对期望肽序列进行编码的重组载体以获得序列变体。关于这些方法和方案的具体细节发现于以下的教导中:Maloy等人,1994;Segal,1976;Prokop和Bajpai,1991;Kuby,1994;以及Maniatis等人,1982,出于所述目的,每个通过引用并入本文中。

[0273] 在许多实施例中,将对Wnt替代分子的多肽进行编码的一种或多种核酸直接引入

宿主细胞种,并且在足以诱导编码的多肽的表达的条件下培育细胞。可以使用本领域技术人员熟知的标准技术并与本文提供的多肽和核酸序列组合来制备本公开的Wnt替代多肽。多肽序列可以用于确定对由此公开的特定多肽进行编码的适当核酸序列。根据本领域技术人员公知的标准方法,可以优化核酸序列以反映各种表达系统的特定密码子"偏好"。

[0274] 根据某些相关实施例,提供了一种重组宿主细胞,所述重组宿主细胞包括一种或多种本文所述的构建体,例如,包括对Wnt替代分子或其多肽进行编码的核酸的载体;以及一种产生经过编码的产物的方法,所述方法包括由其编码核酸进行表达。可以通过在适当的条件下培养含有核酸的重组宿主细胞方便地实现表达。在通过表达产生后,抗体或其抗原结合片段可以使用任何适合的技术分离和/或纯化,并且然后根据需要使用。

[0275] 多肽以及编码核酸分子和载体可以例如从其天然环境中分离和/或纯化,其呈基本上纯净或均质的形式,或者在核酸的情况下,不含或基本上不含除了对具有期望功能的多肽进行编码的序列以外的原始核酸或基因。核酸可以包括DNA或RNA,并且可以是全部或部分合成的。除非上下文另外要求,否则提及本文所示的核苷酸序列涵盖具有指定序列的DNA分子,并且涵盖具有其中U取代了T的指定序列的RNA分子。

[0276] 用于在各种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是公知的。适合的宿主细胞包含细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。在本领域中可获得的用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包含中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NSO小鼠黑素瘤细胞等。常见的优选细菌宿主是大肠杆菌。

[0277] 在本领域中已很好地建立了如大肠杆菌等原核细胞中的多肽(例如,抗体和其抗原结合片段)的表达。关于综述,参见例如Pluckthun,《生物技术》9:545-551(1991)。培养的真核细胞中的表达对于本领域技术人员而言也可用作为产生抗体或其抗原结合片段的选择,参见最近的综述,例如Ref,M.E.(1993)《生物技术当前评述(Curr.Opinion Biotech.)》4:573-576;Trill J.J.等人(1995)《生物技术当前评述》6:553-560。

[0278] 适当时,可以选择或构建含有适当的调节序列(包含启动子序列、终止子序列、多腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因)和其它序列的合适的载体。载体可以根据需要是质粒、病毒,例如噬菌体或噬菌粒。关于进一步细节,参见例如《分子克隆:实验室手册》第2版,Sambrook等人,1989,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)。《现代分子生物学实验指南》,第二版,Ausubel等人编辑,约翰威利父子公司,1992或其后续更新详细描述了用于例如在制备核酸构建体、诱变、测序、将DNA引入细胞中和基因表达以及蛋白质分析中操控核酸的许多已知技术和方案。

[0279] 术语"宿主细胞"用于指代在其中已经引入或能够引入对本文所述多肽中的一种或多种多肽进行编码的核酸序列的细胞,并且所述细胞进一步表达或能够表达关注的所选基因,如对任何本文所述多肽进行编码的基因。所述术语包含亲本细胞的子代,无论所述子代是否在形态上或遗传构成上与原始亲本相同,只要存在所选基因即可。因此,还设想了包括将这种核酸引入宿主细胞中的方法。引入可以采用任何可用的技术。对于真核细胞,适合的技术可以包含磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其它病毒(例如,牛痘或针对昆虫细胞的病毒、杆状病毒)的转导。对于细菌细胞,适合的技术可以包含氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。在引入之后,可以引起或允许例如通过在表达基因的条件下培养宿主细胞从核酸表达。在一个实施例中,核酸被整合到宿主

细胞的基因组(例如,染色体)中。根据标准技术,可以通过包含促进与基因组重组的序列来促进整合。

[0280] 在某些实施例中,本公开还提供了一种方法,所述方法包括在表达系统中使用如上所述的构建体以表达特定多肽,如本文所述的Wnt模拟分子。术语"转导"用于指代基因通常通过噬菌体从一种细菌转移到另一种细菌。"转导"还指代通过逆转录病毒获取和转移真核细胞序列。术语"转染"用于指代细胞对外来或外源DNA的摄取,并且当外源DNA已经被引入细胞膜内部时,细胞已经被"转染"。许多转染技术是本领域中公知的并且在本文中公开。参见例如Graham等人,1973,《病毒学(Virology)》52:456;Sambrook等人,2001,《分子克隆,实验室手册》,冷泉港实验室;Davis等人,1986,《分子生物学基础方法(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY)》,爱思唯尔(Elsevier);以及Chu等人,1981,《基因》13:197。此类技术可以用于将一个或多个外源DNA部分引入适合的宿主细胞中。

[0281] 如本文所使用的术语"转化"是指细胞遗传特性的改变,并且当细胞已经被修饰以含有新的DNA时,所述细胞已经被转化。例如,在将细胞从其天然状态进行遗传修饰的情况下,所述细胞被转化。在转染或转导后,转化DNA可以通过物理整合到细胞的染色体中而与细胞的DNA重组,或者可以作为附加型元件短暂地维持而不被复制,或者可以作为质粒独立复制。当DNA随着细胞分裂而复制时,认为细胞已经稳定转化。当与如核酸分子、多肽、宿主细胞等生物材料结合使用时,术语"天然存在的"或"天然的"是指在自然界发现并且未被人类操控的材料。类似地,如本文所使用的"非天然存在的"或"非天然的"是指在自然界中未发现或已被人类结构修饰或合成的材料。

[0282] 术语"多肽"、"蛋白质"和"肽"以及"糖蛋白"可互换使用并且意指不限于任何特定长度的氨基酸的聚合物。所述术语不排除如豆蔻酰化、硫酸化、糖基化、磷酸化和信号序列的添加或缺失等修饰。术语"多肽"或"蛋白质"意指一个或多个氨基酸链,其中每个链包括通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白质可以包括多个通过肽键非共价和/或共价连接且具有天然蛋白质序列的链,即,由天然存在的以及特别是非重组细胞、或基因工程或重组细胞产生的蛋白质,并且包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子、或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的分子。术语"多肽"和"蛋白质"具体涵盖与本文公开的Fzd受体或LRP5或LRP6受体结合的Wnt替代分子、其Fzd结合区、其LRP5/6结合区、抗体和其抗原结合片段,或具有这些多肽中的任一种多肽的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的序列。因此,"多肽"或"蛋白质"可以包括一个(称为"单体")或多个(称为"多聚体")氨基酸链。

[0283] 本文提及的术语"分离的蛋白质"、"分离的Wnt替代分子"或"分离的抗体"意指主题蛋白质、Wnt替代分子或抗体:(1)不含至少一些通常在自然界中发现的其它蛋白质;(2)基本上不含来自相同来源,例如来自相同物种的其它蛋白质;(3)由来自不同物种的细胞表达;(4)已经从至少约50%的多核苷酸、脂类、碳水化合物或与其在自然界中缔合的其它物质中分离出来;(5)不在自然界中与"分离的蛋白质"缔合的蛋白质的部分缔合(通过共价或非共价相互作用);(6)与在自然界中不与其缔合的多肽可操作地缔合(通过共价或非共价相互作用);或者(7)不在自然界发生。此类分离的蛋白质可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其它RNA编码,或者可以具有合成来源,或其任何组合。在某些实施例中,分离的蛋白质可以包括天然存在的多肽序列和/或人工多肽序列。在某些实施例中,分离的蛋白质基本上不含在

其天然环境中会发现的且会干扰其使用(治疗、诊断、预防、研究或其它)的蛋白质或多肽或其它污染物。

[0284] 设想了本文描述的多肽(例如,Wnt替代分子或其Fzd结合区或LRP5/6结合区)中的任一种多肽的一个或多个氨基酸序列修饰。例如,可能期望改善Wnt替代分子的结合亲和力和/或其它生物学性质。例如,可以通过将适当的核苷酸改变引入对抗体或其链进行编码的多核苷酸中或通过肽合成来制备Wnt替代分子的氨基酸序列变体。此类修饰包含例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终Wnt替代分子,条件是最终构建体具有期望特性(例如,与一种或多种Fzd和/或LRP5/6受体结合的高亲和力)。氨基酸变化还可以改变抗体的翻译后过程,如改变糖基化位点的数量或位置。上文描述的本公开的多肽的变体和修饰中的任一种可以包含在本公开的抗体中。

[0285] 本公开提供了本文公开的多肽(例如,Wnt替代分子或其Fzd结合区或LRP5/6结合区,或抗体或其抗原结合片段)中的任一种多肽的变体。在某些实施例中,变体与本文公开的多肽具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性。在某些实施例中,此类变体多肽与一种或多种Fzd受体和/或一种或多种LRP5/6受体的结合为相对于本文具体所示的Wnt替代分子与一种或多种Fzd受体和/或一种或多种LRP5/6受体的结合的至少约50%、至少约70%,并且在某些实施例中至少约90%。在另外的实施例中,此类变体Wnt替代分子以比本文所示的Wnt替代分子更大的亲和力与一种或多种Fzd受体和/或一种或多种LRP5/6受体结合,例如,其结合定量地为相对于本文具体所示的抗体序列的结合的至少约105%、106%、107%、108%、109%或110%。

[0286] 在特定实施例中,Wnt替代分子或其结合区,例如Fab、scFv或VHH或sdAb可以包括:a)重链可变区,所述重链可变区包括:i.CDR1区,所述CDR1区的氨基酸序列与本文所述的所选抗体的重链CDR1区的氨基酸序列相同;ii.CDR2区,所述CDR2区的氨基酸序列与所选抗体的重链CDR2区的氨基酸序列相同;以及iii.CDR3区,所述CDR3区的氨基酸序列与所选抗体的重链CDR3区的氨基酸序列相同;和/或b)轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括:i.CDR1区,所述CDR1区的氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR1区的氨基酸序列相同;ii.CDR2区,所述CDR2区的氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR2区的氨基酸序列相同;以及iii.CDR3区,所述CDR3区的氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR3区的氨基酸序列相同;其中抗体特异性结合选定的靶(例如,一个或多个Fzd受体表位或LRP5或LRP6受体)。在另外的实施例中,所述抗体或其抗原结合片段是变体抗体或其抗原结合片段,其中除了VH和VL区的CDR区中的至多8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代之外,所述变体包括与所选抗体相同的重链和轻链。在这方面,在所选抗体的CDR区中可以存在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个氨基酸取代,或在某些实施例中,9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代。取代可以在VH和/或VL区中的CDR中。(参见例如,Muller,1998,《结构》6:1153-1167)。

[0287] 在特定实施例中,Wnt替代分子或其结合区,例如Fab、scFv或VHH或sdAb可以具有:a)重链可变区,所述重链可变区具有与本文所述的抗体或其抗原结合片段的重链可变区至少80%相同、至少95%相同、至少90%、至少95%或至少98%或99%相同的氨基酸序列;和/或b)轻链可变区,所述轻链可变区具有与本文所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区

至少80％相同、至少85％相同、至少90％、至少95％或至少98％或99％相同的氨基酸序列。其说明性抗原结合片段的氨基酸序列在SEQ ID NO:1-97和109-157中示出。

[0288] 多肽与另一种多肽具有一定的“序列同一性”百分比,这意味着在进行比对时,当比较两个序列时,氨基酸的百分比是相同的。序列类似性可以通过多种不同的方式来确定。为了确定序列同一性,可以使用包含可通过万维网ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/获得的BLAST在内的方法和计算机程序来比对序列。另一种比对算法是FASTA,可从牛津分子集团有限公司(Oxford Molecular Group,Inc.)的全资子公司、来自美国威斯康星州麦迪逊市(Madison,Wis.,USA)的遗传学计算机集团(Genetics Computing Group)(GCG)的软件包中获得。以下中描述了用于比对的其它技术:《酶学方法(Methods in Enzymology)》,第266卷:用于大分子序列分析的计算机方法(Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis)(1996),Doolittle编,学术出版社有限公司(Academic Press,Inc.),美国加利福尼亚州圣地亚哥哈考特布瑞斯公司(Harcourt Brace&Co.,San Diego,Calif.,USA)的分公司。特别关注了允许序列中有空位的比对程序。Smith-Waterman是允许序列比对中有空位的一种类型的算法。参见《分子生物学方法(Meth.Mol.Biol.)70:173-187(1997)。而且,可以利用使用Needleman和Wunsch比对方法的GAP程序来比对序列。参见《分子生物学期刊(J.Mol.Biol.)》48:443-453(1970)。

[0289] 关注了使用Smith和Waterman的局部同源性算法(《应用数学进展(Advances in Applied Mathematics)》2:482-489(1981))来确定序列一致性的BestFit程序。空位生成罚分的范围通常将为1到5,经常为2到4并且在许多实施例中将为3。空位生成罚分的范围通常将为0.01到0.20并且在许多情况下将为0.10。程序具有由输入以进行比较的序列确定的默认参数。优选地,序列同一性是使用由程序确定的默认参数来确定的。此程序也可从来自美国威斯康星州麦迪逊市的遗传学计算集团(GCG)的软件包获得。

[0290] 关注的另一个程序是FastDB算法。以下中描述了FastDB:序列比较和分析的当前方法(Current Methods in Sequence Comparison and Analysis),《大分子测序与合成所选方法与应用(Macromolecule Sequencing and Synthesis,Selected Methods and Applications)》,第127-149页,1988,Alan R.Liss有限公司(Alan R.Liss,Inc.)。基于以下参数通过FastDB来计算序列同一性百分比:

[0291] 不匹配罚分:1.00;空位罚分:1.00;空位大小罚分:0.33;以及连接罚分:30.0。

[0292] 在特定实施例中,Wnt替代分子或其结合区,例如Fab、scFv或VHH或sdAb可以包括:a)重链可变区,所述重链可变区包括:i.CDR1区,所述CDR1区的氨基酸序列与本文所述的所选抗体的重链CDR1区的氨基酸序列相同;ii.CDR2区,所述CDR2区的氨基酸序列与所选抗体的重链CDR2区的氨基酸序列相同;以及iii.CDR3区,所述CDR3区的氨基酸序列与所选抗体的重链CDR3区的氨基酸序列相同;以及b)轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括:i.CDR1区,所述CDR1区的氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR1区的氨基酸序列相同;ii.CDR2区,所述CDR2区的氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR2区的氨基酸序列相同;以及iii.CDR3区,所述CDR3区的氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR3区的氨基酸序列相同;其中所述抗体特异性结合所选靶标(例如,Fzd受体,如Fzd1)。在另外的实施例中,抗体或其抗原结合片段是变体抗体,其中除了VH和VL区的CDR区中的至多8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代之外,所述变体包括与所选抗体相同的重链和轻链。在这方面,在所

选抗体的CDR区中可以存在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个氨基酸取代,或在某些实施例中,9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代。取代可以在VH和/或VL区中的CDR中。(参见例如,Muller,1998,《结构》6:1153-1167)。

[0293] 代表性多肽(例如,本文提供的Wnt替代分子的变体Fzd结合区或LRP5/6结合区)的三维结构的确定可以通过常规方法进行,使得例如,利用所选的天然或非天然氨基酸进行的一个或多个氨基酸的取代、添加、缺失或插入可以出于确定如此衍生的结构变体是否保留当前公开的物种的空间填充性质的目的来虚拟地建模。参见例如Donate等人,1994,《保护科学(Prot.Sci.)》3:2378;Bird等人,《科学》309:1868-1871(2005);Schueler-Furman等人,《科学》310:638(2005);Dietz等人,《美国国家科学院院刊》103:1244(2006);Dodson等人,《自然》450:176(2007);Qian等人,《自然》450:259(2007);Raman等人,《科学》327:1014-1018(2010)。可以用于这些和相关实施例(如用于结合区的合理设计)的计算机算法的一些另外非限制性实例包含VMD,其是用于使用3-D图形和内置脚本显示、动画化并分析大生物分子系统的分子可视化程序,(参见伊利诺伊大学厄巴纳-香槟分校的理论和计算生物物理小组(the Theoretical and Computational Biophysics Group,University of Illinois at Urbana-Champagne)的网站ks.uiuc.edu/Research/vmd/。许多其它计算机程序是本领域已知的并可供技术人员使用并且允许根据能量最小化构象的空间填充模型(范德华半径(van der Waals radii))确定原子尺度;试图确定针对不同化学基团的高亲和力区从而增强结合的GRID、计算数学比对的蒙特卡罗搜索(Monte Carlo searches)以及评估力场计算的CHARMM(Brooks等人(1983)《计算化学杂志(J.Comput.Chem.)》4:187-217)和AMBER(Weiner等人(1981)《计算化学杂志》106:765)以及分析(还参见Eisenfield等人(1991)《美国生理学杂志(Am.J.Physiol.)》261:C376-386;Lybrand(1991)《药学与生命科学杂志(J.Pharm.Belg.)》46:49-54;Froimowitz(1990)《生物技术(Biotechniques)》8:640-644;Burbam等人(1990)《蛋白质(Proteins)》7:99-111;Pedersen(1985)《环境健康视角(Environ.Health Perspect.)》61:185-190;以及Kini等人(1991)《生物分子结构与动力学杂志(J.Biomol.Struct.Dyn.)》9:475-488。各种合适的计算计算机程序也可以从例如Schrödinger(德国慕尼黑(Munich,Germany))商购获得。

[0294] 组合物

[0295] 还公开了包括本文所描述的Wnt替代分子和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物。在特定实施例中,所述药物组合物进一步包括一种或多种Wnt多肽或Norrin多肽。

[0296] 在进一步的实施例中,还公开了包括多核苷酸和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物,所述多核苷酸包括对本文所描述的Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在特定实施例中,药物组合物进一步包括一种或多种多核苷,所述一种或多种多核苷酸包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的多核苷酸中。

[0297] 在进一步的实施例中,还公开了包括表达载体例如病毒载体和一种或多种药学上

可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物,所述载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括对本文所描述的Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在特定实施例中,药物组合物进一步包括表达载体(例如,病毒载体),所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的多核苷酸(例如,表达盒)中。

[0298] 本公开进一步设想了包括细胞和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物,所述细胞包括表达载体,所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括与对Wnt替代分子进行编码的核酸操作性地连接的启动子。在特定实施例中,药物组合物进一步包括细胞,所述细胞包括表达载体,所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括与对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列操作性地连接的启动子。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的多核苷酸(例如,表达盒)和/或相同细胞中。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0299] 本公开设想了药物组合物,所述药物组合物包括用于递送作为第一活性剂的Wnt替代分子的第一分子和用于递送Wnt多肽或Norrin多肽的第二分子。第一分子和第二分子可以是相同类型的分子或不同类型的分子。例如,在某些实施例中,第一分子和第二分子可以各自独立地选自以下类型的分子:多肽、有机小分子、对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸(任选地,DNA或mRNA,任选地,经过修饰的RNA)、包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的载体(任选地,表达载体或病毒载体)以及包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的细胞(任选地,表达盒)。

[0300] 单独的或组合的主题分子可以与可用于制备通常安全、无毒且理想的调配物的药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂和试剂进行组合,并且包含可接受以供哺乳动物例如人或灵长类动物使用的赋形剂。此类赋形剂可以是固体、液体、半固体或在气雾组合物的情况下为气态的。此类载剂、稀释剂和赋形剂的实例包含但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。补充性活性化合物也可以并入调配物中。用于调配物的溶液或悬浮液可以包含:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌化合物,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合化合物,如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;洗涤剂,如用于防止聚合的吐温(Tween)20;以及用于调节张力的化合物,如氯化钠或右旋糖。可以用如盐酸或氢氧化钠等酸或碱调节pH。在特定实施例中,药物组合物是无菌的。

[0301] 药物组合物可以进一步包含无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,适合的载剂包含生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在某些情况下,组合物是无菌的,并且应该是流体,使得其可以被抽吸到注射器中并从注射器递送给受试者。在某些实施例中,组合物在制造和储存条件下是稳定的,并且抵抗如细菌和真菌等微生物的污染作用进行保存。载剂可以是例如溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及其适合的混合物。可以例如通过使用如卵磷脂等包衣、通过在分散体的情况下维持所需粒度以及通过使用表面活性剂来维持恰当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、三氯

叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现防止微生物的作用。在许多情况下,组合物中包含等渗剂(例如糖、如甘露醇、山梨醇等多元醇、氯化钠)是优选的。可以通过在组合物中包含延缓吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现内部组合物的延长吸收。

[0302] 无菌溶液可以通过根据需要将所需量的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(或编码多核苷酸或包括其的细胞)与上文所列举的成分中的一种成分或其组合并入适当的溶剂中、随后过滤灭菌来制备。通常,通过将活性化合物掺入无菌媒剂中来制备分散液,所述无菌媒剂含有基础分散介质和来自以上列举的那些的其它所需成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法为真空干燥和冷冻干燥,这些干燥产生活性成分加上来自其先前无菌过滤溶液的任何另外的期望成分的粉末。

[0303] 在一个实施例中,药物组合物与保护抗体或其抗原结合片段免于从体内快速消除的载剂一起制备,如控释调配物,包含植入物和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类调配物的方法对本领域技术人员而言是显而易见的。材料也可以商购获得。脂质体悬浮液也可以用作药学上可接受的载剂。这些脂质体悬浮液可以根据本领域技术人员已知的方法制备。

[0304] 以易于施用和实现剂量均匀性的剂量单位形式来配制药物组合物可以是有利的。如本文所用,剂量单位形式是指作为针对有待治疗的受试者的单一剂量适合的物理上离散的单位;每单位含有经计算以与所需的药物载剂的联合产生所期望的治疗效果的预定量的活性抗体或其抗原结合片段。剂量单位形式的规格由抗体或其抗原结合片段的独特特性和待实现的特定治疗效果以及本领域中在混配这种活性抗体或其抗原结合片段以用于治疗个体时固有的局限性决定并且直接依赖于此。

[0305] 药物组合物可以与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器(例如,注射器,例如载药注射器)中。

[0306] 本公开的药物组合物涵盖任何药学上可接受的盐、酯或这种酯的盐、或在施用于包括人的动物时能够(直接或间接)提供生物活性抗体或其抗原结合片段的任何其它化合物。

[0307] 本公开包含本文所描述的Wnt替代分子的药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”是指本公开的化合物的生理学上可接受的盐和药学上可接受的盐:即,保留了亲本化合物的期望生物活性并且不对亲本化合物产生不期望的毒理效果的盐。各种药学上可接受的盐是本领域已知的并且描述于例如以下中:《雷明顿药学大全(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第17版,Alfonso R.Gennaro(编),美国宾夕法尼亚州伊斯顿Mark出版公司(Mark Publishing Company,Easton,PA,USA),1985(以及其最近的版本);《制药技术百科全书(Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology)》,第3版,James Swarbrick(编),美国纽约州美国英富曼卫生保健(有限公司)(Informa Healthcare USA(Inc.),NY,USA),2007;以及《药物科学杂志(J.Pharm.Sci.)》66:2(1977)。而且,有关适合的盐的综述,参见Stahl和Wermuth的《“药用盐手册:性质、选择和使用(Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use)”》(Wiley-VCH,2002)。

[0308] 用如碱金属和碱土金属或有机胺等金属或胺形成药学上可接受的碱加成盐。用作阳离子的金属包括钠、钾、镁、钙等。胺包括N-N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇

胺、二环己胺、乙二胺、N-甲基葡糖胺和普鲁卡因(参见例如Berge等人,“药用盐(Pharmaceutical Salts)”,《药学杂志(J.Pharma Sci)》,1977,66,119)。酸性化合物的碱加成盐是通过使游离酸形式与足量的期望的碱相接触以常规方式产生盐来制备的。游离酸形式可以通过使盐形式与酸相接触并且以常规方式分离游离酸来再生。游离酸形式在某些物理性质方面如在极性溶剂中的溶解度与其各自的盐形式略有不同,但是出于本公开的目的,盐等同于其各自的游离酸。

[0309] 在一些实施例中,本文所提供的药物组合物包括与药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂混合的治疗有效量的Wnt替代分子或其药学上可接受的盐,所述药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂例如盐水、磷酸盐缓冲盐水、磷酸盐和氨基酸、聚合物、多元醇、糖、缓冲剂、防腐剂和其它蛋白质。示例性氨基酸、聚合物和糖等是辛基苯氧基聚乙氧基乙醇化合物、聚乙二醇单硬脂酸酯化合物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、蔗糖、果糖、右旋糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露醇、葡聚糖、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、木糖醇、乳糖、海藻糖、牛或人血清白蛋白、柠檬酸盐、乙酸盐、林格氏和汉克氏(Hank's)溶液、半胱氨酸、精氨酸、肉毒碱、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯和乙二醇。优选地,此调配物在4℃下在至少六个月内是稳定的。

[0310] 在一些实施例中,本文所提供的药物组合物包括缓冲液,如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或磷酸钠/硫酸钠、tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、无菌水以及本领域普通技术人员已知的其它缓冲液,如Good等人(1966)《生物化学(Biochemistry)》5:467中描述的那些缓冲液。所述缓冲液的pH值可以处于6.5到7.75的范围内,优选地7到7.5,并且最优选地7.2到7.4。

[0311] 使用方法

[0312] 本公开还提供了用于使用本文公开的Wnt替代分子,例如来调节Wnt信号传导通路(例如,增加Wnt信号传导)的方法,以及用于施用本文在多种治疗设置中公开的Wnt替代分子的方法。本文提供了使用Wnt替代分子的治疗方法。在一个实施例中,Wnt替代分子被提供给患有涉及不适当或失调的Wnt信号传导(例如,Wnt信号传导减少)的疾病的受试者。

[0313] 激动Wnt通路信号传导和相关治疗方法

[0314] 在某些实施例中,Wnt替代分子可以用于激动组织或细胞中的Wnt信号传导通路。激动Wnt信号传导通路可以包含,例如,增加组织或细胞中的Wnt信号传导或增强Wnt信号传导。因此,在一些方面,本公开提供了一种用于激动细胞中的Wnt信号传导通路的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的本文公开的Wnt替代分子或其药学上可接受的盐接触,其中Wnt替代分子是Wnt信号传导通路激动剂。在一些实施例中,接触发生在体外、离体或体内。在特定实施例中,细胞是培养细胞,并且接触发生在体外。在某些实施例中,所述方法包括进一步使组织或细胞与一种或多种Wnt多肽或Norrin多肽接触。

[0315] 在相关方面,本公开提供了一种用于激动组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的包括本文公开的Wnt替代分子的多核苷酸接触。在某些实施例中,还使靶组织或靶细胞与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的多核苷酸接触。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列

存在于相同的多核苷酸中。

[0316] 在相关方面,本公开提供了一种用于激动组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列的载体接触。在某些实施例中,还使组织或细胞与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的载体接触。在某些实施例中,载体是表达载体并且可以包括与核酸序列操作性地连接的启动子序列。在特定实施例中,载体是病毒载体。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的载体(例如,相同表达盒)中。

[0317] 在相关方面,本公开提供了一种用于激动组织中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织与有效量的包括对本公开的Wnt替代分子进行编码的核酸序列的细胞接触。在某些实施例中,还使组织与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的细胞接触。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的细胞中。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在某些实施例中,用包括对Wnt替代分子或Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的表达盒的载体对细胞进行转导。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0318] 本文公开的Wnt替代分子可以用于例如通过激动(例如,增加)靶向细胞、组织或器官中的Wnt信号传导来治疗疾病、病症或病状。因此,在一些方面,本公开提供了一种用于治疗有需要的受试者的疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少或受损相关的疾病或病症和/或针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使受试者与有效量的本公开的组合物接触。在特定实施例中,所述组合物是药物组合物,所述药物组合物包括以下中的任一种:Wnt替代分子;多核苷酸,所述多核苷酸包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列,例如DNA或mRNA,任选地经过修饰的mRNA;载体,所述载体包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列,例如表达载体或病毒载体;或者细胞,所述细胞包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列,例如用对Wnt替代分子进行编码的表达载体或病毒载体转导的细胞。在特定实施例中,疾病或病况是病理性疾病或病症或者损伤,例如由伤口引起的损伤。在某些实施例中,伤口可能是另一种治疗性治疗的结果。在某些实施例中,疾病或病况包括受损组织修复、愈合或再生,或者会受益于增加的组织修复、愈合或再生。在一些实施例中,在体内发生接触,即,向受试者施用主题组合物。

[0319] 在某些实施例中,所述方法包括进一步使受试者与药物组合物接触,所述药物组合物包括一种或多种Wnt多肽或Norrin多肽。本公开设想了使受试者与用于递送作为第一活性剂的Wnt替代分子的第一分子和用于递送Wnt多肽或Norrin多肽的第二分子接触。第一分子和第二分子可以是相同类型的分子或不同类型的分子。例如,在某些实施例中,第一分子和第二分子可以各自独立地选自以下类型的分子:多肽、有机小分子、对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸(任选地,DNA或mRNA,任选地,经过修饰的RNA)、包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的载体(任选地,表达载体或病毒载体)以及包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的细胞(任选地,表达盒)。

[0320] 在相关方面,本公开提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或者针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所

述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的多核苷酸的药物组合物接触,所述多核苷酸包括对本文公开的Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使受试者与包括有效量的多核苷酸的药物组合物接触,所述多核苷酸包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的多核苷酸中。

[0321] 在相关方面,本公开提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或者针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的载体的药物组合物接触,所述载体包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使受试者与包括有效量的载体的药物组合物接触,所述载体包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,载体是表达载体并且可以包括与核酸序列操作性地连接的启动子序列。在特定实施例中,载体是病毒载体。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的载体(例如,相同表达盒)中。

[0322] 在相关方面,本公开提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或者针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的细胞的药物组合物接触,所述细胞包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使受试者与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的细胞接触。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的细胞中。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在某些实施例中,用包括对Wnt替代分子或Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的表达盒的载体对细胞进行转导。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0323] Wnt信号传导在干细胞的发育过程和维持中发挥着关键作用。Wnt信号的重新活化与损伤和疾病后大多数组织的再生和修复相关。预期Wnt替代分子响应于损伤和疾病而提供愈合和组织修复的益处。组织损害和损失的原因包含但不限于老化、变性、遗传性病况、感染和炎症、创伤性损伤、毒素/代谢诱导的毒性、或其它病理性病况。已经显示Wnt信号和Wnt信号的增强子使成年组织驻留干细胞活化。在一些实施例中,施用本公开的化合物以用于治疗患病组织或受损组织、用于组织再生以及用于细胞生长和增殖和/或用于组织工程化。

[0324] 与Wnt通路的突变相关的人类疾病针对治疗和预防疾病中Wnt信号的增强提供了有力证据。临床前体内和体外研究提供了许多疾病病况中涉及Wnt信号的另外的证据,并且进一步支持将Wnt替代分子用于各种人类疾病。例如,本公开的组合物可以用于促进或增加骨生长或再生、骨移植、骨折愈合、应力性骨折、椎体压缩性骨折、骨质疏松症和骨质疏松性骨折的治疗、脊柱融合、矫形装置的骨整合、腱-骨整合、牙齿生长和再生、牙种植、牙周疾病、颌面重建和颌骨坏死。本发明的组合物还可以用于:治疗脱发;增强感觉器官的再生,例如治疗听力损失,治疗前庭功能减退,治疗黄斑变性,治疗玻璃体视网膜病变,其它视网膜

变性疾病、福斯氏营养不良、其它角膜疾病等;治疗中风、创伤性脑损伤、阿尔茨海默症、多发性硬化、肌肉营养不良、由肌少症或恶病质引起的肌肉萎缩以及影响血脑屏障的其它病状;治疗脊髓损伤、其它脊髓疾病。本公开的组合物还可以用于:治疗口腔粘膜炎、治疗短肠综合征、炎性肠疾病(IBD)、其它胃肠道病症;治疗代谢综合征;治疗糖尿病、血脂异常、治疗胰腺炎、其中外分泌或内分泌胰腺组织受损的病状、其中期望增强的表皮再生例如表皮伤口愈合的病状;治疗糖尿病足溃疡、涉及牙齿、指甲或真皮发育不全等的综合征、其中血管生成有益的病状;治疗心肌梗死、冠状动脉疾病、心力衰竭、增强造血细胞的生长,例如增强来自骨髓的造血干细胞移植、动员外周血;治疗免疫缺陷、移植物抗宿主疾病等;治疗急性肾损伤、慢性肾病;治疗肺病、慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化(IPF);增强肺组织的再生。本公开的组合物还可以用于增强肝细胞再生(NASH),例如肝再生、治疗肝硬化、增强肝移植、治疗急性肝衰竭、治疗经历丙型肝炎或乙型肝炎病毒感染或抗病毒后药物疗法的慢性肝病、酒精性肝病、酒精性肝炎、伴随脂肪变性或脂肪性肝炎的非酒精性肝病(NASH)等。本公开的组合物可以治疗疾病和病症,包含但不限于其中期望再生性细胞生长的病况。

[0325] 涉及Wnt信号传导组分中的功能丧失突变或功能获得突变的人类遗传学显示了支持增强Wnt信号以用于骨生长的有力证据。其中期望增强的骨生长的病状可以包含但不限于骨折、移植、在假体装置周围向内生长、骨质疏松症、骨质疏松性骨折、脊柱融合、颌骨坏死、牙种植、牙周疾病、颌面重建等。Wnt替代分子增强和促进了对促进骨再生至关重要的Wnt信号。用于使骨组织再生的方法受益于施用本公开的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。在一些实施例中,使骨髓细胞暴露于本公开的分子,从而使得所述骨髓内的干细胞活化。

[0326] 在一些实施例中,通过使响应性细胞群(例如,骨髓、骨祖细胞、骨干细胞等)与有效剂量的本文公开的Wnt替代分子接触来增强骨再生。用于使骨组织再生的方法受益于施用Wnt替代分子,所述施用可以是全身性的或局部化的。在一些这种实施例中,在体内执行接触。在其它这种实施例中,离体地执行接触。分子可以例如通过加载到任选地可生物降解的基质上而定位到作用位点,并且任选地提供活性剂的缓释。基质载体包含但不限于可吸收的胶原海绵、陶瓷、水凝胶、高分子微球、纳米颗粒、骨水泥等。

[0327] 在特定实施例中,包括本文公开的一种或多种Wnt替代分子(或对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸,或包括对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸的载体或细胞)的组合物用于治疗或预防包含但不限于以下中的任一种的骨骼疾病或病症,或治疗或预防与以下中的任一种相关但不限于其的损伤:骨质疏松症、骨质疏松性骨折、骨折、未愈合性骨折、延迟愈合骨折、脊柱融合、骨坏死,颌、髋或股骨头等的坏死,植入物的骨整合(例如,用于在部分或全部膝盖或髋置换后加速恢复)、成骨不全症、骨移植、腱修复、颌面外科手术、牙种植、由遗传疾病、变性、老化、药品或损伤引起的任何其它骨病症或缺陷。在一个实施例中,结合Fzd1、Fzd2和Fzd7以及LRP5和/或LRP6的Wnt替代分子用于治疗或预防任何骨骼疾病或病症。在一个实施例中,结合Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8以及LRP5和/或LRP6的Wnt替代分子用于治疗或预防任何骨骼疾病或病症。

[0328] 在特定实施例中,本文公开的组合物和方法可以用于:增加受试者的骨矿物质密度、增加所述受试者的骨体积(例如,胫骨和/或股骨骨体积)、增加所述受试者的皮质厚度(例如,在骨小梁区或在股骨中骨干中)、增加所述受试者的矿物质沉积率、增加所述受试者

的(例如,骨中的)成骨细胞的数量和/或减少所述受试者的(例如,骨中的)破骨细胞的数量、增加所述受试者的骨刚度、增加所述受试者的骨折点的极限负荷、改善所述受试者的骨的对骨折的抵抗力、减少所述受试者的与骨质疏松症相关的骨流失或增加所述受试者的骨的生物化学强度。在一个实施例中,结合Fzd1、Fzd2和Fzd7的Wnt替代分子用于这些指定用途中的任一种用途。在一个实施例中,结合Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8的Wnt替代分子用于这些指定用途中的任一种用途。

[0329] 包括本文公开的一种或多种Wnt替代分子(或对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸,或包括对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸的载体或细胞)的组合物可以用于体内治疗骨骼组织缺陷。“骨骼组织缺陷”意指骨骼或其它骨骼结缔组织在期望恢复骨骼或结缔组织的任何位点处的缺陷,无论缺陷是如何引起的,例如无论是手术干预、肿瘤切除、溃疡、植入、骨折还是其它创伤性或变性病况的结果。本公开的组合物可以用作用于恢复结缔组织的软骨功能、用于修复软骨组织的缺损或损伤的方案的一部分,所述软骨组织的缺损或损伤如变性磨损和关节炎、组织创伤、半月板撕裂移位、半月板切除、由韧带撕裂、关节不齐、骨折或遗传性疾病引起的关节脱位。

[0330] Wnt替代分子还可以用于治疗牙周病。牙周病是牙齿脱落的主要原因并且与多种全身性病况有关。在一些实施例中,通过接触响应性细胞群来增强牙齿或下层骨再生。在一些这种实施例中,在体内执行接触。在其它这种实施例中,离体地执行接触,随后植入活化的干细胞或祖细胞。分子可以例如通过加载到任选地可生物降解的基质上而定位到作用位点,并且任选地提供活性剂的缓释。基质载体包含但不限于可吸收的胶原海绵、陶瓷、水凝胶、骨水泥、聚合物微球、纳米颗粒等。

[0331] 研究已经表明,Wnt信号传导和R-脊椎蛋白的生物学能够在损伤、老化或变性后促进内耳中的感觉毛细胞再生。听力丧失或前庭功能减退所涉及的内耳中感觉毛细胞的损失也可以受益于本公开的组合物。在内耳中,听觉器官容纳将声音振动转化为电脉冲所需的机械敏感毛细胞。包括半规管(SSC)、椭圆囊和球囊的前庭器官还含有感觉毛细胞,以检测头部位置和头部运动。本公开的组合物可以用于例如:输注;基质或其它储库系统;或者到耳朵的其它局部应用以增强听觉再生。

[0332] Wnt替代分子还可以用于视网膜组织的再生。在成年哺乳动物视网膜中,穆勒神经胶质细胞(Muller glia cell)能够例如在体内神经毒性损伤后之后使视网膜细胞(包含光感受器)再生。Wnt信号传导和Wnt信号的增强子可以促进穆勒神经胶质源视网膜祖细胞在损害后或在变性期间增殖。本公开的组合物还可以用于使眼中的组织和其它细胞类型再生。例如,年龄相关性黄斑变性(AMD)、其它视网膜变性疾病、角膜病、富克斯氏营养不良、玻璃体视网膜病变、遗传性疾病等可以受益于本公开的组合物。AMD的特征在于渐进性降低的中心视觉和视敏度。富克斯氏营养不良症的特征在于角膜内皮细胞逐渐丧失。Wnt信号和Wnt信号的增强可以促进眼部组织中角膜内皮、视网膜上皮等的再生。在其它实施例中,本公开的组合物可以用于例如:输注;基质或其它储库系统;或者到眼睛的其它局部应用以使视网膜再生并治疗黄斑变性。

[0333] 已经通过谱系示踪研究鉴别出用于肝细胞的稳态更新的特定增殖细胞群,例如中心周围区的Axin2阳性细胞。谱系示踪研究还鉴别出了另外可能的肝脏祖细胞,包含但不限于Lgr阳性细胞。包含Lgr5阳性细胞和Axin2阳性细胞在内的自我更新肝细胞和其它可能祖

细胞群被鉴别为能够在损伤后响应于Wnt信号和/或R-脊椎蛋白进行再生。急性肝损伤和衰竭以及慢性肝病的许多临床前模型显示出肝细胞的恢复和再生受益于增强Wnt信号。

[0334] 在某些实施例中,包括本文公开的Wnt替代分子(或对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸,或包括对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸的载体或细胞)的组合物用于促进肝再生、减少纤维化和/或改善肝功能。在某些实施例中,本文公开的组合物和方法被用于:增加肝重量、增加肝重量与体重的比率、增加肝中PCNA和pH3阳性细胞核的数目、增加肝中Ki67和/或细胞周期蛋白D1的表达、增加肝细胞增殖和/或有丝分裂、减少慢性肝损伤后的纤维化或增加肝细胞功能。

[0335] 在特定实施例中,本公开的组合物可以用于:治疗急性肝衰竭、急性酒精性肝损伤;治疗经历丙型肝炎或乙型肝炎病毒感染或抗病毒后药物疗法的慢性肝疾病、慢性酒精性肝病、非酒精性脂肪肝疾病和非酒精性脂肪性肝炎(NASH);治疗肝硬化和所有原因的严重慢性肝病;以及增强肝细胞的再生。用于使肝组织再生的方法受益于施用本公开的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。这些方法包含但不限于全身性施用方法和局部化施用方法,例如通过注射到肝组织中、通过注射到通向肝脏的静脉或血管中、通过植入缓释调配物等。

[0336] 在特定实施例中,包括本文公开的Wnt替代分子(或对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸,或包括对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸的载体或细胞)的组合物用于治疗或预防肝疾病或病症,包含但不限于治疗或预防由以下中的任一种引起的肝损伤或病症:急性肝衰竭(所有原因)、慢性肝衰竭(所有原因)、肝硬化、肝纤维化(所有原因)、门脉高压、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)(脂肪肝)、酒精性肝炎、丙型肝炎病毒诱导的肝病(HCV)、乙型肝炎病毒诱导的肝病(HBV)、其它病毒性肝炎(例如,甲型肝炎病毒诱导的肝病(HAV)和丁型肝炎病毒诱导的肝病(HDV))、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎、肝脏外科手术、肝损伤、肝移植、肝脏外科手术和移植中的“小肝”综合征、先天性肝脏疾病和病症,由遗传疾病、变性、老化、药品和损伤引起的任何其它肝脏病症或缺陷。

[0337] Wnt信号在各种上皮组织的再生中发挥着重要作用。各种表皮病况受益于用本公开的化合物进行的治疗。当附在胃肠道上的快速分开的上皮细胞破裂从而使粘膜组织易于溃疡和感染时,发生粘膜炎。上皮层(epithelial lining)的覆盖口腔的部分,被称为口腔粘膜,是身体最敏感的部位之一,并且特别容易受到化疗和放射的伤害。口腔粘膜炎可能是癌症治疗特别是化疗和放射中最常见的使人衰弱的并发症。另外,本公开的组合物还可以有益于治疗短肠综合征、炎性肠病(IBD)或其它胃肠病症。其它表皮病况包含表皮伤口愈合、糖尿病足溃疡、涉及牙齿、指甲或皮肤发育不全的综合征等。本公开的分子可以用于所有这些病况,其中再生性细胞与本公开的化合物接触。用于使上皮组织再生的方法受益于施用本公开的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。接触可以是例如局部的,包含皮内、皮下,以施加在靶向位点等处的凝胶、洗剂、乳膏等形式。

[0338] 除皮肤和胃肠道外,Wnt信号以及Wnt信号的增强和促进还在临床前模型中在包含胰腺、肾和肺在内的组织的修复和再生中发挥着重要作用。Wnt替代分子可以有益于涉及外分泌和内分泌胰腺、肾或肺的各种疾病病状。Wnt替代分子可以用于:治疗代谢综合征;治疗糖尿病;治疗急性或慢性胰腺炎、外分泌胰腺功能不全;治疗急性肾损伤、慢性肾病;治疗包含但不限于慢性阻塞性肺病(COPD)、导致肺上皮组织缺失的其它病状。用于使这些组织再

生的方法受益于施用本公开的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。

[0339] 与经由其它发育因子进行的信号传导协调的表皮Wnt信号传导对成人毛囊再生至关重要。脱发是常见问题,并且雄激素性脱发,通常称为男性型秃发,是男性最常见的脱发形式。在一些实施例中,通过使响应性细胞群与本公开的分子接触来增强毛囊再生。在一些这种实施例中,在体内执行接触。在其它这种实施例中,离体地执行接触。分子可以定位到作用位点处,例如外用洗剂、凝胶、乳膏等。

[0340] 可以用Wnt替代分子治疗中风、创伤性脑损伤、阿尔茨海默症、多发性硬化和影响血脑屏障(BBB)的其它病状。血管生成对确保向贯穿全身的许多组织供应氧气和营养物至关重要,并且对CNS而言尤其重要,因为神经组织对缺氧和缺血极其敏感。形成BBB的CNS内皮细胞与非神经组织中的内皮细胞的不同之处在于,CNS内皮细胞是通过紧密连接保持在一起的高度极化细胞并且表达特定转运蛋白。Wnt信号传导调节CNS血管形成和/或功能。BBB受损的病况可以受益于施用本公开的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的,例如通过直接注射、鞘内施用、植入缓释调配物等。另外,Wnt信号积极参与神经发生并且在损伤后发挥神经保护的作用。本公开的组合物还可以用于治疗脊髓损伤、其它脊髓疾病、中风、创伤性脑损伤等。

[0341] Wnt信号还在血管生成中发挥作用。Wnt替代分子可以有益于血管生成有利的病状、治疗心肌梗死、冠状动脉疾病、心力衰竭等,以及源自遗传性疾病的病状。用于使这些组织再生的方法受益于施用本公开的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。

[0342] 在某些实施例中,本公开的方法促进组织再生,例如在经受损害或者组织或细胞减少或损耗的组织中。损耗或损害可以是导致细胞数量减少的任何事物,包含疾病或损伤。例如,事故、自身免疫病症、治疗副作用或疾病况态可能会构成创伤。组织再生增加了组织内的细胞数量,并且优选地使组织的细胞之间能够重新建立连接,并且更优选地使组织能够重新获得功能。

[0343] 如本文所使用的,术语“施用”或“引入”或“提供”是指向细胞、向受试者的细胞、组织和/或器官或者向受试者递送组合物。这种施用或引入可以在体内、在体外或离体地发生。

[0344] 在特定实施例中,药物组合物是肠胃外施用的,例如,静脉内、口服、直肠或通过注射施用。在一些实施例中,局部(locally),例如局部地(topically)或肌内地施用药物组合物。在一些实施例中,组合物施用于靶组织,例如骨、关节、耳组织、眼组织、胃肠道、皮肤、伤口部位或脊髓。可以在体内或离体地实践本公开的方法。在一些实施例中,离体地执行靶细胞或靶组织与Wnt替代分子的接触,随后将细胞或组织例如活化的干细胞或祖细胞植入到受试者体内。技术人员可以基于正在治疗的疾病或病症确定适合的施用位点和施用途径。

[0345] 剂量和剂量方案可以取决于医师容易确定的各种因素,如疾病或病症的性质、受试者的特性和受试者的病史。在特定实施例中,向受试者施用或提供的Wnt替代分子的量的范围为受试者体重的约0.01mg/kg到约50mg/kg、0.1mg/kg到约500mg/kg或约0.1mg/kg到约50mg/kg。

[0346] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等在本文中用于通常意指获得期望的药理学和/或生理学效应。效果在完全或部分地预防疾病或其症状方面可以是预防性的,例如降低受试者体内发生疾病或其症状的可能性,和/或在部分或完全治愈疾病和/或由疾

病引起的不良反应方面可以是治疗性的。如本文所使用的,“治疗”覆盖了对哺乳动物的疾病的任何治疗,并且包含:(a)防止疾病在可能倾向于患有疾病但尚未被诊断为患有疾病的受试者身上发生;(b)抑制疾病,即,中止疾病发展;或者(c)缓解疾病,即,使疾病消退。可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用治疗剂(例如,Wnt替代分子)。特别关注了对发展中的疾病的治疗,其中所述治疗稳定或减少了患者的不期望的临床症状。理想的是,在受影响组织的功能完全丧失之前执行这种治疗。理想的是,将在疾病的症状期期间并且在一些情况下在疾病的症状期之后施用主题疗法。在一些实施例中,主题方法产生了治疗益处,例如预防病症的发展、停止病症的进展、逆转病症的进展等。在一些实施例中,主题方法包括检测到已经达到治疗益处的步骤。本领域内普通技术人员应了解,治疗功效的这种量度将适用于正被修饰的特定疾病,并且应认识到用于测量治疗功效的适当检测方法。

[0347] 其它实施例部分涉及本文公开的Wnt替代分子用于例如通过使细胞或组织与任选地与Norrin或Rspondin多肽组合的一种或多种Wnt替代物接触来促进或增强细胞、组织和类器官的生长或增殖的用途。在某些实施例中,所述细胞或组织离体、体外或体内接触。此类方法可以用于产生细胞、组织或类器官以用于治疗用途,例如,将其植入或移植到受试者中。它们也可以用于产生细胞、组织或类器官以供研究使用。Wnt替代分子在非治疗方法,例如体外研究方法中具有广泛的应用。

[0348] 本公开提供了一种用于受损组织(如上述组织)的组织再生的方法,所述方法包括向细胞施用Wnt替代分子。可以将Wnt替代分子直接体内施用到细胞,口服、静脉内或通过本领域已知的其它方法施用到受试者或施用到离体细胞。在将Wnt替代分子施用到离体细胞的一些实施例中,可以在施用Wnt替代分子之前、之后或期间将这些细胞移植入受试者中。

[0349] Wnt信号传导是干细胞培养的关键组成部分。例如,在WO2010/090513、WO2012/014076、Sato等人,2011(《肠胃病学(GASTROENTEROLOGY)》201 1;141:1762-1772)以及Sato等人,2009(《自然》459,262-5)。本文公开的Wnt替代分子是用于这些干细胞培养基的Rspondin的适合替代方案,或者可以与Rspondin组合。

[0350] 因此,在一个实施例中,本公开提供了一种用于增强干细胞增殖的方法,所述方法包括使干细胞与本文公开的一种或多种Wnt替代分子接触。在一个实施例中,本公开提供了一种细胞培养基,所述细胞培养基包括一种或多种本文公开的Wnt替代分子。在一些实施例中,细胞培养基可以是通常包括Wnt或Rspondin,但是其中Wnt或Rspondin被本文公开的一种或多种Wnt替代分子(全部或部分)替代或补充的本领域已知的任何细胞培养基。例如,培养基可以如在WO2010/090513、WO2012/014076、Sato等人,2011(《肠胃病学》201 1;141:1762-1772)以及Sato等人,2009(《自然》459,262-5)中所描述的,所述文献由此通过引用以其整体并入本文。

[0351] 干细胞培养基通常包括另外的生长因子。因此,此方法可以另外包括向干细胞供应生长因子。细胞培养基中常用的生长因子包含表皮生长因子(EGF,(派普泰克(Peprotech))、转化生长因子-α(TGF-α,派普泰克)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,派普泰克)、脑源性神经营养因子(BDNF,R&D系统)、肝细胞生长因子(HGF)和角质形成细胞生长因子(KGF,派普泰克,也被称为FGF7)。EGF是各种培养的外胚层和中胚层细胞的强效促有丝分裂因子,并且对体内和体外特定细胞以及细胞培养中某些成纤维细胞的分化具有深远的影响。EGF前体以膜结合分子的形式存在,所述膜结合分子通过蛋白水解方式切割以产生刺

激细胞的53个氨基酸的肽激素。因此,EGF或其它促有丝分裂生长因子可以供应给干细胞。在干细胞培养期间,可以每两天将促有丝分裂生长因子添加到培养基,同时培养基优选地每四天更新一次。通常,促有丝分裂因子选自由以下组成的组:i)EGF、TGF-α和KGF,ii)EGF、TGF-α和FGF7;iii)EGF、TGF-α和FGF;iv)EGF和KGF;v)EGF和FGF7;vi)EGF和FGF;vii)TGF-α和KGF;viii)TGF-α和FGF7;ix)或来自TGF-α和FGF。在某些实施例中,本公开包含干细胞培养基,所述干细胞培养基包括例如任选地与本文所述的生长因子中的一种或多种生长因子或其组合进行组合的本文公开的Wnt替代分子。

[0352] 这些增强干细胞增殖的方法可以用于从干细胞中生长出新的类器官和组织,如例如在WO2010/090513、WO2012/014076、Sato等人,201 1(《肠胃病学》2011;141:1762-1772)以及Sato等人,2009(《自然》459,262-5)。

[0353] 在一些实施例中,Wnt替代分子用于增强干细胞再生。关注的示例性干细胞包含但不限于:肌肉卫星细胞;造血干细胞和由其衍生的祖细胞(美国专利第5,061,620号);神经干细胞(见莫里森等人(1999)《细胞》96:737-749);胚胎干细胞;间质干细胞;中胚层干细胞;肝干细胞;脂肪组织来源的干细胞等。

[0354] 本公开的其它实施例部分地涉及用于检测表达一种或多种Fzd受体或LRP5或LRP6受体的细胞或组织的存在的诊断应用。因此,本公开提供了检测样品中的一种或多种Fzd受体或LRP5或LRP6受体(如检测表达Fzd1的细胞或组织)的方法。此类方法可以例如通过检测Wnt替代分子的结合以多种已知的检测形式应用,包含但不限于免疫组织化学(IHC)、免疫细胞化学(ICC)、原位杂交(ISH)、整装原位杂交(WISH)、荧光DNA原位杂交(FISH)、流式细胞术、酶免疫测定法(EIA)和酶联免疫测定法(ELISA)。

[0355] ISH是一种杂交类型,其使用标记的互补DNA或RNA链(即,主要结合剂)将特定DNA或RNA序列定位在细胞或组织(原位)的一部分或区段中,或者如果组织是足够小,则定位在整个组织中(整装ISH)。本领域普通技术人员将认识到,这与使用抗体作为主要结合剂将蛋白质定位在组织切片中的免疫组织化学不同。DNA ISH可以针对基因组DNA用于确定染色体的结构。荧光DNA ISH(FISH)可以例如用于医学诊断以评定染色体完整性。RNA ISH(杂交组织化学)用于测量和定位组织切片或整装中的mRNA和其它转录物。

[0356] 在各种实施例中,本文所述的Wnt替代分子与可以直接或间接检测的可检测标记缀合。在这方面,抗体“缀合物”是指与可检测标记共价连接的Wnt替代分子。在本公开中,DNA探针、RNA探针、单克隆抗体、其抗原结合片段和其抗体衍生物,如单链可变片段抗体或表位标记的抗体可以全部与可检测标记共价连接。在“直接检测”中,仅使用一种可检测抗体,即,第一可检测抗体。因此,直接检测意指可以检测本身与可检测标记缀合的抗体,而无需添加第二抗体(第二抗体)。

[0357] “可检测标记”是可以产生指示样品中标记的存在和/或浓度的可检测(如视觉上、以电子地方式或其它方式)信号的分子或材料。当与抗体缀合时,可检测标记可以用于定位和/或定量特异性抗体所针对的靶标。因此,可以通过检测由可检测标记产生的信号来检测样品中靶标的存在和/或浓度。可以直接或间接检测可检测标记,并且可以将与不同特异性抗体缀合的若干种不同可检测标记组合使用以检测一个或多个靶标。

[0358] 可以直接检测的可检测标记的实例包含荧光染料和放射性物质以及金属颗粒。相反,间接检测需要在应用第一抗体后应用一种或多种另外的抗体,即,第二抗体。因此,通过

检测第二抗体或结合剂与第一可检测抗体的结合来执行检测。需要添加第二结合剂或抗体的第一可检测结合剂或抗体的实例包含酶可检测结合剂和半抗原可检测结合剂或抗体。

[0359] 在一些实施例中,可检测标记与包括第一结合剂的核酸聚合物缀合(例如,在ISH、WISH或FISH过程中)。在其它实施例中,可检测标记与包括第一结合剂的抗体缀合(例如,在IHC过程中)。

[0360] 可以与本公开的方法中使用的Wnt替代分子缀合的可检测标记的实例包含荧光标记、酶标记、放射性同位素、化学发光标记、电化学发光标记、生物发光标记、聚合物、聚合物颗粒、金属颗粒、半抗原和染料。

[0361] 荧光标记的实例包含5-(和6)-羧基荧光素、5-或6-羧基荧光素、6-(荧光素)-5-(和6)-甲酰氨基己酸、异硫氰酸荧光素、若丹明、四甲基若丹明和染料(如Cy2、Cy3和Cy5)、任选的取代的香豆素(包含AMCA、PerCP)、藻胆蛋白(包含R-藻红蛋白(RPE)和别藻红蛋白(APC))、德克萨斯红、普林斯顿红(Princeton Red)、绿色荧光蛋白(GFP)和其类似物,以及R-藻红蛋白或别藻红蛋白的缀合物、无机荧光标记,如基于半导体材料的颗粒,如经涂覆的CdSe纳米微晶。

[0362] 聚合物颗粒标记的实例包含可以嵌入荧光染料或含有染料、酶或底物的聚合物胶束或胶囊的聚苯乙烯、PMMA或二氧化硅的微粒或胶乳颗粒。

[0363] 金属颗粒标记的实例包含可以通过银染转化的金颗粒和经涂覆的金颗粒。半抗原的实例包含DNP、异硫氰酸荧光素(FITC)、生物素和洋地黄毒苷。酶标记的实例包含辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP或AP)、β-半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶、β-葡萄糖醛酸苷酶、转化酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶和葡萄糖氧化酶(GO)。辣根过氧化物酶的常用底物实例包含3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、具有镍增强作用的二氨基联苯胺、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、联苯胺二盐酸盐(BDHC)、汉克耶茨(Hanker-Yates)试剂(HYR)、靛蓝(IB)、四甲基联苯胺(TMB)、4-氯-1-萘酚(CN)、α-萘酚派洛宁(α-NP)、邻联茴香胺(OD)、5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯(BCIP)、硝基蓝四唑(NBT)、2-(对碘苯基)-3-对硝基苯基-5-苯基氯化四唑(INT)、四硝基蓝四唑(TNBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-半乳糖苷/铁-铁氰化物(BCIG/FF)。

[0364] 碱性磷酸酶的常用底物的实例包含萘酚-AS-B1-磷酸酯/坚牢红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸酯/坚牢红TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸酯/-坚牢红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸酯/坚牢TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸酯/新品红(NABP/NF)、溴氯吲哚磷酸酯/硝基蓝四唑(BCIP/NBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚基-b-d-吡喃半乳糖苷(BCIG)。

[0365] 发光标记的实例包含鲁米诺、异鲁米诺、吖啶酯、1,2-二氧杂环丁烷和吡啶并哒嗪。电化学发光标记的实例包含钌衍生物。放射性标记的实例包含碘、钴、硒、氚、碳、硫和磷的放射性同位素。

[0366] 可检测标记可以与本文所述的抗体或特异性结合关注的生物标志物的任何其它分子,例如抗体、核酸探针或聚合物连接。此外,本领域普通技术人员将理解,可以检测标记也可以与第二和/或第三和/或第四和/或第五和/或第五结合剂或抗体等缀合。此外,技术人员将理解用于表征目标生物学标记的每种其它结合剂或抗体都可以用作信号放大步骤。可以使用例如光学显微镜、荧光显微镜、电子显微镜在视觉上检测生物标记,其中可检测物质是例如染料、胶体金颗粒、发光试剂。还可以使用分光光度计检测结合到生物标志物的视

觉上可检测物质。当可以检测物质是放射性同位素时,可以通过放射自显影在视觉上进行检测,或使用闪烁计数器在视觉上进行检测。参见例如Larsson,1988,《免疫细胞化学:理论与实践(Immunocytochemistry:Theory and Practice)》,(佛罗里达州波卡拉顿的CRC出版社(CRC Press,Boca Raton,Fla.));《分子生物学方法》,第80卷1998,John D.Pound(编)(新泽西州托托瓦的胡玛纳出版社(Humana Press,Totowa,N.J.))。

[0367] 本公开进一步提供了用于检测样品中一种或多种Fzd或LRP5/6受体或表达一种或多种Fzd或LRP5/6受体的细胞或组织的试剂盒,其中试剂盒含有至少一种本文所述的抗体、多肽、多核苷酸、载体或宿主细胞。在某些实施例中,试剂盒可以包括与本公开的抗体关联的缓冲液、酶、标记、底物、珠或其它表面等以及使用说明书。

[0368] 本说明书中提及的和/或在申请数据表中列出的所有上述美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过全文引用的方式并入本文中。

[0369] 根据前述内容,应了解,尽管出于说明的目的已经描述了本公开的具体实施例,但是可以在不背离本公开的精神或范围的情况下作出各种修改。因此,除所附权利要求进行的限制之外,本公开不受限制。

[0370] 实例

[0371] 实例1

[0372] 多特异性Wnt替代分子

[0373] 如以下实例中进一步描述的,产生了许多表示不同构型的多特异性Wnt替代分子。这些包含下表5中公开的Wnt替代分子,所述Wnt替代分子包括SEQ ID NO:109-157中所示的序列。表1A和1B以及2A和2B列出了这些实例中所呈现的用于Wnt替代分子的特定Fzd和LRP结合元件。

[0374] 表5.Wnt替代分子序列

[0375] Lrp VHH或sdAb=斜体

[0376] 抗Fzd轻链=下划线

[0377] 抗Fzd重链=粗体

[0378]

名称	SEQ ID NO	序列
R2M3-3 LC	109	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVST NYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKA ALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS

[0379]

名称	SEQ ID NO	序列
R2M3-3 HC	110	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CASSKEKATYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**
1291-3 LC	111	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGDVVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLL YSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFTLTISSVKAKDLAVYYCQQYYSYPTFGGGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
1291-3 HC	112	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVESGGGLVKPGGSL KLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSYT RYPDKLKGRFTISRDNAKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCA RVGGRRDYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**
1791-3 LC	113	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCD*VQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGDIVMTQSPKSMSMSVGERVTLRCKASENV LNYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDF TLTISSVQAEDLADYHCGQSYRYPTFGAGTKLELKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC*

[0380]

名称	SEQ ID NO	序列
1791-3 HC	114	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQPVESGGGLVQPKGSL KLSCAASGFTFNTYAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNN YAKNYDDSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMY YCVRENYGGRFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**
4SD1-3 LC	115	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
4SD1-3HC	116	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFTNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCA RATGFGTVVFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**
14SB6-3 LC	117	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

[0381]

名称	SEQ ID NO	序列
14SB6-3 HC	118	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYIENDGSIT TYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR APYYYGSGSLFRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**
4SD1-3 LC	119	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
4SD1-3 HC-臼	120	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFTNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCA RATGFGTVVFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSGH HHHHH
14SB6-3 LC	121	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

[0382]

名称	SEQ ID NO	序列
14SB6-3 HC-杵	122	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYIENDGSIT TYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR APYYYGSGSLFRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GG SGGDYKDDDDK
Fc-杵	123	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEFDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKGGSGGDYKDDDDK
Fc-臼	124	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEFDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKGSGSGHHHHHH
4SC10-3 LC	125	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAG SLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDD DYVYRGQGTQVTVSS***GGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
4SC10-3 HC	126	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYIFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGLVDPED GETIYAEKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYY CAHSDFFSGLSFGDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

[0383]

名称	SEQ ID NO	序列
杂 Ig 4SC10-3+1R C07-3 LC1	127	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQKKPGKKPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLESTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
杂 Ig 4SC10-3+1R C07-3 HC1	128	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYIFTDYYMHWVRDAPGQGLEWMGLVDPED GETIYAEKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYY CAHSDFFSGLSFGDWGDGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGS GHHHHHH
杂 Ig 4SC10-3+1R C07-3 LC2	129	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHK YASWYQDKPGQDPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLT ISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAAKSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
杂 Ig 4SC10-3+1R C07-3 HC2	130	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSET LSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGST NYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARG GQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**G GSGGDYKDDDDK

[0384]

名称	SEQ ID NO	序列
1RC07-3 单价双特异性 LC1	129	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHK YASWYQDKPGQDPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLT ISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAAKSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
1RC07-3 单价双特异性 HC	130	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSET LSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGST NYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARG GQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**G GSGGDYKDDDDK
1RC07-3 单价双特异性 Fc	131	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEF**DKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK**GSGSGHHHHHH
R2M3-26 LC	132	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRL ACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKG RFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS*GSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSV STNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNK AALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
R2M3-26 HC	110	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CASSKEKATYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

[0385]

名称	SEQ ID NO	序列
R2M3mut-26 LC	132	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRL ACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKG RFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS*GSGSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSV STNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNK AALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
R2M3mut-26 HC	133	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CASSKEKATYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GS GSGHHHHHH
R2M3-3 LC	109	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSG*QAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVST NYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKA ALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
R2M3-3 HC	110	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CASSKEKATYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

[0386]

名称	SEQ ID NO	序列
R2M3mut-3 LC	109	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVST NYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKA ALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
R2M3mut-3 HC	133	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CASSKEKATYYAGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GS GSGHHHHHH
1RC07-3 (2:2) LC	134	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTI SGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
1RC07-3 (2:2) HC	135	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSET LSLTCAVSGASFSGHYWTWIRQPPGKGLEWIGEIDHTGST NYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARG GQGGYDWGHYHGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

[0387]

名称	SEQ ID NO	序列
1RC07-3 (2:1) LC1	129	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHK YASWYQDKPGQDPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLT ISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAAKSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
1RC07-3 (2:1) HC1	130	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSET LSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGST NYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARG GQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**G GSGGDYKDDDDK
1RC07-3 (2:1) LC2	136	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCSYVLTQPPSVSVSPGQTASI TCSGDKVGHKYASWYQKKPGQKPVLVIYEDSQRPSGIPVRFS GSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAESYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
1RC07-3 (2:1) HC2	137	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSET LSLTCAVSGASFSGHYWTWIRDPPGKGLEWIGEIDHTGST NYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARG GQGGYDWGHYHGLDVWGDGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**G SGSGHHHHHH
R2M3-26NL-26NH (1:2) LC	132	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRL ACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKG RFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS*GSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSV STNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNK AALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS

[0388]

名称	SEQ ID NO	序列
R2M3-26NL-26NH (1:2) HC	138	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRL ACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKG RFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS*GSGSG**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKL QGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKAT YYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGDYKD DDDK
R2M3-26NL-26NH (1:2) Fc	131	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEF**DKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK**GSGSGHHHHHH
R2M3-26NL-26CL (1:2) LC	139	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRL ACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKG RFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS*GSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSV STNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNK AALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECSGSGSG*DVQLVESGGGLVQAGGSLRLA CAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKGR FTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS*
R2M3-26NL-26CL (1:2) HC_Fab	140	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CASSKEKATYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSC**GSGSGHHHHHH

[0389]

名称	SEQ ID NO	序列
R2M3-26NL-26CH (1:2) LC	132	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWGQGTQVTVSS*GSGSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
R2M3-26NL-26CH (1:2) HC	141	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSG*DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWGQGTQVTVSS*S
R2M3-26NL-26CH (1:2) Fc	131	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEF**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSGHHHHHH
1RC07-3+R2M3 (1:1:1) LC1	129	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQGTQVTVSS*GSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0390]

名称	SEQ ID NO	序列
1RC07-3+R2 M3 (1:1:1) HC1	130	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGDYKDDDDK
1RC07-3+R2 M3 (1:1:1) LC2	142	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQKTPGQKPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAESYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
1RC07-3+R2 M3 (1:1:1) HC2	143	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRDAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYGMDVWGDGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSGHHHHHH
1RC07-3+R2 M13 (1:1:1) LC1	129	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQGTQVTVSS*GSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0391]

名称	SEQ ID NO	序列
1RC07-3+R2M13 (1:1:1)HC1	130	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGDYKDDDDK
1RC07-3+R2M13 (1:1:1)LC2	144	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQKKPGKKPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
1RC07-3+R2M13 (1:1:1)HC2	145	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLLQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFTYRYLHWVRDAPGQGLEWMGGIIPIFGTGNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASSMVRVPYYYGMDVWGDGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSGHHHHHH
1RC07-3+5SH5 (1:1:1)LC1	129	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQGTQVTVSS*GSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0392]

名称	SEQ ID NO	序列
1RC07-3+5SH5 (1:1:1) HC1	130	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGDYKDDDDK
1RC07-3+5SH5 (1:1:1) LC2	146	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQKKPGKKPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSMPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
1RC07-3+5SH5 (1:1:1) HC2	147	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRDAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARVPDFWSGYLDYWGDGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSGHHHHHH
1RC07-3-26NL (2:1:1) LC1	129	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQGTQVTVSS*GSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0393]

名称	SEQ ID NO	序列
1RC07-3-26 NL (2:1:1) HC1	130	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSET LSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGST NYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARG GQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**G GSGGDYKDDDDK
1RC07-3-26 NL (2:1:1) LC2	148	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRL ACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKG RFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS*GGSGSSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGH KYASWYQKKPGQKPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATL TISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNNKYAAESYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
1RC07-3-26 NL (2:1:1) HC2	137	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSET LSLTCAVSGASFSGHYWTWIRDPPGKGLEWIGEIDHTGST NYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARG GQGGYDWGHYHGLDVWGDGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**G SGSGHHHHHH
1RC07-3-26 NH (2:1:1) LC	149	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCSYVLTQPPSVSVSPGQTASI TCSGDKVGHKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPSGIPVRFS GSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0394]

名称	SEQ ID NO	序列
1RC07-3-26 NH (2:1:1) HC1	150	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRL ACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKG RFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS*GGSGS**QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSG ASFSGHYWTWIRQPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSR VTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDW GHYHGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGSGG*DYK DDDDK
1RC07-3-26 NH (2:1:1) HC2	151	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKG RFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ GTQVTVSS*GGSGS**QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGAS FSGHYWTWIRQPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVT ISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGH YHGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GSGSG*HHHHH H
1RC07-26+4 SD1-3_(1:1:1 :1) LC1	152	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRL ACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKG RFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS*GGSGSSSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGH KYASWYQDKPGQDPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATL TISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNNKYAAKSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS

[0395]

名称	SEQ ID NO	序列
1RC07-26+4SD1-3_(1:1:1:1) HC1	130	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGDYKDDDDK
1RC07-26+4SD1-3_(1:1:1:1) LC2	153	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQGTQVTVSS*GGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQKKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
1RC07-26+4SD1-3_(1:1:1:1) HC2	154	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTNYAMSWVRDAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARATGFGTVVFDYWGDGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSGHHHHHH
R2M9-26+1RC07-3(1:1:1:1) LC1	155	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWGQGTQVTVSS*GSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQDKPGKDPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLKSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0396]

名称	SEQ ID NO	序列
R2M9-26+1RC07-3(1:1:1:1) HC1	156	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNNFMHWVRKAPGQGLEWMGWINPNSGGTKYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGEVGATMLGIGVWYWFDPWGKGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGDYKDDDDK
R2M9-26+1RC07-3(1:1:1:1) LC2	157	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQGTQVTVSS*GGSGSSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQKKPGQKPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAESYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
R2M9-26+1RC07-3(1:1:1:1) HC2	130	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC**QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GGSGGDYKDDDDK

[0397] 实例2

[0398] 对Fzd受体铰链区具有结合特异性的Wnt替代分子的产生

[0399] 产生了活性Wnt替代分子,所述活性Wnt替代分子包括结合Fzd受体铰链区的Fzd结合体(参见图2A)和LRP结合体的各种组合。WO2016/205551和WO2016/205566中描述了两种结合Fzd7的铰链区的抗体,抗FZD7-1791(SEQ ID NO:70-71)和抗FZD7-1291(SEQ ID NO:72-73)。这两种抗体被用来证明Fzd铰链区的结合体产生活性Wnt替代分子。

[0400] 抗FZD7-1791和抗FZD7-1291都被克隆到人IgG1框架中,其中Fc中具有LALA-PG突变以减少效应子功能。LRP5结合体#3(008S-D01;SEQ ID NO:97)在框架中克隆到两种抗体轻链的N端,如图2B所描绘的。根据制造商的说明,分别命名为1791-3(SEQ ID NO:113-114)和1291-3(SEQ ID NO:111-112)的两种重组附接IgG蛋白是通过将相应的表达载体转染到Expi293F细胞(马萨诸塞州沃尔瑟姆赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA))中制备的。简言之,在转染后四天,在使细胞团块旋转减慢后收集细胞培养基。培养基与蛋白A树脂(马萨诸塞州沃尔瑟姆的REPLIGEN)一起温育,以收集含有人IgG-Fc部分的蛋白。用pH为3.5的10mM甘氨酸从蛋白A树脂中洗脱蛋白质。随后,将蛋白洗脱液分

级,并且通过尺寸排阻色谱法(SEC)进一步纯化。通过快速蛋白质液相色谱法在HBS缓冲液(10mM HEPES,150mM NaCl,pH 7.4)中使用Superdex 200Increase 10/300GL(宾夕法尼亚州匹兹堡市通用电气医疗集团(GE Healthcare,Pittsburgh,PA))执行SEC。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进一步分析峰级分以确认含量。

[0401] 利用与Fzd1和Fzd2的铰链区结合的抗体来证明,除了Fzd7铰链之外,其它Fzd铰链区也产生活性Wnt替代分子。这些抗体的重组Fab片段是通过瞬时转染从Expi293F细胞(马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司)产生的。用镍树脂从培养基中纯化Fab,并且用尺寸排阻色谱法(SEC)进一步精制。

[0402] 抗FZD1铰链和抗FZD2铰链抗体都被克隆到人IgG1框架中,其中Fc中具有LALA-PG突变以减少效应子功能。LRP5结合体#3(008S-D01;SEQ ID NO:97)或LRP5/6结合体#36(013S-D05;SEQ ID NO:91和96)在框架中克隆到相应抗体的轻链的N端,如图2B所描绘的。根据制造商的说明书,通过将相应的表达载体转染到Expi293F细胞(马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技)中来制备重组附接IgG蛋白。简言之,在转染后四天,在使细胞团块旋转减慢后收集细胞培养基。培养基与蛋白A树脂(马萨诸塞州沃尔瑟姆的REPLIGEN)一起温育,以收集含有人IgG-Fc部分的蛋白。用pH为3.5的10mM甘氨酸从蛋白A树脂中洗脱蛋白质。随后,将蛋白洗脱液分级,并且通过尺寸排阻色谱法(SEC)进一步纯化。通过快速蛋白质液相色谱法在HBS缓冲液(10mM HEPES,150mM NaCl,pH 7.4)中使用Superdex 200Increase 10/300GL(宾夕法尼亚州匹兹堡市通用电气医疗集团(GE Healthcare,Pittsburgh,PA))执行SEC。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进一步分析峰级分以确认含量。结果指示,这些抗体也产生了活性Wnt替代分子。

[0403] 实例3

[0404] 铰链区特异性Wnt替代分子的结合动力学

[0405] 通过生物层干涉测量法(BLI)、使用Octet Red 96(加利福尼亚州佛瑞蒙的PALL ForteBio(PALL ForteBio,Fremont,CA))仪器、在30℃、1000rpm下利用链霉亲和素(SA)生物传感器来确定1791-3和1291-3与Fzd7 CRD或具有细胞外铰链区序列的Fzd7CRD(Fzd7 CRD+铰链)的结合动力学。N端生物素化的Fzd7 CRD和Fzd7 CRD+铰链蛋白在SA生物传感器上被捕获。捕获生物素化Fzd7之后,将具有捕获的生物素化Fzd7的SA生物传感器浸入含有在处于运行缓冲液中的7种不同浓度下的相关抗体的孔以及仅将运行缓冲液作为参考通道的孔中。KD由全局拟合确定。如图2C所示,这两种抗体融合蛋白仅与具有铰链区的Fzd7蛋白结合,而不单独与Fzd7 CRD结构域结合。

[0406] 实例4

[0407] 铰链区特异性Wnt替代分子的体外活性

[0408] 在293STF细胞系中评定了1791-3和1291-3激活Wnt信号传导的能力,其中稳定整合了β-连环蛋白荧光素酶报告基因质粒Super TOP Flash(STF)。如图2D所示,1791-3和1291-3都激活了Wnt信号传导,如通过在存在20nM R-脊椎蛋白2(RPSO)的情况下在这些细胞中诱导荧光素酶报告基因来判断的。尽管1291-3对Fzd7 CRD+铰链具有更高的亲和力,1791-3也显示出比1291-3更高的活性,这表明两种抗体之间几何形状的潜在差异可以引起活性的差异。对另一种Wnt替代分子R2M3-3(Fzd结合体001S-A04;Lrp结合体008S-D01;SEQ ID NO:109-110)也进行了测试,其可以接合Fzd1、Fzd2、Fzd7、Fzd5和Fzd8。如图2D所示,来

自1791-3的最大效应接近多家族(multifamily)特异性R2M3-3的效应。

[0409] 在过度表达Fzd1或Fzd2的293STF细胞系中评定了包括结合Fzd1或Fzd2铰链区的抗体的Wnt替代物激活Wnt信号传导的能力,其中稳定整合了β-连环蛋白荧光素酶报告基因质粒Super TOP Flash(STF)。针对荧光素酶报告基因测定,在每个96孔板中,接种1百万个细胞,以3μM的最终浓度添加IWP2(wnt信号传导抑制剂)。在接种后26小时,将化合物一式三份添加到96孔板中,其中从100nM开始10倍系列稀释,并且最高浓度为500nM。18小时之后,用100μl裂解缓冲液来裂解细胞。从上述裂解的细胞中,将20ul样品转移到不透明的96孔板中。向每个孔中添加10μl荧光素酶底物。立即将板放置在分子装置Lum96板读取器中,并且收集荧光素酶发光信号。数据用Prism7处理。这些抗体激活Wnt信号传导,如通过在存在20nM R-脊椎蛋白2(RPSO)的情况下具有Fzd1或Fzd 2过表达的这些细胞中诱导荧光素酶报告基因来判断的。这些结果表明,当与LRP结合体组装时,Fzd铰链结合抗体可以诱导Wnt信号传导激活。

[0410] 实例5

[0411] 多特异性Wnt替代分子的产生

[0412] 将来自单特异性Wnt替代分子的序列组合以产生具有Fzd结合特异性的期望组合的多特异性Wnt替代分子。如图3A所描绘的,使用杵臼技术将两种单特异性Wnt替代分子:结合Fzd4的4SD1-3(Fzd结合体004S-D01;Lrp结合体008S-D01;SEQ ID NO:115-116)以及结合Fzd9的14SB6-3(Fzd结合体014S-B06;Lrp结合体008S-D01;SEQ ID NO:117-118),组合成杂Ig Wnt替代分子杂Ig 4SD1-3+14SB6-3(SEQ ID NO:120和122)。杂Ig分子的一半来自4SD1-3,其中在CH3结构域(SEQ ID NO:120)中引入了“臼”突变。分子的这一半含有到Fzd4的一个结合臂和到LRP5的一个结合臂。杂Ig分子的另一半来自14SB6-3,其中在CH3结构域(SEQ ID NO:122)中引入了“杵”突变。分子的这一半含有到Fzd9的一个结合臂和到LRP5的一个结合臂。最终的Wnt替代物(杂Ig 4SD1-3+14SB6-3)为四价三特异性分子,其含有到Fzd4的一个结合臂、到Fzd9的一个结合臂以及到LRP5的两个结合臂。

[0413] 还产生了两种控制分子:4SD1-3单价双特异性(SEQ ID NO:120和123)和14SB6-3单价双特异性(图3A)(SEQ ID NO:122和124)。4SD1-3单价双特异性分子含有杂Ig的具有“臼”突变(SEQ ID NO:120)的4SD1-3半部,其与具有“杵”突变(SEQ ID NO:123)的Fc配对,但不具有Fab臂;因此,此分子对Fzd4和LRP5是双特异性但单价的。14SB6-3单价双特异性含有杂Ig的具有“杵”突变(SEQ ID NO:122)的14SB6-3半部,其与具有“臼”突变(SEQ ID NO:124)的Fc配对,但不具有Fab臂;因此,此分子对Fzd9和LRP5是双特异性但单价的。

[0414] 通过4步纯化工艺对杂Ig 4SD1-3+14SB6-3、4SD1-3单价双特异性和14SB6-3单价双特异性进行纯化。由于含有“杵”突变的Fc也含有FLAG标签,并且含有“臼”突变的Fc也含有His标签,因此这些蛋白质首先通过蛋白质A和Ni-NTA亲和力纯化步骤纯化,之后是SEC步骤;抗FLAG M2珠用作最后的纯化步骤。

[0415] 实例6

[0416] 多特异性Wnt替代分子的表征

[0417] 在存在或不存在20nM RPSO的情况下,在Wnt响应性293STF报告基因细胞中评定了杂Ig 4SD1-3+14SB6-3、4SD1-3单价双特异性和14SB6-3单价双特异性激活Wnt信号传导的能力(图3B-3E中仅显示了在存在RPSO的情况下的数据)。对可以结合Fzd1、Fzd2、Fzd7、Fzd5

和Fzd8的R2M3-3也进行了测试。

[0418] 293STF细胞系表达低水平的Fzd4,并且通过QPCR没有检测到Fzd9表达。除R2M3-3之外的所有分子在亲代293STF细胞中显示出非常少的活性或没有活性(图3B)。

[0419] 产生了基于逆转录病毒的Fzd4过度表达293STF稳定细胞系(293STF Fzd4OE)。在此细胞系中,R2M3-3和4SD1-3(Fzd4单特异性)均强效激活Wnt信号传导,而杂Ig 4SD1-3+14SB6-3显示非常弱的活性,并且Fzd9单特异性分子14SB6-3是无活性的(图3C)。

[0420] 通过瞬时转染将Fzd9引入亲代293STF细胞中,以产生293STF Fzd9OE细胞系。在此细胞系中,R2M3-3和14SB6-3(Fzd9单特异性)都能够激活Wnt信号传导,而杂Ig 4SD1-3+14SB6-3显示非常弱的活性,并且Fzd4单特异性分子4SD1-3是无活性的(图3D)。

[0421] 通过逆转录病毒Fzd4递送和Fzd9瞬时转染的组合,将Fzd4和Fzd9共同引入293STF细胞中,以产生293STF Fzd4OE+Fzd9OE细胞系。在此细胞系中,R2M3-3、4SD1-3、14SB6-3和杂Ig 4SD1-3+14SB6-3都是完全活性的(图3E)

[0422] 两种单价双特异性分子,4SD1-3单价双特异性和14SB6-3单价双特异性,在所有细胞中都是无活性的(图3B-3E)。这些结果表明,对于两种单特异性结合体,与LRP5结合体组合的单价双特异性不能诱导或不能有效诱导Wnt信号传导。因此,观察到的杂Ig 4SD1-3+14SB6-3的活性确实是Fzd4和Fzd9蛋白以及LRP接合的结果。这些结果进一步表明,此方法可以应用于两种或更多种不同特异性的Fzd结合体的任何组合,从而使得能够通过此工艺来产生任何期望的Fzd特异性组合。

[0423] 此实例表明,两种不同特异性的Fzd结合体可以以杂Ig形式组合,以产生不同特异性的Wnt替代分子。此概念也可以扩展到在两种不同表位上将两种Fzd结合体用于同一Fzd。所得的杂Ig Wnt替代分子将是双互补位分子,这对于进一步的受体聚集和Wnt信号传导的激活可以是有利的。

[0424] 实例7

[0425] 典型和非典型信号传导Fzd受体以及LRP受体结合的异源二聚化引起β-连环蛋白依赖性信号传导的激活

[0426] Wnt信号传导可以通过β-连环蛋白依赖性(典型)和β-连环蛋白非依赖性(非典型)通路介导。据报道,存在激活β-连环蛋白非依赖性信号传导的Fzd受体,如Fzd6,而其它Fzd受体激活β-连环蛋白依赖性信号传导。先前没有考虑非典型Fzd受体与Lrp的强制二聚化或典型和非典型Fzd受体与Lrp的异源二聚化是否可以引起β-连环蛋白依赖性或β-连环蛋白非依赖性信号传导。为了测试这些想法,产生了以下实例。

[0427] 首先,将由针对非典型受体Fzd6的二价结合臂(004S-C10)组成的多价分子与针对Lrp5的二价结合臂(3;004S-D01)组合。所述分子被命名为4SC10-3(图5A的上图区)。当Fzd结合体针对典型的Fzd受体时,这种形式已被证明能激活β-连环蛋白依赖性信号传导。然而,如图5A的下图区所示,与接合Fzd1、2、7、5、8的阳性对照分子R2M3-26(Fzd结合体001S-A04;Lrp结合体009S-E04)相比,4SC10-3在293STF报告基因细胞中(在存在20nM R-脊椎蛋白的情况下)不能有效激活β-连环蛋白依赖性信号传导。

[0428] 接下来,将由4SC10和与Fzd1、2、7(典型的Fzd受体)结合的另一个Fzd结合臂1RC07(001S-B03)组成的多价分子与针对Lrp5的二价结合臂(3)组合。所述分子被命名为杂Ig 4SC10-3+1RC07-3(图5B的上图区),并且其在293STF报告基因细胞中激活β-连环蛋白依赖

性信号传导。为了排除1RC07-3臂单独能够激活信号传导的可能性,也测试了图5C上图区所示的1RC07-3单价双特异性分子。如图5C所示,1RC07-3单价双特异性分子不能有效激活信号传导。这些结果首次证明,将典型的和非典型的Fzd受体与Lrp组合可以引起β-连环蛋白依赖性信号传导。

[0429] 实例8

[0430] 探索Wnt替代分子中Fzd与Lrp结合体的不同比率对β-连环蛋白依赖性信号传导的影响

[0431] 多价形式产生了强效且高度有效的Wnt信号传导激活剂。实验被设计用于测试所述形式对内源性Wnt信号传导的影响。为了理解二价/多价Lrp结合臂对内源性Wnt配体的影响,用R2M3、R2M3mut(Y9A)的无效突变体产生了无活性的替代分子,并且与Lrp结合体3或26融合,并且分别命名为R2M3mut-3或R2M3mut-26。如图6A所示,虽然在存在20nM R-脊椎蛋白的情况下,野生型R2M3替代物R2M3-3和R2M3-26在293STF Wnt报告基因细胞系中具有完全活性,但是R2M3mut-3和R2M3mut-26是无活性的。为了测试替代分子中二价Lrp臂对内源性Wnt信号传导的影响,在存在含有Wnt3A的20%条件培养基的情况下,在293STF Wnt报告基因细胞系中测试了这两种无活性的替代分子。如图6B所示,尽管R2M3mut-3和R2M3mut-26自身是无活性的,但是R2M3mut-3以剂量响应方式与Wnt3a协同作用,并且R2M3mut-26以剂量响应方式拮抗Wnt3a。这表明多价形式可能具有与内源性Wnt配体相互作用的潜力。

[0432] 为了理解减少与内源性Wnt潜在相互作用的形式,并且进一步理解主动信号传导所需的受体结合体的数量,探索了多价替代分子中Fzd和Lrp结合体的不同数量和比率。

[0433] 由于Lrp结合臂的二价性可能导致与内源性Wnt的协同作用,因此测试了去除一个Lrp结合臂,因此在最终分子中存在两个Fzd结合臂和一个Lrp结合体;此分子被称为2:1。最初的分子形式是2:2,因为存在两个Fzd结合体和两个Lrp结合臂。与2:2形式相比,2:1分子的一个实例1RC07-3(2:1)在图6C左图区中示出。如图6C右图区所示,1RC07-3(2:1)是活性的并且能够在293STF报告基因细胞中诱导Wnt信号传导。原则上,这种形式应该缺乏通过Lrp共受体的交联来与内源性Wnt配体协同作用的能力。还构建了反向比率,一个Fzd结合体和两个Lrp结合体,如图6D中的几个形式所举例说明的。通常,这些分子最多显示出适度的信号传导诱导(图6D)。

[0434] 由于2:2形式的异源二聚化Fzd可以诱导Wnt信号传导(如图3和图5所示),因此构建了使两个不同的Fzd结合体与一个Lrp结合体(1:1:1)形式异源二聚化的分子,并且测试了所述分子赋予Wnt信号传导的能力。如图6E所示,1:1:1分子的几个实例都激活了293STF报告基因细胞中的Wnt信号传导。在此结构中测试的Fzd结合体包含R2M3(001S-A04)、1RC07(001S-B03)、R2M13(004S-G06)和5S-H5(005S-H05)。

[0435] 实例9

[0436] Lrp结合体以及Fzd结合的异源二聚化引起Wnt信号传导的激活

[0437] 除了异源二聚化/多聚化不同的Fzd受体结合体外,还测试了异源二聚化/多聚化不同的Lrp共受体结合体对Wnt信号传导的影响。如上所示,两个Fzd:一个Lrp形式减轻了与内源性Wnt配体的协同作用。为了确定针对Lrp上两个不同区的异源二聚化的/多聚化的Lrp结合体是否也可以减轻二价Lrp结合体形式对内源性Wnt配体的协同效应,进行了测试。如图7A所示,以2:1:1的比率构建了几个实例,其中两个不同的Lrp结合体(一个结合到

Lrp5E1E2,另一个结合到Lrp6E3E4)各自与Fzd结合体1RC07的轻链的N端融合,作为1RC07-3-26NL(2:1:1);或者与1RC07重链的N端融合,作为1RC07-3-26NH(2:1:1)。这两种分子在诱导Wnt信号传导方面都是高度活性的,如在293STF Wnt响应性报告基因细胞中检测到的(图7B)。

[0438] 最后,产生了具有两个不同Fzd结合臂和两个不同Lrp结合臂的多价分子,其被称为1:1:1:1形式,如图7C所示。1RC07-26+4SD1-3(1:1:1:1)和R2M9-26+1RC07-3(1:1:1:1)组合都引起Wnt信号传导的强诱导(图7D)。R2M9结构含有003S-E07 Fzd结合元件。

[0439] 图5-7所示的实例说明了用于诱导典型或非典型的Wnt信号传导(或两者)的各种结构,以及通过靶组织内的内源性Wnt配体与信号传导协同作用、拮抗信号传导或留下不受影响的信号传导的能力。这种可溶性Wnt替代配体的通用集合可以用于具有定制Wnt信号传导的疗法,所述疗法可以允许最大的治疗效果和最小的副作用。

[0440] 实例10

[0441] 含有不同化学计量比率的Fzd和LRP结合体的Wnt替代分子的结构功能分析

[0442] 通过将FZD结合体(scFv形式的18R5抗体)和Dickkopf(DKK1c)的C端部分连接成单个多肽链(18R5-DKK1c)产生的替代WNT激动剂表现出激活WNT/β-连环蛋白信号传导的能力(Janda等人,2017,《自然》,545(7653):234-237)。基于此概念产生了各种FZD和LRP结合抗体片段的组合。

[0443] Fzd结合scFv(被称为F1、F2和F3)和LRP scFv(被称为L1和L2)的序列以及用于组合其的接头序列在表6A中示出。由于这些分子具有到每个靶的单价结合臂,所以将这种形式称为二价双特异性形式(表示为1:1以表示结合一个FZD和一个LRP分子的化学计量)。

[0444] 测试了串联scFv构建体的另外的化学计量。表6B示出了用于此分析的组合Wnt替代构建体的总结。

[0445] 表6A:用于化学计量分析的Wnt替代组分

[0446]

组分	SEQ ID NO	名称	特异性(克隆名称)	序列
信号肽	2234			MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC
抗 FZD_scFv	2235	F1:	抗 FZD1、2、7 、 5 、 8（18R5）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS HYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGD GSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELT QPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFY VHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYY CQSYANTLSLVFGGGTKLTVL
	2236	F2:	抗 FZD1、2、7（R2H1）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIS SSYIHWVRQAPGKGLEWVAYIYSSY GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARASWYALDYWG QGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YWYGVAPITFGQGTKVEIK
	2237	F3:	抗 FZD5、8（2919）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIS YSYIHWVRQAPGKGLEWVASIYSSSGS TSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARGAIDYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQWYSSGHV LITFGQGTKVEIK
抗 LRP_scFv	2238	L1:	抗 LRP6E1E2	DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFS TSYMSWVRQTPEKRLELVAAINLNGGS

[0447]

			（1115.3）	TYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSL KSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYWGQGT LVTVSAGSAASGSSGGSSSGADIVLTQSPAT LSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQ KSHESPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTD FTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFG AGTKLEVK
	2239	L2:	抗 LRP6E3E4（G211）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT SYYISWVRQAPGKGLEWVAEISPYSGST YYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCALRARPPIRLHPRGSVMDY WGQGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YTTPPTFGQGTKVEIK

[0448]

组分	SEQ ID NO	名称	特异性（克隆名称）	序列
抗 GFP_scFv	2240			QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISSI GSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARWYKTYIDV WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLG KKYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDDERP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEA DYYCASYDSSHILIVFGGGTKLTVL
串联 scFv 之间的接头	2241	5 聚体（5）		GSGSG
	2242	10 聚体（10）		GSGSGGSGSG
	2243	15 聚体（15）		GSGSGGSGSGGSSGG
hIgG1_Fc_LALAPG	2244	Fc		DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
	2245	Fc 杵		DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK

[0449]

		-FLAG		DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGSGGDYKDDD DK
	2246	Fc_臼 -His		DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGSGSGHHHHHH
标签或 Fc 前的接头	2241			GSGSG
标签	2247	标志（Flag）		DYKDDDDK
	2248	His		HHHHHH

[0450] 表6B:组合Wnt替代构建体

[0451]

FZD: LRP 比率	构建体
1FZD: 1LRP	L1:5: F1_His
	L1:10: F1_His
	L1:15: F1_His
	F1:5: L1_His
	F1:10: L1_His
	F1:15: L1_His
	L2:5: F1_His
	L2:10: F1_His
	L2:15: F1_His
	F1:5: L2_His
	F1:10: L2_His
	F1:15: L2_His
	L2:5: F2_His
	L2:15: F2_His
	F2:5: L2_His
	F2:15: L2_His
	L1:5: F2_His

[0452]

FZD: LRP 比率	构建体
	L1:15: F2_His
	F2:5: L1_His
	F2:15: L1_His
	F3:5: L1_His
	L1:5: F3_His
	F3:5: L2_His
	L2:5: F3_His
	F1:5: Fc_杵+L2:5: Fc_臼
	F1:5: αGFP: Fc_杵+L2:5: αGFP: Fc_臼
	F1:5: αGFP: Fc_杵+αGFP: 5: L2: Fc_臼
	αGFP: 5: F1: Fc_杵+L2:5: αGFP: Fc_臼
	F3:5: Fc_杵+L2:5: Fc_臼
	F3:5: αGFP: Fc_杵+αGFP: 5: L2: Fc_臼
	αGFP: 5: F3: Fc_杵+L2:5: αGFP: Fc_臼
	L2:5 聚体: αGFP: Fc_杵+αGFP: 5 聚体: F2: Fc_臼
	F2:5: Fc_杵+L2:5: Fc_臼
	F2:5: αGFP: Fc_杵+αGFP: 5: L2: Fc_臼
2FZD: 2LRP	L1:5: F1: Fc
	L1:10: F1: Fc
	L1:15: F1: Fc
	F1:5: L1: Fc
	F1:10: L1: Fc
	F1:15: L1: Fc
	L2:5: F1: Fc
	L2:10: F1: Fc
	L2:15: F1: Fc
	F1:5: L2: Fc
	F1:10: L2: Fc
	F1:15: L2: Fc
	L1:5: F2: Fc
	L1:15: F2: Fc
	F2:5: L1: Fc
	F2:15: L1: Fc
	L2:5: F2: Fc
	L2:15: F2: Fc
	F2:5: L2: Fc
	F2:15: L2: Fc
	F3:5: L1: Fc
	F3:5: L2: Fc
	L1:5: F3: Fc
	L2:5: F3: Fc
	F1:5: Fc: 5: L1
	L1:5: Fc: 5: F1
	F1:5: Fc: 5: L2
	L2:5: Fc: 5: F1
	F3:5: L2: Fc_杵+F2:5: L2: Fc_臼
	L2:5: F3: Fc_杵+L2:5: F2: Fc_臼

[0453]

FZD: LRP 比率	构建体
	L1:5: F3: Fc_杵+L2:5: F2: Fc_臼
	F3:5: L1: Fc_杵+F2:5: L2: Fc_臼
0FZD: 2LRP	αGFP: 5: L1: Fc
	L1:5: αGFP: Fc
	αGFP: 5: L2: Fc
	L2:5: αGFP: Fc
2FZD: 0LRP	αGFP: 5: F1: Fc
	F1:5: αGFP: Fc
2FZD: 1LRP	F2:5: L2: Fc_杵+F2:5: αGFP: Fc_臼
	L2:5: F2: Fc_杵+αGFP: 5: F2: Fc_臼
	αGFP: 5: F2: Fc_杵+L2:5: F2: Fc_臼
	L2:5: F3: Fc_杵+αGFP: 5: F2: Fc_臼
1FZD: 2LRP	F2:5: L2: Fc_杵+αGFP: 5: L2: Fc_臼
	L2:5: F2: Fc_杵+L2:5: αGFP: Fc_臼
	F3:5: L2: Fc_杵+αGFP: 5: L2: Fc_臼
	L2:5: F3: Fc_杵+L2:5: αGFP: Fc_臼

[0454] 产生的分子集合用scFv形式的LRP结合抗体片段替换了18R5-DKK1c分子中的DKK1c组分(Janda等人,2017,《自然》,545(7653):234-237),以产生串联scFv分子,如图8A所描绘的。LRP结合体是LRP6 E1E2结构域结合体,1115.3(US 8,715,941B2),其在本文中被称为L1。为了测试几何形状对活性的影响,将L1与18R5 scFv(在本文中被称为F1)的N端或C端融合,其间具有5、10或15个氨基酸接头。通过Ni亲和柱(图8B)将此组六种蛋白质纯化到接近均质,并且在WNT应答性293STF报告基因细胞中进行测试。虽然接头长度似乎不会显著影响活性,但是将LRP6结合体与FZD结合体的N端融合会引起比其它朝向高得多的活性(比较图8C和图8D,注意y轴的差异)。与平行测试的WNT3A和18R5-DKK1c相比,所有这些新的替代分子显示出更低的Emax(最大应答)(图9)。

[0455] 由于scFv片段具有形成更高分子量聚集体的趋势,为了确认替代WNT活性是否来自串联scFv分子的单体形式,这六种蛋白质在尺寸排阻色谱(SEC)上纯化,并在293STF报告基因细胞中测试对应于单体形式的峰级分。与SEC之前的Ni纯化材料相比,SEC纯化的蛋白质显著丧失活性(将图8E和8F与8C和8D进行比较)。在293STF报告基因细胞中测定了跨SEC运行的级分。鉴定了柱级分的峰活性;然而,STF活性峰与单体分子的蛋白质峰不一致。相反,在所有情况下,STF活性在较高分子量级分中达到峰值(图8G和8H,图8I所示的SEC分子量标准),从而表明1:1串联scFv分子在诱导β-连环蛋白依赖性信号传导方面无效。这些结果表明,WNT信号传导的有效激活需要受体复合物的多聚化。含有6 x His标签的串联scFv分子人工地与抗His抗体交联,并且在293STF报告基因测定中进行测试。如图8J所示,虽然在存在同种型对照(抗GFP)抗体的情况下,来自单体级分的L1:5:F1单独不能有效激活β-连环蛋白依赖性信号传导,但添加抗His抗体显著诱导了信号传导,从而支持了信号传导可能需要受体复合物多聚化的观点。

[0456] 如图10A所描绘的,通过将L1和F1串联scFv融合附接到Fc片段的N端以产生四价双特异性形式来以更明确且容易产生的形式产生多价分子。在这种形式中,针对每个受体靶存在两个结合位点(在后面的章节中表示为2:2,表示两个FZD和两个LRP的化学计量比率)。这些蛋白质通过蛋白A亲和步骤、然后进行SEC来纯化。如图10B和10C所示,来自SEC级分的

293STF测定的活性峰与对应于图10A所示分子的单体种类的蛋白质峰一致。SEC分子量标准如图10D所示。这些新的构型证明了STF与主要蛋白质峰之间的相关性。还进行了峰级分的剂量应答曲线,虽然接头长度似乎并未显著影响活性,但是两个结合体的相对朝向确实影响了活性。将L1与F1的N端融合是这两个结合体的组合的优选朝向(比较图10E和10F y轴)。与WNT3A和18R5-DKK1c相比,这些多价双特异性FZD/LRP结合分子的活性的相对Emax类似于图8(图11)所示的预SEC材料的活性。在此四价双特异性形式中,结合臂与其相应受体的亲和力是使用Octet仪器上的生物层干涉法测定的。如图11B所示,相对朝向和接头长度对相应臂与其靶受体的亲和力没有影响,从而表明朝向对报告基因活性的影响不是由于形式对结合的影响,而是由替代分子组装的受体的几何形状引起的。

[0457] DKK1c主要结合LRP E3E4结构域(Ahn等人,2011,Cheng等人,2011)。为了理解LRP表位对活性的影响,以1:1串联scFv形式测试了F1与LRP6E3E4结合体YW211.31.57(US 8,846,041 B2)(在本文中称为L2)的融合,其中L2与F1 scFv的N端或C端融合,其间具有5、10或15个氨基酸接头。虽然与L1/F1融合蛋白(图13A)相比,这些融合蛋白表现较差并以较低的水平表达,但是类似于图8所示的L1/F1融合蛋白,L2/F1融合的1:1串联scFv在293STF报告基因细胞中诱导β-连环蛋白依赖性信号传导方面也是无效的,如在跨SEC柱的活性测试(图13A)以及来自SEC柱的单体峰级分的滴定(图13B)中所见的。串联scFv L2/F1分子与Fc片段的融合产生2:2四价双特异性分子会有效激活典型的WNT信号传导。如图12A所示,来自SEC级分的293STF测定的峰与对应于单体物种的蛋白质峰一致。这些L2/F1融合分子比Emax范围类似于WNT3A的L1/F1融合分子具有更高的活性,并且显著改进了超过WNT3A和18R5-DKK1c的效价(图12B)。L2和F1组合对朝向的敏感性较小;两种朝向都产生类似的Emax,而在15聚体接头的情况下在F1的N端具有L2产生更高的效价(图12B和12C)。

[0458] 作为用于验证2:2四价双特异性分子激活WNT信号传导需要结合FZD和LRP受体的对照,FZD结合体(F1)或LRP结合体(L1或L2)被以2:2四价双特异性形式结合GFP的scFv片段替换。这些分子被称为四价单特异性或2:0或0:2形式。如图12D和12E所示,虽然所有这些分子都结合到其相应的受体,但是这些四价单特异性分子均没有活性,从而表明激活WNT信号传导的能力需要FZD和LRP的接合。

[0459] 为了产生具有不同FZD特异性的WNT替代分子并且理解针对WNT信号传导的多价性要求是否是FZD结合体F1(其结合FZD1、2、7、5、8,Gurney等人,2012)之外的总体要求,在两个LRP6结合体L1和L2的情况下,在另外的FZD结合体R2H1(US 2016/0194394 A1)(其结合到FZD1、2、7,在本文中被称为F2)与2919(WO 2017/127933 A1)(其结合到FZD5、8,在本文中被称为F3)之间产生融合蛋白。在Octet结合测定中验证了F2和F3的特异性(图15A)

[0460] 1:1串联scFv形式的F2/L1组合由5聚体和15聚体接头构建。类似于图8中的F1融合数据,跨SEC柱的峰STF活性广泛分布在较高分子量级分中,并且与分子的单体形式的峰不一致(图15B)。相比之下,当串联scFv以2:2四价双特异性形式与Fc片段融合时,跨SEC柱的STF峰活性与单体形式一致(图14A)。在更高分子量级分中还观察到SEC柱上的第二STF活性峰,这在F1融合分子中未观察到(图14A)。来自293STF报告基因细胞的单体SEC峰级分的剂量应答曲线显示出对L1与F2的N端融合的轻微偏好,以获得类似于与F1的融合(图10)的更高的活性(图14B)。

[0461] F2与L2之间的融合也以各种形式构建(表6B)。虽然在SEC柱上,峰STF活性与以1:1

形式与L2的N端融合的F2的单体形式不一致(图14C),但是似乎L2与F2的N端融合的反向朝向的单体1:1形式是活性的(图14D)。与优选5聚体接头的WNT3A相比,此朝向上的峰级分的剂量应答显示出较弱的活性(图14E)。来自这些串联scFv与Fc的N端融合的2:2四价双特异性形式产生了高度强效的分子。在SEC柱上,峰STF活性与蛋白质峰一致,所述蛋白质峰与单体形式一致(图14F和14H),并且293STF报告基因细胞中的剂量应答显示出强效且有效的分子,超过了图3所示的F1/L2融合的活性(图14G和14I)。

[0462] 在F3与两个LRP结合体之间还构建了1:1二价双特异性串联scFv形式和2:2四价双特异性Fc融合。类似于图8所示的对F1融合的观察,对于F3与L1或L2之间的1:1串联scFv融合分子,没有观察到稳健的活性(图17)。相比之下,来自SEC柱级分的2:2的四价双特异性形式的F3、LRP结合体与Fc之间的融合分子的293STF报告基因活性与分子的单体形式的蛋白质峰一致(图16A和16B)。值得注意的是,类似于与F1和F2融合,SEC峰级分的剂量应答显示出L2-F3融合在两个朝向上都具有高度活性,而L1-F3融合活性较低,并且显示对L1在F3的N端上的偏好(图16C和16D)。所有这些结果共同表明,FZD和LRP结合的多价性以及两个FZD和两个LRP的化学计量是β-连环蛋白依赖性信号传导的一致且有效激活所必需的,至少在所测试的结合体中是如此。

[0463] 在建立了对有效诱导典型的WNT信号传导的多价性要求后,探索了替代性2:2四价双特异性形式(称为哑铃形式),其中如图18A和18B所示,两个scFv结合体附接到Fc片段的两个末端。在报告基因测定中,F1与L1以此哑铃形式的融合最低限度地激活了WNT信号传导(图18A)。有趣的是,还存在对L1分子的朝向的偏好,其中其与Fc的C端的附接影响活性。F1和L2以此形式的融合还会激活WNT信号传导,其中在LRP结合臂的朝向上具有类似的偏好(图18B)。还测试了这些分子的跨SEC柱的活性,并且如图18C所示,峰STF报告基因活性与对应于蛋白质单价形式的蛋白质峰一致。

[0464] 为了理解来自2:2四价双特异性形式的活性是由于同一替代分子同时结合多个FZD和LRP,还是由于由所述形式提供的独特几何结构不需要与受体的多价结合引起的,进行用于评定1:1串联scFv形式是否允许同时结合FZD和LRP的Octet结合研究。如图19A所示,通过向传感器表面顺序添加FZD8 CRD,之后是1:1串联scFv L2:5:F3或F3:5:L2,并且然后LRP6 E3E4,观察到结合信号的逐步增加。这表明1:1串联scFv分子能够同时与两种受体结合,并且因此,这些分子缺乏诱导WNT信号传导的活性不是由于不能交联FZD和LRP受体引起的。

[0465] 然而,为了确定2:2四价双特异性形式是否仍然通过独特的几何结构以1:1的方式与受体接合,所述几何结构允许1:1串联scFv形式未提供的信号传导。如图19B和图20所描绘的,在2:2四价双特异性分子的框架上构建了可能的1:1几何结构的4种不同变体。这4种分子中没有一种分子诱导WNT信号传导(图19C和图20A),从而表明有效的信号传导需要受体的交联的多个拷贝。

[0466] 为了进一步理解FZD受体与LRP受体的所需比率,如图21A和21D所描绘的,构建了2个FZD结合体与1个LRP结合体(2:1)或1个FZD结合体与2个LRP结合体的组合(1:2)。如图21所示,从2:2形式中去除1个FZD结合体或1个LRP结合体仍然激活β-连环蛋白依赖性信号传导。由于图19中所示的1:1形式没有激活信号传导,所以这些结果进一步支持了多个FZD和LRP的同时接合对于有效信号传导是必要的概念。由于与比去除1个FZD结合体相比,去除1

个LRP结合体对活性的影响小得多,所以这些结果也表明FZD受体的二聚化对于信号传导复合物的形成更重要。

[0467] 已经建立了对典型的WNT信号传导有效诱导的多价性要求,然而,由于替代分子中的FZD结合臂中的每一个对几种不同的FZD受体具有特异性,尚不清楚信号传导是否可以来自不同FZD受体的异源二聚化。为了解决此问题,将具有非重叠特异性的两个FZD结合体F2和F3组合成一个分子,如图21G所描绘的。尽管以1:2形式的F2或F3(1个FZD结合体与LRP结合体的2个拷贝相组合,图21B和21C)分别在293STF报告基因细胞中显示出低至非常低的活性,但是将F2和F3以及LRP结合体L2的2个拷贝组合形成一个分子(将此称为1:1:2形式,其中化学计量为一个FZD加一个不同的FZD加两个LRP)产生了高度强效且有效的替代分子(图21H)。为了进一步确认这一点,构建了具有F2和F3以及LRP结合体L2的一个拷贝的分子(1:1:1:0形式,其中化学计量为一个FZD加一个不同的FZD加一个LRP结合体,表6B和图21I)。此分子也是高度活性的(图21J),即使F2或F3单独与L2的一个拷贝没有显示出活性(图20)。由于F2和F3结合不同的FZD,所以这些结果表明FZD的异源二聚化引起β-连环蛋白依赖性信号传导。

[0468] 作为最后的构型,还构建了具有两个不同FZD结合臂和两个不同LRP结合臂(1:1:1:1形式)的替代分子,如图21K所描绘的。值得注意的是,尽管与WNT3A相比,含有LRP结合体L1的替代分子始终产生低得多的Emax,但当在1:1:1:1形式的上下文中与L2组合时,产生了高度强效且有效的分子(图21L)。

[0469] 所有的观察结果一起证明了新的替代WNT平台是灵活的,可以产生任何FZD/LRP特异性组合,并且可以产生高度强效且具有活性的分子。

[0470] 上述各种实施例可以被组合以提供进一步的实施例。本说明书中提及的和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过全文引用的方式并入本文中。如果需要,则可以修改实施例的方面以采用各个专利、申请和出版物的概念来提供又另外的实施例。鉴于以上详细描述,可以对实施例进行这些以和其它改变。

[0471] 总之,在以下权利要求书中,所使用的术语不应当被解释为将权利要求书限制于本说明书和权利要求书中所公开的特定实施例,而是应当被解释为包含所有可能的实施例连同此类权利要求有权获得的等效物的整个范围。因此,权利要求书并不受本公开的限制。

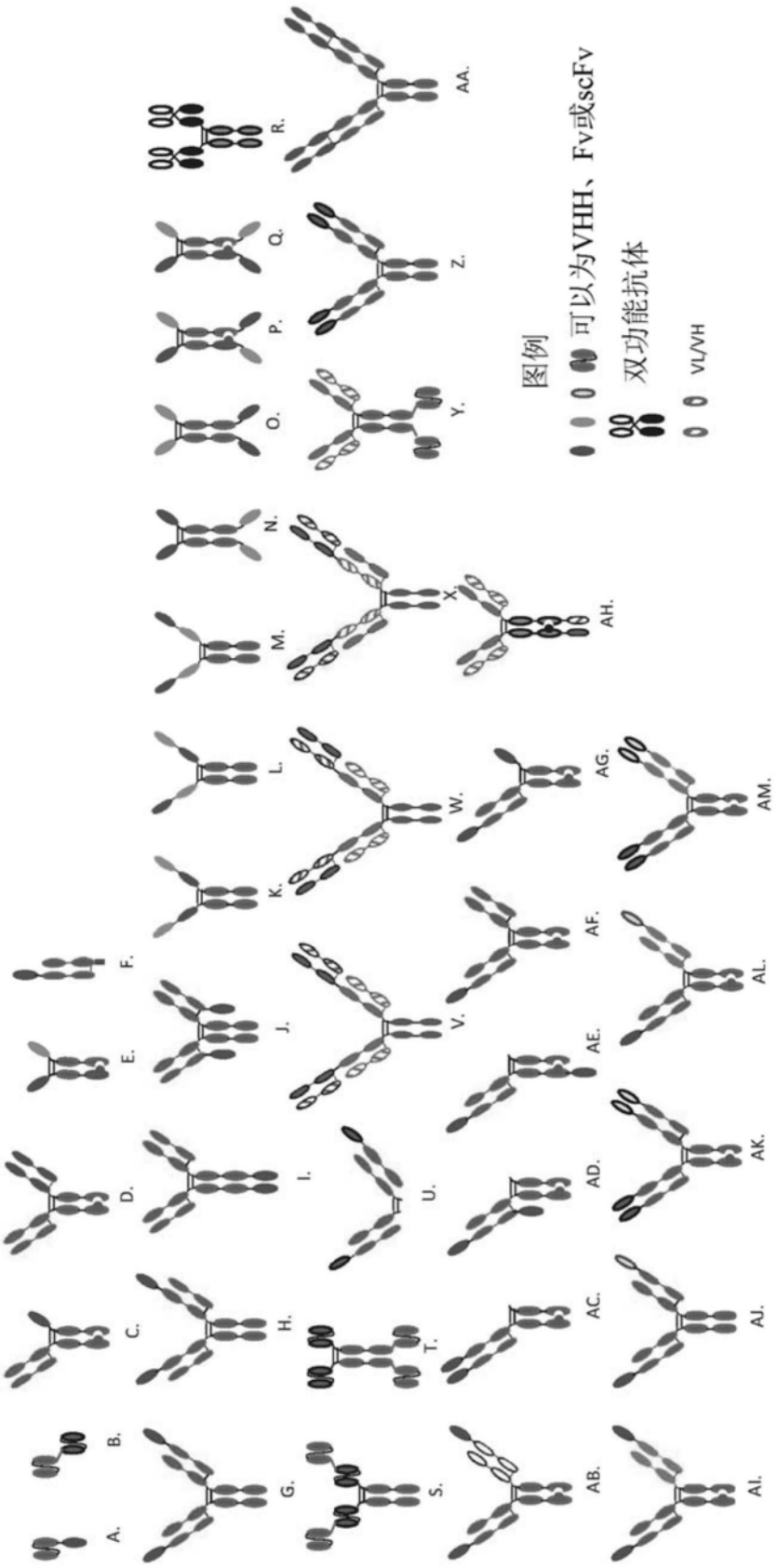


图1

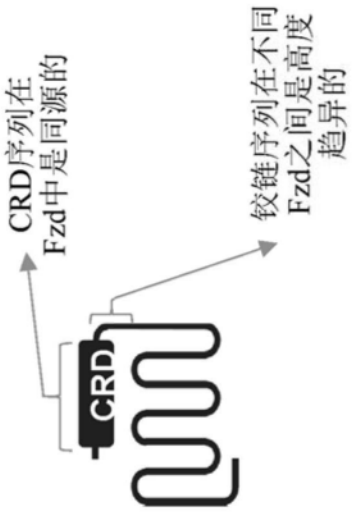


图2A

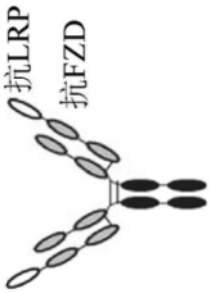


图2B

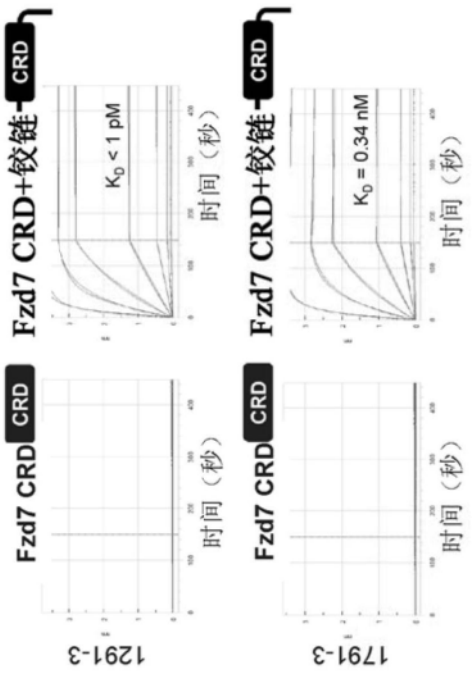

Fzd7 CRD+铰链
CRD
K_D < 1 pM
K_D = 0.34 nM
Fzd7 CRD
时间（秒）
1291-3
1791-3

图2C

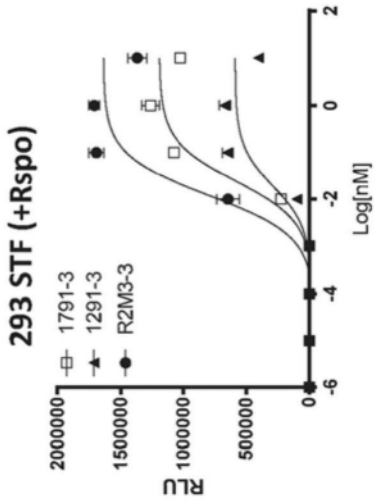

293 STF (+Rspo)
1791-3
1291-3
R2M3-3
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
Log[nM]

图2D

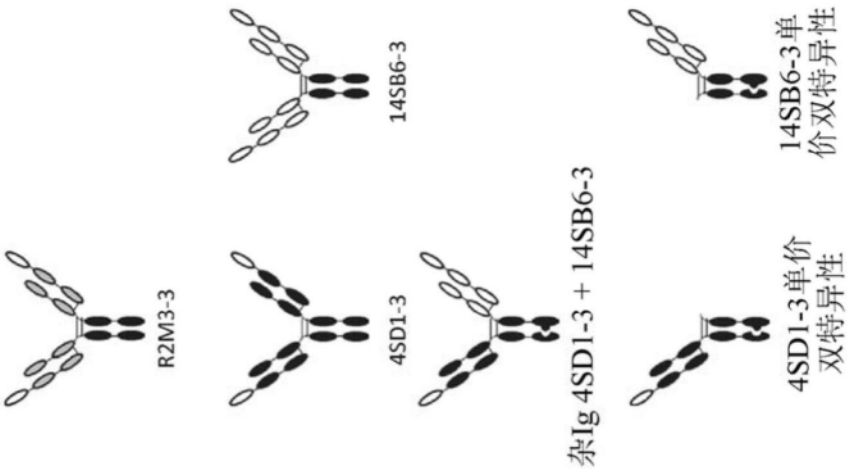

R2M3-3
4SD1-3
14SB6-3
杂Ig 4SD1-3 + 14SB6-3
4SD1-3单价双特异性
14SB6-3单价双特异性

图3A

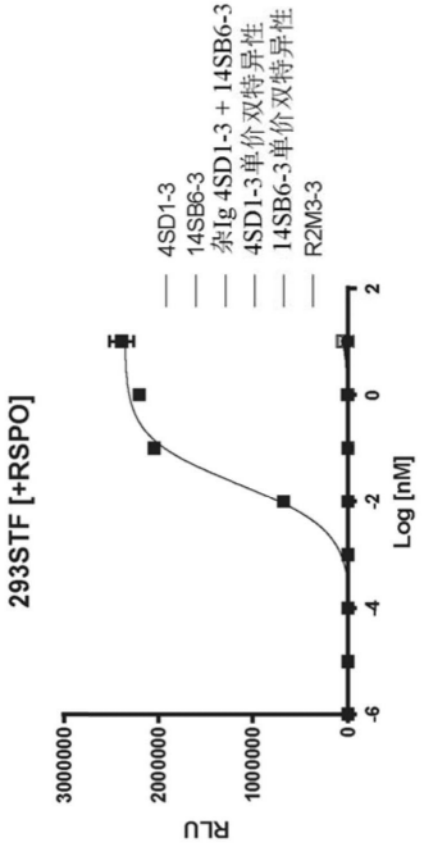

293STF [+RSPO]
RLU
3000000
2000000
1000000
0
-6
-4
-2
0
2
Log [nM]
4SD1-3
14SB6-3
杂Ig 4SD1-3 + 14SB6-3
4SD1-3单价双特异性
14SB6-3单价双特异性
R2M3-3

图3B

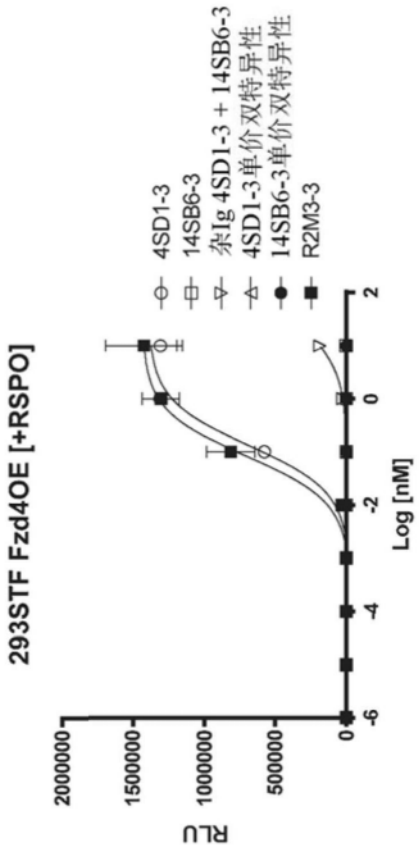

293STF Fzd4OE [+RSPO]
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
Log [nM]
4SD1-3
14SB6-3
杂Ig 4SD1-3 + 14SB6-3
4SD1-3单价双特异性
14SB6-3单价双特异性
R2M3-3

图3C

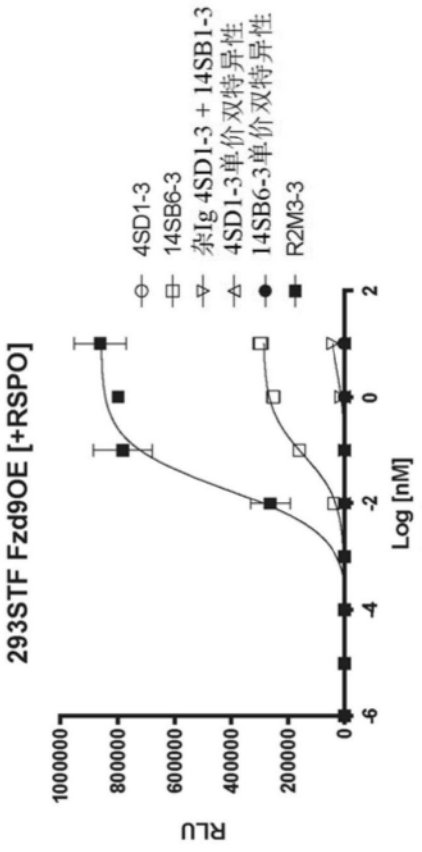

293STF Fzd9OE [+RSPO]
RLU
1000000
800000
600000
400000
200000
0
-6
-4
-2
0
2
Log [nM]
4SD1-3
14SB6-3
杂Ig 4SD1-3 + 14SB1-3
4SD1-3单价双特异性
14SB6-3单价双特异性
R2M3-3

图3D

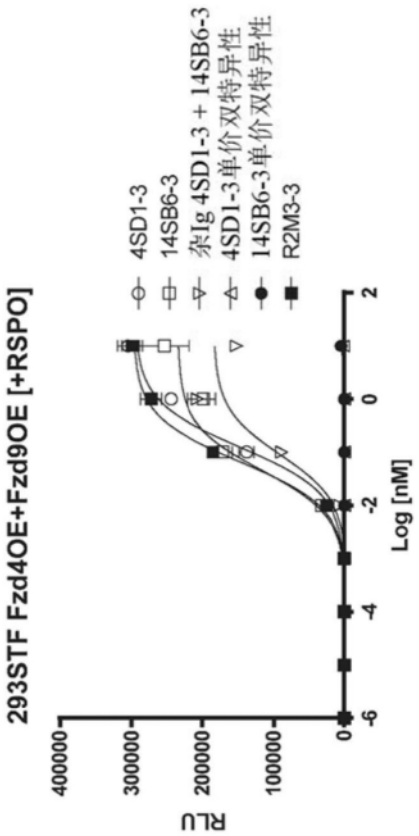

293STF Fzd4OE+Fzd9OE [+RSPO]
RLU
400000
300000
200000
100000
0
-6
-4
-2
0
2
Log [nM]
4SD1-3
14SB6-3
杂Ig 4SD1-3 + 14SB6-3
4SD1-3单价双特异性
14SB6-3单价双特异性
R2M3-3

图3E

同一性百分比矩阵-由Clustal2.1创建

1: hFzd3铰链	100.00	39.39	100.00	12.12	23.08	11.76	25.00	18.18	17.65	19.05
2: hFzd6铰链	39.39	100.00	100.00	12.12	15.38	17.65	25.00	13.64	17.65	14.29
3: hFzd5铰链	100.00	100.00	100.00	47.06	24.14	15.38	50.00	25.00	25.00	26.67
4: hFzd8铰链	12.12	12.12	47.06	100.00	34.88	31.82	29.17	22.45	28.00	30.77
5: hFzd9铰链	23.08	15.38	24.14	34.88	100.00	47.62	70.00	20.00	15.15	23.33
6: hFzd10铰链	11.76	17.65	15.38	31.82	47.62	100.00	40.00	17.65	16.67	22.22
7: hFzd4铰链	25.00	25.00	50.00	29.17	70.00	40.00	100.00	29.17	35.71	28.57
8: hFzd7铰链	18.18	13.64	25.00	22.45	20.00	17.65	29.17	100.00	44.12	39.47
9: hFzd1铰链	17.65	17.65	25.00	28.00	15.15	16.67	35.71	44.12	100.00	44.68
10: hFzd2铰链	19.05	14.29	26.67	30.77	23.33	22.22	28.57	39.47	44.68	100.00

CLUSTAL O（1.2.4）多序列比对

```
hFzd3铰链       ------------------------------CDEPYPRLVDLNLAGEPTE------     19
hFzd6铰链       ------------------------------CDETVPVTFDPHTEFLGPQ------     19
hFzd5铰链       ------------------------------------------------------     36
hFzd8铰链       CMDYNRSEAITAPPRPFPAKPTLPGPPGAPASGGEC-------------------     58
hFzd9铰链       CMDYNRTDLITAAPSPPRRLPP--PPPGEQPPSGSGHGRPPGARPPHRGGGRGGGGDAA
hFzd10铰链      CMEAPENAT-AGPAEPHKGLGMLPVAPRPA--------RPPGD----LGPGAGGSGT---     44
hFzd4铰链       CMEAPNNG----SDEPTRGSGLFPPLFRPQ--------RPHSAQEHPLKDGGPGRGG---     45
hFzd7铰链       CMEG----------------------------------PGD-----------EE-VP     11
hFzd1铰链       CVGQNTSDGSGGA-------------------GGSPTAYPTA-----------PY-LP     27
hFzd1铰链       CVGQNTSDKGTPTPSLLPEF----WTSNPQHGGGGHRGGFPGG-----------AG---     41
hFzd2铰链       CVGQNHSEDGAPALL--TTA----PPPGLQPGAGGTPGG-PGG-----------GG---     38

hFzd3铰链       ---------GAPVAVQRDYGFWC  33
hFzd6铰链       ---------KKTEQVQRDIGFWC  33
hFzd5铰链       ----------------------   36
hFzd8铰链       APPARGGGGGGKARPPGGGAAPC  81
hFzd9铰链       ----------------------C  45
hFzd10铰链      ----------------------C  46
hFzd4铰链       LPHKTPI-QPGE----------EC  24
hFzd7铰链       DPPFTAM-SPSDGRGRLSFPPSC  49
hFzd1铰链       ---------ASE-----RGKFSC  50
hFzd2铰链       ---------APPRYATLEHPFHC  52
```

图4A

```
# 同一性百分比矩阵-由Clustal2.1创建

     1: hFzd7铰链      100.00   44.12   39.47
     2: hFzd1铰链       44.12  100.00   44.68
     3: hFzd2铰链       39.47   44.68  100.00

CLUSTAL O（1.2.4）多序列比对

hFzd7铰链       CVGQNTSDGSGGA-----------------GGSPTAYPTAPYLPDPFFTAMSPSDGRGRLS   44
hFzd1铰链       CVGQNTSDKGTPTPSLLPEFWTSNPQHGGGGHRGGPPGGAG-----------ASE-----R   45
hFzd2铰链       CVGQNHSEDGAPALL--TTAPPPGLQPGAGGTPGG-PGGGG-----------APPRYATLE   47
                *****  *: .  :                **   . * .

hFzd7铰链       FPFSC   49
hFzd1铰链       GKFSC   50
hFzd2铰链       HPFHC   52
                  * *
```

图4B

```
# 同一性百分比矩阵-由Clustal2.1创建

     1: hFzd5铰链       100.00   47.06
     2: hFzd8铰链        47.06  100.00

CLUSTAL O（1.2.4）多序列比对

hFzd5铰链       CMDYNRSEATTAPPRPFPAKPTLPGPPGAPASGGEC---------------------------------- 36
hFzd8铰链       CMDYNRTDLITAAPSPPRRLPP--PPPGEQPPSGSGHGRPPGARPPHRGGGRGGGGDAA 58
                *******:: *** * *    *    ***    .*.

                ----------------------------------  36
hFzd5铰链       APPARGGGGGGKARPPGGGAAPC  81
hFzd8铰链
```

图4C

```
# 同一性百分比矩阵-由Clustal2.1创建

     1: hFzd3接头       100.00   39.39
     2: hFzd6接头        39.39  100.00

CLUSTAL O（1.2.4）多序列比对

hFzd3铰链       CDEPYPRLVDLNLAGEPTEGAPVAVQRDYGFWC 33
hFzd6铰链       CDETVPVTFDPHTEFLGPQKKTEQVQRDIGFWC 33
                ***  *  .* :     :    **** ****
```

图4D

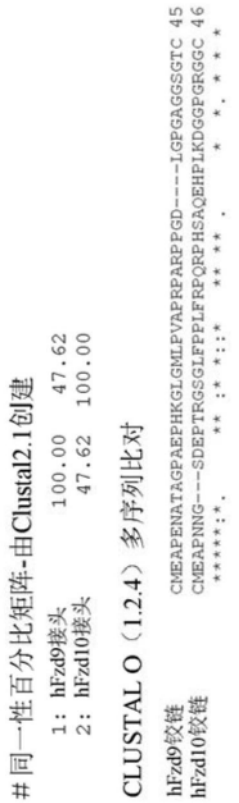

同一性百分比矩阵-由Clustal2.1创建
1: hFzd9接头 100.00 47.62
2: hFzd10接头 47.62 100.00
CLUSTAL O（1.2.4）多序列比对
hFzd9铰链 CMEAPENATAGPAEPHKGLGMLPVAPRPARPPGD----LGPGAGGSGTC 45
hFzd10铰链 CMEAPNNG---SDEPTRGSGLFPPLFRPQRPHSAQEHPLKDGGPGRGGC 46

图4E

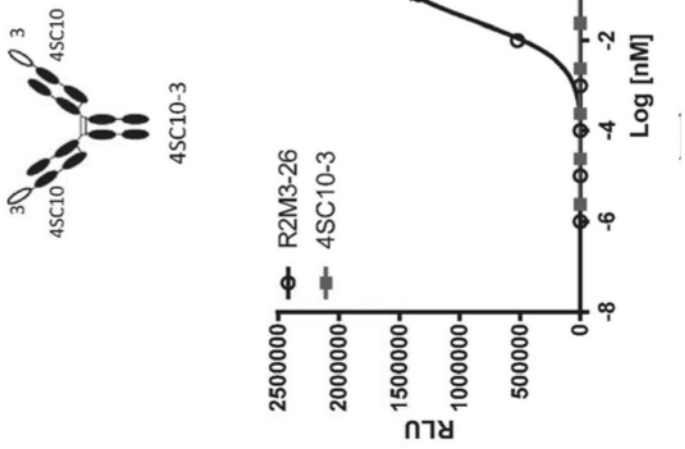

3
4SC10
4SC10
4SC10-3
R2M3-26
4SC10-3
RLU
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
Log [nM]

图5A

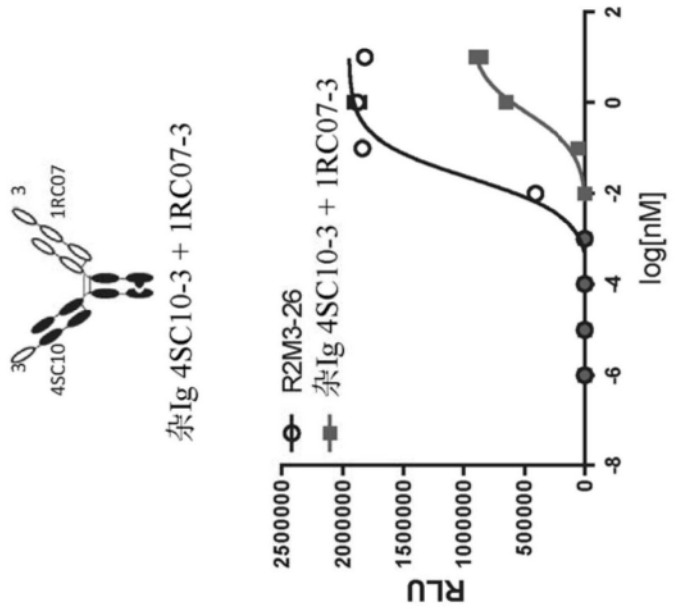

3
1RC07
4SC10
杂Ig 4SC10-3 + 1RC07-3
R2M3-26
杂Ig 4SC10-3 + 1RC07-3
RLU
log[nM]

图5B

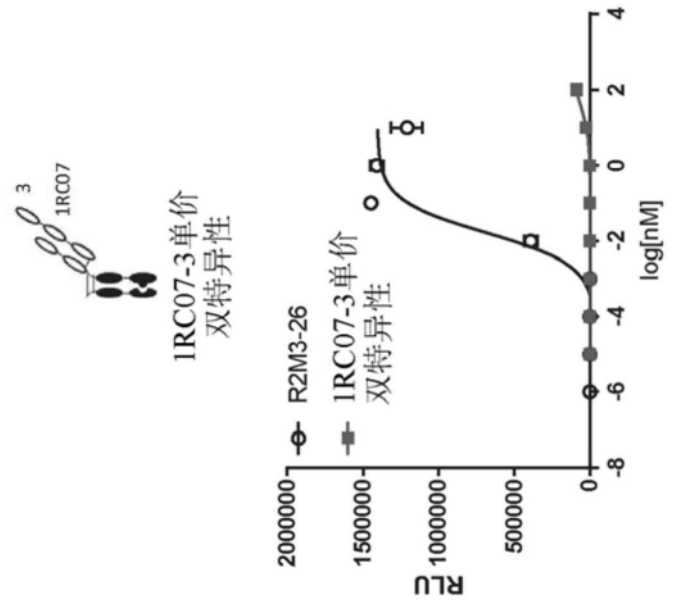

3
1RC07
1RC07-3单价
双特异性
R2M3-26
1RC07-3单价
双特异性
RLU
log[nM]

图5C

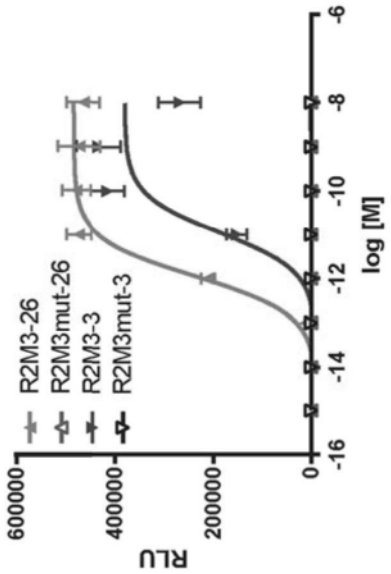

R2M3-26
R2M3mut-26
R2M3-3
R2M3mut-3
RLU
600000
400000
200000
0
-6
-8
-10
-12
-14
-16
log [M]

图6A

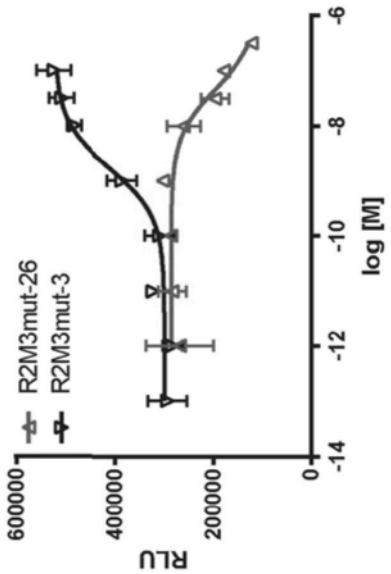

R2M3mut-26
R2M3mut-3
RLU
600000
400000
200000
0
-6
-8
-10
-12
-14
log [M]

图6B

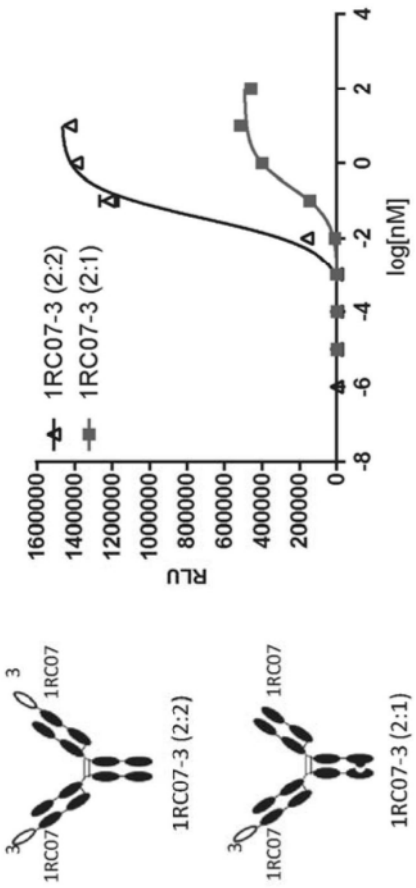

1RC07-3 (2:2)
1RC07-3 (2:1)
RLU
log[nM]
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
4
3
1RC07
1RC07
1RC07-3 (2:2)
1RC07
1RC07
3
1RC07-3 (2:1)

图6C

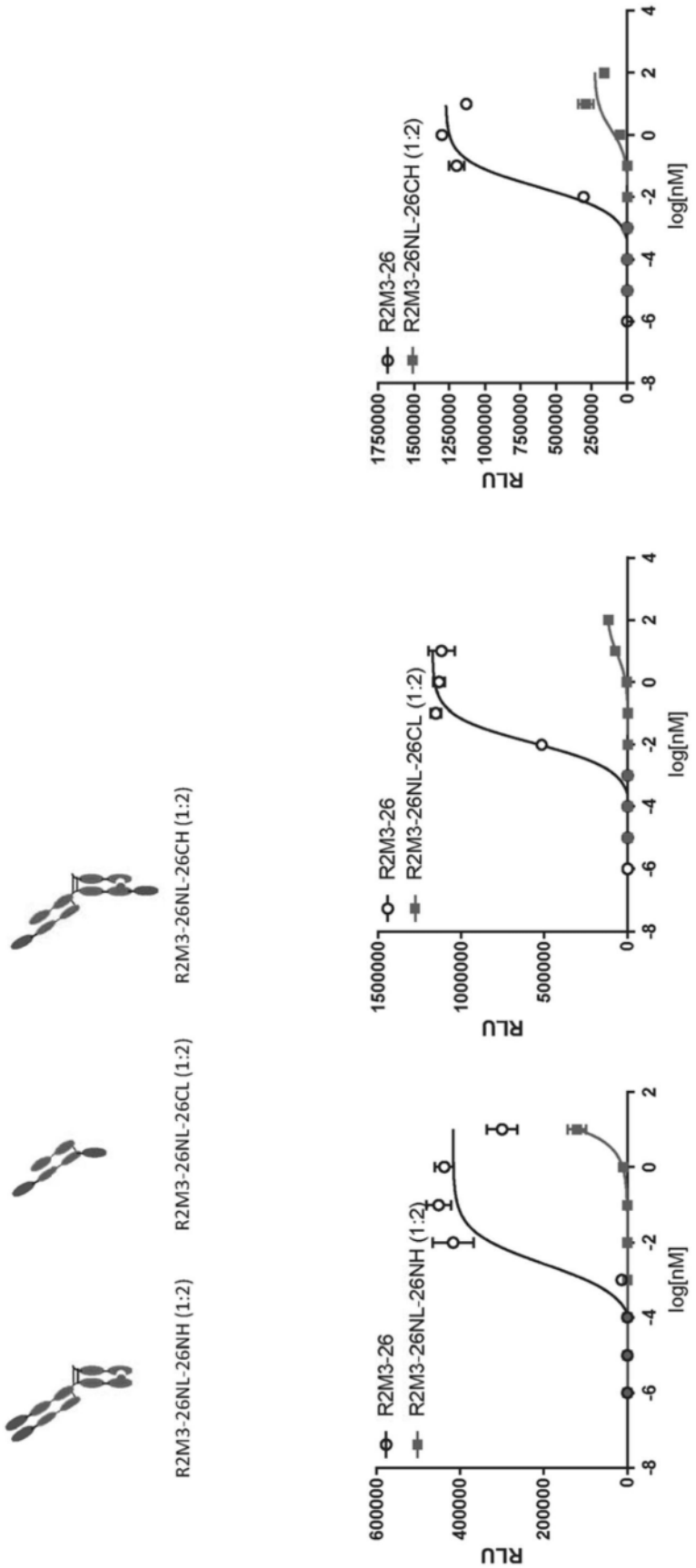

R2M3-26NL-26NH (1:2)
R2M3-26NL-26CL (1:2)
R2M3-26NL-26CH (1:2)
R2M3-26
RLU
log[nM]

图6D

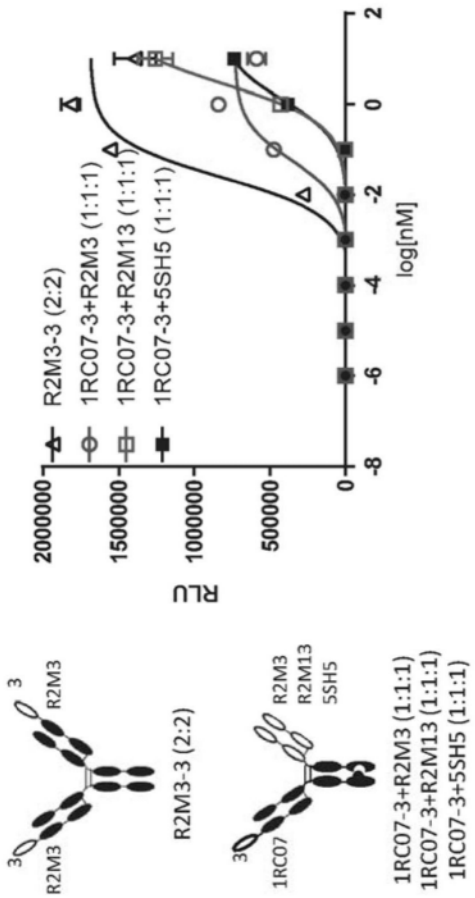

RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
log[nM]
R2M3-3 (2:2)
1RC07-3+R2M3 (1:1:1)
1RC07-3+R2M13 (1:1:1)
1RC07-3+5SH5 (1:1:1)
3
R2M3
R2M3
R2M3-3 (2:2)
R2M3
R2M13
5SH5
1RC07
1RC07-3+R2M3 (1:1:1)
1RC07-3+R2M13 (1:1:1)
1RC07-3+5SH5 (1:1:1)

图6E

2
6
1RC07
3
1RC07
1RC07-3-26 NH (2:1:1)
1RC07-3-26 NL (2:1:1)

图7A

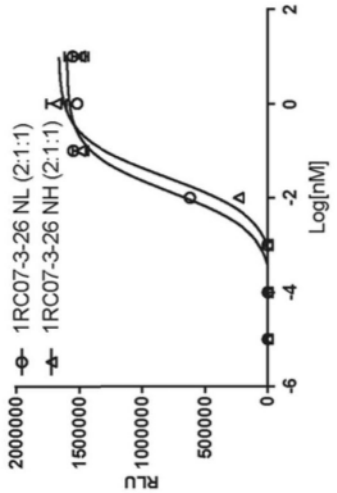

1RC07-3-26 NL (2:1:1)
1RC07-3-26 NH (2:1:1)
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
Log[nM]

图7B

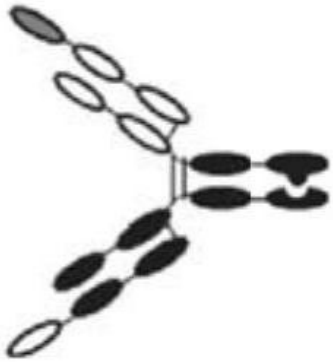


图7C

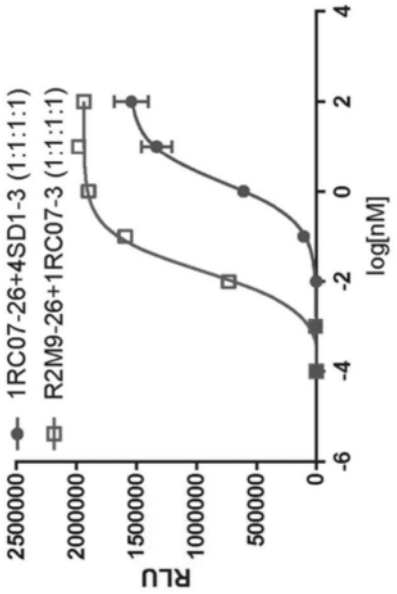

1RC07-26+4SD1-3 (1:1:1:1)
R2M9-26+1RC07-3 (1:1:1:1)
RLU
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[nM]

图7D

F1
L1
L1
F1

图8A

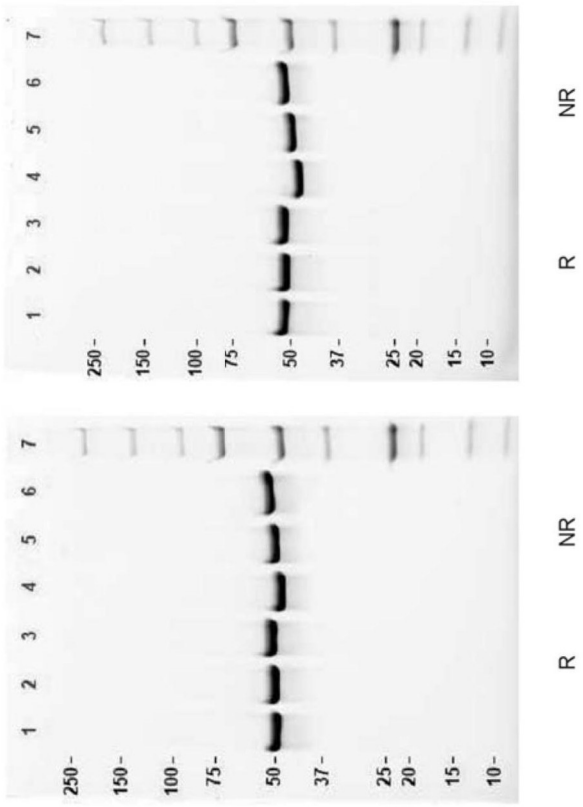

1 2 3 4 5 6 7
250-
150-
100-
75-
50-
37-
25-
20-
15-
10-
R
NR
1 2 3 4 5 6 7
250-
150-
100-
75-
50-
37-
25-
20-
15-
10-
R
NR

图8B

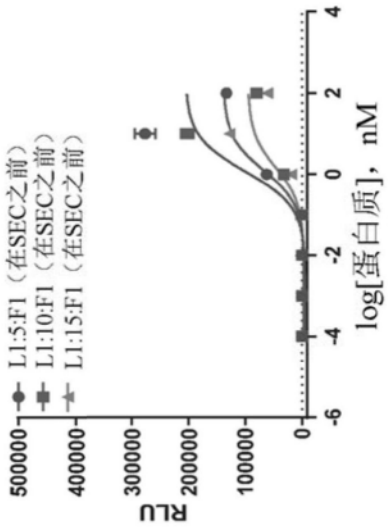

L1:5:F1（在SEC之前）
L1:10:F1（在SEC之前）
L1:15:F1（在SEC之前）
RLU
500000
400000
300000
200000
100000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图8C

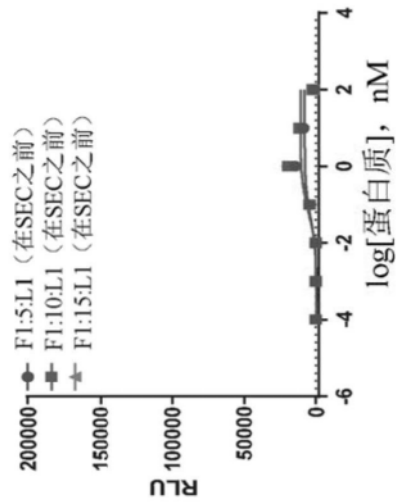

F1:5:L1（在SEC之前）
F1:10:L1（在SEC之前）
F1:15:L1（在SEC之前）
RLU
200000
150000
100000
50000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图8D

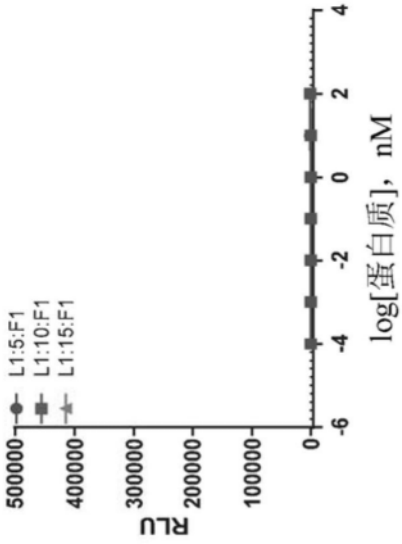

L1:5:F1
L1:10:F1
L1:15:F1
RLU
500000
400000
300000
200000
100000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图8E

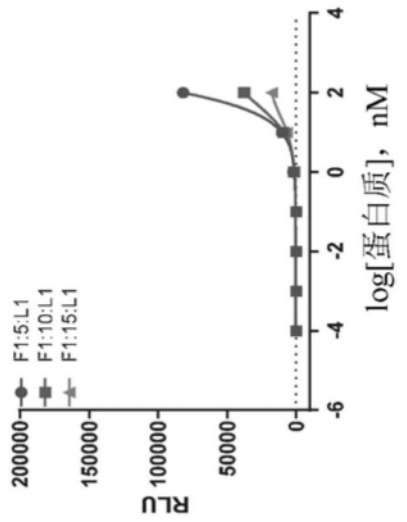

F1:5:L1
F1:10:L1
F1:15:L1
RLU
200000
150000
100000
50000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图8F

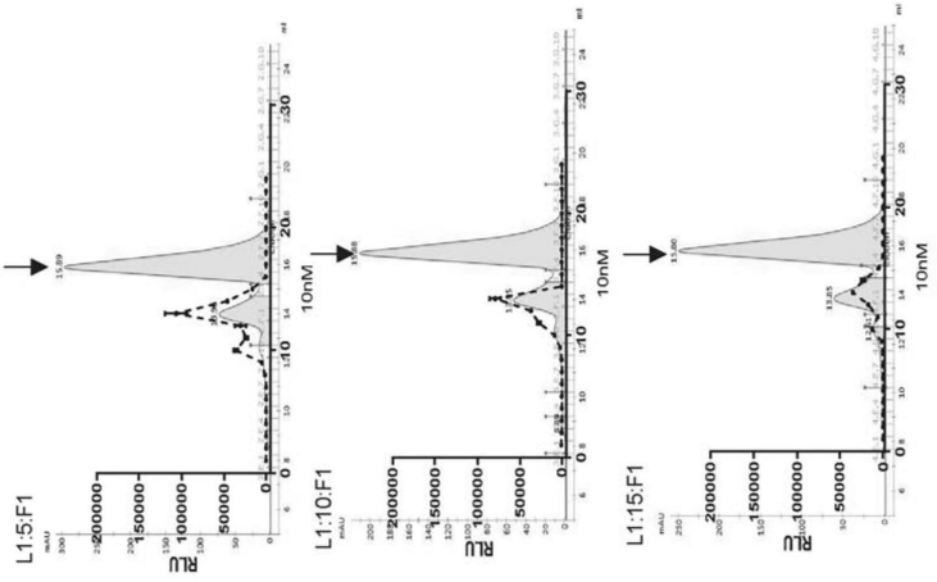

L1:5:F1
L1:10:F1
L1:15:F1
RLU
10nM

图8G

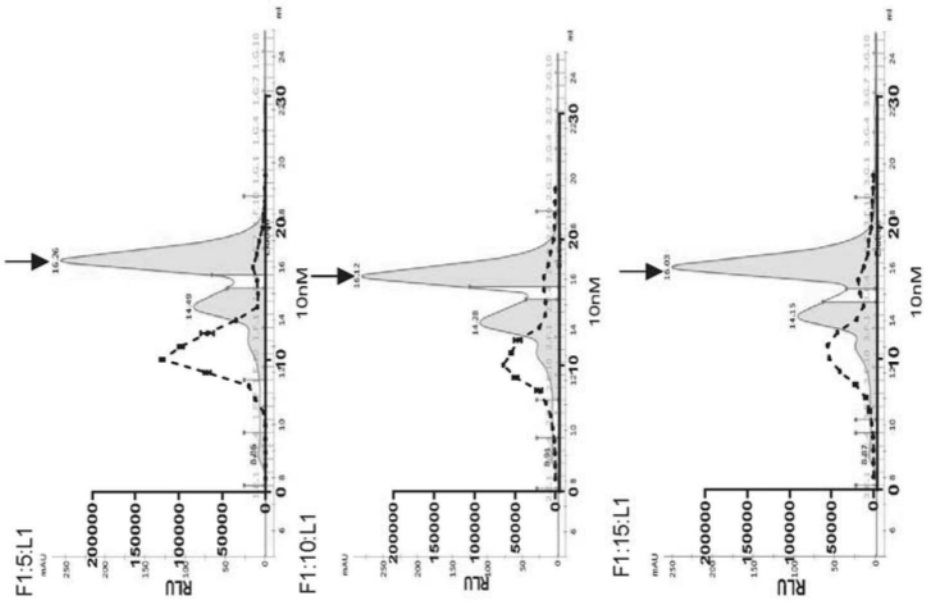

F1:5:L1
F1:10:L1
F1:15:L1
10nM
RLU
mAU
ml

图8H

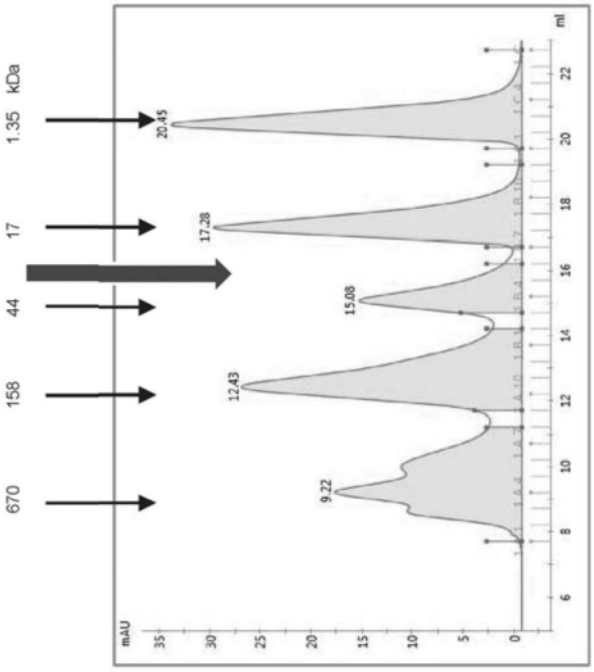

kDa
1.35
17
44
158
670
20.45
17.28
15.08
12.43
9.22
mAU
ml

图8I

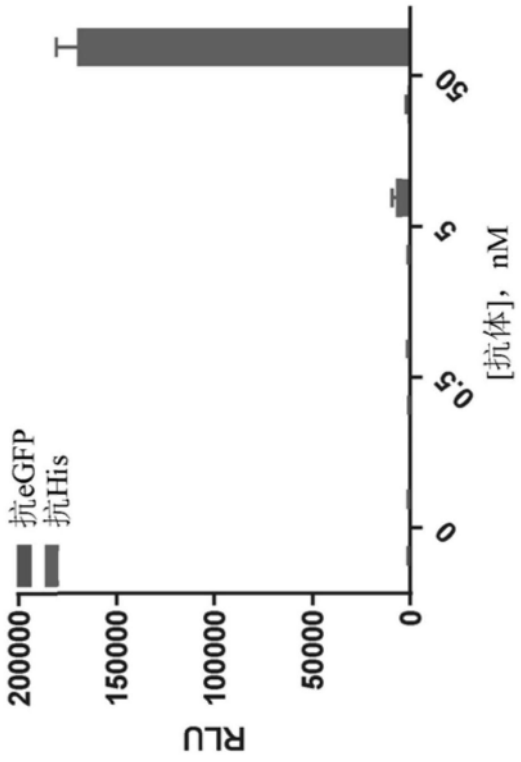


图8J

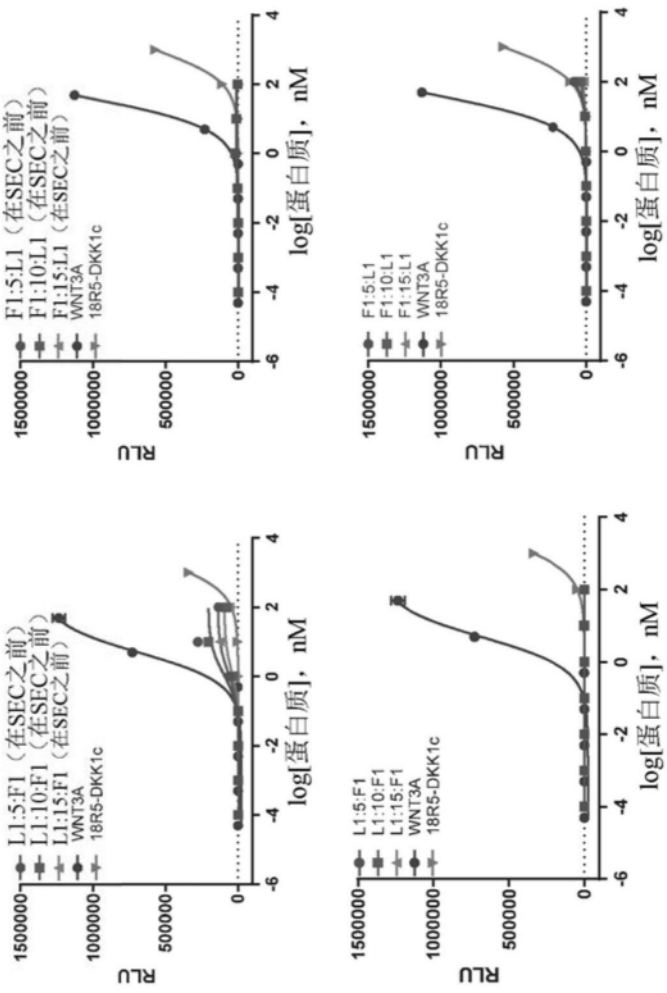

F1:5:L1（在SEC之前）
F1:10:L1（在SEC之前）
F1:15:L1（在SEC之前）
WNT3A
18R5-DKK1c
RLU
log[蛋白质]，nM
L1:5:F1（在SEC之前）
L1:10:F1（在SEC之前）
L1:15:F1（在SEC之前）
L1:5:F1
L1:10:F1
L1:15:F1

图9

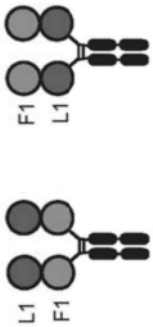

F1
L1
L1
F1

图10A

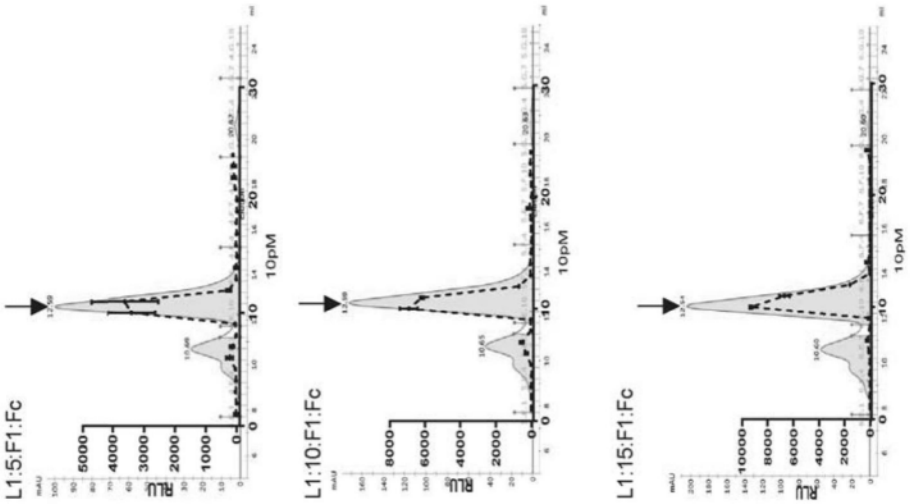

L1:5:F1:Fc
L1:10:F1:Fc
L1:15:F1:Fc
RU
10pM

图10B

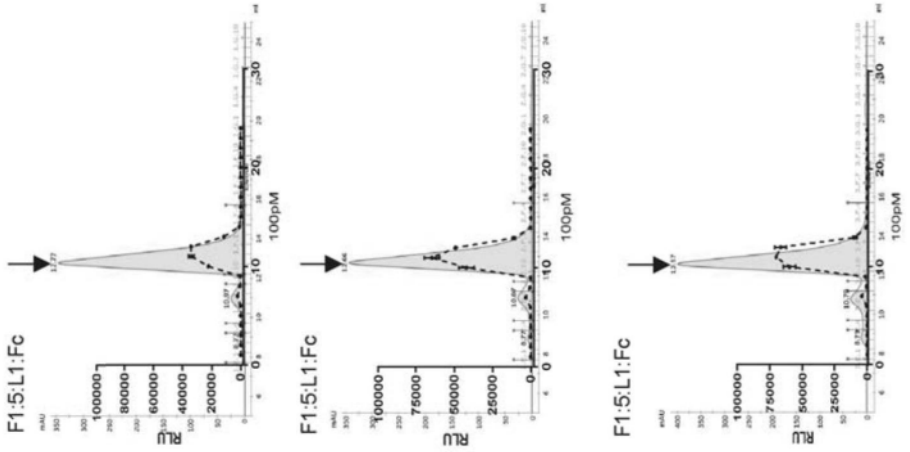

F1:5:L1:Fc
F1:5:L1:Fc
F1:5:L1:Fc
RU
100pM

图10C

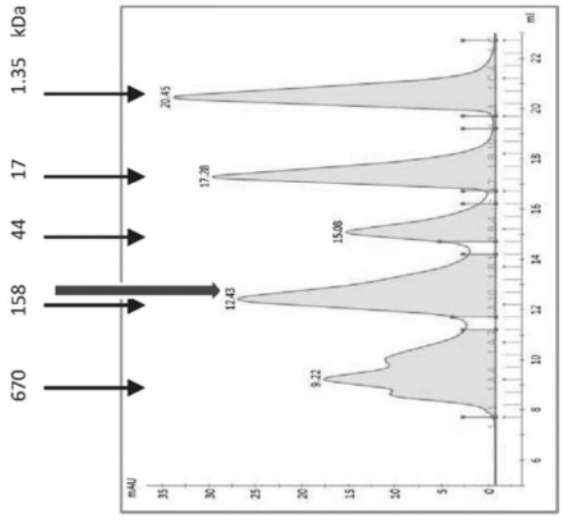

kDa
1.35
17
44
158
670
20.45
17.28
15.08
12.43
9.22
mAU
ml

图10D

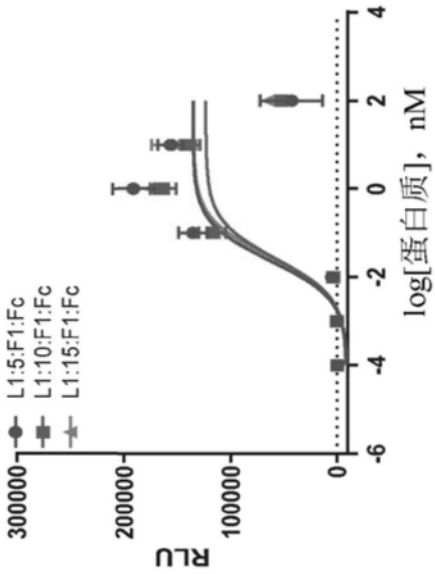

L1:5:F1:Fc
L1:10:F1:Fc
L1:15:F1:Fc
RLU
300000
200000
100000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图10E

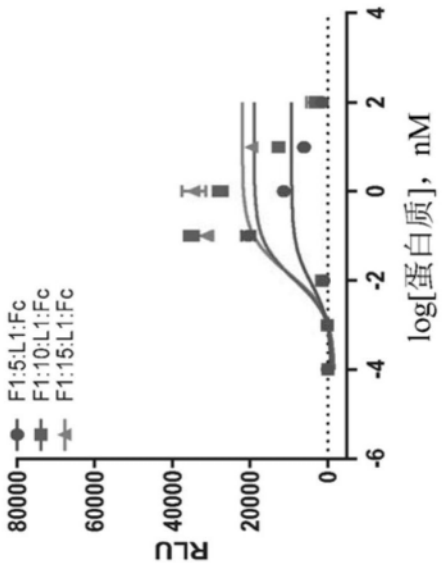

F1:5:L1:Fc
F1:10:L1:Fc
F1:15:L1:Fc
RLU
80000
60000
40000
20000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图10F

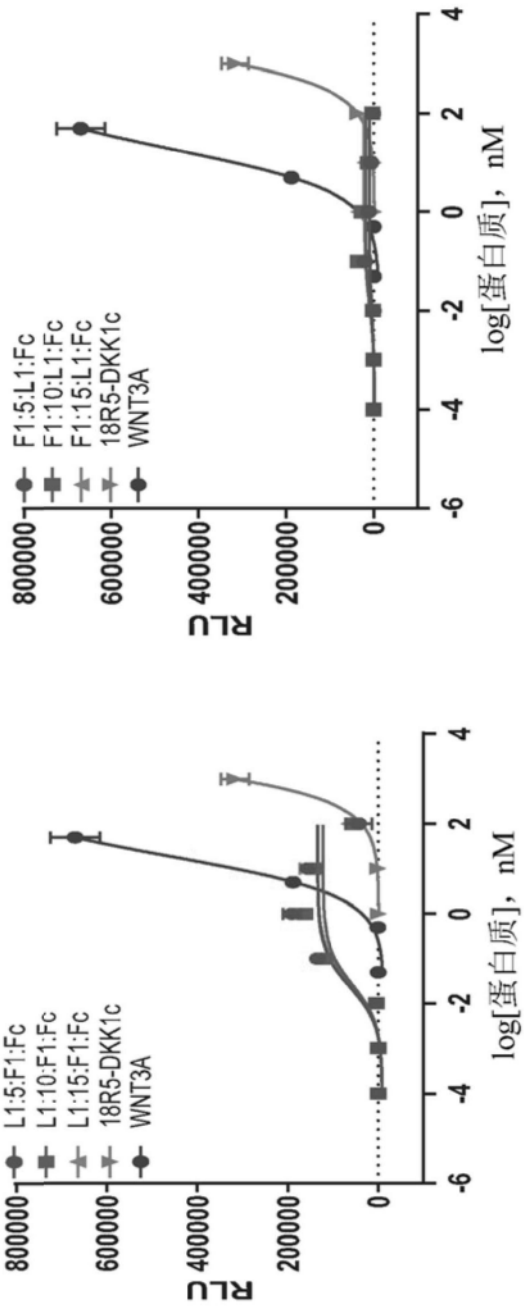

F1:5:L1:Fc
F1:10:L1:Fc
F1:15:L1:Fc
18R5-DKK1c
WNT3A
RLU
800000
600000
400000
200000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM
L1:5:F1:Fc
L1:10:F1:Fc
L1:15:F1:Fc
18R5-DKK1c
WNT3A
RLU
800000
600000
400000
200000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图11A

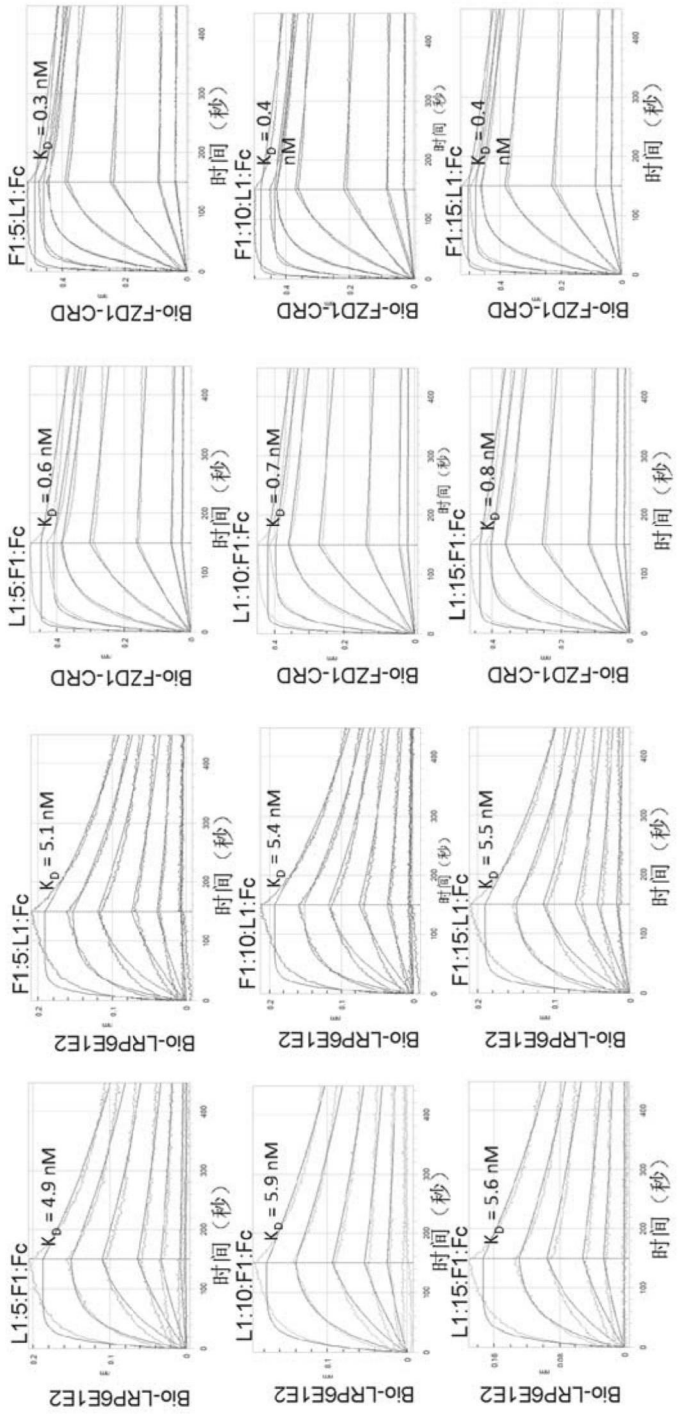

Bio-FZD1-CRD
F1:5:L1:Fc
K_D = 0.3 nM
F1:10:L1:Fc
K_D = 0.4 nM
F1:15:L1:Fc
K_D = 0.4 nM
L1:5:F1:Fc
K_D = 0.6 nM
L1:10:F1:Fc
K_D = 0.7 nM
L1:15:F1:Fc
K_D = 0.8 nM
Bio-LRP6E1E2
F1:5:L1:Fc
K_D = 5.1 nM
F1:10:L1:Fc
K_D = 5.4 nM
F1:15:L1:Fc
K_D = 5.5 nM
L1:5:F1:Fc
K_D = 4.9 nM
L1:10:F1:Fc
K_D = 5.9 nM
L1:15:F1:Fc
K_D = 5.6 nM
时间（秒）

图11B

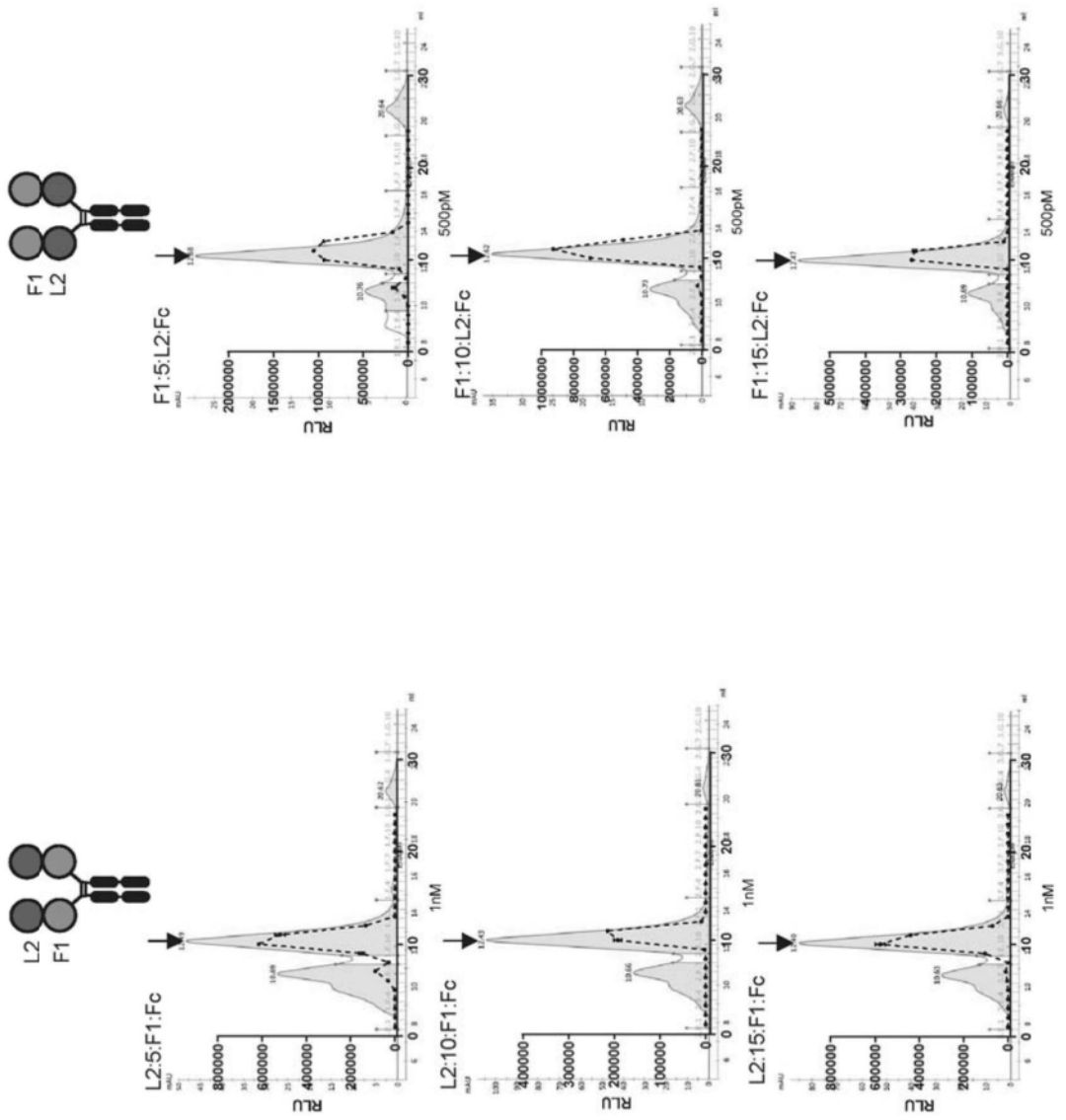

F1
L2
F1:5:L2:Fc
F1:10:L2:Fc
F1:15:L2:Fc
500pM
RU
L2
F1
L2:5:F1:Fc
L2:10:F1:Fc
L2:15:F1:Fc
1nM
RU

图12A

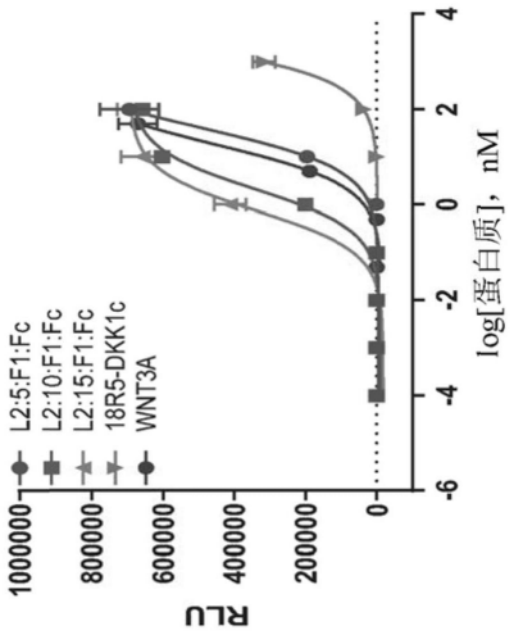

L2:5:F1:Fc
L2:10:F1:Fc
L2:15:F1:Fc
18R5-DKK1c
WNT3A
RLU
1000000
800000
600000
400000
200000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图12B

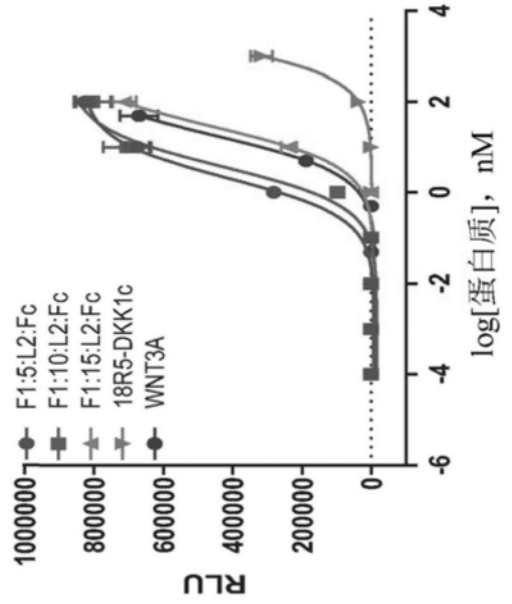

F1:5:L2:Fc
F1:10:L2:Fc
F1:15:L2:Fc
18R5-DKK1c
WNT3A
RLU
1000000
800000
600000
400000
200000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图12C

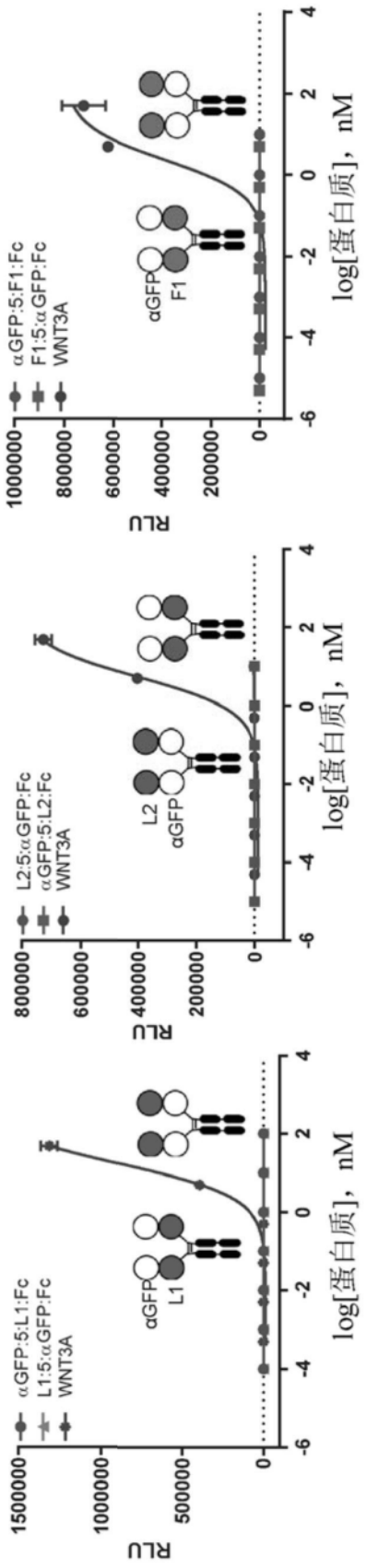

αGFP:5:L1:Fc
L1:5:αGFP:Fc
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
αGFP
L1
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM
L2:5:αGFP:Fc
αGFP:5:L2:Fc
WNT3A
800000
600000
400000
200000
L2
αGFP
αGFP:5:F1:Fc
F1:5:αGFP:Fc
WNT3A
1000000
αGFP
F1

图12D

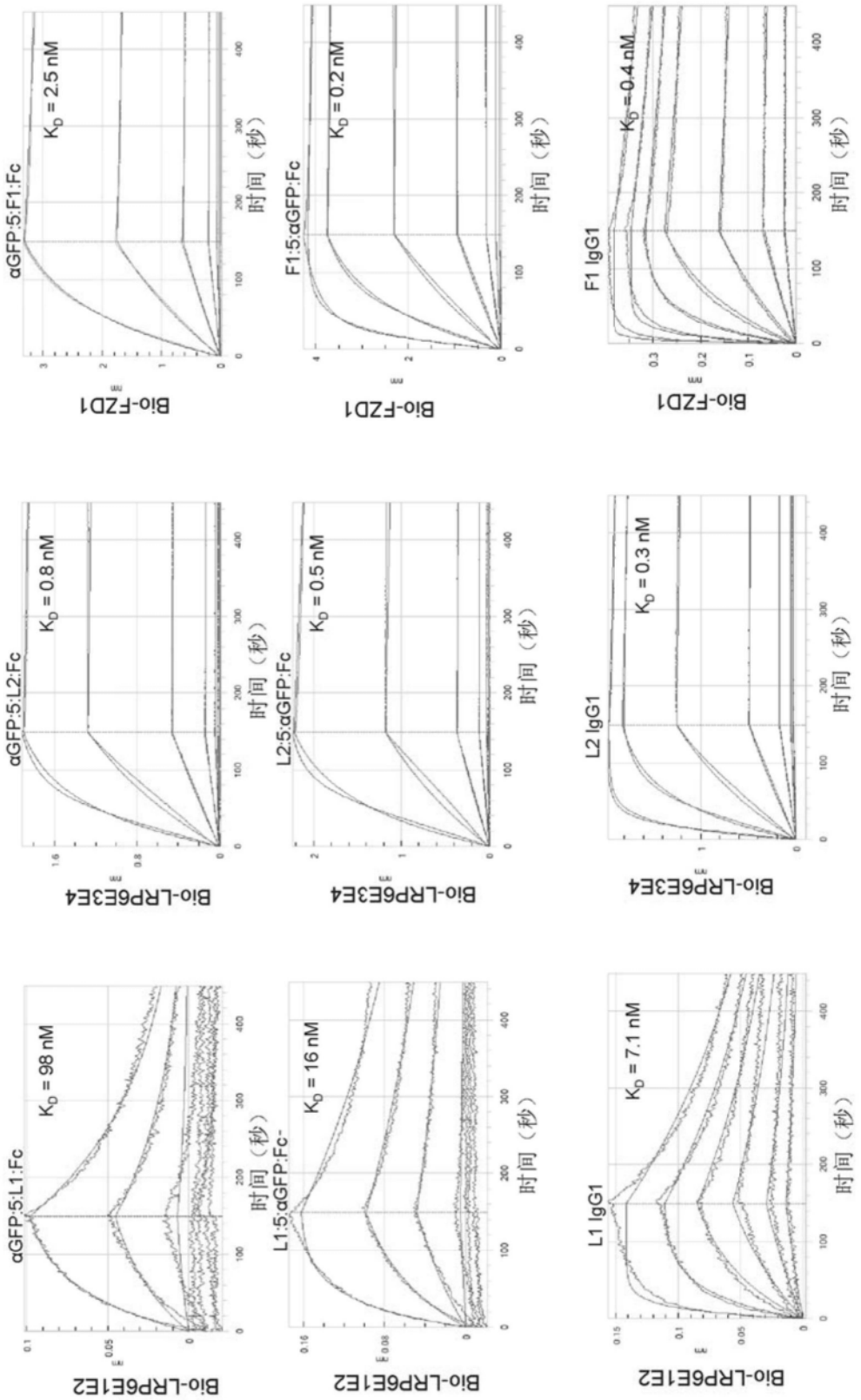

αGFP:5:F1:Fc
K_D = 2.5 nM
F1:5:αGFP:Fc
K_D = 0.2 nM
F1 IgG1
K_D = 0.4 nM
αGFP:5:L2:Fc
K_D = 0.8 nM
L2:5:αGFP:Fc
K_D = 0.5 nM
L2 IgG1
K_D = 0.3 nM
αGFP:5:L1:Fc
K_D = 98 nM
L1:5:αGFP:Fc-
K_D = 16 nM
L1 IgG1
K_D = 7.1 nM
Bio-FZD1
Bio-LRP6E3E4
Bio-LRP6E1E2
时间（秒）

图12E

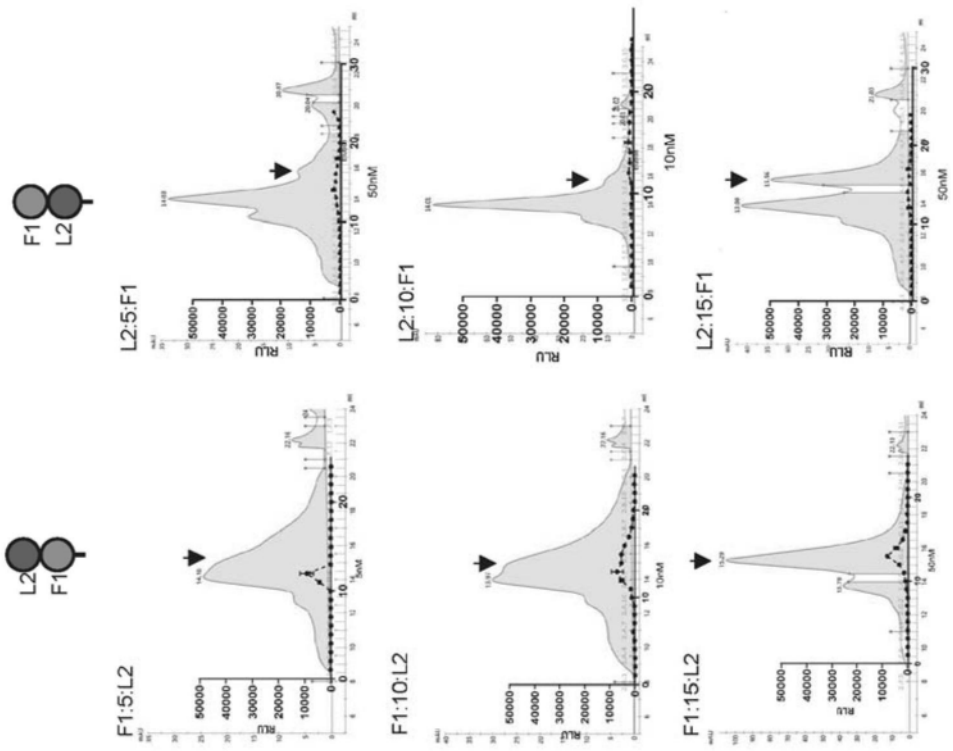

F1
L2
L2:5:F1
L2:10:F1
L2:15:F1
L2
F1
F1:5:L2
F1:10:L2
F1:15:L2
RLU
50nM
10nM

图13A

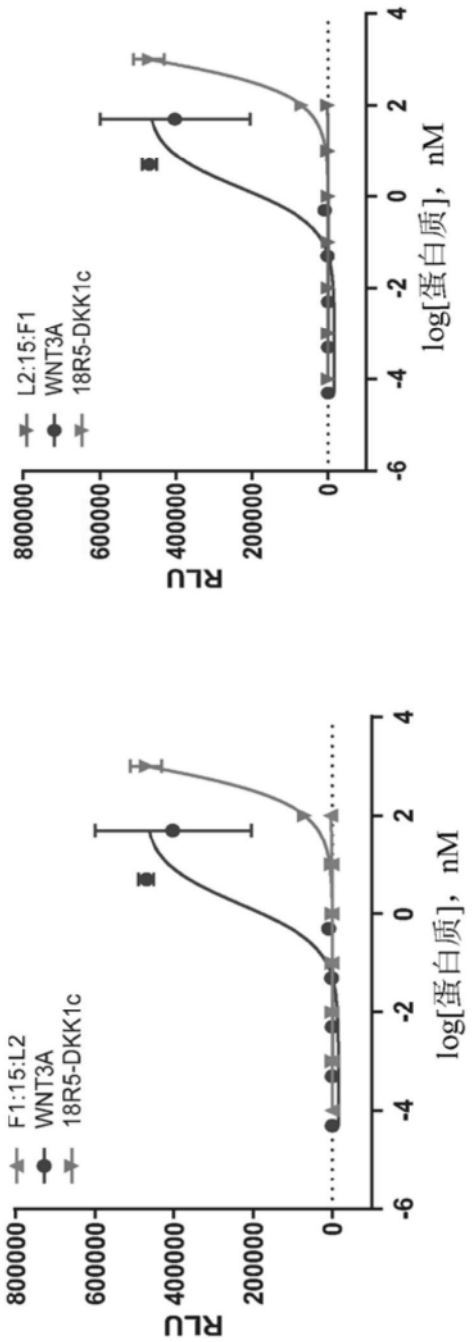

L2:15:F1
WNT3A
18R5-DKK1c
RLU
800000
600000
400000
200000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM
F1:15:L2
WNT3A
18R5-DKK1c
RLU
800000
600000
400000
200000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图13B

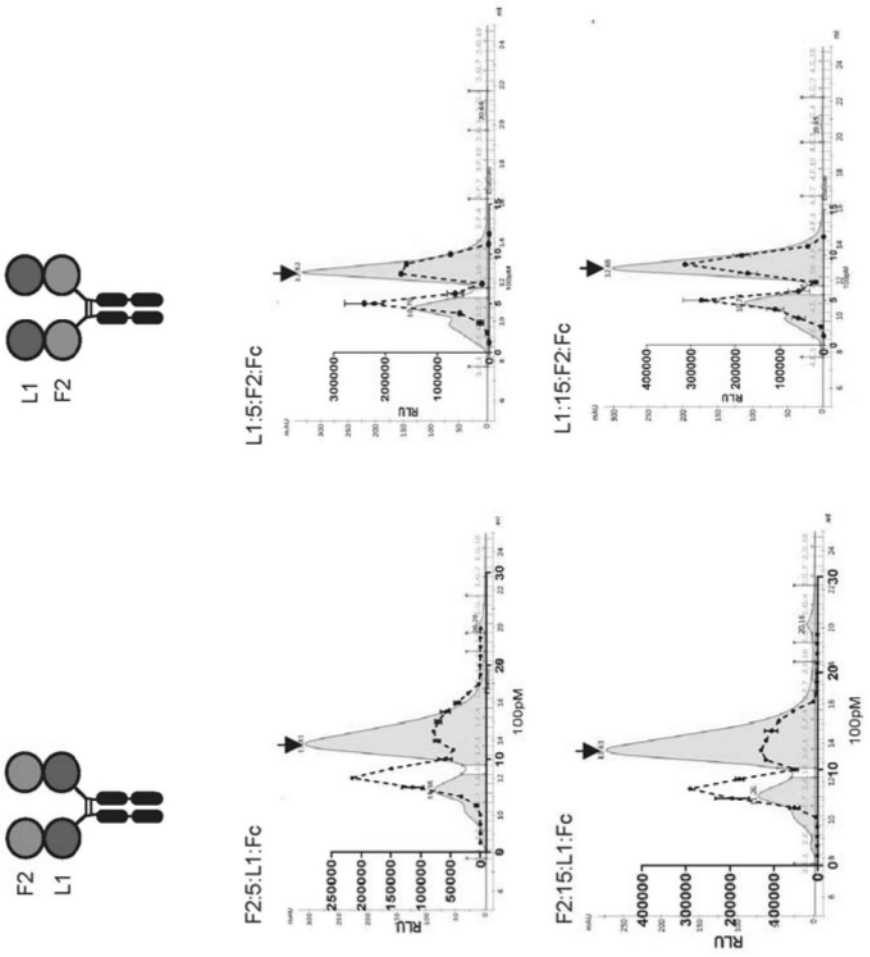


图14A

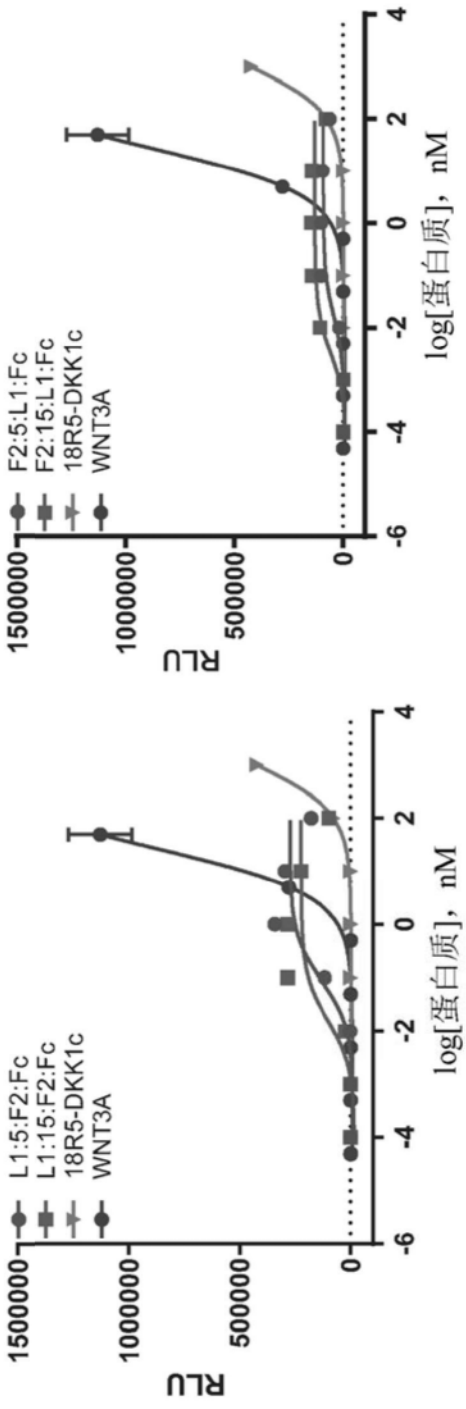

F2:5:L1:Fc
F2:15:L1:Fc
18R5-DKK1c
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM
L1:5:F2:Fc
L1:15:F2:Fc
18R5-DKK1c
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图14B

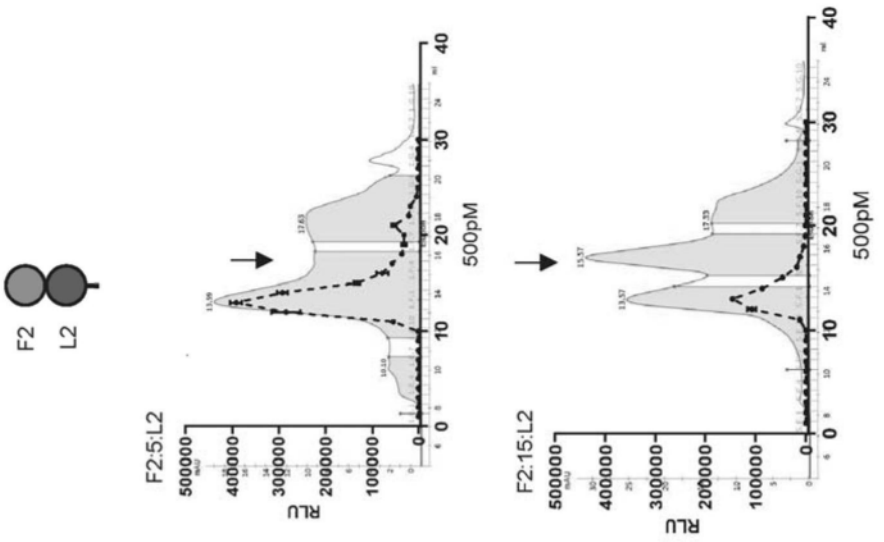


图14C

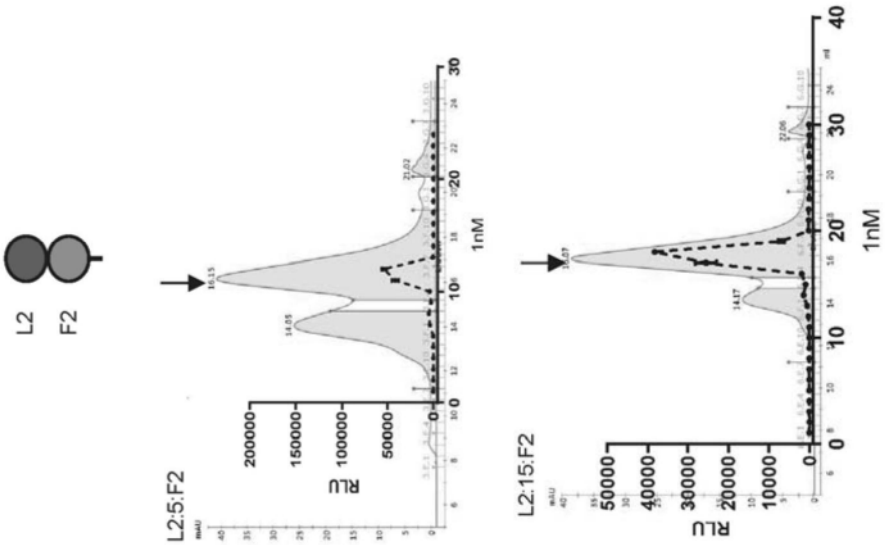


图14D

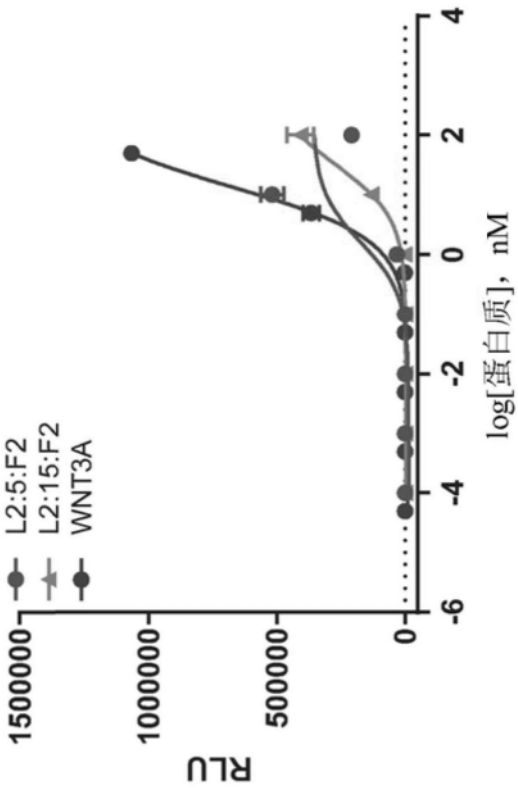

L2:5:F2
L2:15:F2
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图14E

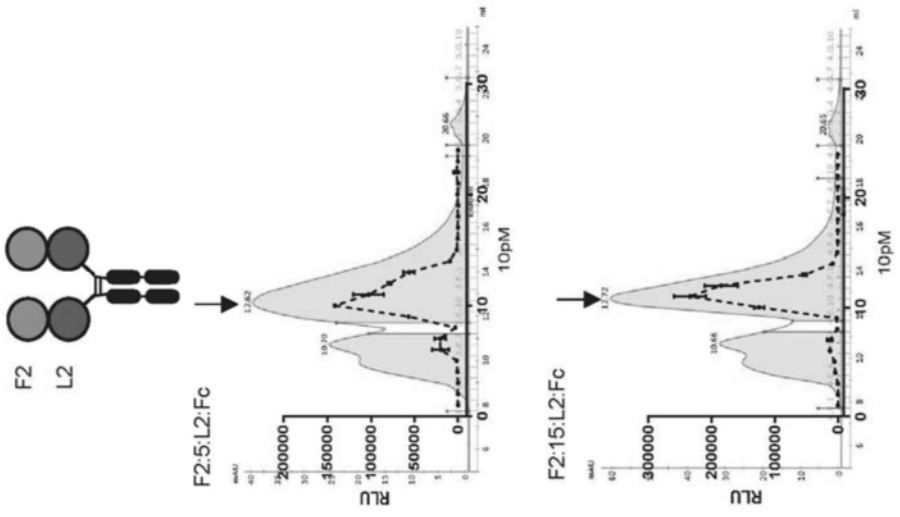

F2
L2
F2:5:L2:Fc
F2:15:L2:Fc
RLU
10pM

图14F

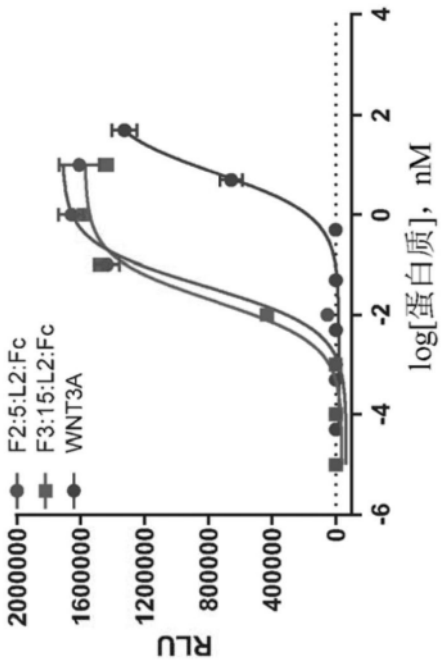

F2:5:L2:Fc
F3:15:L2:Fc
WNT3A
RLU
2000000
1600000
1200000
800000
400000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图14G

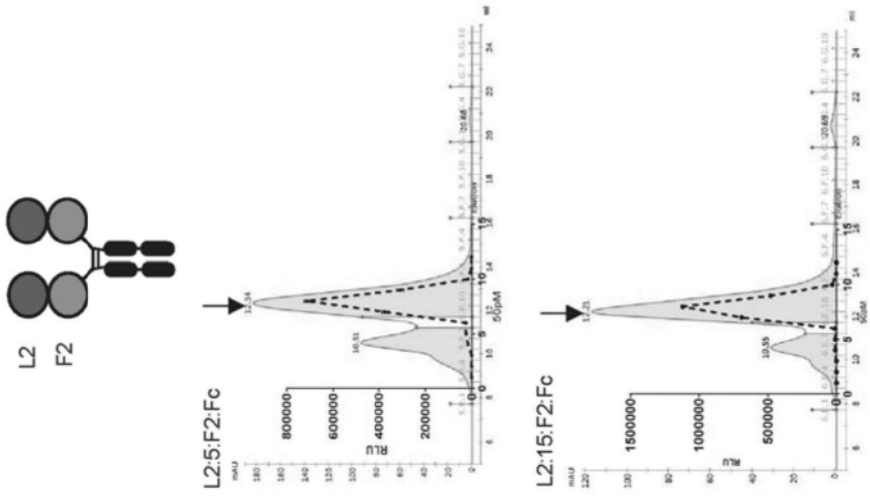

L2
F2
L2:5:F2:Fc
L2:15:F2:Fc
RLU

图14H

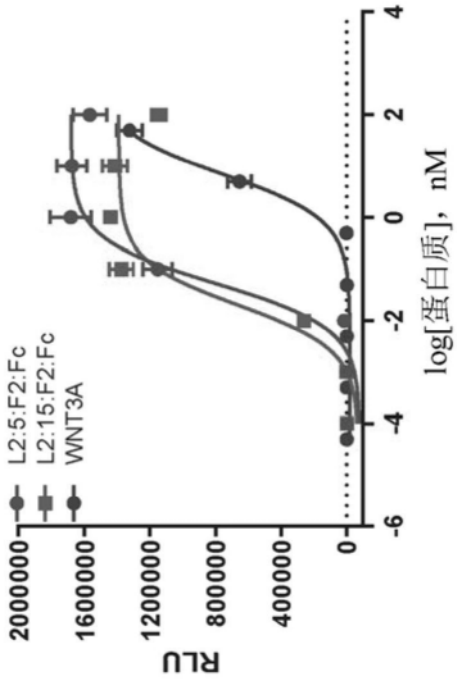

L2:5:F2:Fc
L2:15:F2:Fc
WNT3A
RLU
2000000
1600000
1200000
800000
400000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图14I

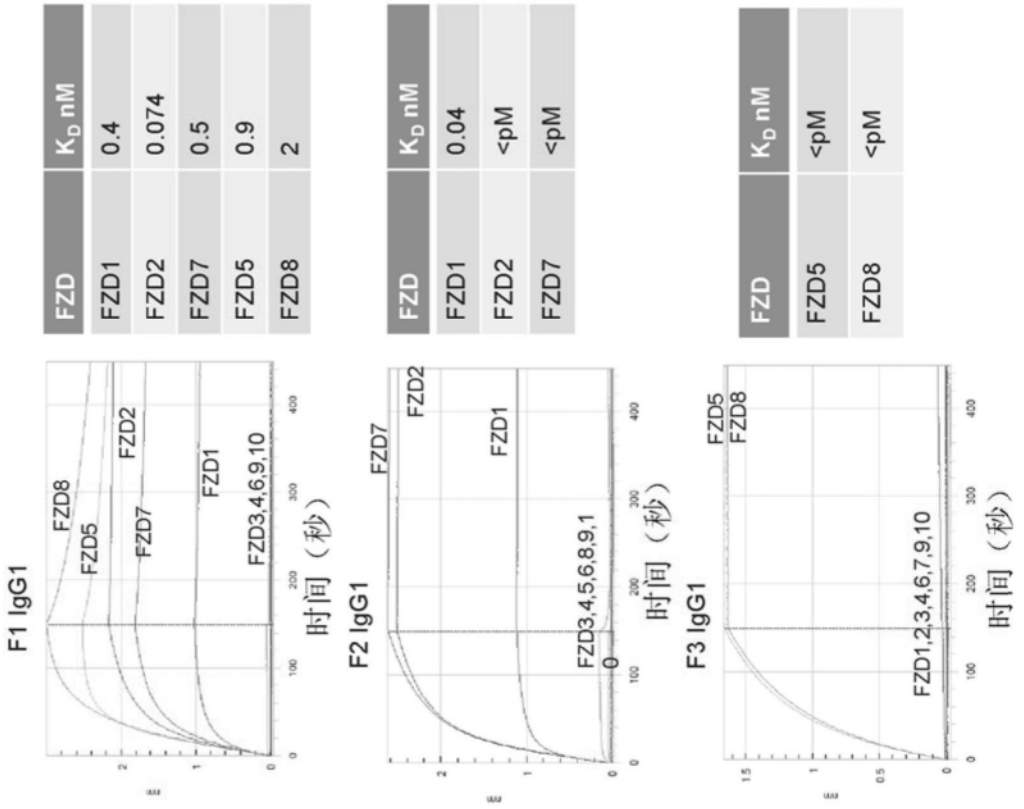

FZD | K_D nM
FZD1 | 0.4
FZD2 | 0.074
FZD7 | 0.5
FZD5 | 0.9
FZD8 | 2
F1 IgG1
FZD8
FZD5
FZD7
FZD2
FZD1
FZD3,4,6,9,10
时间（秒）
FZD | K_D nM
FZD1 | 0.04
FZD2 | <pM
FZD7 | <pM
F2 IgG1
FZD7
FZD2
FZD1
FZD3,4,5,6,8,9,1
时间（秒）
FZD | K_D nM
FZD5 | <pM
FZD8 | <pM
F3 IgG1
FZD5
FZD8
FZD1,2,3,4,6,7,9,10
时间（秒）

图15A

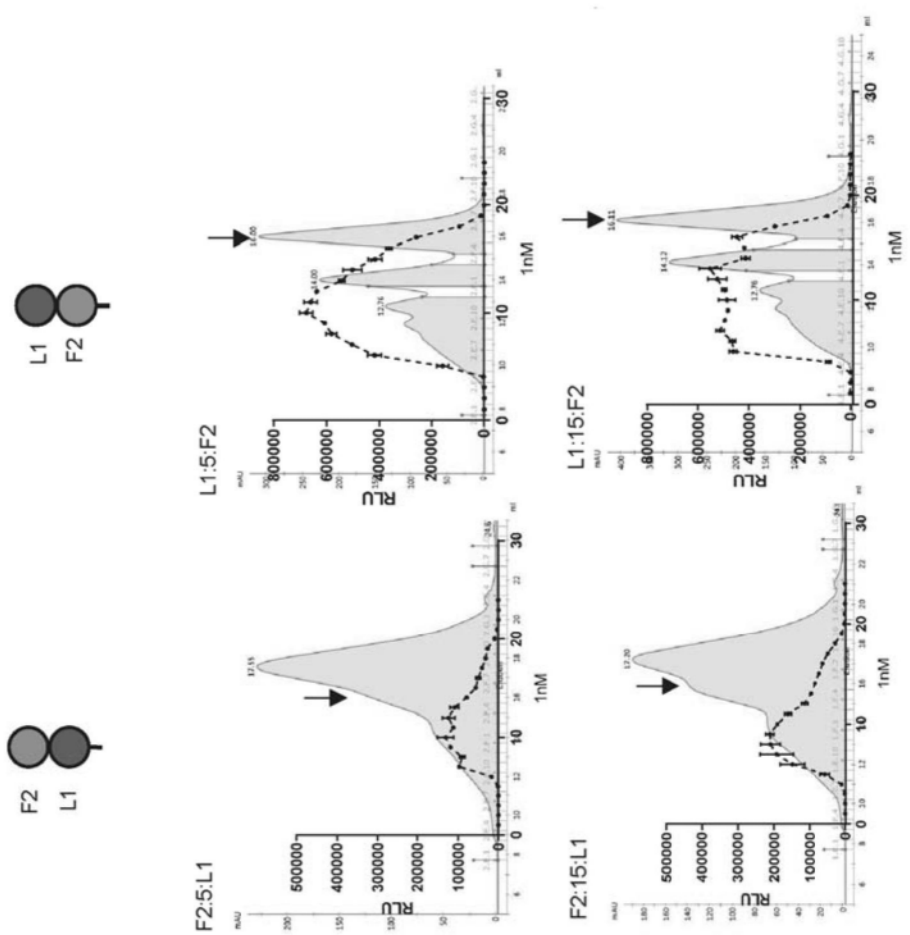


图15B

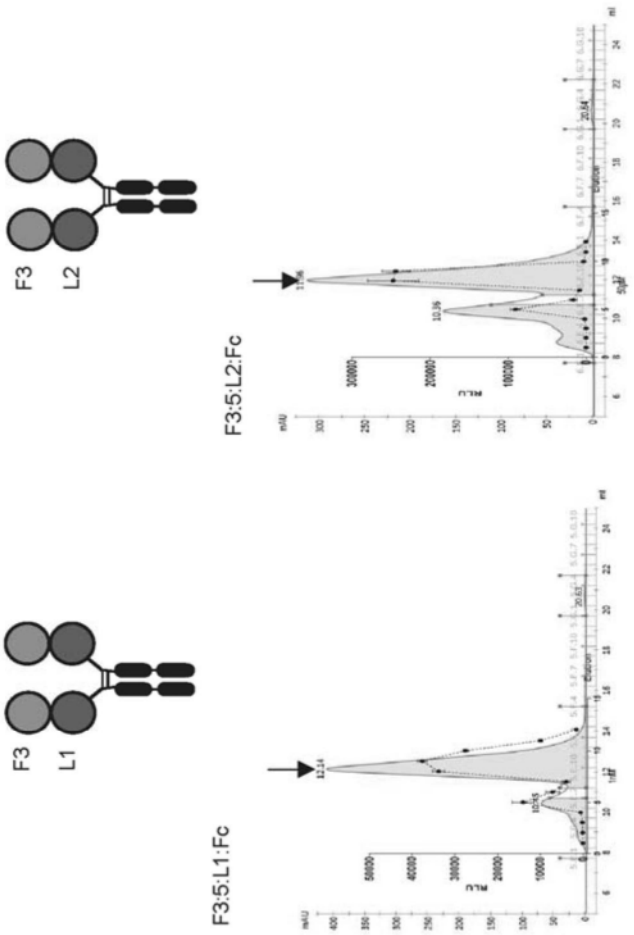


图16A

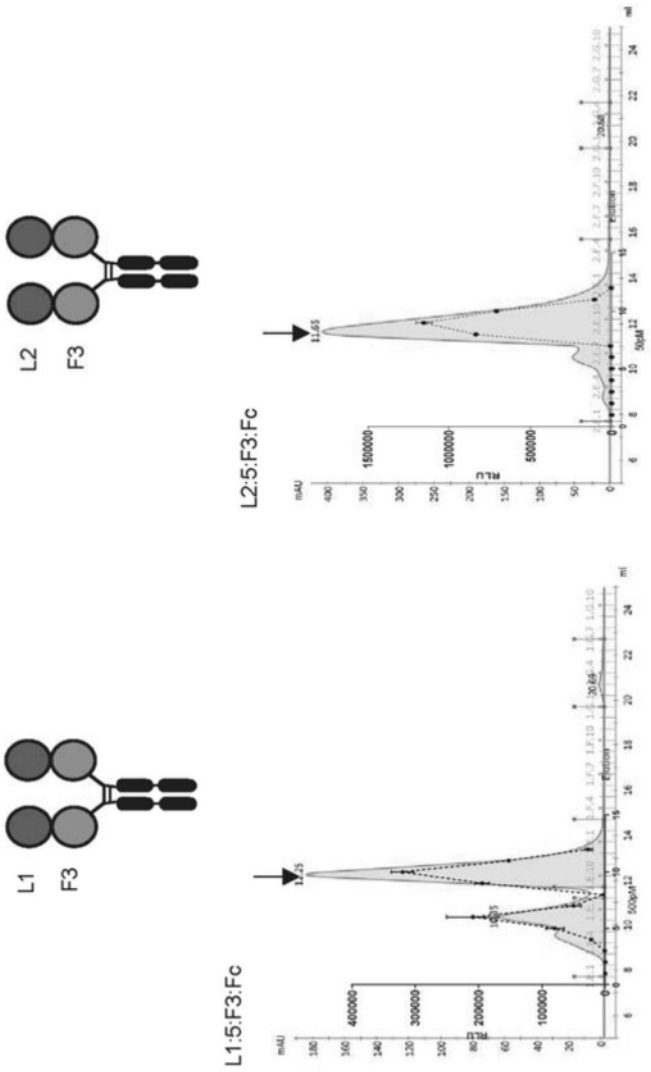


图16B

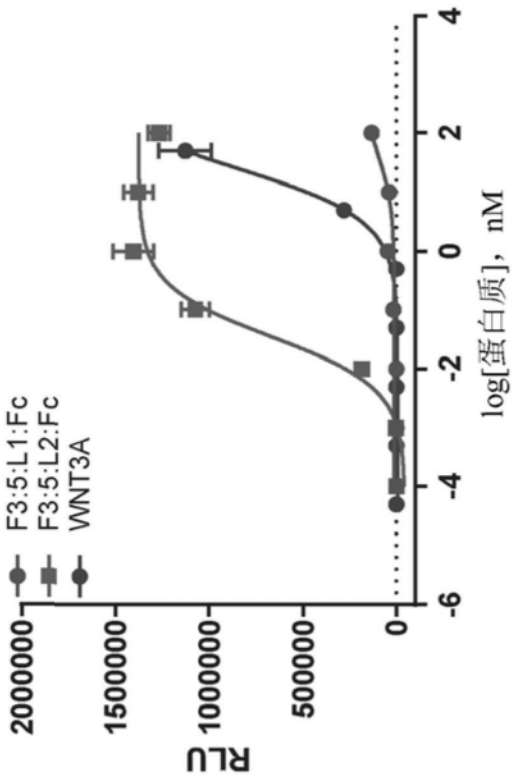

F3:5:L1:Fc
F3:5:L2:Fc
WNT3A
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图16C

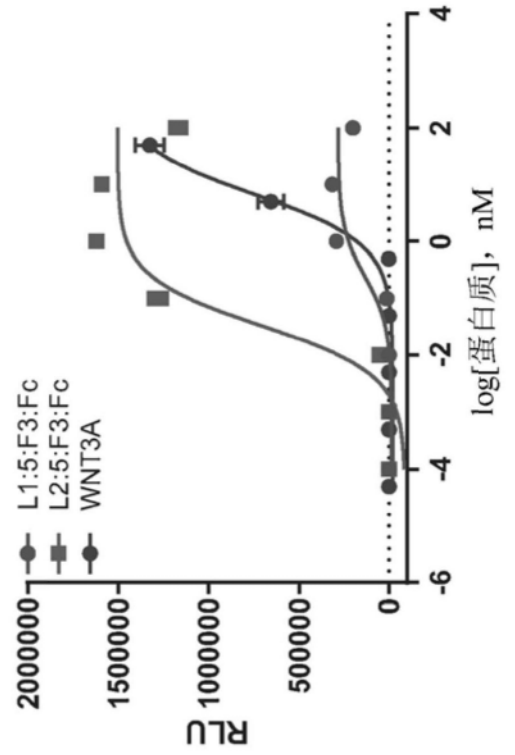

L1:5:F3:Fc
L2:5:F3:Fc
WNT3A
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图16D

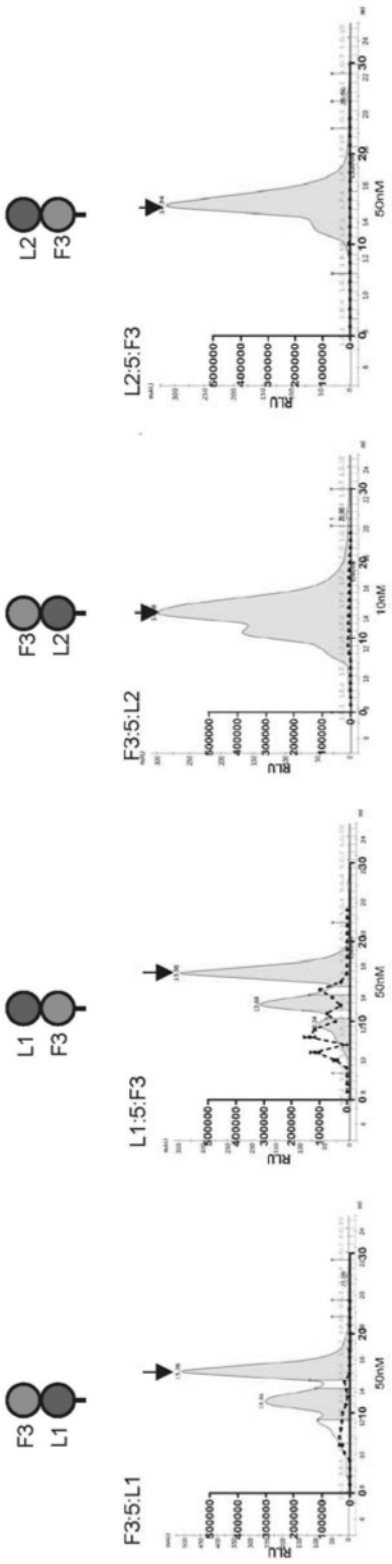

L2
F3
L2:5:F3
50nM
F3
L2
F3:5:L2
10nM
L1
F3
L1:5:F3
50nM
F3
L1
F3:5:L1
50nM
RU

图17

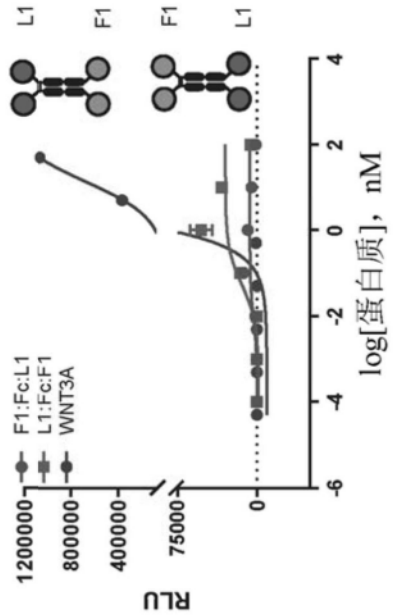

L1
F1
F1
L1
F1:Fc:L1
L1:Fc:F1
WNT3A
1200000
800000
400000
75000
0
RLU
4
2
0
-2
-4
-6
log[蛋白质], nM

图18A

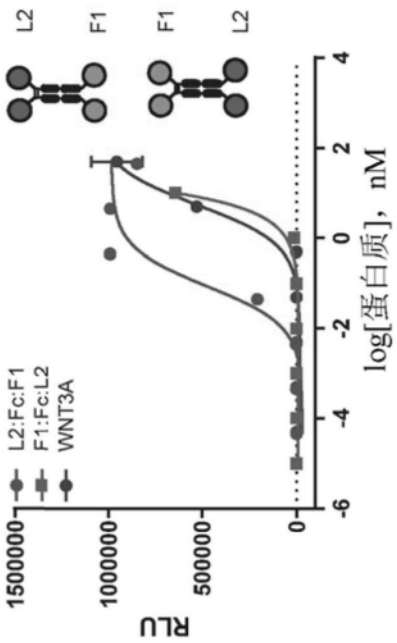

L2
F1
F1
L2
L2:Fc:F1
F1:Fc:L2
WNT3A
1500000
1000000
500000
0
RLU
4
2
0
-2
-4
-6
log[蛋白质], nM

图18B

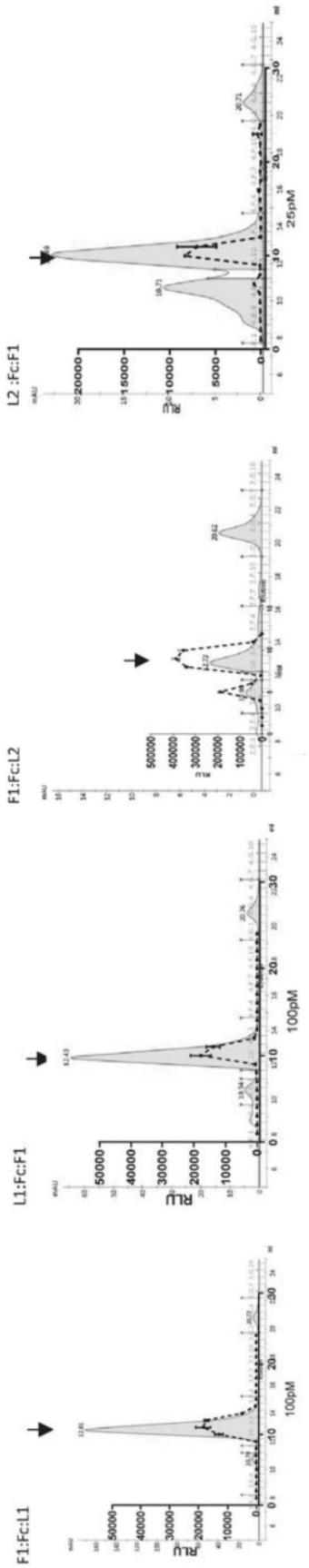


图18C

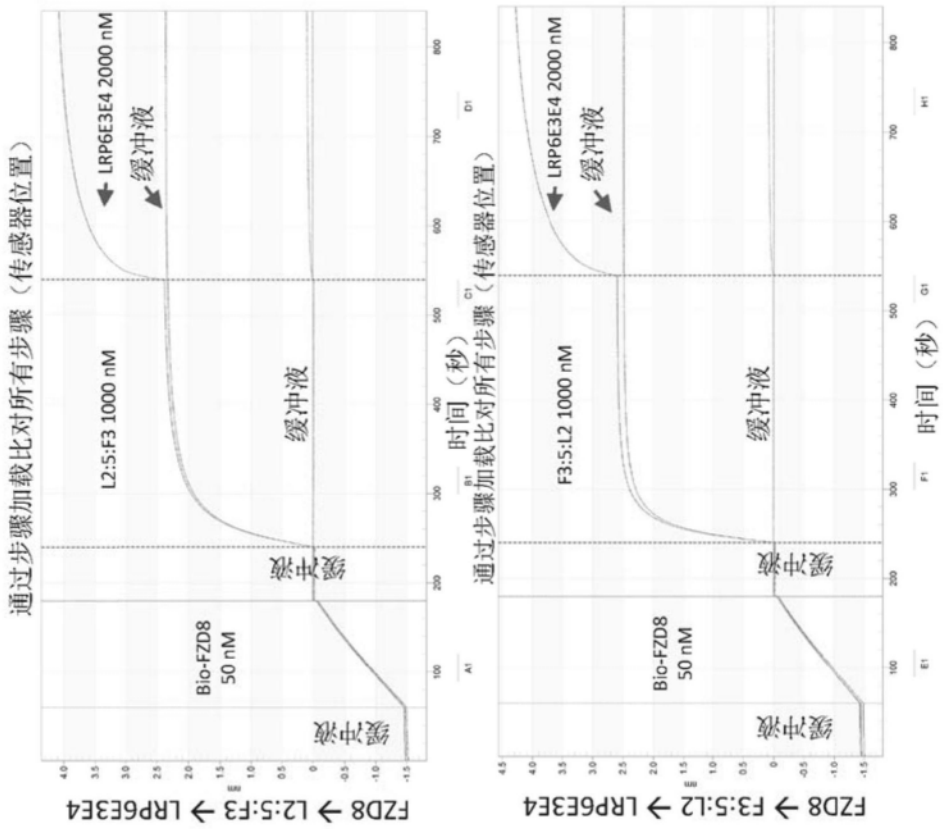

通过步骤加载比对所有步骤（传感器位置）
FZD8 → L2:5:F3 → LRP6E3E4
缓冲液
Bio-FZD8
50 nM
缓冲液
L2:5:F3 1000 nM
缓冲液
LRP6E3E4 2000 nM
缓冲液
时间（秒）
通过步骤加载比对所有步骤（传感器位置）
FZD8 → F3:5:L2 → LRP6E3E4
缓冲液
Bio-FZD8
50 nM
缓冲液
F3:5:L2 1000 nM
缓冲液
LRP6E3E4 2000 nM
缓冲液
时间（秒）

图19A

图19B

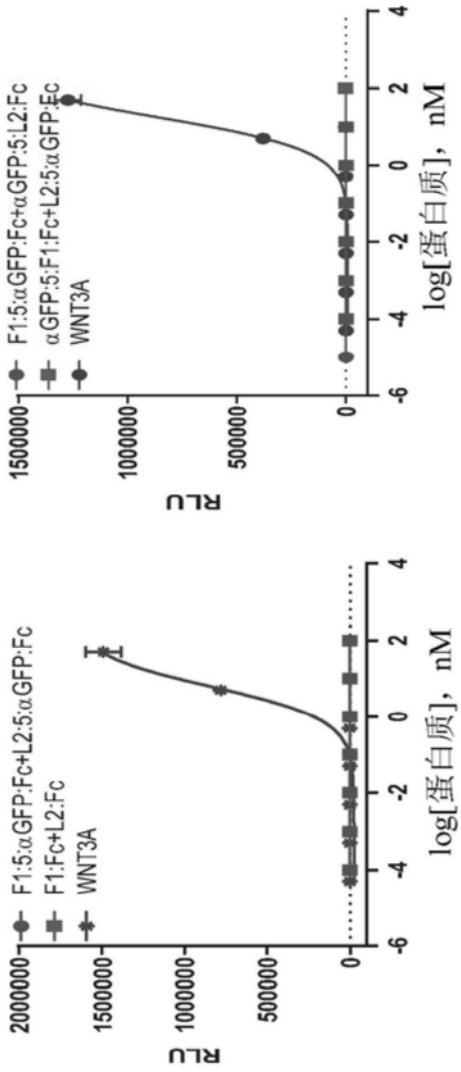

F1:5:αGFP:Fc+αGFP:5:L2:Fc
αGFP:5:F1:Fc+L2:5:αGFP:Fc
WNT3A
RLU
log[蛋白质]，nM
F1:5:αGFP:Fc+L2:5:αGFP:Fc
F1:Fc+L2:Fc
WNT3A
RLU
log[蛋白质]，nM

图19C

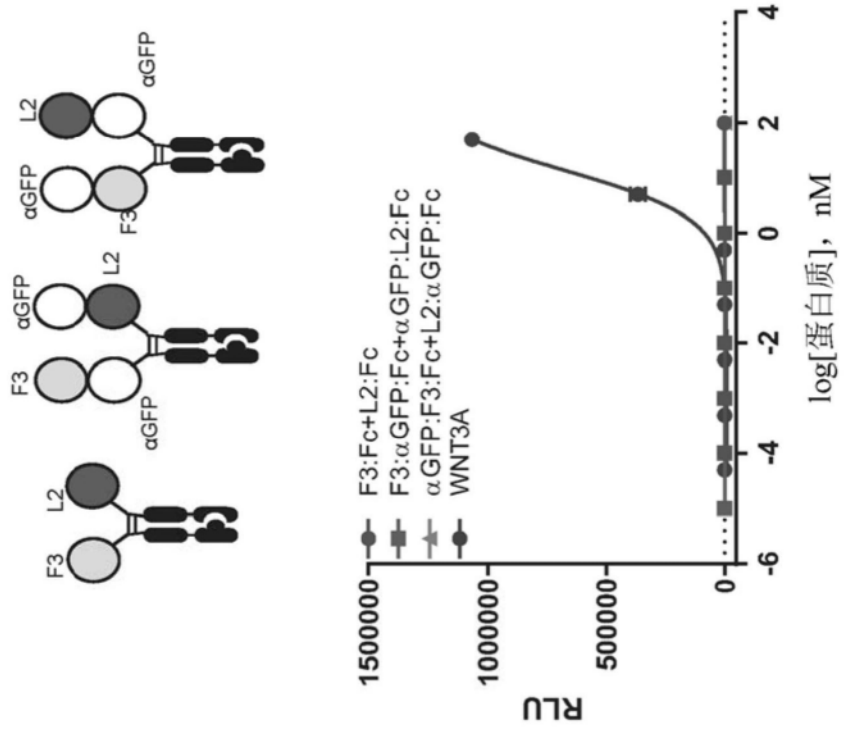

αGFP
L2
αGFP
F3
αGFP
L2
F3
αGFP
L2
F3
F3:Fc+L2:Fc
F3:αGFP:Fc+αGFP:L2:Fc
αGFP:F3:Fc+L2:αGFP:Fc
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图20A

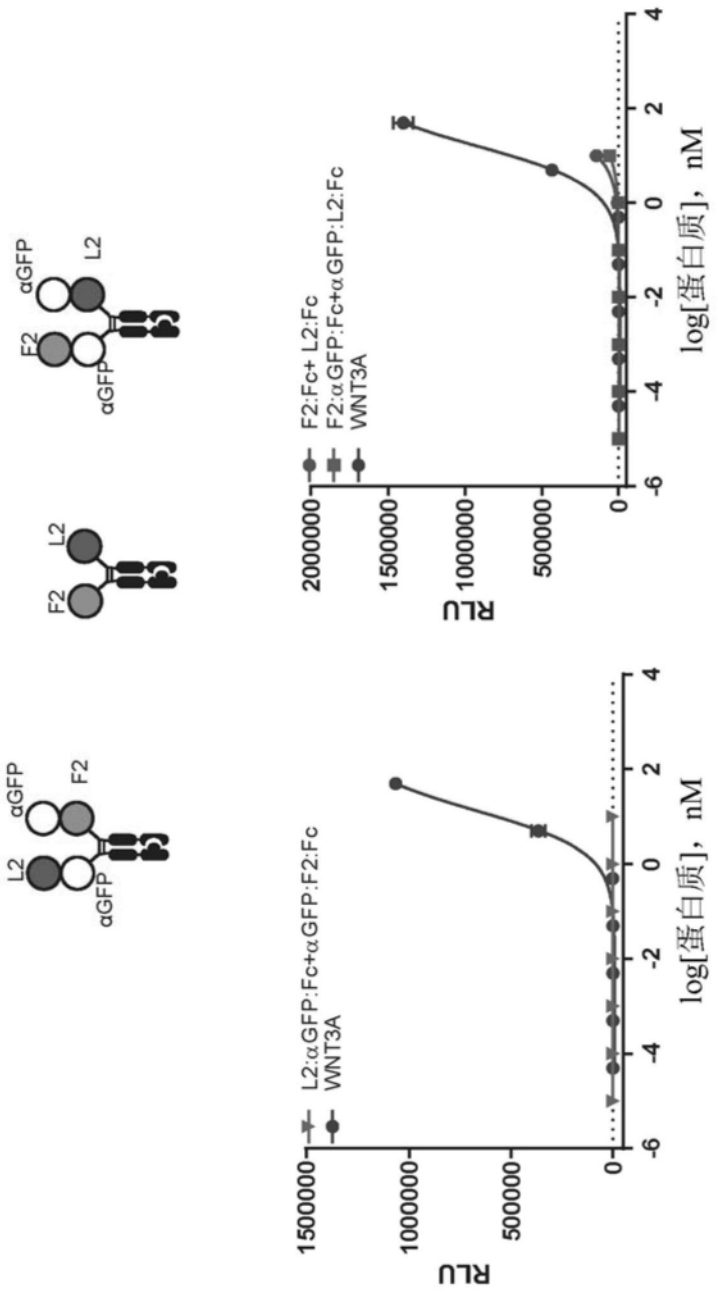

αGFP
L2
F2
αGFP
F2
L2
L2
αGFP
F2
αGFP
F2:Fc+ L2:Fc
F2:αGFP:Fc+αGFP:L2:Fc
WNT3A
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM
L2:αGFP:Fc+αGFP:F2:Fc
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图20B

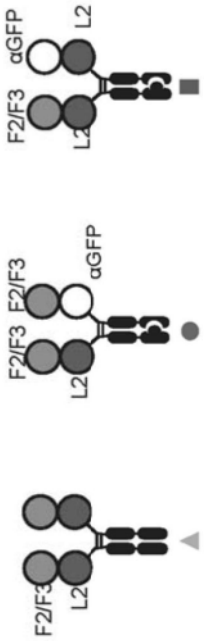

αGFP
L2
F2/F3
L2
F2/F3
αGFP
F2/F3
L2
F2/F3
L2

图21A

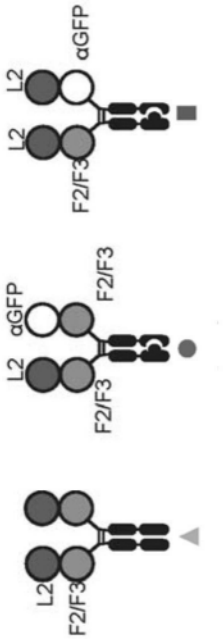

L2
αGFP
L2
F2/F3
αGFP
F2/F3
L2
F2/F3
L2
F2/F3

图21D

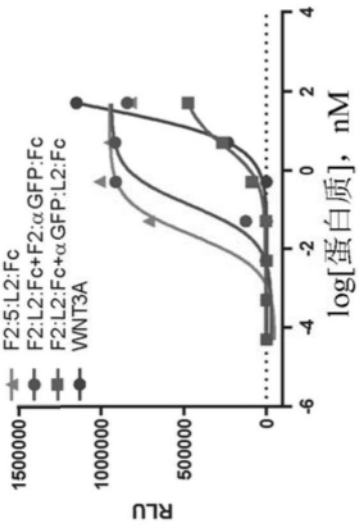

F2:5:L2:Fc
F2:L2:Fc+F2:αGFP:Fc
F2:L2:Fc+αGFP:L2:Fc
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质], nM

图21B

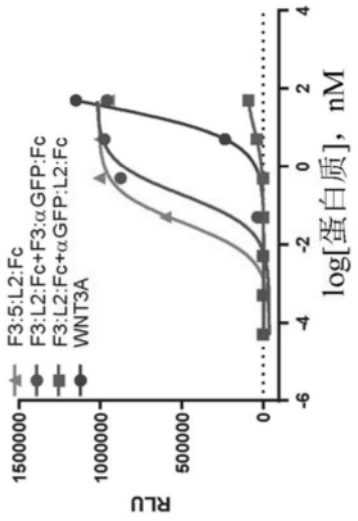

F3:5:L2:Fc
F3:L2:Fc+F3:αGFP:Fc
F3:L2:Fc+αGFP:L2:Fc
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质], nM

图21C

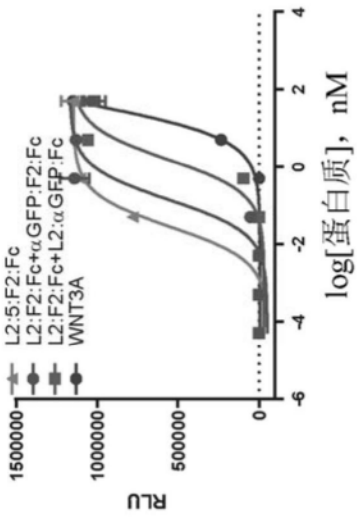


图21E

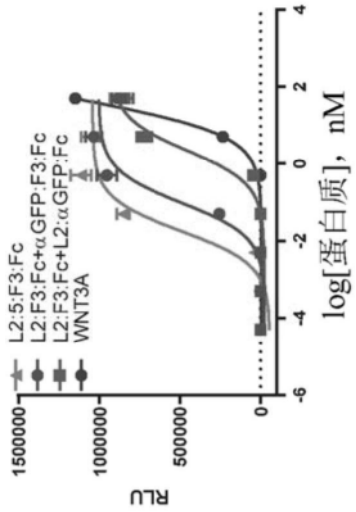


图21F

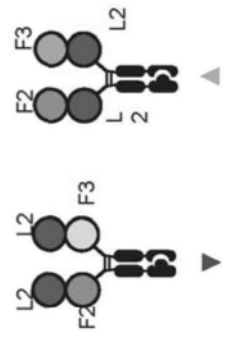


图21G

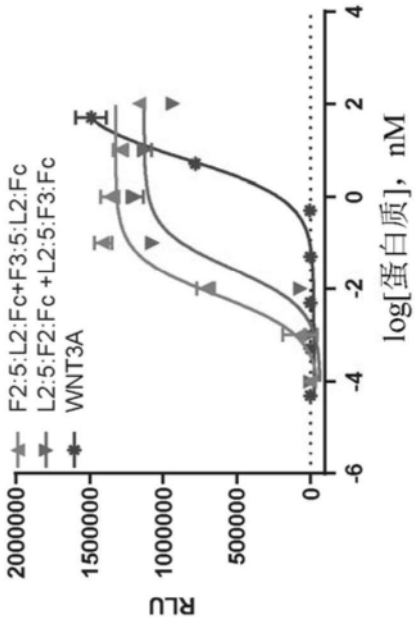

F2:5:L2:Fc+F3:5:L2:Fc
L2:5:F2:Fc +L2:5:F3:Fc
WNT3A
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
4
2
0
-2
-4
-6
log[蛋白质], nM

图21H

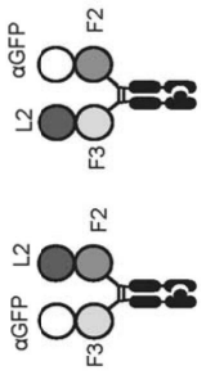

αGFP
F2
L2
F3
L2
F2
αGFP
F3

图21I

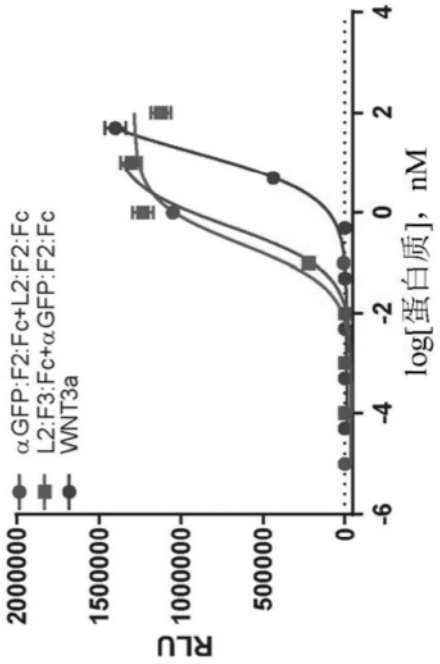

αGFP:F2:Fc+L2:F2:Fc
L2:F3:Fc+αGFP:F2:Fc
WNT3a
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[蛋白质]，nM

图21J

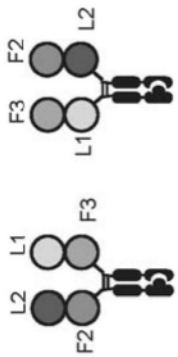

F2
L2
F3
L1
L1
F3
L2
F2

图21K

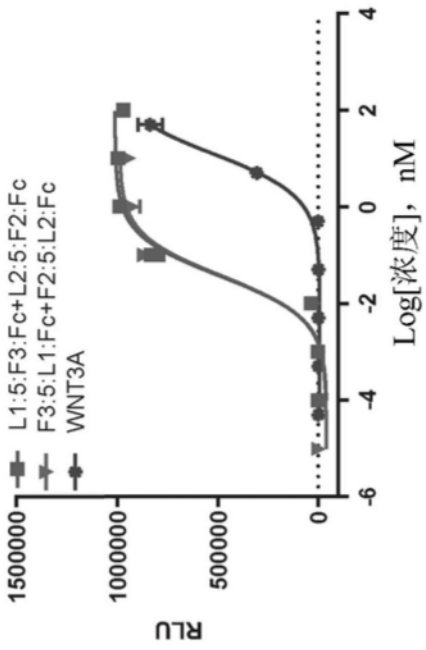

L1:5:F3:Fc+L2:5:F2:Fc
F3:5:L1:Fc+F2:5:L2:Fc
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
Log[浓度], nM

图21L

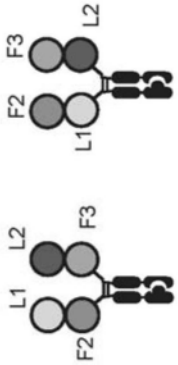

F3
L2
F2
L1
L2
F3
L1
F2

图21M

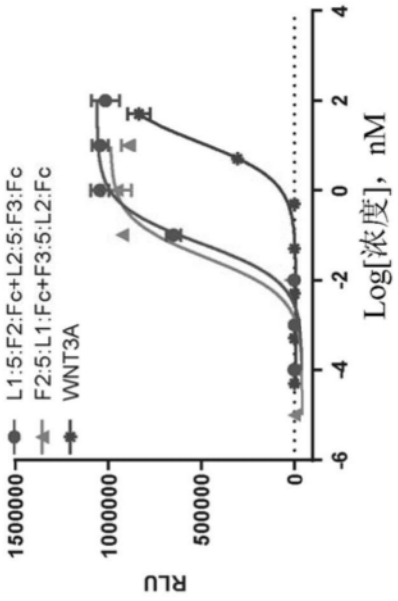

L1:5:F2:Fc+L2:5:F3:Fc
F2:5:L1:Fc+F3:5:L2:Fc
WNT3A
RLU
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
Log[浓度]，nM

图21N