



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102388067 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 21

(21) 申请号 200980146739. 0

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

(22) 申请日 2009. 09. 18

代理人 韦东

(30) 优先权数据

61/098, 685 2008. 09. 19 US

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 39/395 (2006. 01)

2011. 05. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2009/051216 2009. 09. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02010/032059 EN 2010. 03. 25

(83) 生物保藏信息

PTA-9517 2008. 09. 17

PTA-9514 2008. 09. 17

PTA-9513 2008. 09. 17

PTA-9512 2008. 09. 17

PTA-9510 2008. 09. 17

(71) 申请人 米迪缪尼有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 J · 巴布科克 S · T · 巴里

G · 加西特 - 伯恩斯坦 N · 莱恩

Q · 周

权利要求书 4 页 说明书 90 页

序列表 43 页 附图 7 页

(54) 发明名称

定向于 CD105 的抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及对抗 CD105 的靶向结合剂以及这种试剂的用途。更具体而言,本发明涉及定向于 CD105 的全人源单克隆抗体。所述的靶向结合剂可用于治疗与 CD105 的活性和 / 或过量产生有关的疾病,并且可以用作诊断工具。

1. 一种与 CD105 特异性结合的经分离的抗体,其中所述的抗体表现出一种或多种以下所述的性质,包括:

以小于 1nM 的 K_D 与人源 CD105 相结合;
使 HUVEC 细胞的细胞增殖的抑制大于 5%;
增强 SMAD2 磷酸化;
表现为抗血管原活性;以及
表现为 ADCC 活性。

2. 根据权利要求 1 所述的经分离的抗体,其中所述的抗体抑制哺乳动物中肿瘤的生长和/或转移。

3. 根据之前权利要求中的任意一项所述的经分离的抗体,其中所述的抗体以低于 500pM 的 K_D 与 CD105 相结合。

4. 根据之前权利要求中的任意一项所述的经分离的抗体,其中所述的抗体为抗体 4.120,9H10,10C9,4D4,11H2,6B1,4.37,6B10,3C1,或 6A6 中的任意一者。

5. 根据权利要求 4 所述的经分离的抗体,其中所述的抗体为单克隆抗体 4.120。

6. 根据权利要求 4 所述的经分离的抗体,其中所述的抗体为单克隆抗体 4.37。

7. 根据权利要求 4 所述的经分离的抗体,其中所述的抗体为单克隆抗体 6B10。

8. 根据权利要求 4 所述的经分离的抗体,其中所述的抗体为单克隆抗体 4D4.1。

9. 根据之前权利要求中的任意一项所述的经分离的抗体,其中所述的抗体包含 SEQ ID NO.:26 序列,其中 SEQ ID NO.:26 包含表 6 的各行所示的种系残基和非种系残基的独特组合中的任意一者。

10. 根据之前权利要求中的任意一项所述的经分离的抗体,其中所述的抗体包含 SEQ ID NO.:28 序列,并且其中 SEQ ID NO.:28 包含表 7 的各行所示的种系残基和非种系残基的独特组合中的任意一者。

11. 根据之前权利要求中的任意一项所述的经分离的抗体,其中所述的抗体包含 SEQ ID NO.:30 序列,其中 SEQ ID NO.:30 包含表 8 的各行所示的种系残基和非种系残基的独特组合中的任意一者。

12. 根据之前权利要求中的任意一项所述的经分离的抗体,其中所述的抗体包含 SEQ ID NO.:32 序列,其中 SEQ ID NO.:32 包含表 9 的各行所示的种系残基和非种系残基的独特组合中的任意一者。

13. 一种全人源单克隆抗体,其与下列抗体 4.120,9H10,10C9,4D4,11H2,6B1,4.37,6B10,3C1 或 6A6 中任意一者竞争结合 CD105。

14. 一种全人源单克隆抗体,其与以下抗体中的任意一者结合 CD105 上的相同的抗原决定部位,其中所述的抗体为抗体 4.120,9H10,10C9,4D4,11H2,6B1,4.37,6B10,3C1 或 6A6。

15. 一种包含氨基酸序列的经分离的抗体,其中所述的氨基酸序列包含:

- a) 如表 2 中所示的 CDR3 序列;
- b) 如表 2 中所示的 CDR1、CDR2 或 CDR3 序列中的任何一者;
- c) 如表 2 中所示的可变轻链序列的 CDR1、CDR2 或 CDR3 序列;或者
- d) 如表 2 中所示的可变重链序列的 CDR1、CDR2 或 CDR3 序列。

16. 一种抗体,其免疫特异性地结合 CD105 并包含:

(a) SEQ ID NO:2 的 VH CDR1,其具有与 SEQ ID NO:2 的 VH CDR1 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:2 的 VH CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

(b) SEQ ID NO:2 的 VH CDR2,其具有与 SEQ ID NO:2 的 VH CDR2 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:2 的 VH CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

(c) SEQ ID NO:2 的 VH CDR3,其具有与 SEQ ID NO:2 的 VH CDR3 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:2 的 VH CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

(d) SEQ ID NO:4 的 VL CDR1,其具有与 SEQ ID NO:4 的 VL CDR1 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:4 的 VL CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

(e) SEQ ID NO:4 的 VL CDR2,其具有与 SEQ ID NO:4 的 VL CDR2 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:4 的 VL CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;以及

(f) SEQ ID NO:4 的 VL CDR3,其具有与 SEQ ID NO:4 的 VL CDR3 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:4 的 VL CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代。

17. 根据权利要求 16 所述的经分离的抗体,其中所述的抗体包含:

(a) SEQ ID NO:2 的 VH CDR1、CDR2 和 CDR3;以及

(b) SEQ ID NO:4 的 VL CDR1、CDR2 和 CDR3。

18. 一种抗体,其免疫特异性地结合 CD105 并包含:

(a) SEQ ID NO:26 的 VH CDR1,其具有与 SEQ ID NO:26 的 VH CDR1 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:26 的 VH CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

(b) SEQ ID NO:26 的 VH CDR2,其具有与 SEQ ID NO:26 的 VH CDR2 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:26 的 VH CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

(c) SEQ ID NO:26 的 VH CDR3,其具有与 SEQ ID NO:26 的 VH CDR3 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:26 的 VH CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

(d) SEQ ID NO:28 的 VL CDR1,其具有与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR1 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

(e) SEQ ID NO:28 的 VL CDR2,其具有与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR2 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;以及

(f) SEQ ID NO:28 的 VL CDR3,其具有与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR3 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代。

19. 根据权利要求 18 所述的经分离的抗体,其中所述的试剂包含:

(a) SEQ ID NO:26 的 VH CDR1、CDR2 和 CDR3;以及

(b) SEQ ID NO:28 的 VL CDR1、CDR2 和 CDR3。

20. 一种抗体,其免疫特异性地结合 CD105,并且包含与 SEQ ID NO:26 的氨基酸具有至少 90%的一致性的重链可变结构域,以及包含与 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列具有至少 90%的一致性的轻链可变结构域,其中所述抗体具有结合 CD105 的活性。

21. 一种抗体,其免疫特异性地结合 CD105 并包含:

(a) SEQ ID NO:30 的 VH CDR1,其具有与 SEQ ID NO:30 的 VH CDR1 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:30 的 VH CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

(b) SEQ ID NO:30 的 VH CDR2,其具有与 SEQ ID NO:30 的 VH CDR2 相同的氨基酸序列,

或者包含与 SEQ ID NO :30 的 VH CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；

(c) SEQ ID NO :30 的 VH CDR3, 其具有与 SEQ ID NO :30 的 VH CDR3 相同的氨基酸序列, 或者包含与 SEQ ID NO :30 的 VH CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；

(d) SEQ ID NO :32 的 VL CDR1, 其具有与 SEQ ID NO :32 的 VL CDR1 相同的氨基酸序列, 或者包含与 SEQ ID NO :32 的 VL CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；

(e) SEQ ID NO :32 的 VL CDR2, 其具有与 SEQ ID NO :32 的 VL CDR2 相同的氨基酸序列, 或者包含与 SEQ ID NO :32 的 VL CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；以及

(f) SEQ ID NO :32 的 VL CDR3, 其具有与 SEQ ID NO :32 的 VL CDR3 相同的氨基酸序列, 或者包含与 SEQ ID NO :32 的 VL CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代。

22. 根据权利要求 21 所述的经分离的抗体, 其中所述的抗体包含：

(a) SEQ ID NO :30 的 VH CDR1、CDR2 和 CDR3；以及

(b) SEQ ID NO :32 的 VL CDR1、CDR2 和 CDR3。

23. 一种抗体, 其免疫特异性地结合 CD105, 并且包含与 SEQ ID NO :30 的氨基酸具有至少 90% 的一致性的重链可变结构域, 以及包含与 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列具有至少 90% 的一致性的轻链可变结构域, 其中所述抗体具有结合 CD105 的活性。

24. 根据之前权利要求中的任意一项所述的经分离的抗体, 其中所述的抗体为单克隆抗体的结合片段。

25. 根据之前权利要求中的任意一项所述的经分离的抗体, 其中所述的抗体为全人源单克隆抗体。

26. 根据权利要求 10 所述的经分离的抗体, 其中所述的结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 和 dAb 片段。

27. 具有氨基酸序列的抗体包含以下序列中的任何一者, 其中所述的序列为：

包含由命名为 Mab4. 120VH 的质粒中的多核苷酸所编码的重链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变重链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9514；

包含由命名为 Mab4. 120VL 的质粒中的多核苷酸所编码的轻链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变轻链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9513；或者

包含由命名为 Mab4. 120VH 的质粒中的多核苷酸所编码的重链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变重链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9514；以及包含由命名为 Mab4. 120VL 的质粒中的多核苷酸所编码的轻链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变轻链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9513。

28. 具有氨基酸序列的抗体包含以下序列中的任何一者, 其中所述的序列为：

包含由命名为 Mab4. 37VH 的质粒中的多核苷酸所编码的重链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变重链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9517；

包含由命名为 Mab4. 37VL 的质粒中的多核苷酸所编码的轻链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变轻链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中

心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9512 ; 或者

包含由命名为 Mab4. 37VH 的质粒中的多核苷酸所编码的重链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变重链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9517 ; 以及包含由命名为 Mab4. 37VL 的质粒中的多核苷酸所编码的轻链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变轻链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9512。

29. 具有氨基酸序列的抗体包含 :

包含由命名为 Mab6B10VH 的质粒中的多核苷酸所编码的重链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变重链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9510 ;

包含由命名为 Mab6B10VL 的质粒中的多核苷酸所编码的轻链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变轻链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9499 ; 或者

包含由命名为 Mab6B10VH 的质粒中的多核苷酸所编码的重链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变重链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9510 ; 以及包含由命名为 Mab6B10VL 的质粒中的多核苷酸所编码的轻链 CDR 中的至少一者、至少二者或者至少三者的可变轻链氨基酸序列, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 PTA-9499。

30. 一种包含之前权利要求中的任意一项所述的靶向试剂或抗体的组合物。

31. 一种包含之前权利要求中的任意一项所述的抗体或抗体的药物组合物。

32. 一种编码之前权利要求中的任意一项所述的抗体或抗体的核酸分子。

33. 一种治疗动物中恶性肿瘤的方法, 包括 : 选择需要治疗恶性肿瘤的动物 ; 以及向所述的动物给药治疗有效剂量的之前权利要求中的任意一项所述的抗体。

34. 根据权利要求 33 所述的方法, 其中所述的动物为人。

35. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中所述的抗体选自全人源单克隆抗体 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37, 6B10, 3C1 或 6A6。

36. 根据权利要求 33-35 所述的方法, 其中所述的恶性肿瘤选自 : 黑素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、肝细胞 (肝) 癌、甲状腺肿瘤、胃部 (胃) 癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌、成胶质细胞瘤、子宫内膜癌、肾癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头部和颈部的癌症、间皮瘤、肉瘤、胆管癌 (胆管细胞癌)、小肠腺癌、小儿恶性肿瘤以及扁平上皮癌。

37. 用于治疗恶性肿瘤的根据权利要求 30 所述的组合物的用途。

38. 根据权利要求 37 所述的组合物的用途, 其中所述的恶性肿瘤选自 : 黑素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、肝细胞 (肝) 癌、甲状腺肿瘤、胃部 (胃) 癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌、成胶质细胞瘤、子宫内膜癌、肾癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头部和颈部的癌症、间皮瘤、肉瘤、胆管癌 (胆管细胞癌)、小肠腺癌、小儿恶性肿瘤以及扁平上皮癌。

定向于 CD105 的抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及对抗 CD105 的靶向结合剂以及这种试剂的用途。更具体而言,本发明涉及定向于 CD105 的全人源单克隆抗体。所述的靶向结合剂可用于治疗与 CD105 的活性和/或过量产生有关的疾病,并且可用作诊断工具。

背景技术

[0002] CD105, 或者称为内皮因子, 是在激活的血管内皮细胞上表达的跨膜糖蛋白 (Letamendia A, Lastres P, Botella LM, et al. J Biol Chem 1998 ;273 :33011-9)。CD105 也已经报道肿瘤血管上高度表达, 并且在有限数量的其他细胞类型上表达较弱, 这些细胞包括巨噬细胞、成纤维细胞和合胞体滋养层 (Fonsatti E et al., Oncogene 2003 :22 :6557-6563)。

[0003] CD105 由两种均为 95kDa 的二硫键亚基构成, 从而形成 180-kDa 同型二聚体蛋白 (Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. J Biol Chem 1999 ;274 :584-94.)。CD105 基因长度为 40kb, 并且定位在人染色体 9q34 上 (Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M. Curr Cancer Drug Targets 2003 ;3 :427-32 ;Rius C, Smith JD, Almendro N, et al. Blood 1998 ;92 :4677-90.)。mRNA 转录物长度为 3.4kb, 并且由 14 个外显子构成。外显子 1 至 12 编码胞外结构域, 而跨膜结构域由外显子 13 编码, 并且胞浆结构域由外显子 14 编码。已经鉴定 CD105 的两种不同亚型, 表示为长型 (L-CD105/ 内皮因子) 和短型 (S-CD105/ 内皮因子)。上述亚型在细胞质尾端内的氨基酸组成不同。更具体而言, 在胞浆结构域中 L 亚型占主导地位并且含有 47 个残基, 而 S 亚型仅含 14 个氨基酸 (Gougos A, Letarte M. J Biol Chem 1990 ;265 :8361-8364 ;Lastres P et al. Biochem J, 1990 ; 301 :765-768)。

[0004] CD105 是转化生长因子- β (TGF- β) 受体的共受体; 其和 TGF- β 的信号传导类型 I 与类型 II 受体形成异二聚体, 并且可调制对于 TGF- β 的应答 (Yamashita H et al., J Biol Chem, 1994 ;269 :1995-2001 ;Guerrero-Esteo M et al., J Biol Chem 2002 ;277 :29197-29209)。TGF- β 是细胞因子, 该细胞因子是包括激活素和骨形成蛋白 (BMP) 的较大超家族的一部分 (Piek E et al., FASEB J, 1999 ;13 :2105-2124)。TGF- β 超家族的成员通过类型 I 与 II 丝氨酸/苏氨酸激酶受体和它们下游核效应子 (称为 Smads) 来介导细胞应答 (Heldin C-H et al., Nature, 1997 ;390 :465-471)。在内皮细胞中, TGF- β 已经显示激活类型 I 受体的两种途径: 激活素受体样激酶 ALK5 和 ALK1。ALK1 的激活促进 Smad1/5 磷酸化, 并且刺激细胞增殖和迁移。相反, ALK5 的激活诱导 Smad2/3 磷酸化并且抑制细胞增殖和迁移 (Goumans M-J et al., EMBO J 2002 ;21 :1743-1753)。因此, 在静态内皮细胞中, ALK5 是 TGF- β 信号传导的主要调制物。然而, 在血管生成的过程中, ALK1 优选被激活 (Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P. Cardiovasc Res 2005 ;65 :599-608)。

[0005] CD105 的突变导致 I 型遗传性出血性毛细血管扩张症 (或 Osler-Rendu-Weber 综合征 1) (Bobik A. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006 ;26 :1712-20.)。该综合征是遗传性常染色体显性疾病, 并且表征为多系统血管发育不良、复发性鼻出血、皮肤粘膜

毛细血管扩张以及肺、脑、肝和胃肠道的动静脉畸形 (Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. *Chest* 2005 ;128 :585-90S; Bobik A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ;26 :1712-20)。已经描述了疾病的两种基因型:遗传性出血性毛细血管扩张症 1, 表征为 CD105 中的突变;以及遗传性出血性毛细血管扩张症 2, 表征为 ALK1 中的突变 (Bobik A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ;26 :1712-20; Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P. *Cardiovasc Res* 2005 ;65 :599-608)。在具有用于 CD105 (CD105^{+/+}) 的杂合基因型遗传性出血性毛细血管扩张症的转基因啮齿动物模型中, 相比于野生型动物, 小鼠表现出无规则、扩大和薄壁的血管, 同时和血管平滑肌细胞相关性较差。令人感兴趣地, CD105 杂合小鼠存活至成年期, 而显示出无效突变纯合 (CD105^{-/-}) 的小鼠无法发育, 从而导致由于卵黄囊血管缺陷、心脏瓣膜异常和不规则的心室发育而在第 11.5 天胚胎致死 (Arthur HM, Ure J, Smith AJ, et al., *Dev Biol* 2000 ;217 :42-53; Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, et al. *Science* 1999 ;284 :1534-7)。因此, 上述发现强调了 CD105 在血管内平衡中的重要性。近年来, CD105 也已经暗指调制内皮细胞迁移和细胞骨架的形成 (Conley BA et al., *J Biol Chem* 2004 ;279 :27440-27449; Sanz-Rodriguez F et al., *J Biol Chem*, 2004 ;279 :32858-32868)。

[0006] CD105 表达已经报道和癌症患者的较差预后有关联。更具体地, CD105 表达相关于乳腺癌、肺癌和结肠直肠癌患者的较差总存活率 (Kumar S et al., *Cancer Res* 1999 ;59 :856-861; Tanaka F et al., *Clin Cancer Res* 2001 ;7 :3410-3415; Li C et al., *Br J Cancer* 2003 ;88 :1424-1431)。此外, 如上所述, 在胃肠道、乳房、前列腺以及头颈部恶性肿瘤中, CD105 表达和远处转移病灶的存在有关联 (Ding S, Li C, Lin S, et al. *Hum Pathol* 2006 ;37 :861-6; Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF. *Hum Pathol* 2005 ;36 :955-61; Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman J F. *Mod Pathol* 2004 ;17 :197-203; Li C, Guo B, Wilson PB, et al. *Int J Cancer* 2000 ;89 :122-6; Yang LY, Lu WQ, Huang GW, Wang W. *BMC Cancer* 2006 ;6 :110; El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, et al. *Am J Clin Pathol* 2007 ;127 :572-9; Chien CY, Su CY, Hwang CF, Chuang HC, Chen CM, Huang CC. *J Surg Oncol* 2006 ;94 :413-7)。

[0007] 近年来, 已经报道了增加 CD105 表达水平具有下列 VEGF 途径的抑制。在胰腺癌移植瘤模型中, CD105 转录水平的上调为用抗 -VEGF 中和抗体处理的小鼠中的水平的 2 倍多 (Bockhorn M et al., *Clin Cancer Res*. 2003 ;9 :4221-4226)。在膀胱癌移植瘤模型中, 通过免疫组织化学法测定的 CD105 水平在用抗 -VEGF 中和抗体处理的小鼠的肿瘤核心内提高 (Davis D et al., *Cancer Res*. 2004 ;64 :4601-4610)。

[0008] 另外, CD105 表达通过组织缺氧而增强, 并且已经报道: 保护低氧细胞避免细胞凋亡; 在缺氧负荷下抑制 CD105 增强的细胞凋亡 (Li C, Issa R, Kumar P, et al. *J Cell Sci* 2003 ;116 :2677-85.)。CD105 mRNA 和启动子活性在缺氧条件下也显著地提高 (Li C, Issa R, Kumar P, et al. *J Cell Sci* 2003 ;116 :2677-85.)。因此, 缺氧被认为是在血管内皮细胞中 CD105 基因表达的有效刺激。

[0009] 因此, 需要开发新的抑制 CD105 信号传导的方式。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及特异性地与 CD105 结合并抑制 CD105 的生物学活性的靶向结合剂。本

发明的实施方案涉及特异性地与 CD105 结合并抑制 CD105 依赖性 TGF- β 信号传导的靶向结合剂。例如,本发明的 CD105 结合剂抑制 CD105 配体(例如 TGF- β 1、TGF- β 3、激活素-A、BMP-2 和 / 或 BMP-7) 与 TGF- β 1 受体络合物的 CD105 部分的结合。

[0012] 本发明的实施方案涉及特异性地与 CD105 结合并抑制 CD105 配体与 CD105 结合的靶向结合剂。在本发明的一个实施方案中,靶向结合剂特异性地与 CD105 结合并抑制 CD105 配体(TGF- β 1、TGF- β 3、激活素-A、BMP-2 和 / 或 BMP-7) 与 CD105 结合。在一个实施方案中,与缺少靶向结合剂的条件下所发生的结合情况相比,所述的靶向结合剂抑制了至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 的 CD105 配体与 CD105 的结合。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 5 纳摩尔 (nM) 的结合亲和性 (K_D) 与 CD105 结合。在其他实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 4nM、3nM、2nM 或 1nM 的 K_D 进行结合。在本发明的一些实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 950 兆摩尔 (pM) 的 K_D 与 CD105 结合。在本发明的一些实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 900pM 的 K_D 与 CD105 结合。在其他实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 800pM、700pM 或 600pM 的 K_D 进行结合。在本发明的一些实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 500pM 的 K_D 与 CD105 结合。在其他实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 400pM 的 K_D 进行结合。在其他实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 300pM 的 K_D 进行结合。在一些其他的实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 200pM 的 K_D 进行结合。在一些其他的实施方案中,所述的靶向结合剂以低于 100pM 的 K_D 进行结合。在一个特定的实施方案中,本发明的靶向结合剂可以以低于 10pM 的亲合性 K_D 与人源 CD105 相结合。在另一个特定的实施方案中,本发明的靶向结合剂可以以低于 1pM 的亲合性 K_D 与人源 CD105 相结合。可以采用本文所述的方法或本领域的任一技术人员已知的方法来估测 K_D (例如 BIAcore 测试,ELISA,FACS) (Biacore International AB, Uppsala, Sweden)。

[0014] 本发明的靶向结合剂或抗体的结合性质还可以通过参照解离速率或结合速率 (分别为 k_{off} 和 k_{on}) 来测定。

[0015] 在本发明的一个实施方案中,靶向结合剂或抗体可以具有至少 $10^4 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 、或者至少 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 的 k_{on} 速率 (抗体 (Ab)+ 抗原 (Ag), $k_{on} \rightarrow Ab-Ag$)。

[0016] 在本发明的另一个实施方案中,靶向结合剂或抗体可以具有低于 $5 \times 10^{-1} s^{-1}$ 、低于 $10^{-1} s^{-1}$ 、低于 $5 \times 10^{-2} s^{-1}$ 、低于 $10^{-2} s^{-1}$ 、低于 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、低于 $10^{-3} s^{-1}$ 、低于 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、低于 $10^{-4} s^{-1}$ 、低于 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、低于 $10^{-5} s^{-1}$ 、低于 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、低于 $10^{-6} s^{-1}$ 、低于 $5 \times 10^{-7} s^{-1}$ 、低于 $10^{-7} s^{-1}$ 、低于 $5 \times 10^{-8} s^{-1}$ 、低于 $10^{-8} s^{-1}$ 、低于 $5 \times 10^{-9} s^{-1}$ 、低于 $10^{-9} s^{-1}$ 、或者低于 $10^{-10} s^{-1}$ 的 k_{off} 速率 ((Ab-Ag) $k_{off} \rightarrow$ 抗体 (Ab)+ 抗原 (Ag))。

[0017] 在一些实例中,本发明的靶向结合剂对得自其他物种的其他 CD105 蛋白质具有交叉反应性。在一个实施方案中,本发明的靶向结合剂 (例如 4.120,6B1,9H10,10C9,4D4,11H2,4.37,6B10,3C1 和 6A6) 对猕猴 CD105 具有交叉反应性。在另一实施方案中,本发明的靶向结合剂对小鼠 CD105 (例如 6B1) 具有交叉反应性。

[0018] 本发明的靶向结合剂还可具有抗增殖活性。在特定实例中,本发明的抗体可使增殖抑制至少 5%,6%,7%,8%,9%,10%,11%,12%,13%,14%,15%,20%,25%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或更多。在一个实施方案中,当抗体浓度为 50 μ g/ml 时,本发明的抗体可使 HUVEC 细胞的增殖抑制在 2-30%,4-25%或 8-20%的范围内。

[0019] 在本发明的另一实施方案中,本发明的靶向结合剂可调制血管形成。在一个例子中,本发明的抗体可抑制血管增长和 / 或分叉数量。在一个特定实施方案中,本发明的抗体可使血管增长抑制至少 5%,10%,15%,20%,25%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或更多。例如,在实施例 6 中所述的全细胞图像分析法中,抗体 6B10 可使血管增长抑制至少 20%例如 20-30%,并且可使分叉数量抑制至少 40%例如 40-60%。

[0020] 在本发明的另一实施方案中,本发明的抗体可调制细胞的肌动蛋白细胞骨架结构。在一个特定实施方案中,3C.1,6B1,6B10,10C9,4.120 或 4.37 的靶向抗体可因此内皮细胞的肌动蛋白细胞骨架结构的显著调制。

[0021] 在本发明的另一实施方案中,本发明的靶向结合剂干扰 TGF β 信号传导。在一个实施方案中,本发明的靶向结合剂(例如 4D4,6A6,6B10,9H10,4.120 或 4.37)介导 pSMAD2 磷酸化。

[0022] 在本发明的另一实施方案中,靶向结合剂交叉竞争 SN6 抗体,例如 6A6,6B10,9H10 或 3C1。

[0023] 在一些实施方案中,靶向结合剂可治疗和血管生成有关的病症。在本发明的一个实施方案中,靶向结合剂抑制哺乳动物中肿瘤的生长和 / 或转移。特别地,靶向结合剂可用于治疗实体瘤。靶向结合剂可联合使用其他抗癌疗法例如化疗方案,或单独抑制肿瘤的生长和 / 或转移。当用作单独疗法时,本发明的靶向结合剂可于其他疗法例如抗 VEGF 疗法都无效的患者。在另一实施方案中,靶向结合剂可治疗眼部疾病,例如糖尿病视网膜病和新生血管性黄斑变性。在又一实施方案中,靶向结合剂可用于治疗慢性炎症性疾病,例如风湿性关节炎、骨关节炎、哮喘、Crohn's 疾病、溃疡性结肠炎和炎症性肠病。

[0024] 在本发明的一些实施方案中,所述的靶向结合剂为抗体。在本发明的一些实施方案中,所述的靶向结合剂为单克隆抗体。在本发明的一个实施方案中,所述的靶向结合剂为全人源单克隆抗体。在本发明的另一个实施方案中,所述的靶向结合剂为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型的全人源单克隆抗体。在本发明的另一个实施方案中,所述的靶向结合剂为 IgG2 同种型的全人源单克隆抗体。与其他同种型相比,所述的 IgG2 同种型具有降低的引发效应器功能的潜力,这可以使得毒性降低。在本发明的另一个实施方案中,所述的靶向结合剂为 IgG1 同种型的全人源单克隆抗体。与其他同种型相比,所述的 IgG1 同种型具有升高的引发 ADCC 和 / 或 CDC 的潜力,这可以使得效力得到改善。与其他同种型(例如 IgG4)相比,IgG1 同种型具有改善的稳定性,这可以使得生物利用率得到改善,或者使制造的方便程度得到改善或者得到更长的半衰期。在一个实施方案中,IgG1 同种型的全人源单克隆抗体为 z、za 或 f 同种异型。

[0025] 在本发明的一个实施方案中,特异性结合 CD105 的靶向结合剂可表现出一种或多种以下所述的性质,包括:

[0026] 以小于 1nM 的 K_D 与人源 CD105 相结合;

[0027] 使 HUVEC 细胞的细胞增殖的抑制大于 5%,例如 5-20%;

[0028] 增强 SMAD2 磷酸化；

[0029] 表现为抗血管原活性；以及

[0030] 表现为 ADCC 活性。

[0031] 另一个实施方案为特异性地与 CD105 结合并包含以下序列的靶向结合剂或抗体，其中所述的序列包含表 2 所示的互补性决定区 (CDR) 的序列。本发明的实施方案包含具有以下序列的靶向结合剂或抗体，其中所述的序列包含：如表 2 所示，得自重链可变结构域的 CDR1、CDR2 或 CDR3 序列中的任何一者。另一个实施方案为特异性地与 CD105 结合并包含以下序列的靶向结合剂或抗体，其中所述的序列包含表 2 所示的重链可变结构域的 CDR 序列中的两个。在另一个实施方案中，所述的靶向结合剂或抗体具有这样的序列，该序列包含表 2 所示的重链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。在另一个实施方案中，所述的靶向结合剂或抗体具有这样的序列，该序列包含表 2 所示的轻链可变结构域的 CDR 序列中的一者。本发明的实施方案包含具有以下序列的靶向结合剂或抗体，其中所述的序列包含：表 2 所示的重链可变结构域的 CDR1、CDR2 或 CDR3 序列中的任何一者。在另一个实施方案中，所述的靶向结合剂或抗体具有这样的序列，该序列包含表 2 所示的重链可变结构域的 CDR 序列中的两个。在另一个实施方案中，所述的靶向结合剂或抗体具有这样的序列，该序列包含表 2 所示的轻链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。在另一个实施方案中，所述的靶向结合剂或抗体可以具有这样的序列，该序列包含表 2 所示的重链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列以及表 2 所示的轻链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。在一些实施方案中，所述的靶向结合剂为抗体。在某些实施方案中，所述的靶向结合剂为全人源单克隆抗体。在某些其他的实施方案中，所述的靶向结合剂为全人源单克隆抗体的结合片段。

[0032] 在一个实施方案中，本发明的抗体包括：

[0033] (a) SEQ ID NO :2 的 VH CDR1，其具有与 SEQ ID NO :2 的 VH CDR1 相同的氨基酸序列，或者包含与 SEQ ID NO :2 的 VH CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；

[0034] (b) SEQ ID NO :2 的 VH CDR2，其具有与 SEQ ID NO :2 的 VH CDR2 相同的氨基酸序列，或者包含与 SEQ ID NO :2 的 VH CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；

[0035] (c) SEQ ID NO :2 的 VH CDR3，其具有与 SEQ ID NO :2 的 VH CDR3 相同的氨基酸序列，或者包含与 SEQ ID NO :2 的 VH CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；

[0036] (d) SEQ ID NO :4 的 VL CDR1，其具有与 SEQ ID NO :4 的 VL CDR1 相同的氨基酸序列，或者包含与 SEQ ID NO :4 的 VL CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；

[0037] (e) SEQ ID NO :4 的 VL CDR2，其具有与 SEQ ID NO :4 的 VL CDR2 相同的氨基酸序列，或者包含与 SEQ ID NO :4 的 VL CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；以及

[0038] (f) SEQ ID NO :4 的 VL CDR3，其具有与 SEQ ID NO :4 的 VL CDR3 相同的氨基酸序列，或者包含与 SEQ ID NO :4 的 VL CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代。

[0039] 在另一个实施方案中，本发明的抗体包括：

[0040] (a) SEQ ID NO :26 的 VH CDR1，其具有与 SEQ ID NO :26 的 VH CDR1 相同的氨基酸序列，或者包含与 SEQ ID NO :26 的 VH CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；

[0041] (b) SEQ ID NO :26 的 VH CDR2，其具有与 SEQ ID NO :26 的 VH CDR2 相同的氨基酸序列，或者包含与 SEQ ID NO :26 的 VH CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代；

[0042] (c) SEQ ID NO :26 的 VH CDR3，其具有与 SEQ ID NO :26 的 VH CDR3 相同的氨基酸

序列,或者包含与 SEQ ID NO:26 的 VH CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

[0043] (d) SEQ ID NO:28 的 VL CDR1,其具有与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR1 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

[0044] (e) SEQ ID NO:28 的 VL CDR2,其具有与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR2 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;以及

[0045] (f) SEQ ID NO:28 的 VL CDR3,其具有与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR3 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:28 的 VL CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代。

[0046] 在又一个实施方案中,本发明的抗体包括:

[0047] (a) SEQ ID NO:30 的 VH CDR1,其具有与 SEQ ID NO:30 的 VH CDR1 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:30 的 VH CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

[0048] (b) SEQ ID NO:30 的 VH CDR2,其具有与 SEQ ID NO:30 的 VH CDR2 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:30 的 VH CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

[0049] (c) SEQ ID NO:30 的 VH CDR3,其具有与 SEQ ID NO:30 的 VH CDR3 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:30 的 VH CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

[0050] (d) SEQ ID NO:32 的 VL CDR1,其具有与 SEQ ID NO:32 的 VL CDR1 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:32 的 VL CDR1 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;

[0051] (e) SEQ ID NO:32 的 VL CDR2,其具有与 SEQ ID NO:32 的 VL CDR2 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:32 的 VL CDR2 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代;以及

[0052] (f) SEQ ID NO:32 的 VL CDR3,其具有与 SEQ ID NO:32 的 VL CDR3 相同的氨基酸序列,或者包含与 SEQ ID NO:32 的 VL CDR3 相比具有 1、2 或 3 个氨基酸残基的取代。

[0053] 在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂可以包含这样的序列,该序列包含由命名为 Mab4.120VH、Mab4.37VH 或 Mab6B10VH 的质粒中的多核苷酸所编码的可变重链序列的 CDR1、CDR2 或 CDR3 中的任何一者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (American type culture collection(ATCC)) 中,编号分别为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9514、PTA-9511 或 PTA-9510。在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂可以包含这样的序列,该序列包含由命名为 Mab4.120VL、Mab4.37VL 或 Mab6B10VL 的质粒中的多核苷酸所编码的可变轻链序列的 CDR1、CDR2 或 CDR3 中的任何一者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号分别为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9513、PTA-9512 或 PTA-9499。

[0054] 在一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列,该可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab4.120VH 的质粒中的多核苷酸所编码的 CDR3,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9514。

[0055] 在一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列和可变轻链氨基酸序列,其中所述的可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab4.120VH 的质粒中的多核苷酸所编码的 CDR3,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9514;其中所述的可变轻链氨基酸序列包含由命名为 Mab4.120VL 的质粒中的多核苷酸所编码的 CDR3,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9513。

[0056] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列,该

可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 120VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9514。

[0057] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变轻链氨基酸序列,该可变轻链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 120VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9514。

[0058] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列和可变轻链氨基酸序列,其中所述的可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 120VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9514;其中所述的可变轻链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 120VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9513。

[0059] 在一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列,该可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 37VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR3,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9511。

[0060] 在一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列和可变轻链氨基酸序列,其中所述的可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 37VH 的质粒中的多核苷酸所编码的 CDR3,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9511;其中所述的可变轻链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 37VL 的质粒中的多核苷酸所编码的 CDR3,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9512。

[0061] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列,该可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 37VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9511。

[0062] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变轻链氨基酸序列,该可变轻链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 37VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9512。

[0063] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列和可变轻链氨基酸序列,其中所述的可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 37VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9511;其中所述的可变轻链氨基酸序列包含由命名为 Mab4. 37VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9512。

[0064] 在一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列,该可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab6B10VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR3,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9510。

[0065] 在一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列和可变轻链氨基酸序列,其中所述的可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab6B10VH 的质粒中的多核苷酸所编码的 CDR3,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9510;其中所述的可变轻链氨基酸序列包含由命名为 Mab6B10VL 的质粒中的多核苷酸所编码的 CDR3,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9499。

[0066] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列,该可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab6B10VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9510。

[0067] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变轻链氨基酸序列,该可变轻链氨基酸序列包含由命名为 Mab6B10VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9499。

[0068] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含可变重链氨基酸序列和可变轻链氨基酸序列,其中所述的可变重链氨基酸序列包含由命名为 Mab6B10VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9510;其中所述的可变轻链氨基酸序列包含由命名为 Mab6B10VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体 CDR 中的至少一者、至少二者或至少三者,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9499。

[0069] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含由命名为 Mab4. 120VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变重链,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9514。

[0070] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含由命名为 Mab4. 37VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变重链,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9511。

[0071] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含由命名为 Mab6B10VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变重链,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9510。

[0072] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含由命名为 Mab4. 120VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变轻链,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中,编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9513。

[0073] 在另一个实施方案中,本发明的靶向结合剂或抗体包含由命名为 Mab4. 37VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变轻链,其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中

心 (ATCC) 中, 编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9512。

[0074] 在另一个实施方案中, 本发明的靶向结合剂或抗体包含由命名为 Mab6B10VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变轻链, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9499。

[0075] 在另一个实施方案中, 本发明的靶向结合剂或抗体包含由命名为 Mab4. 120VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变重链, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9514, 以及由命名为 Mab4. 120VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变轻链, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9513。

[0076] 在另一个实施方案中, 本发明的靶向结合剂或抗体包含由命名为 Mab4. 37VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变轻链, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9512; 以及由命名为 Mab4. 37VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变重链, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9511。

[0077] 在另一个实施方案中, 本发明的靶向结合剂或抗体包含由命名为 Mab6B10VH 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变重链, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9510, 以及由命名为 Mab6B10VL 的质粒中的多核苷酸所编码的抗体的可变轻链, 其中所述的质粒保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 中, 编号为 2008 年 9 月 17 日的 PTA-9499。

[0078] 应该注意, 本领域的普通技术人员可以容易地完成 CDR 的测定。例如参见 Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3。Kabat 提供了得自多个物种的同种型抗体的免疫球蛋白链的多个序列比对。根据单一的编号系统 (Kabat 编号系统) 对比对的序列进行编号。Kabat 序列从 1991 的出版物开始更新, 并且可以用作电子序列数据库 (最近的可下载的版本 1997)。可以根据 Kabat 通过与 Kabat 参照序列进行比对来对任何免疫球蛋白序列进行编码。因此, Kabat 编码系统提供了用于编码免疫球蛋白链的统一的系统。

[0079] 在一个实施方案中, 所述的靶向结合剂或抗体包含具有表 2 所示重链序列中的任何一者的序列。在另一个实施方案中, 所述的靶向结合剂或抗体包含具有抗体 4. 120, 4. 37 和 6B10 的重链序列中的任何一者的序列。

[0080] 轻链混杂 (promiscuity) 在本领域中是良好建立的, 因此包含以下序列的靶向结合剂或抗体可以进一步包含表 2 中所示的; 或者抗体 4. 120, 4. 37 和 6B10 的; 或者本文中公开的另一种抗体的轻链序列中的任何一者, 其中所述的序列包含抗体 4. 120, 4. 37 和 6B10 的或者本文中所公开的另一种抗体的重链序列中的任何一者。在一些实施方案中, 所述的抗体为全人源单克隆抗体。

[0081] 在一个实施方案中, 所述的靶向结合剂或抗体包含具有表 2 所示的轻链序列中的任何一者的序列。在另一个实施方案中, 所述的靶向结合剂或抗体包含具有抗体 4. 120, 4. 37 和 6B10 轻链序列中的任何一者。在一些实施方案中, 所述的抗体为全人源单克隆抗体。

[0082] 在一些实施方案中, 靶向结合剂是选自 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37,

6B10, 3C1 和 6A6 中的单克隆抗体。在一个实施方案中,靶向结合剂包含全人源单克隆抗体 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37, 6B10, 3C1 和 6A6 中的一种或多种。在某些实施方案中,靶向结合剂是单克隆抗体 4. 120。在某些其他实施方案中,靶向结合剂是单克隆抗体 4. 37。在某些其他实施方案中,靶向结合剂是单克隆抗体 6B10。

[0083] 在一个实施方案中,靶向结合剂或抗体可以包含这样的序列,该序列具有选自表 2 中所示序列中的任何一者的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3。在一个实施方案中,靶向结合剂或抗体可以包含这样的序列,该序列具有选自表 2 中所示序列中的任何一者的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3。在一个实施方案中,靶向结合剂或抗体可以包含这样的序列,该序列具有选自抗体 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37, 6B10, 3C1 和 6A6 的 CDR 中的任何一者的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3。在一个实施方案中,靶向结合剂或抗体可以包含这样的序列,该序列具有选自抗体 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37, 6B10, 3C1 和 6A6 的 CDR 中的任何一者的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3。

[0084] 在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体可以包含这样的序列,该序列具有表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 120, 4. 37 或 6B10 中的 任何一者的 CDR1、CDR2 或 CDR3 中的任何一者。在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体可以包含这样的序列,该序列具有表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 120, 4. 37 或 6B10 中的任何一者的 CDR1、CDR2 或 CDR3 中的任何一者。在一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体可以包含这样的序列,该序列具有表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 120, 4. 37 或 6B10 的 CDR1、CDR2 或 CDR3。在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体可以包含这样的序列,该序列具有表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 120, 4. 37 或 6B10 的 CDR1、CDR2 或 CDR3。在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体可以包含这样的序列,该序列具有表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 120, 4. 37 或 6B10 的 CDR1、CDR2 或 CDR3;以及表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 120, 4. 37 或 6B10 的 CDR1、CDR2 或 CDR3。在一些实施方案中,所述的抗体为全人源单克隆抗体。

[0085] 在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体包含这样的序列,该序列具有表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 120 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列和表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 120 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体包含这样的序列,该序列具有表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 37 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列和表 2 中所示的全人源单克隆抗体 4. 37 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体包含这样的序列,该序列具有表 2 中所示的全人源单克隆抗体 6B10 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列和表 2 中所示的全人源单克隆抗体 6B10 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。在一些实施方案中,所述的抗体为全人源单克隆抗体。

[0086] 本发明的另一个实施方案为包含以下序列的靶向结合剂或抗体,其中所述的序列具有跨越表 2 中所示序列的任何一者的构架区和 CDR(具体而言为 FR1 至 FR4、或者 CDR1 至 CDR3) 的临近序列。在一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体包含这样的序列,该序列具有跨越表 2 中所示的单克隆抗体 4. 120, 4. 37 或 6B10 序列的任何一者的构架区和 CDR(具体而言为 FR1 至 FR4、或者 CDR1 至 CDR3) 的临近序列。在一些实施方案中,所述的抗体为全人源单克隆抗体。

[0087] 在另一个实施方案中,所述的试剂或抗体、或者其抗原结合部分包含 具有 SEQ ID NO. :2 序列的重链多肽。在一个实施方案中,所述的试剂或抗体、或者其抗原结合部分还包

含具有 SEQ ID NO. :4 序列的轻链多肽。在一些实施方案中,所述的抗体为全人源单克隆抗体。

[0088] 一个实施方案提供靶向结合剂或抗体、或者其抗原结合部分,其中所述的试剂或抗体、或者其抗原结合部分包含具有 SEQ ID NO. :26 序列的重链多肽。在一个实施方案中,所述的试剂或抗体、或者其抗原结合部分还包含具有 SEQ ID NO. :28 序列的轻链多肽。在一些实施方案中,所述的抗体为全人源单克隆抗体。

[0089] 在另一个实施方案中,所述的试剂或抗体、或者其抗原结合部分包含具有 SEQ ID NO. :30 序列的重链多肽。在另一个实施方案中,所述的试剂或抗体、或者其抗原结合部分还包含具有 SEQ ID NO. :32 的轻链多肽。在一些实施方案中,所述的抗体为全人源单克隆抗体。

[0090] 在一个实施方案中,在所公开的 CDR、或者重链或轻链框架序列中,所述的靶向结合剂或抗体包含多达 20、16、10、9 或更少(例如 1、2、3、4 或 5 个)的氨基酸添加、取代、删除和/或插入。这种修饰可以潜在地在 CDR 和/或框架序列范围内的任何残基处形成。在一些实施方案中,所述的抗体为全人源单克隆抗体。

[0091] 在一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体包含本文所公开的 CDR 的变体或衍生物、跨越构架区和 CDR 的临近序列(具体而言为 FR1 至 FR4、或者 CDR1 至 CDR3)、本文所公开的轻链或重链序列、或者本文所公开的抗体。变体包含这样的靶向结合剂或抗体,该靶向结合剂或抗体具有在表 2 中所示的 CDR1、CDR2 或 CDR3 的任何一者中具有多达 20、16、10、9 或更少(例如 1、2、3、4、5 或 6 个)的氨基酸添加、取代(例如保守氨基酸取代)、删除和/或插入的序列;跨越表 2 中所示的构架区和 CDR(具体而言为 FR1 至 FR4、或者 CDR1 至 CDR3)的临近序列;本文所公开的轻链或重链序列;或者本文所公开的单克隆抗体。变体包含这样的靶向结合剂或抗体,该靶向结合剂或抗体具有表 2 中所示的 CDR1、CDR2 或 CDR3 中的任何一者的至少大约 60、70、80、85、90、95、98 或大约 99% 氨基酸序列一致性的序列;跨越表 2 中所示的构架区和 CDR(具体而言为 FR1 至 FR4、或者 CDR1 至 CDR3)的临近序列;本文所公开的轻链或重链序列;或者本文所公开的单克隆抗体。两个氨基酸序列的百分率一致性可以通过本领域的技术人员已知的任何方法来测定,包括但不限于成对的蛋白质比对。在一个实施方案中,变体包含在 CDR 序列中或者在本文所公开的轻链或重链多肽中的变化,所述的变化是天然存在的,或者采用重组 DNA 技术或诱变技术对天然序列进行体外基因工程处理而诱导得到的。天然存在的变体包括在针对外源抗原产生抗体的过程中相对于种系核苷酸序列而在体内产生的那些。在一个实施方案中,所述的衍生物可以为异种抗体,其为其中两个或多个抗体被连接到一起而形成的抗体。衍生物包括经过化学修饰的抗体。实例包括一种或多种聚合物形成的共价连接物,例如水溶性的聚合物,N-连接或 O-连接的碳水化合物,糖,磷酸酯和/或其他此类分子。所述的衍生物按照不同于天然存在的或起始抗体的方式进行修饰(按照所附分子的种类或位置)。衍生物还包含删除天然存在于所述抗体上的一个或多个化学基团。

[0092] 在一个实施方案中,所述的靶向结合剂为双特异性抗体。双特异性抗体为对至少两个不同的抗原决定部位具有结合特异性的抗体。用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。(例如参见,Millstein et al, Nature, 305 :537-539(1983); Traunecker et al, EMBO J, 10 :3655-3659(1991); Suresh et al, Methods in Enzymology, 121 :210(1986);

Kostelny et al, J. Immunol, 148(5) :1547-1553(1992) ;Hollinger et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 90 :6444-6448(1993) ;Gruber et al, J. Immunol, 152 :5368(1994) ;美国专利 No. 4, 474, 893 ;4, 714, 681 ;4, 925, 648 ;5, 573, 920 ;5, 601, 81 ;95, 731, 168 ;4, 676, 980 ;和 4, 676, 980, WO 94/04690 ;WO 91/00360 ;WO 92/200373 ;WO 93/17715 ;WO 92/08802 ;和 EP 03089)。在一个例子中,本发明的双特异性抗体是对于至少两个不同 CD105 抗原决定部位具有结合特异性的抗体。由于本发明的多种 CD105 靶向结合剂具有不同的抗原决定部位或者具有部分或重叠的抗原决定部位,因此涵盖本发明的双特异性抗体可包括具有部分或重叠的抗原决定部位的 CD105 靶向结合剂的任意组合。例如,6A6 和 6B10 具有与 4D4 和 10C9 不同的抗原决定部位。在一个例子中,双特异性抗体 6A6 或 6B10 的可变或高变区以及 4D4 或 10C9 的可变或高变区。

[0093] 在本发明的一些实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体包含具有 SEQ ID NO. :26 的序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO. :26 包含表 5 的各行中所示的种系和非种系残基的组合中的任何一者。在一些实施方案中,SEQ ID NO. :26 包含表 5 中所示的种系残基的任何一者、任何二者、或三者或者所有三者。在某些实施方案中,SEQ ID NO. :2 包含表 5 的各行所示的种系和非种系残基的独特组合中的任何一者。在其他实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体衍生自具有 VH3-33、D6-13 和 JH6 结构域的种系序列,其中一个或多个残基已经突变,从而在所述位置处产生相应的种系残基。

[0094] 本发明的另一个实施方案为与本发明的靶向结合剂或抗体竞争性地结合 CD105 的靶向结合剂或抗体。在本发明的另一个实施方案中,存在有与本发明的靶向结合剂或抗体竞争性地结合 CD105 的抗体。在另一个实施方案中,所述的靶向结合剂或抗体与全人源单克隆抗体 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37, 6B10, 3C1 或 6A6 的任何一者竞争性地结合 CD105。“竞争”是指所述的靶向结合剂或抗体与全人源单克隆抗体 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37, 6B10, 3C1 或 6A6 中的任何一者竞争性地结合 CD105,即,竞争是非单向性的。

[0095] 本发明的实施方案包含与全人源单克隆抗体 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37, 6B10, 3C1 或 6A6 中的任何一者交叉竞争以结合 CD105 的靶向结合剂或抗体。“交叉竞争”是指与全人源单克隆抗体 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37, 6B10, 3C1 或 6A6 中的任何一者竞争性地结合 CD105 的靶向结合剂或抗体,反之,即,竞争是指双向性的。

[0096] 本发明的另一个实施方案为竞争性地结合 CD105 的靶向结合剂或抗体。在本发明的另一个实施方案中,存在有与本发明的靶向结合剂或抗体交叉竞争性地结合 CD105 的靶向结合剂或抗体。

[0097] 本发明的另一个实施方案为与本发明的靶向结合剂或抗体相同的 CD105 上的抗原决定部位相结合的靶向结合剂或抗体。本发明的实施方案还包括与全人源单克隆抗体 4. 120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4. 37, 6B10, 3C1 或 6A6 中的任何一者的 CD105 上相同的抗原决定部位相结合的靶向结合剂或抗体。

[0098] 本发明的其他实施方案包括编码本文所述的靶向结合剂或抗体中的任何一者的经分离的核酸分子、具有编码本文所述的靶向结合剂或抗体的经分离的核酸分子的载体、或者使用这种核酸分子的任何一者的转化的宿主细胞。本发明的实施方案包括这样的核酸分子,该核酸分子编码特异性地与 CD105 相结合并抑制 CD105 配体例如 TGF- β 与 CD105 受

体相结合的全人源经分离的靶向结合剂。本发明还涵盖了在如本文所定义的严格或严格程度较低的杂交条件下与编码本文所述的靶向结合剂或抗体中的任何一者的多核苷酸相杂交的多核苷酸。本发明的实施方案还包括具有编码所述结合剂的核酸分子的载体。其他实施方案包括具有所述载体（包含所述的核酸分子）的宿主细胞。

[0099] 如本领域已知的那样，抗体可以有利地为（例如）多克隆、寡克隆、单克隆、嵌合的、人源的和 / 或全人源的抗体。

[0100] 应该理解的是，本发明的实施方案不限于任何特定形式的抗体或者生成或制备方法。在本发明的一些实施方案中，所述的靶向结合剂为全人源单克隆抗体的结合片段。例如，所述的靶向结合剂可以为全长的抗体（例如具有完整的人源 Fc 区域）或者抗体结合片段（例如 Fab、Fab' 或 F(ab')₂、FV 或者 dAb）。此外，所述的抗体可以为单一结构域的抗体，例如与 CD105 结合的 camelid 或人源单一 VH 或 VL 结构域（例如 dAb 片段）。

[0101] 本文所述的本发明的实施方案还提供了用于制备所述这些抗体的细胞。细胞的实例包括杂交瘤细胞、重组创建的细胞（例如中国仓鼠卵细胞（CHO））、CHO 细胞的变体（例如 DG44）以及产生对抗 CD105 的抗体的 NS0 细胞。关于 CHO 细胞的变体的其他信息可以在 Andersen and Reilly(2004)Current Opinion in Biotechnology 15,456-462 中找到，该文献以引用方式全文并入本文。所述的抗体可以由分泌所述抗体的杂交瘤细胞、或者由重组的基因工程细胞（其经编码所述抗体的基因转化或转染）制得。

[0102] 此外，本发明的一个实施方案为通过在核酸分子被表达从而制得所述抗体、然后回收所述抗体的条件下培养宿主细胞来制备本发明的抗体的方法。应该认识到，本发明的实施方案还包括可以编码本发明的抗体或抗体片段的任何核酸分子（包括当被转染到用于抗体制备的宿主细胞中时被优化用于提高抗体及其片段的核酸序列的产量）。

[0103] 本发明的另一个实施方案包括通过使用表达人源 CD105 的细胞免疫哺乳动物、分离含有人源 CD105 的细胞膜、纯化出人源 CD105 或其片段 和 / 或一个或多个定向进化同源序列或其片段来制备与 CD105 特异性结合并抑制 CD105 的生物学活性的抗体的方法。

[0104] 在其他实施方案中，本发明提供了组合物，该组合物包含本发明的靶向结合剂或抗体或者其结合片段、以及可药用的载体或稀释剂。

[0105] 本发明的又一个实施方案包括通过对动物给药治疗有效剂量的、特异性结合 CD105 的靶向结合剂来有效地治疗患有血管原增殖性疾病的动物的方法。在某些实施方案中，所述的方法还包括选择需要治疗肿瘤、癌症和 / 或细胞增殖紊乱的动物，以及向这些动物给药治疗有效剂量的、特异性结合 CD105 的靶向结合剂。

[0106] 本发明的又一个实施方案包括通过对动物给药治疗有效剂量的、特异性结合 CD105 的靶向结合剂来有效地治疗患有增生性疾病的动物的方法。在某些实施方案中，所述的方法还包括选择需要治疗增生性疾病的动物，以及向这些动物给药治疗有效剂量的、特异性结合 CD105 的靶向结合剂。

[0107] 本发明的又一个实施方案包括通过对动物给药治疗有效剂量的、特异性结合 CD105 的靶向结合剂来有效地治疗患有恶性肿瘤的动物的方法。在某些实施方案中，所述的方法还包括选择需要治疗恶性肿瘤的动物，以及向这些动物给药治疗有效剂量的、特异性结合 CD105 的靶向结合剂。

[0108] 本发明的又一个实施方案包括通过对动物给药治疗有效剂量的、特异性结合

CD105 的靶向结合剂来有效地治疗患有与 CD105 表达有关的疾病或状况的动物的方法。在某些实施方案中,所述的方法还包括选择需要治疗与 CD105 表达有关的疾病或状况的动物,以及向这些动物给药治疗有效剂量的、特异性结合 CD105 的靶向结合剂。

[0109] 恶性肿瘤可以选自:黑素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、肝细胞(肝)癌、甲状腺肿瘤、胃部(胃)癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌、成胶质细胞瘤、子宫内膜癌、肾癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头部和颈部的癌症、间皮瘤、肉瘤、胆管癌(胆管细胞癌)、小肠腺癌、小儿恶性肿瘤(pediatric malignancy)以及扁平上皮癌。

[0110] 可治疗的增殖性或血管原疾病包括赘生性疾病,例如黑素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、晚期非小细胞肺癌、肝细胞(肝)癌、甲状腺肿瘤、胃部(胃)癌、胆管癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肾细胞癌、肺癌、成胶质细胞瘤、子宫内膜癌、肾癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头部和颈部的癌症、间皮瘤、肉瘤、胆管癌(胆管细胞癌)、小肠腺癌、小儿恶性肿瘤、扁平上皮癌和白血病(包括慢性粒细胞白血病)。

[0111] 在一个实施方案中,本发明的靶向结合剂可用于治疗实体瘤,包括肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、卵巢癌、肝细胞癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、食道癌。

[0112] 在一个实施方案中,本发明适用于抑制具有肿瘤的患者中的 CD105,所述肿瘤单独或部分依赖于 CD105。

[0113] 本发明的又一个实施方案包括本发明的靶向结合剂或抗体在制备用于治疗患有增殖或血管原相关性疾病的动物的药剂中的用途。在某些实施方案中,所述的用途还包括选择需要治疗增殖或血管原相关性疾病的动物。

[0114] 本发明的又一个实施方案包括本发明的靶向结合剂或抗体在制备用于治疗患有赘生性疾病的动物的药剂中的用途。在某些实施方案中,所述的用途还包括选择需要治疗赘生性疾病的动物。

[0115] 本发明的又一个实施方案包括本发明的靶向结合剂或抗体在制备用于治疗患有非赘生性疾病的动物的药剂中的用途。在某些实施方案中,所述的用途还包括选择需要治疗非赘生性疾病的动物。

[0116] 本发明的又一个实施方案包括本发明的靶向结合剂或抗体在制备用于治疗患有恶性肿瘤的动物的药剂中的用途。在某些实施方案中,所述的用途还包括选择需要治疗恶性肿瘤的动物。

[0117] 本发明的又一个实施方案包括本发明的靶向结合剂或抗体在制备用于治疗患有 CD105 表达相关性疾病或状况的动物的药剂中的用途。在某些实施方案中,所述的用途还包括选择需要治疗 CD105 表达相关性疾病或状况的动物。

[0118] 本发明的又一个实施方案包括用作用于治疗患有增殖或血管原相关性疾病的动物的药剂的、本发明的靶向结合剂或抗体。

[0119] 本发明的又一个实施方案包括用作用于治疗患有赘生性疾病的动物的药剂的、本发明的靶向结合剂或抗体。

[0120] 本发明的另一个实施方案包括用作用于治疗患有恶性肿瘤的动物的药剂的、本发明的靶向结合剂或抗体。

[0121] 本发明的又一个实施方案包括用作用于治疗患有 CD105 表达相关性疾病或状况的动物的药剂的、本发明的靶向结合剂或抗体。

[0122] 本发明的又一个实施方案包括用作用于治疗患有 CD105 诱导疾病的动物的药剂的、本发明的靶向结合剂或抗体。

[0123] 在一个实施方案中,治疗

[0124] 增殖或血管原相关性疾病

[0125] 赘生性疾病;

[0126] 恶性肿瘤;

[0127] 眼病;

[0128] 慢性炎症疾病;

[0129] 与 CD105 表达有关的疾病或状况;或者

[0130] 包括管理、减轻、抑制任何上述疾病或状况。

[0131] 在一个实施方案中,赘生性疾病的治疗包括肿瘤生长的抑制、肿瘤生长的延迟、肿瘤的衰退、肿瘤的收缩、在治疗终止时肿瘤再次生长的时间的增长、肿瘤复发的时间的增长、疾病进程的减慢。

[0132] 在本发明的一些实施方案中,所述的待治疗的动物为人。

[0133] 在本发明的一些实施方案中,所述的靶向结合剂为全人源单克隆抗体。

[0134] 在本发明的一些实施方案中,所述的靶向结合剂选自全人源单克隆抗体 4.120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4.37, 6B10, 3C1 和 6A6。

[0135] 本发明的实施方案包括含有本文所述的靶向结合剂与治疗剂的缀合物。在本发明的一些实施方案中,所述的治疗剂为毒素。在其他实施方案中,所述的治疗剂为放射性同位素。在其他实施方案中,所述的治疗剂为药物组合物。

[0136] 在另一个方面中,提供了选择性地杀死患者中的癌细胞的方法。所述的方法包括向患者给药全人源抗体缀合物。该全人源抗体缀合物包括可以与 CD105 结合的抗体、以及试剂。所述的试剂为毒素、放射性同位素或者会杀死癌细胞的另一种物质。因此,所述的抗体缀合物选择性地杀死癌细胞。

[0137] 在一个方面中,提供了特异性地结合 CD105 的缀合全人源抗体。所述的抗体附着在试剂上,并且抗体与细胞相结合使得所述的试剂被传递给细胞。在一个实施方案中,上述缀合全人源抗体与 CD105 的细胞外结构域结合。在另一个实施方案中,所述的抗体与缀合的毒素被表达 CD105 的细胞内化。在另一个实施方案中,所述的试剂为细胞毒性试剂。在另一个实施方案中,所述的试剂为(例如)皂草素、auristatin、假单胞菌外毒素、白树毒素、蓖麻毒素、刺孢毒素、或者基于美登素的免疫缀合物等。在另一个实施方案中,所述的试剂为放射性同位素。

[0138] 本发明的靶向结合剂或抗体可以单独给药,或者可以与其他抗体、化疗药品或放疗结合给药。例如,阻断细胞粘附、侵入、血管生成或增殖的 CD105 抗体的单克隆、寡克隆或多克隆混合物可以与表现出可抑制肿瘤细胞增殖的药品结合给药。此外,本发明的 CD105 靶向剂可以用于其他化疗治疗(例如包含抗-VEGF 试剂的治疗)失效的患者中。

[0139] 本发明的另一个实施方案包括诊断疾病或状况的方法,其中本文所述的抗体用于检测患者或患者样品中 CD105 的水平。在一个实施方案中,所述的患者样品为血液、血清或尿液。在另一个实施方案中,列出了检测风险因子、诊断疾病以及疾病分段的方法,其中涉及使用抗 CD105 抗体检测 CD105 的表达和/或过表达。在一些实施方案中,所述的方法包

括向患者给药与细胞上的 CD105 选择性地结合的全人源抗体缀合物。所述的抗体缀合物包含特异性地与 CD105 相结合的抗体以及标记。所述的方法还包括观察患者中所述标记的存在情况。标记的量相对高表明所述疾病的风险相对高,而标记的量相对低表明所述疾病的风险相对低。在一个实施方案中,所述的标记为绿色荧光蛋白质。

[0140] 本发明还提供了测定患者样品中 CD105 水平的方法,包括将本文所述的抗体与得自患者的生物学样品相接处,以及检测所述样品中所述抗体与 CD105 之间的结合水平。在更具体的实施方案中,所述的生物学样品为血液、血浆或血清。

[0141] 本发明的另一个实施方案包括通过将所述的血清或细胞与本文所述的抗体相接触、然后检测 CD105 的存在情况来诊断与细胞中 CD105 的表达有关的状况的方法。在一个实施方案中,所述的状况可以为增殖、血管 原性、细胞粘附或侵入相关性疾病,包括但不限于赘生性疾病。

[0142] 在另一个实施方案中,本发明包括用于检测哺乳动物组织、细胞或体液中的 CD105 以筛查 CD105 相关性疾病的测试试剂盒。所述的试剂盒包括本文所述的抗体以及用于表明所述抗体与 CD105(如果存在的话)的反应情况的手段。在一个实施方案中,与 CD105 相结合的抗体被标记。在另一个实施方案中,所述的抗体为未标记的初级抗体,而所述的试剂盒还包含用于检测所述初级抗体的手段。在一个实施方案中,所述的检测手段包括作为抗免疫球蛋白的经标记的第二抗体。所述的抗体可以用选自荧光色素、酶、放射性核以及非透过性材料的标志物来标记。

[0143] 在一些实施方案中,可以对本文所公开的靶向结合剂或抗体进行修饰,从而增强它们结合补体及参与补体依赖的细胞毒性 (CDC) 的能力。在其他实施方案中,可以对所述的靶向结合剂或抗体进行修饰,从而增强它们活化效应器细胞及参与抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 的能力。在其他实施方案中,可以对本文所述的靶向结合剂或抗体进行修饰,从而增强它们活化效应器细胞及参与抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 的能力,以及增强它们结合补体及参与补体依赖的细胞毒性 (CDC) 的能力。

[0144] 在一些实施方案中,可以对本文所公开的靶向结合剂或抗体进行修饰,从而降低它们结合补体及参与补体依赖的细胞毒性 (CDC) 的能力。在其他实施方案中,可以对所述的靶向结合剂或抗体进行修饰,从而降低它们活化效应器细胞及参与抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 的能力。在其他实施方案中,可以对本文所述的靶向结合剂或抗体进行修饰,从而降低它们活化效应器细胞及参与抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 的能力,以及降低它们结合补体及参与补体依赖的细胞毒性 (CDC) 的能力。

[0145] 在某些实施方案中,本文所公开的靶向结合剂或抗体的半衰期以及本发明的组合物的半衰期为至少大约 4 至 7 天。在某些实施方案中,本文所公开的靶向结合剂或抗体的平均半衰期以及本发明的组合物的平均半衰期为至少大约 2 至 5 天、3 至 6 天、4 至 7 天、5 至 8 天、6 至 9 天、7 至 10 天、8 至 11 天、8 至 12 天、9 至 13 天、10 至 14 天、11 至 15 天、12 至 16 天、13 至 17 天、14 至 18 天、15 至 19 天、或者 16 至 20 天。在其他实施方案中,本文所公开的靶向结合剂或抗体的平均半衰期以及本发明的组合物的平均半衰期为至少大约 17 至 21 天、18 至 22 天、19 至 23 天、20 至 24 天、21 至 25 天、22 至 26 天、23 至 27 天、24 至 28 天、25 至 29 天、或者 26 至 30 天。在另一个实施方案中,本文所公开的靶向结合剂或抗体的半衰期以及本发明的组合物的半衰期可以为至多大约 50 天。在某些实施方案中,抗体的半

衰期以及本发明的组合物的半衰期可以通过本领域已知的方法延长。这种延长转而可以降低所述抗体组合物的定量给药的量和 / 或频率。具有改善的体内半衰期的抗体以及制备这些抗体的方法在美国专利 No. 6, 277, 375、以及国际公开 No. WO 98/23289 和 WO 97/3461 中有所公开。

[0146] 在另一个实施方案中, 本发明提供了具有容器的制造制品。所述的容器包含装有本文所公开的靶向结合剂或抗体的组合物, 以及表明所述组合物可以用于治疗细胞粘附、侵入、血管生成和 / 或增殖相关性疾病 (包括但不限于由 CD105 表达或过表达所表征的疾病) 的包装插入物或标记。

[0147] 在其他实施方案中, 本发明提供了试剂盒, 该试剂盒包含装有本文所公开的靶向结合剂或抗体的组合物、以及向需要治疗的受试对象给药所述组合物的说明书。

[0148] 本发明提供了包含变体 Fc 区域的蛋白质的配制物。即, 非天然存在的 Fc 区域, 例如包含一个或多个非天然存在的氨基酸残基的 Fc 区域。此外, 本发明的变体 Fc 区域还涵盖了包含氨基酸删除、添加和 / 或修饰的 Fc 区域。

[0149] 可以通过增加 Fc 区域对 FcRn 的结合亲和性来增长包含 Fc 区域的蛋白质的血清半衰期。在一个实施方案中, 与同类分子相比, Fc 变体蛋白质增长了血清半衰期。

[0150] 在另一个实施方案中, 本发明提供了 Fc 变体, 其中所述的 Fc 区域在选自 239、330 和 332 (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处包含至少一个非天然存在的氨基酸。在具体的实施方案中, 本发明提供了 Fc 变体, 其中所述的 Fc 区域包含至少一个选自 239D、330L 和 332E (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的非天然存在的氨基酸。可选地, 所述的 Fc 区域还可以在选自 252、254 和 256 (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处包含添加的非天然存在的氨基酸。在具体的实施方案中, 本发明提供了 Fc 变体, 其中所述的 Fc 区域包含至少一个选自 239D、330L 和 332E (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的非天然存在的氨基酸, 以及在选自 252Y、254T 和 256E (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处的至少一个非天然存在的氨基酸。

[0151] 在另一个实施方案中, 本发明提供了 Fc 变体, 其中所述的 Fc 区域在选自 234、235 和 331 (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处包含至少一个非天然存在的氨基酸。在具体的实施方案中, 本发明提供了 Fc 变体, 其中所述的 Fc 区域包含至少一个选自 234F、235F、235Y 和 331S (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的非天然存在的氨基酸。在另一个具体的实施方案中, 本发明的 Fc 变体包含 234F、235F 和 331S (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 非天然存在的氨基酸残基。在另一个具体的实施方案中, 本发明的 Fc 变体包含 234F、235Y 和 331S (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 非天然存在的氨基酸。可选地, 所述的 Fc 区域还可以在选自 252、254 和 256 (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处包含添加的非天然存在的氨基酸。在具体的实施方案中, 本发明提供了 Fc 变体, 其中所述的 Fc 区域包含至少一个选自 234F、235F、235Y 和 331S (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的非天然存在的氨基酸; 以及在选自 252Y、254T 和 256E (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处的至少一个非天然存在的氨基酸。

[0152] 在另一个实施方案中, 本发明提供了 Fc 变体蛋白质配制物, 其中所述的 Fc 区域在选自 239、330 和 332 (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处包含至少一个非天然存在的氨基酸。在具体的实施方案中, 本发明提供了 Fc 变体蛋白质配制物, 其中

所述的 Fc 区域包含至少一个选自 239D、330L 和 332E (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的非天然存在的氨基酸。可选地,所述的 Fc 区域还可以在选自 252、254 和 256 (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处包含添加的非天然存在的氨基酸。在具体的实施方案中,本发明提供了 Fc 变体蛋白质配制物,其中所述的 Fc 区域包含至少一个选自 239D、330L 和 332E (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的非天然存在的氨基酸,以及在选自 252Y、254T 和 256E (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处的至少一个非天然存在的氨基酸。

[0153] 在另一个实施方案中,本发明提供了 Fc 变体蛋白质配制物,其中所述的 Fc 区域在选自 234、235 和 331 (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处包含至少一个非天然存在的氨基酸。在具体的实施方案中,本发明提供了 Fc 变体蛋白质配制物,其中所述的 Fc 区域包含至少一个选自 234F、235F、235Y 和 331S (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的非天然存在的氨基酸。可选地,所述的 Fc 区域还可以在选自 252、254 和 256 (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处包含添加的非天然存在的氨基酸。在具体的实施方案中,本发明提供了 Fc 变体蛋白质配制物,其中所述的 Fc 区域包含至少一个选自 234F、235F、235Y 和 331S (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的非天然存在的氨基酸;以及在选自 252Y、254T 和 256E (按照 Kabat 列出的 EU 索引编号) 中的一个或多个位置处的至少一个非天然存在的氨基酸。

[0154] 用于生成非天然存在的 Fc 区域的方法是本领域已知的。例如,氨基酸的取代和 / 或删除可以通过突变方法生成,包括但不限于定点突变 (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492(1985))、PCR 突变 (Higuchi, in "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp. 177-183(1990))、盒式突变 (Wells et al, Gene 34:315-323(1985))。优选的是,定点突变是通过重叠延伸 PCR 方法来进行的 (Higuchi, in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York, pp. 61-70(1989))。重叠延伸 PCR (Higuchi, ibid.) 技术还可以用于向靶向序列 (起始 DNA) 中引入任何所需的突变。例如,在重叠延伸方法中 PCR 的第一个循环涉及使用外引物 (引物 1) 和内突变引物 (引物 3)、以及分开的第二外引物 (引物 4) 和内引物 (引物 2) 来扩增靶向序列,从而产生两条 PCR 节段 (节段 A 和 B)。内突变引物 (引物 3) 被设计成包含与靶向序列的错配,从而指定了所需的突变。在 PCR 的第二个循环中,通过使用所述的两个外引物 (引物 1 和 4) 进行 PCR 而扩增得到第一个 PCR 循环的产物 (节段 A 和 B)。使用限制性酶对所得的全长 PCR 节段 (节段 C) 进行水解,并将所得的限制性片段克隆到合适的载体中。作为突变的第一个步骤,将起始 DNA (例如编码 Fc 融合蛋白质、抗体或者简单的 Fc 区域) 可操作地克隆到突变载体中。所述的引物被设计成反应了所需的氨基酸取代。用于生成变体 Fc 区域的其他方法是本领域已知的 (例如参见美国专利 No. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; 美国专利公开 No. 2004/0002587 以及 PCT 公开 WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351)。

[0155] 在本发明的一些实施方案中,本文所提供的抗体的糖基化模式被修改,以增强 ADCC 和 CDC 效应器的功能。参见 Shields RL et al, (2002) JBC. 277:26733; Shinkawa T

et al, (2003) JBC. 278 :3466 和 Okazaki A et al, (2004) J. Mol. Biol., 336 :1239。在一些实施方案中, Fc 变体蛋白质包含一个或多个基因工程化的糖型, 即, 碳水化合物组合物以共价方式与包含 Fc 区域的分子相连。基因工程化的糖型可以用于多种目的, 包括但不限于增强或降低效应器的功能。基因工程化的糖型可以通过本领域的技术人员已知的任何方法生成, 例如通过采用基因工程化的或变体表达的菌株, 通过与一种或多种酶 (例如 DI N- 乙酰基氨基葡萄糖转移酶 III (GnTI11)) 共表达, 通过在多种有机体或得自多种有机体的细胞系中表达包含 Fc 区域的分子, 或者通过在包含 Fc 区域的分子已经被表达之后对碳水化合物进行修饰。用于生成基因工程化的糖型的方法是本领域已知的, 并且包括但不限于在 Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17 :176-180 ; Davies et al, 20017 Biotechnol Bioeng 74 : 288-294 ; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277 :26733-26740 ; Shinkawa et al, 2003, J Biol Chem 278 :3466-3473) 美国专利 No. 6, 602, 684 ; 美国系列号 No. 10/277, 370 ; 美国系列号 No. 10/113, 929 ; PCT WO 00/61739A1 ; PCT WO 01/292246A1 ; PCT WO 02/311140A1 ; PCT WO 02/30954A1 ; Potillegent™ technology (Biowa, Inc. Princeton, N. J.) ; GlycoMAb™ glycosylation engineering technology (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)。例如参见 WO 00061739 ; EA01229125 ; US 20030115614 ; Okazaki et al, 2004, JMB, 336 :1239-49 中所描述的那些。

[0156] 因此, 在一个实施方案中, 本发明的抗 -CD105 抗体的 Fc 区域包含氨基酸残基的改变的糖基化。在另一个实施方案中, 氨基酸残基的改变的糖基化导致降低的效应器的功能。在另一个实施方案中, 氨基酸残基的改变的糖基化导致增加的效应器的功能。在特定实施方案中, Fc 区域具有降低的岩藻糖基化。在另一个实施方案中, Fc 区域是非岩藻糖基化的 (afucosylated) (例如参见美国专利申请公开 No. 2005/0226867)。在一个方面, 这些具有增加的效应器的功能的抗体, 具有而言为 ADCC, 产生在宿主细胞 (例如 CHO 细胞, Lemna minor), 其被工程化以产生高度去岩藻糖基化抗体, 所述抗体和由亲代细胞产生的抗体相比具有超过 100 倍高的 ADCC (Mori et al., 2004, Biotechnol Bioeng 88 :901-908 ; Cox et al., 2006, Nat Biotechnol., 24 :1591-7)。

[0157] 本领域还已知 Fc 区域的糖基化可以被修饰, 以增强或降低效应器的功能 (例如参见 Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17 :176-180 ; Davies et al, 2001, Biotechnol Bioeng 74 :288-294 ; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277 :26733-26740 ; Shinkawa et al, 2003, J Biol Chem 278 :3466-3473) 美国专利 No. 6, 602, 684 ; 美国序列 .No. 10/277, 370 ; 美国序列 .No. 10/113, 929 ; PCT WO 00/61739A1 ; PCT WO 01/292246A1 ; PCT WO 02/311140A1 ; PCT WO 02/30954A1 ; Potillegent™ technology (Biowa, Inc. Princeton, N. J.) ; GlycoMAb™ glycosylation engineering technology (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland))。因此, 在一个实施方案中, 本发明的抗体的 Fc 区域包含糖基化被改变的氨基酸残基。在另一个实施方案中, 糖基化被改变的氨基酸使得效应器的功能降低。在另一个实施方案中, 糖基化被改变的氨基酸残基使得效应器的功能增强。在具体的实施方案中, 所述的 Fc 区域具有减少的岩藻糖基化。在另一个实施方案中, 所述的 Fc 区域为岩藻糖基化的 (例如参见美国专利申请公开 No. 2005/0226867)。

[0158] 附图简述

[0159] 图 1 示出柱状图,其表示抗体 4.37 和 4.120 的 HUVEC 增殖测定的结果。

[0160] 图 2 示出柱状图,其表示抗体 4D4,6A6,6B1,6B10,11H2,9H10,3C1 和 10C9 的 HUVEC 增殖测定的结果。

[0161] 图 3 示出柱状图,其表示抗体 4D4,6B1,6B10 和 10C9 对于血管长度 (mm) 和分叉数量的影响。

[0162] 图 4 示出柱状图,其表示结合研究的结果。具体而言,抗体 4D4,6A6,6B1,6B10,11H2,9H10,3C1,4.37,4.120 和 10C9 能够阻断 SN6 结合 HUVEC 细胞。

[0163] 图 5 示出柱状图,其表示对于抗体 4.120,4D4,6B10 和 4.37 而言测量血红蛋白 (hb) 含量的 Colo205 基质胶塞测定的结果。

[0164] 图 6 示出柱状图,其表示对于抗体 4.120,4D4,6B10 和 4.37 而言测量阳性 CD31 染色的 Colo205 基质胶塞测定的结果。

[0165] 图 7 示出柱状图,其表示抗体 4D4,6A6,6B1,6B10,11H2,9H10,3C1,4.37,4.120 和 10C9 的 ADCC 活性。

[0166] 图 8 示出柱状图,其表示抗体 4.120 的 CDC 活性。

[0167] 图 9 示出柱状图,其表示抗体 4D4,6A6,6B1,6B10,11H2,9H10,3C1,4.37,4.120 和 10C9 的内在化结果。

[0168] 发明详述

[0169] 本发明的实施方案涉及能够抑制 TGF- β 信号传导的一组新型的 CD105 阻断分子,例如抗体。这种分子可以以单一试剂的形式使用、或者可选择地与其他结合抗体 / 试剂组合使用。此外,它们还可以与任何标准品或新型抗癌试剂组合使用。

[0170] 本发明的实施方案涉及与 CD105 相结合的靶向结合剂。在一些实施方案中,所述的靶向结合剂与 CD105 相结合,并抑制 CD105 配体例如 TGF- β 与其受体 CD105 相结合。在一些实施方案中,这种结合可以中和、阻断、抑制、消除或干扰 CD105 相关作用的一个或多个方面。在一个实施方案中,所述的靶向结合剂为单克隆抗体或其结合片段。本文中,这种单克隆抗体可以被称为抗 CD105 的抗体。

[0171] 本发明的其他实施方案包括全人源抗 CD105 的抗体,以及具有治疗用途的抗体制备物。在一个实施方案中,本发明的抗 CD105 抗体的制备物具有所需的治疗性质,包括对 CD105 的强的结合亲和性、促进内皮细胞凋亡或抑制内皮细胞增殖的能力、调制细胞骨架的形成、抑制管的形成、以及通过 ADCC 和 / 或 CDC 活性诱导内皮细胞的细胞毒性的能力。

[0172] 此外,本发明的实施方案包括使用所述的这些抗体来治疗疾病的方法。本发明的抗 CD105 的抗体可以用于预防 CD105 介导的肿瘤细胞的增殖和健康组织的肿瘤侵入。另外,CD105 抗体可以用于治疗和血管生成有关的疾病,例如眼病如 AMD、炎症性疾病如风湿性关节炎、和心血管疾病与败血症、以及赘生性疾病。可以表征为任何类型的恶性肿瘤 (包括转移性癌症、淋巴肿瘤以及血癌) 的任何疾病也都可以通过这种抑制机制来进行治疗。人类中示例性的癌症包括膀胱肿瘤、肾细胞癌、乳腺肿瘤、前列腺肿瘤、基细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑和 CNS 癌 (例如神经胶质肿瘤)、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠和直肠癌、结缔组织癌、消化系统的癌症;子宫内膜癌、食管癌;眼癌;头部和颈部的癌症;胃部的癌症;上皮内赘生物;肾癌;喉癌;白血病;肝癌;肺癌 (例如小细胞和非小细胞);淋巴瘤,包括 Hodgkin 或非 Hodgkin 淋巴瘤;黑素瘤;骨髓瘤、成神经细胞瘤、口腔癌 (例如唇、舌、口和咽);卵巢

癌；胰腺癌、视网膜母细胞瘤；横纹肌肉瘤；直肠癌、肾癌、呼吸系统的癌症；肉瘤、皮肤癌；胃癌、睾丸癌、甲状腺癌；子宫癌、泌尿系统的癌症以及其他癌症和肉瘤。通常在狗、猫和其他宠物中诊断的恶性紊乱包括但不限于淋巴肉瘤、骨肉瘤、乳房肿瘤、肥大细胞瘤、脑肿瘤、黑素瘤、腺鳞癌、良性的肺部肿瘤、支气管腺肿瘤、细支气管腺癌、纤维瘤、粘液软骨瘤、肺部肉瘤、神经肉瘤、骨瘤、刺瘤、视网膜母细胞瘤、Ewing 肉瘤、Wilm 肿瘤、Burkitt 淋巴瘤、小神经胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、破骨细胞瘤、口腔瘤形成、纤维肉瘤、骨肉瘤和横纹肌肉瘤、生殖器鳞状细胞癌、传染性性病肿瘤、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、Sertoli 细胞肿瘤、血管外皮细胞瘤、组织细胞瘤、绿色瘤（例如粒细胞肉瘤）、角膜刺瘤、角膜鳞状细胞癌、血管肉瘤、胸膜间皮瘤、基细胞肿瘤、胸腺瘤、胃部肿瘤、肾上腺癌、口腔多发性乳头瘤、血管内皮瘤和囊腺瘤、毛囊淋巴瘤、小肠淋巴瘤、纤维肉瘤和肺部鳞状细胞癌。在啮齿动物（例如雪貂）中，示例性的癌症包括胰岛瘤、淋巴瘤、肉瘤、神经瘤、胰腺岛细胞肿瘤、胃部 MALT 淋巴瘤和胃腺瘤。影响农业牲畜的瘤形成包括白血病、血管外皮细胞瘤和牛眼部的瘤形成（在牛中）；包皮纤维肉瘤、溃疡性鳞状细胞癌、包皮癌、结缔组织瘤形成和肥大细胞瘤（在马中）；肝细胞癌（在猪中）；淋巴瘤和肺部腺瘤病（在羊中）；肺部肉瘤、淋巴瘤、Rous 肉瘤、成血细胞综合症、纤维肉瘤、肾母细胞瘤、B 细胞淋巴瘤和淋巴白血病性增生（在鸟类物种中）；视网膜母细胞瘤、肝脏的瘤形成、淋巴肉瘤（成淋巴细胞的淋巴瘤）、类浆细胞白血病和浮囊肉瘤（在鱼中）、干酪样淋巴结炎（CLA）；由细菌假结核棒杆菌（*Corynebacterium pseudotuberculosis*）引起的绵羊和山羊的慢性感染性传染病、以及由南非羊肺炎引起的绵羊的传染性肺部肿瘤。

[0173] 本发明的其他实施方案包括用于特异性检测生物学样品中 CD105 的数量的诊断性测试。所述的测试试剂盒可以包括本文所公开的靶向结合剂或抗体以及用于检测这些抗体的必要性的标记。这些诊断性测试可用于筛查细胞粘附、侵入、血管生成或增殖相关性疾病，包括但不限于赘生性疾病。

[0174] 本发明的另一个方面为 CD105 的生物学活性的拮抗剂，其中所述的拮抗剂能够与 CD105 结合。在一个实施方案中，所述的拮抗剂为靶向结合剂，例如抗体。所述的拮抗剂可以选自本文所述的抗体，例如抗体 4.120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4.37, 6B10, 3C1 和 6A6。

[0175] 在一个实施方案中，所述的 CD105 的生物学活性的拮抗剂可以与 CD105 相结合，并由此抑制或阻止配体与 CD105 受体相结合，由此抑制肿瘤血管生成和 / 或细胞增殖。

[0176] 一个实施方案为与全人源单克隆抗体 4.120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4.37, 6B10, 3C1 和 6A6 相同的一个或多个抗原决定部位相结合的靶向结合剂。

[0177] 一个实施方案为与全人源单克隆抗体 4.120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4.37, 6B10, 3C1 和 6A6 相同的一个或多个抗原决定部位相结合的抗体。

[0178] 一个实施方案为能够产生上文所述的靶向结合剂的杂交瘤细胞。在一个实施方案中，为能够产生上文所述的抗体的轻链和 / 或重链的杂交瘤细胞。在一个实施方案中，所述的杂交瘤细胞能够产生全人源单克隆抗体的轻链和 / 或重链。在另一个实施方案中，所述的杂交瘤细胞能够产生全人源单克隆抗体 4.120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4.37, 6B10, 3C1 和 6A6 的轻链和 / 或重链。可选择地，所述的杂交瘤细胞可以产生这样的抗体，该抗体能够与全人源单克隆抗体 4.120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4.37, 6B10, 3C1 和 6A6 相同的一个或多个抗原决定部位相结合。

[0179] 另一个实施方案为编码上文所述的靶向结合剂的核酸分子。在一个实施方案中，为编码上文所述的抗体的轻链或重链的核酸分子。在一个实施方案中，所述的核酸分子编码了全人源单克隆抗体的轻链或重链。另一个实施方案为编码选自抗体 4.120, 9H10, 10C9, 4D4, 11H2, 6B1, 4.37, 6B10, 3C1 和 6A6 中的全人源单克隆抗体的轻链或重链的核酸分子。

[0180] 本发明的另一个实施方案为包含一个或多个上文所述的核酸分子的载体，其中所述的载体编码了上文所述的靶向结合剂。在本发明的一个实施方案中，为包含一个或多个上文所述的核酸分子的载体，其中所述的载体编码了上文所述的抗体的轻链和 / 或重链。

[0181] 本发明的另一个实施方案为包含上文所述的载体的宿主细胞。可选择地，所述的宿主细胞可以包含多于一个的载体。

[0182] 此外，本发明的一个实施方案为通过在其中核酸分子被表达从而产生所述的靶向结合剂、然后回收所述的靶向结合剂的条件下来培养宿主细胞来制备本发明的靶向结合剂的方法。在本发明的一个实施方案中通过核酸分子被表达从而产生所述的抗体、然后回收所述的抗体的条件下培养宿主细胞来制备本发明的抗体的方法。

[0183] 在一个实施方案中，本发明包括通过用编码上文所述的靶向结合剂的至少一个核酸分子转染至少一个宿主细胞、在所述的宿主细胞中表达所述的核酸分子以及分离所述的靶向结合剂来制备靶向结合剂的方法。在一个实施方案中，本发明包括通过用编码上文所述的抗体的至少一个核酸分子转染至少一个宿主细胞、在所述的宿主细胞中表达所述的核酸分子以及分离所述的抗体来制备抗体的方法。

[0184] 根据另一个方面，本发明包括通过给药本文所述的拮抗剂来拮抗 CD105 的生物学活性的方法。所述的方法可以包括选择需要治疗血管生成和 / 或增殖的动物，以及向所述的动物给药治疗有效剂量的 CD105 的生物学活性的拮抗剂。

[0185] 本发明的另一个方面包括通过给药上文所述的靶向结合剂来拮抗 CD105 的生物学活性的方法。所述的方法可以包括选择需要治疗血管生成和 / 或增殖的动物，以及向所述的动物给药治疗有效剂量的、拮抗 CD105 的生物学活性的靶向结合剂。

[0186] 本发明的另一个方面包括通过给药上文所述的抗体来拮抗 CD105 的生物学活性的方法。所述的方法可以包括选择需要治疗血管生成和 / 或增殖的动物，以及向所述的动物给药治疗有效剂量的、拮抗 CD105 的生物学活性的抗体。

[0187] 根据另一个方面，提供了通过给药治疗有效量的 CD105 的生物学活性的拮抗剂来治疗动物中细胞增殖的方法。所述的方法可以包括选择需要治疗血管生成和 / 或增殖的动物，以及向所述的动物给药治疗有效剂量的 CD105 的生物学活性的拮抗剂。

[0188] 根据另一个方面，提供了通过给药治疗有效量的拮抗 CD105 的生物学活性的靶向结合剂来治疗动物中血管生成和 / 或增殖的方法。所述的方法可以包括选择需要治疗血管生成和 / 或增殖的动物，以及向所述的动物给药治疗有效剂量的、拮抗 CD105 的生物学活性的靶向结合剂。所述的靶向结合剂可以单独给药，或者与其他抗体或者化疗药品或放疗结合给药。

[0189] 根据另一个方面，提供了通过给药治疗有效量的拮抗 CD105 的生物学活性的抗体来治疗动物中血管生成和 / 或增殖的方法。所述的方法可以包括选择需要治疗血管生成和 / 或增殖的动物，以及向所述的动物给药治疗有效剂量的、拮抗 CD105 的生物学活性的抗体。所述的抗体可以单独给药，或者与其他抗体或者化疗药品或放疗结合给药。

[0190] 根据另一个方面,提供了通过给药治疗有效量的 CD105 的生物学活性的拮抗剂来治疗动物癌症的方法。所述的方法可以包括选择需要治疗癌症的动物,以及向所述的动物给药治疗有效剂量的、拮抗 CD105 的生物学活性的拮抗剂。所述的拮抗剂可以单独给药,或者与其他抗体或者化疗药品或放疗结合给药。

[0191] 根据另一个方面,提供了通过给药治疗有效量的拮抗 CD105 的生物学活性的靶向结合剂来治疗动物癌症的方法。所述的方法可以包括选择需要治疗癌症的动物,以及向所述的动物给药治疗有效剂量的、拮抗 CD105 的生物学活性的靶向结合剂。所述的靶向结合剂可以单独给药,或者与其他抗体或者化疗药品或放疗结合给药。

[0192] 根据另一个方面,提供了通过给药治疗有效量的拮抗 CD105 的生物学活性的抗体来治疗动物癌症的方法。所述的方法可以包括选择需要治疗癌症的动物,以及向所述的动物给药治疗有效剂量的、拮抗 CD105 的生物学活性的抗体。所述的抗体可以单独给药,或者与其他抗体或者化疗药品或放疗结合给药。

[0193] 根据另一个方面,提供了通过给药治疗有效量的拮抗 CD105 的生物学活性的抗体来减轻或抑制动物肿瘤细胞的增殖、粘附、侵入和 / 或血管生成的方法。所述的方法可以包括选择需要减轻或抑制增殖、粘附、侵入和 / 或血管生成的动物,以及向所述的动物给药治疗有效剂量的、拮抗 CD105 的生物学活性的抗体。所述的抗体可以单独给药,或者与其他抗体或者化疗药品或放疗结合给药。

[0194] 根据另一个方面,提供了通过给药治疗有效量的拮抗 CD105 的生物学活性的抗体来减缓动物肿瘤的生长和 / 或转移的方法。所述的方法可以包括选择需要减缓肿瘤的生长和 / 或转移的动物,以及向所述的动物给药治疗有效剂量的、拮抗 CD105 的生物学活性的抗体。所述的抗体可以单独给药,或者与其他抗体或者化疗药品或放疗结合给药。

[0195] 根据本发明的另一个方面,提供了 CD105 的生物学活性拮抗剂在用于制造治疗肿瘤血管生成和 / 或细胞增殖的药剂中的用途。在一个实施方案中,所述的 CD105 的生物学活性拮抗剂为本发明的靶向结合剂。在一个实施方案中,所述的 CD105 的生物学活性拮抗剂为本发明的抗体。

[0196] 根据本发明的另一个方面,提供了用作用于治疗肿瘤血管生成和 / 或细胞增殖的药剂的 CD105 的生物学活性拮抗剂。在一个实施方案中,所述的 CD105 的生物学活性拮抗剂为本发明的靶向结合剂。在一个实施方案中,所述的 CD105 的生物学活性拮抗剂为本发明的抗体。

[0197] 根据本发明的另一个方面,提供了拮抗所述的 CD105 的生物学活性的靶向结合剂或抗体在用于制造治疗血管生成和 / 或增殖的药剂中的用途。

[0198] 根据本发明的另一个方面,提供了用作用于治疗血管生成和 / 或增殖的药剂的、拮抗所述的 CD105 的生物学活性的靶向结合剂或抗体。

[0199] 根据本发明的另一个方面,提供了拮抗所述的 CD105 的生物学活性的靶向结合剂或抗体在用于制造治疗疾病相关性血管生成和 / 或增殖的药剂 中的用途。

[0200] 根据本发明的另一个方面,提供了用作用于治疗疾病相关性血管生成和 / 或增殖的药剂的、拮抗所述的 CD105 的生物学活性的抗体。

[0201] 根据本发明的另一个方面,提供了所述的 CD105 的生物学活性的拮抗剂在用于制造用于治疗哺乳动物癌症的药剂中的用途。在一个实施方案中,所述的 CD105 的生物学活

性拮抗剂为本发明的靶向结合剂。在一个实施方案中,所述的 CD105 的生物学活性拮抗剂为本发明的抗体。

[0202] 根据本发明的另一个方面,提供了用作用于治疗哺乳动物癌症的药剂的 CD105 的生物学活性拮抗剂。在一个实施方案中,所述的 CD105 的生物学活性拮抗剂为本发明的靶向结合剂。在一个实施方案中,所述的 CD105 的生物学活性拮抗剂为本发明的抗体。

[0203] 根据本发明的另一个方面,提供了拮抗所述的 CD105 的生物学活性的靶向结合剂在用于制造用于治疗哺乳动物癌症的药剂中的用途。

[0204] 根据本发明的另一个方面,提供了用作用于治疗哺乳动物癌症的药剂的、拮抗所述的 CD105 的生物学活性的靶向结合剂。

[0205] 根据本发明的另一个方面,提供了拮抗所述的 CD105 的生物学活性的抗体在用于制造用于治疗哺乳动物癌症的药剂中的用途。

[0206] 根据本发明的另一个方面,提供了用作用于治疗哺乳动物癌症的药剂的、拮抗所述的 CD105 的生物学活性的抗体。

[0207] 根据另一个方面,提供了拮抗所述的 CD105 的生物学活性的靶向结合剂或抗体在用于制造用于减缓或抑制动物增殖和 / 或血管生成的药剂中的用途。

[0208] 根据另一个方面,提供了用作用于减缓或抑制动物中增殖和 / 或血管生成的药剂的、拮抗所述的 CD105 的生物学活性的靶向结合剂或抗体。

[0209] 根据另一个方面,提供了拮抗所述的 CD105 的生物学活性的靶向结合剂或抗体在用于制造用于减缓动物肿瘤生长和 / 或转移的药剂中的用途。

[0210] 根据另一个方面,提供了用作用于减缓动物中肿瘤生长和 / 或转移的药剂的、拮抗所述的 CD105 的生物学活性的靶向结合剂或抗体。

[0211] 在一个实施方案中,本发明特别适用于在患有单独依赖于或部分依赖于 CD105 受体信号传导的肿瘤患者中拮抗 CD105。

[0212] 根据本发明的另一个方面,提供了包含 CD105 的生物学活性的拮抗剂以及可药用的载体的药物组合物。在一个实施方案中,所述的拮抗剂包含抗体。根据本发明的另一个方面,提供了包含 CD105 的生物学活性的拮抗剂以及可药用的载体的药物组合物。在一个实施方案中,所述的拮抗剂包含抗体。

[0213] 在一些实施方案中,在给药特异性结合 CD105 的抗体之后,给药清除剂,从而移除血液中过量的循环抗体。

[0214] 抗 CD105 的抗体可以用于消除患者样品中的 CD105,并因此可以用作用于本文所述的疾病状态的诊断工具。此外,基于抗 CD105 抗体的显著抑制由 CD105 介导的信号传导活性(如以下实施例中所表明的那样)的能力,所述的抗 CD105 的抗体在治疗由 CD105 的表达所导致的症状和状况中具有治疗作用。在具体的实施方案中,本文所述的抗体和方法涉及治疗由 CD105 诱导的血管生成、增殖和 / 或细胞内信号传导所导致的症状。另一个实施方案涉及采用本文所述的抗体和方法来治疗血管生成和 / 或增殖相关性疾病,包括赘生性疾病,例如黑素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、干细胞(肝)癌、甲状腺肿瘤、胃部(胃)癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌、成胶质细胞瘤、子宫内膜癌、肾癌、结肠癌以及胰腺癌。所述的抗体还可用于治疗细胞粘附和 / 或关节炎侵入、动脉硬化症和涉及血管生成的疾病。

[0215] 本发明的另一个实施方案包括用于检测哺乳动物组织、细胞或体液中的 CD105 以筛查细胞粘附、侵入、血管生成或增殖相关性疾病的测试试剂盒。所述的试剂盒包括与 CD105 相结合的靶向结合剂以及用于表明所述的靶向结合剂与 CD105 (如果存在的话) 的反应情况的手段。在一个实施方案中, 与 CD105 相结合的靶向结合剂被标记。在另一个实施方案中, 所述的靶向结合剂为未标记的, 而所述的试剂盒还包含用于检测所述靶向结合剂的手段。优选的是, 所述的靶向结合剂可以用选自荧光色素、酶、放射性核以及辐射非透过性材料的标志物来标记。

[0216] 本发明的另一个实施方案包括用于检测哺乳动物组织、细胞或体液中的 CD105 以筛查细胞粘附、侵入、血管生成或增殖相关性疾病的测试试剂盒。所述的试剂盒包括与 CD105 相结合的抗体以及用于表明所述抗体与 CD105 (如果存在的话) 的反应情况的手段。所述的抗体可以为单克隆抗体。在一个实施方案中, 与 CD105 相结合的抗体被标记。在另一个实施方案中, 所述的抗体为未标记的初级抗体, 而所述的试剂盒还包含用于检测所述初级抗体的手段。在一个实施方案中, 所述的手段包括作为抗免疫球蛋白的经标记的第二抗体。优选的是, 所述的抗体可以用选自荧光色素、酶、放射性核以及辐射非透过性材料的标志物来标记。

[0217] 在以下另外的详细材料中提供了本文所公开的、关于所述抗体的其他实施方案、特征等。

[0218] 序列列表

[0219] 本发明的实施方案包括以下表 1 中所列的特异性抗体。该表格分别报告了各种抗 CD105 的抗体的识别编号, 以及相应重链和轻链的基因和多肽的可变结构域的 SEQ ID 编号。各种抗体已经给出了识别编号。

[0220] 表 1

[0221]

mAb ID No.:	序列	SEQ ID NO:
4.120	编码重链可变区的核苷酸序列	1
	编码重链可变区的氨基酸序列	2
	编码轻链可变区的核苷酸序列	3
	编码轻链可变区的氨基酸序列	4
9H10	编码重链可变区的核苷酸序列	5
	编码重链可变区的氨基酸序列	6
	编码轻链可变区的核苷酸序列	7
	编码轻链可变区的氨基酸序列	8
10C9	编码重链可变区的核苷酸序列	9
	编码重链可变区的氨基酸序列	10
	编码轻链可变区的核苷酸序列	11
	编码轻链可变区的氨基酸序列	12
4D4	编码重链可变区的核苷酸序列	13
	编码重链可变区的氨基酸序列	14
	编码轻链可变区的核苷酸序列	15
	编码轻链可变区的氨基酸序列	16
11H2	编码重链可变区的核苷酸序列	17
	编码重链可变区的氨基酸序列	18
	编码轻链可变区的核苷酸序列	19
	编码轻链可变区的氨基酸序列	20
6B1	编码重链可变区的核苷酸序列	21
	编码重链可变区的氨基酸序列	22
	编码轻链可变区的核苷酸序列	23
	编码轻链可变区的氨基酸序列	24
4.37	编码重链可变区的核苷酸序列	25
	编码重链可变区的氨基酸序列	26
	编码轻链可变区的核苷酸序列	27
	编码轻链可变区的氨基酸序列	28
6B10	编码重链可变区的核苷酸序列	29
	编码重链可变区的氨基酸序列	30
	编码轻链可变区的核苷酸序列	31
	编码轻链可变区的氨基酸序列	32
3C1	编码重链可变区的核苷酸序列	33
	编码重链可变区的氨基酸序列	34
	编码轻链可变区的核苷酸序列	35
	编码轻链可变区的氨基酸序列	36
6A6	编码重链可变区的核苷酸序列	37
	编码重链可变区的氨基酸序列	38
	编码轻链可变区的核苷酸序列	39
	编码轻链可变区的氨基酸序列	40

[0222]

[0223] 表 2 为将抗体的重链区与它们的同族种系重链区、以及抗体的轻链区与它们的同

族种系轻链区进行比较的表。

[0224]

表 2

SEQ ID No	链	链	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
2	4.120VH	4.120VH				QVQLQESGPGLVKPS SETLSLTCTVSGGSI S	SYVWS	WIRQPA KLEWIG	RIYTSGSTNY NPSLKS	RVTMSVDTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCAR	RDIGATIKGFD Y	WGQGTILVTVS S
41	种系	种系	VH4-59	D5-12	JH4	QVQLQESGPGLVKPS SETLSLTCTVSGGSI S	SYVWS	WIRQPA KLEWIG	YIYSGSTNY NPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLK SSVTAADTA VYYCAR	-DIVATLYFDY	WGQGTILVTVS S
4	4.120Vk	4.120Vk				DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITTC	RASQSISSY LN	WYQQKP GKAPKLL IY	AASSLOS	GVPSRFGSGSGTDFTL TISLQPEDFATYYC	QQSYSTP-T	FGQGTIRLEIK
42	种系	种系	Vk02/012		JK5	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITTC	RASQSISSY LN	WYQQKP GKAPKLL IY	AASSLOS	GVPSRFGSGSGTDFTL TISLQPEDFATYYC	QQSYSTPIT	FGQGTIRLEIK
6	9H10VH	9H10VH				QVQLVESGGGVVQ PGRSRLSCAASGF AFI	NYGMH	WVRQAP GKGLDW VA	VISYDGSNKY YTDSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTA VYYCAR	DLMGATLFDN	WGQGTILVTVS S
43	种系	种系	VH3-30*01	D1-26	JH4	QVQLVESGGGVVQ PGRSRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKGLDW VA	VISYDGSNKY YADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTA VYYCAR	---GATYFDY	WGQGTILVTVS S
8	9H10VL	9H10VL				SYVLTQPSVSVAP GQTARISC	GGNIGSK SVH	WFOQKP GQAPVLV VY	DDSDRPS	GIPERFSGNSGNTAIL TISRVEAGDEADYYC	QVWDSSSDHV V	FGGGTKLTVL
44	种系	种系	V2-14		JL2	SYVLTQPSVSVAP GQTARITC	GGNIGSK SVH	WYQQKP GQAPVLV	DDSDRPS	GIPERFSGNSGNTAIL TISRVEAGDEADYYC	QVWDSSSDHV V	FGGGTKLTVL

[0225]

10	10C9VH	10C9VH						QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGF TFR	SYGMII	WVRQAP GKLEW VA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNSKNTLDLQM NSLRAEDTAVYYCAR	DRIAAARVYN GMDV	WGQGTITVTS S
45	种系	种系	VH3-33	D6-13	JH6			QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGF TFS	SYGMII	WVRQAP GKLEW VA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	-IAAA-YYYG MDV	WGQGTITVTS S
12	10C9Vk	10C9Vk						AIVMTQSPDSLAVS LGERATINC	KSSQSVLY SSNNKNYL A	WYQQKP GQPPNLL FY	WASTRES	GVPDRFVSFGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYC	QYYDSPLT	FGGGTKVEIK
46	种系	种系	VkB3		Jk4			DIVMTQSPDSLAVS LGERATINC	KSSQSVLY SSNNKNYL A	WYQQKP GQPPKLLI Y	WASTRES	GVPDRFSGSGGTDFTL TISSLQAEDVAVYYC	QYYSTPLT	FGGGTKVEIK
14	4D4VH	4D4VH						QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKLEW VA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	VLGATGGVYY YYGMDV	WGQGTITVTS S
47	种系	种系	VH3-33	D1-26	JH6			QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKLEW VA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	-GAT-YYYY GMDV	WGQGTITVTS S
16	4D4VL	4D4VL						SYELTQPTSPSVSPG QTASITC	SGDKLGDK YAC	WYQQKP GQSPVLV IY	QDIKRPS	GIPERFSGSGNTAIL TISGTQAMDEADYYC	QAWDSST-VV	FGGGTKLTVL
48	种系	种系	V2-1		JL2			SYELTQPTSPSVSPG QTASITC	SGDKLGDK YAC	WYQQKP GQSPVLV IY	QDSKRPS	GIPERFSGSGNTAIL TISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTAVV	FGGGTKLTVL
18	11H2VH	11H2VH						QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGF SFS	SYGMH	WVRQAP GKGLDW VA	IIWYDGSYKY YADSVKG	RFTISRDNSKNTLSLQM NSLRAEDTAVYYCAR	DGKYPFDY	WGQGTITVTS S

[0226]

49	种系	种系	VH3-33	D5-24	JH4	QVQLVESGGGVVQ PCRSRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKGLEW VA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	DG-YFDY	WQGGTILTVS S
20	11H2VL	11H2VL				SYVLTPPSVSVAP GQTARITC	GGNIGSK SVH	WYQQK GQAPVLV VY	DDSDRPS	GIPERFSGNSGNTATL TISRVEAGDEADYYC	QVWDRSSDHV V	FGGGTKLTVL
50	种系	种系	V2-14		JL2	SYVLTPPSVSVAP GQTARITC	GGNIGSK SVH	WYQQK GQAPVLV VY	DDSDRPS	GIPERFSGNSGNTATL TISRVEAGDEADYYC	QVWDRSSDHV V	FGGGTKLTVL
22	6B1VH	6B1VH				QVQLVESGGGVVQ PCRSRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKGLEW VA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCVR	DYSSGWY	WQGGTILTVS S
51	种系	种系	VH3-33	D6-19	JH4	QVQLVESGGGVVQ PCRSRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKGLEW VA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	-YSSGWY	WQGGTILTVS S
24	6B1VL	6B1VL				SYELTPPSVSVSPG QTARITC	SGDALPKK YAY	WYQQKS GQAPVLV IY	EDSKRPS	GIPERFSGSSGTMATL TISGAQVEDEADYSC	YSIDSSVNHVV	FGGGTKLTVL
52	种系	种系	V2-7		JL2	SYELTPPSVSVSPG QTARITC	SGDALPKK YAY	WYQQKS GQAPVLV IY	EDSKRPS	GIPERFSGSSGTMATL TISGAQVEDEADYYC	YSTDSSGNHV V	FGGGTKLTVL
26	4.37VH	4.37VH				QVQLVESGGGVVQ PCRSRLSCAASGF TFS	DYGMH	WVRQAP GKGLEW VA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	AAGFYYYG MDV	WQGGTITVTS S
53	种系	种系	VH3-33	D6-13	JH6	QVQLVESGGGVVQ PCRSRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKGLEW VA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	AAGYYYG MDV	WQGGTITVTS S

[0227]

28	4.37V _k	4.37V _k						DIVMTQSPSLPVP GEPASISC	RSSQSLLYS NGYNYLD	WYLQKP GQSPQLLI Y	LGSNRAS	GVPDRFSGSGTDFTL KISRVEAEDVGLYYC	MRALQTPFT	FGPGTKVDIK
54	种系	种系	VkA3/A19				Jk3	DIVMTQSPSLPVP GEPASISC	RSSQSLLHS NGYNYLD	WYLQKP GQSPQLLI Y	LGSNRAS	GVPDRFSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYC	MQALQTPFT	FGPGTKVDIK
30	6B10.1VH	6B10.1VH						QEQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCTASGF TFS	NYGIH	WVRQAP GKGLEW VT	VISYDGSKKY YADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	AFSTMVRGVD H	WGQGTLLVTVS S
55	种系	种系	VH3-30*01		D3-10		JH4	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKGLEW VA	VISYDGSNKY YADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	--TMVRGVVDY	WGQGTLLVTVS S
32	6B10.1V _k	6B10.1V _k						DIQMTQSPFSLAS VGDRVITTC	QASQDIYK SLN	WYQQR GKAPNLL IY	DASNLET	GVPDRFSGSGTDFTF TISSLQPEDFARYFC	QQYDNLPLT	FGGGRTRVEIK
56	种系	种系	VkO8/O18				Jk4	DIQMTQSPFSLAS VGDRVITTC	QASQDISN YLN	WYQQR GKAPKLL IY	DASNLET	GVPDRFSGSGTDFTF TISSLQPEDIATYYC	QQYDNLPLT	FGGGRTRVEIK
34	3C1VH	3C1VH						QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKGLEW VA	IISYDGSNKY YADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQM NSLKTEDTAVYYCAR	GGRDYYYAM DV	WGQGTLLVTVS S
57	种系	种系	VH3-30*01		D3-16		JH6	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGF TFS	SYGMH	WVRQAP GKGLEW VA	VISYDGSNKY YADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	GG--YYYGMD V	WGQGTLLVTVS S
36	3C1V _k	3C1V _k						DIQMTQSPFSLAS VGDRVITTC	RASQNIYS YLN	WVRQAP GKAPKLL IY	TASSLQS	GVPDRFSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC	QQGYSTPLT	FGGGRTRVDIK

[0228]

58	种系	种系	Vk02/O12		Jk4	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITTC	RASQISSY LN	WYQQKP GKAPKLL IY	AASSLQS	GVPSRFGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC	QQSYSTPLT	FGGGTKVEIK
38	6A6.2VH	6A6.2VH				EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FS	SYAMS	WVRQAP GKGLEW VS	TISGGGHSTY YADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	IAPAGPHFDY	WGQGTLVTVS S
59	种系	种系	VH3-23	D6-13	JH4	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FS	SYAMS	WVRQAP GKGLEW VS	AISGSGSTY YADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAK	IAAAG-YFDY	WGQGTLVTVS S
40	6A6.2VL	6A6.2VL				NFMLTQPHSVSESP GKTVTFSC	TRSSGSIAS NFVQ	WYQQRP GSSPTTVI Y	EHNQRPS	GVDPDRFSGSIDSSSSAS LTISGLKTEDEADYYC	QFYDRNSHWV	FGGGTKLTVL
60	种系	种系	V1-22		JL3b	NFMLTQPHSVSESP GKTVTISC	TRSSGSIAS NYVQ	WYQQRP GSSPTTVI Y	EDNQRPS	GVDPDRFSGSIDSSNSA SLTISGLKTEDEADYYC	QSYDSSN-WV	FGGGTKLTVL

[0229] 定义

[0230] 除非另作说明, 否则本文所用的科学及技术术语具有本领域的普通技术人员通常

所理解的含义。此外,除非内容需要,否则单数的术语包含复数的含义而复数的术语也包含单数的含义。通常与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、以及蛋白质和寡或多核苷酸化学及杂交相关使用的系统命名法,以及本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、以及蛋白质和寡或多核苷酸化学及杂交的技术都是公知的那些,并且在本领域中常用。

[0231] 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、脂转染)。根据供应商提供的说明书、或者本领域的常规完成方法、或者本文所述的方法来进行酶反应和纯化技术。通常,根据本领域公知的常规方法以及按照本发明的整个说明书中所引用和讨论的多个通常且更具体的参考中所述的方法来实施之前所述的技术和程序。例如参见 Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)), 该文献以引用方式并入本文。与本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学相关使用的系统命名法,以及本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学的实验室程序和技术是公知的那些,并在本领域中常用。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制、传递以及患者的治疗。

[0232] 如本发明公开所用,以下属于除非另作说明,否则应该理解为具有以下含义:

[0233] 拮抗剂或抑制剂可以为多肽、核酸、碳水化合物、脂质、小分子量的化合物、寡核苷酸、寡肽、RNA 干扰 (RNAi)、反义物 (antisense)、重组蛋白质、抗体、或其片段或其缀合物或其融合蛋白质。就 RNAi 的综述,参见 Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. (*Pharmacol Rev.* 2003 Dec ;55(4) :629-48. Review), 而反义物(参见 Opalinska JB, Gewirtz AM. (*Sci STKE.* 2003 Oct 28 ;2003(206) :pe47.))。

[0234] 化合物是指分子量小于大约 2000 道尔顿的任何小分子量化合物。

[0235] 术语“CD105”是指 CD105 蛋白分子,也称为 CD105 抗原,END,内皮因子,FLJ41744, HHT1, ORW 和 ORW1。

[0236] 术语“中和性”或“抑制”当用于指靶向结合剂(例如抗体)时,是指抗体消除、降低或显著降低靶向抗原的活性的能力。因此,本发明的“中和性”抗 CD105 的抗体能够消除或显著降低 CD105 的活性。中和性 CD105 抗体可以例如通过阻断 CD105 配体例如 TGF- β 与 CD105 的结合来起作用。通过阻断这种结合,CD105 信号介导的活性显著或完全消除。理想的是,对抗 CD105 的中和性抗体抑制肿瘤血管生成和 / 或细胞增殖。

[0237] “CD105 的生物学活性的拮抗剂”能够消除、降低或显著降低 CD105 的活性。“CD105 的生物学活性的拮抗剂”能够消除、降低或显著降低 CD105 的信号传导。“CD105 的生物学活性的拮抗剂”可以消除或显著降低肿瘤血管生成和 / 或细胞增殖。

[0238] “降低 CD105 的信号传导”涵盖了与缺乏本发明的靶向结合剂、抗体或拮抗剂而产生的信号传导的水平相比,CD105 的信号传导降低了至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%。

[0239] “优化的”序列是指这样的抗体序列(本文中所述的任何抗体的可变重链或轻链),其已经突变,使得在一个或多个残基使非种系序列突变回种系序列,并且还可以包含由所述的序列中除去结构倾向,例如糖基化位点或未配对的半胱氨酸。

[0240] 术语“多肽”在本文中用作常规术语,是指天然蛋白质、片段或者多肽序列的类似

物。因此,天然蛋白质、片段以及类似物为多肽类型的一些种类。根据本发明的优选多肽包括人源重链免疫球蛋白分子和人源 γ 轻链免疫球蛋白分子、和通过包含重链免疫球蛋白分子和轻链免疫球蛋白分子(例如 γ 或 λ 轻链免疫球蛋白分子)的组合所形成的抗体分子,及上述情况的相反情况,以及它们的片段或类似物。根据本发明的优选多肽还可以仅仅包含人源重链免疫球蛋白分子或其片段。

[0241] 如本文所用,适用于对象的术语“天然”或“天然存在”是指这样的事实,即,对象可以在自然界中找到。例如,可以在由自然界来源分离得到的有机体(包括病毒)中存在的、并且并未经人在实验室中有意地修饰或以其他方式修饰的多肽或多核苷酸是天然存在的。

[0242] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指这样的元件位置,如此描述的元件位置具有允许它们按照它们所需的方式发挥作用的关系。例如,对照序列与编码序列“可操作地连接”是指以这样的方法进行连接,所述的方式为编码序列的表达是在与对照序列相容的条件下完成的。

[0243] 术语“多核苷酸”在本文中是指长度为至少 10 个碱基的聚合物形式的核苷酸,为核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或者任何一种核苷酸的修饰形式,或者为 RNA-DNA 异源双链。所述的术语包括单链和双链形式的 DNA。

[0244] 术语“寡核苷酸”在本文中包括通过天然存在和非天然存在的键而连接在一起的天然存在和修饰的核苷酸。寡核苷酸为多核苷酸的子集,通常包含长度为 200 个或更少的碱基。优选的是,寡核苷酸的长度为 10 至 60 个碱基,并且最优选的是长度为 12、13、14、15、16、17、18、19 或者 20 至 40 个碱基。寡核苷酸通常为单链的,例如可用于探针;但是寡核苷酸可以为双链的,例如用于基因突变体的构建。寡核苷酸可以为正义或反义寡核苷酸。

[0245] 术语“天然存在的核苷酸”在本文中包括脱氧核糖核酸和核糖核酸。术语“修饰的核苷酸”在本文中包括具有修饰的或取代的糖基等的核苷酸。术语“寡核苷酸键”在本文中包括寡核苷酸键,例如硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、硒代磷酸酯键、二硒代磷酸酯键、phosphoroanilothioate、phosphoraniladate、氨基磷酸酯键等。例如参见 LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14 :9081(1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106 :6077(1984); Stein et al. Nucl. Acids Res. 16 :3209(1988); Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6 :539(1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues :A Practical Approach, pp. 87-108(F. Eckstein, Ed, Oxford University Press, Oxford England(1991)); Stec et al. 美国专利 No. 5,151,510; Uhlmann 和 Peyman Chemical Reviews 90 :543(1990),这些公开均以引用方式并入本文。如果需要的话,寡核苷酸可以包括用于检测的标记。

[0246] 术语“选择性杂交”在本文中是指可检测的且特异性的结合。多核苷酸、寡核苷酸及其片段在杂交和洗涤条件(该条件将非特异性核酸的可检测结合的可估测的量降至最低)下选择性地与核酸链杂交。高度的严格条件可以用于得到本领域已知的及本文所讨论的选择性杂交条件。通常,在所关注的多核苷酸、寡核苷酸或其抗体片段和核酸序列之间的核酸序列同源性为至少 80%,并且更通常的是同源性优选地增加至至少 85%、90%、95%、99%和 100%。

[0247] 严格的杂交条件包括但不限于在大约 45°C 下在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) (0.9M NaCl, 90mM 柠檬酸钠, pH 7.0) 与过滤器结合的 DNA 杂交,然后在大约 50-65°C 下在 0.2XSSC, 0.1% SDS 中进行一次或多次洗涤;高度严格的条件例如为在大约 45°C 下在 6XSSC

中与过滤器结合的 DNA 杂交,然后在大约 60℃ 下在 0.1XSSC,0.2% SDS 中进行一次或多次洗涤;或者本领域的技术人员已知的其他严格的杂交条件(例如参见 Ausubel, F. M. et al, eds. 1989 *Current Protocols in Molecular Biology*, vol.1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc, NY, 页 6.3.1 至 6.3.6 和 2.10.3)。如果在两个氨基酸的序列之间具有部分或完全的一致性,则这两个氨基酸序列是“同源的”。例如,85%的同源性是指当两条序列被比对以达到最大程度的匹配时,85%的氨基酸是一致的。在达到最大匹配的条件下允许存在缺口(在两条匹配序列的任何一条中);缺口长度为 5 或更少是优选的,并且缺口长度为 2 或更少是更优选的。可选择的且优选的是,如果两条蛋白质序列(或者由长度为至少大约 30 个氨基酸衍生得到的多肽序列)的比对得分超过 5 分(以标准偏差单元)(使用具有突变数据矩阵的程序 ALIGN)而缺口罚分为 6 或更高,则这两条蛋白质序列是同源的(该术语如本文所用)。参见 Dayhoff, M. O, in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp.101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) 和 Supplement 2 to this volume, pp.1-10。如果当使用 ALIGN 程序对两条序列或其部分进行最佳比对时,它们的氨基酸为大约或等于 50%的一致性,则更优选的是这两条序列或其部分是同源的。应该理解的是在两条定向进化同源序列中可以存在有不同的同源性区域。例如,与非功能区域相比,小鼠和人的直系同源物的功能位点可以具有更高度的同源性。

[0248] 术语“相应于”在本文中用于指多核苷酸序列与参照多核苷酸序列的全部或部分同源(即,是一致的,并不具有严格的进化相关性),或者指多肽序列与参照多肽序列是一致的。

[0249] 对比而言,术语“与……互补”在本文中用于指互补序列与参照多核苷酸序列的全部或部分同源。为了说明,核苷酸序列“TATAC”相应于参照序列“TATAC”,并且与参照序列“GTATA”互补。

[0250] 术语“序列一致性”是指在比较窗口内两条多核苷酸或氨基酸序列是一致的(即,基于核苷酸对核苷酸、或残基对残基)。术语“序列一致性的百分率”是通过以下方式计算得到的,将比较窗口内的两条最佳比对序列进行比较,测定其中在两条序列中都具有一致的核酸碱基(例如 A、T、C、G、U 或 I)或氨基酸残基的位置的数量从而得到匹配位置的数量,将在比较窗口内匹配位置的数量除以位置的总数量(即,窗口尺寸),以及将所得的结合乘以 100 从而得到序列一致性的百分率。术语“基本一致性”在本文中用于指多核苷酸或氨基酸序列的特征,其中与比较窗口为至少 18 个核苷酸(6 个氨基酸)位置内、通常窗口为至少 24-48 个核苷酸(8-16 个氨基酸)位置内的参照序列相比,所述的多核苷酸或氨基酸包含具有至少 85%序列一致性、优选的是至少 90 至 95%序列一致性、更优选的是至少 99%序列一致性的序列,其中序列一致性的百分率是通过将参照序列与可以在比较窗口内包含总量为参照序列的 20%或更少的删除或添加的序列相比较。所述的参照序列可以为较大序列的子集。

[0251] 如本文所用,20 个常规氨基酸及其缩写跟在常规用途之后。参见 *Immunology-A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 该文献以引用方式并入本文。20 个常规氨基酸的立体异构体(例如 D-氨基酸)、非天然氨基酸(例如 α -、 α -取代的氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸以

及其他非常规氨基酸也可以为用于本发明多肽的合适的元件。非常规氨基酸的实例包括：4-羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰基赖氨酸、O-磷基丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-精氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸、以及其他相似的氨基酸和亚氨基酸（例如 4-羟脯氨酸）。在本文所用的多肽符号中，根据标准用法和常规情况，左手方向为氨基末端方向，而右手方向为羧基末端方向。

[0252] 类似地，除非另作说明，否则单链多核苷酸序列的左手末端为 5' 末端；双链多核苷酸序列的左手方向被称为 5' 方向。初始 RNA 转录物的 5' 至 3' 的添加方向被称为转录方向；在具有与 RNA 相同序列的 DNA 链上的并且为其 5' 至 RNA 转录物的 5' 末端的序列区域被称为“上游序列”；在具有与 RNA 相同序列的 DNA 链上的并且为其 3' 至 RNA 转录物的 3' 末端的序列区域被称为“下游序列”。

[0253] 如多肽所用，术语“基本一致性”是指当将两条肽序列通过例如采用了缺省缺口权重 (default gap weight) 的程序 GAP 或 BESTFIT 进行最佳比对时，这两条肽序列共有至少 80% 的序列一致性，优选为至少 90% 的序列一致性，更优选为至少 95% 的序列一致性，最优选为至少 99% 的序列一致性。优选的是，并非一致的残基位置可以通过保守的氨基酸取代而不同。保守的氨基酸取代是指具有相同侧链的残基的可交换性。例如，具有脂肪族侧链的一组氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸为丝氨酸和苏氨酸；具有含氨基侧链的一组氨基酸为天冬酰胺和谷氨酰胺；具有芳香族侧链的一组氨基酸为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；具有碱性侧链的一组氨基酸为赖氨酸、精氨酸和组氨酸；以及具有含硫侧链的一组氨基酸为半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守的氨基酸取代基团为：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸、以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0254] 如本文所讨论的那样，认为氨基酸序列中变化较少的抗体或免疫球蛋白分子都被涵盖在本发明的范围内，只要在所述氨基酸序列中的变化与本文所述的抗体或免疫球蛋白分子保持了至少 75%、更优选的是至少 80%、90%、95%，并且更优选的是 99% 序列一致性即可。具体而言，考虑了保守的氨基酸的替代。保守的替代为在具有相关侧链的一系列氨基酸中发生的那些。遗传学编码的氨基酸通常被分为几个系列：(1) 酸性=天冬氨酸、谷氨酸；(2) 碱性=赖氨酸、精氨酸、组氨酸；(3) 非极性=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸；以及 (4) 不带电荷的极性=甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。更优选的系列为：丝氨酸和苏氨酸为脂肪族-羟基系列；天冬酰胺和谷氨酰胺为含氨基系列；丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸为脂肪族系列；以及苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸为芳香族系列。例如，合理的是，认为亮氨酸被异亮氨酸或缬氨酸、天冬氨酸被谷氨酸、苏氨酸被丝氨酸的分别的替代或者氨基酸被具有结构相关性的氨基酸的相似的替代不会对所得分子的结合功能或形成产生主要的影响，特别是如果所述的替代不涉及构架位点中的氨基酸时，更是如此。可以通过测试所述多肽衍生物的特定的活性来容易地测定氨基酸的变化是否会得到功能肽。所述的测定方法在本文进行了详细的描述。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可以通过本领域普通的技术人员容易地制备。片段或类似物的优选的氨基或羧基末端在功能结构域的边界附近形成。结构和功能结构域可以通过将所述的核苷酸和 / 或氨基酸序列数据库与公共或私人的序列数据库

相比较来确定。优选的是,可以采用计算机化的比较方法来确定序列基元或者预测在已知结构和 / 或功能的其他蛋白质中形成的蛋白质构象结构域。确定折叠形成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。Bowie et al. Science 253 :164(1991)。因此,之前的实例证明本领域的技术人员可以识别可根据本文所述的抗体、用于定义结构和功能结构域的序列基元和结构构象。

[0255] 谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基通常会脱去酰胺基,从而分别形成相应的谷氨酰基和天冬酰基残基。所述的这些残基是在中性或碱性条件下脱去酰胺基的。这些残基的脱酰胺基形成也落入本发明的范围。

[0256] 通常,蛋白质中的半胱氨酸残基参与半胱氨酸-半胱氨酸二硫键;或者当半胱氨酸残基为折叠蛋白质区域的一部分时,蛋白质中的半胱氨酸残基在空间上被保护以防止二硫键的形成。蛋白质中二硫键的形成是一个复杂的过程,该过程是由环境的氧化还原潜力以及专门的巯基-二硫键交换酶决定的(Creighton, Methods Enzymol. 107, 305-329, 1984; Houee-Levin, Methods Enzymol. 353, 35-44, 2002)。当半胱氨酸残基在蛋白质结构中未成对并且在空间上为被折叠所保护时,该半胱氨酸可以以已知为二硫键缓慢重排的过程与得自溶液中的游离半胱氨酸形成二硫键。在已知为二硫键交换的另一个过程中,游离的半胱氨酸还可以干扰天然存在的二硫键(例如在抗体结构中存在的那些),并导致结合少、生物学活性低和 / 或稳定性差。

[0257] 优选的氨基酸取代为以下这些:(1) 降低对蛋白质水解的敏感性,(2) 降低对氧化的敏感性,(3) 改变用于形成蛋白质络合物的结合亲和性,(4) 改变结合亲和性,以及(4) 赋予或修改所述类似物的其他物理化学或功能性 质。类似物可以包括除了天然存在的肽序列以为的多种序列突变体。例如,可以在天然存在的序列(优选的是,在形成分子内接触的结构域之外的部分多肽中)中形成单个或多个氨基酸取代(优选的是保守的氨基酸取代)。保守的氨基酸取代不应该较大程度低改变亲代序列的结构特征(例如替代氨基酸不应该倾向于断裂在亲代序列中形成的螺旋结构,或者扰乱表征亲代序列的其他类型的二级结构)。本领域识别的多肽的二级和三级结构的实例在Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton, Ed, W. H. Freeman and Company, New York(1984)); Introduction to Protein Structure(C. Branden and J. Tooze, eds, Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); 和 Thornton et al. Nature 354 :105(1991) 中有所描述,这些文献均以引用方式并入本文。

[0258] 此外,此类方法可以用于形成氨基酸取代或删除参与链内二硫键的一个或多个可变区的半胱氨酸残基,从而生成缺乏一个或多个链内二硫键的抗体分子。

[0259] 术语“CDR 区域”或“CDR”是指赋予抗体以抗原结合特异性的抗体的重链和轻链的高度可变区。可以根据 Kabat 系统(Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington) 以及后来的版本来定义 CDR。抗体通常包含 3 个重链 CDR 和 3 个轻链 CDR。在此使用术语一个 CDR 或多个 CDR, 以便根据实际情况表明这些区域中的一个区域或若干个区域,或者甚至是这些区域的全部,其中所述的区域包含了造成抗体通过对其所识别的抗原或抗原决定部位的亲和性而结合的氨基酸残基的大部分。

[0260] 重链的第三个 CDR(HCDR3) 具有更大的尺寸变化性(基本上是由于基因的排布机

制而导致的更高的多样性)。虽然已知重链的第三个 CDR 的最长尺寸为 26 个氨基酸,但是其可以短至 2 个氨基酸。CDR 的长度还可以根据通过具体的具有下划线的构架所容纳的长度而变化。功能上而言,HC3 在抗体特异性的确定中起到部分作用 (Segal et al, PNAS, 71:4298-4302, 1974, Amit et al, Science, 233:747-753, 1986, Chothia et al, J. Mol. Biol, 196:901-917, 1987, Chothia et al, Nature, 342:877-883, 1989, Caton et al, J. Immunol, 144:1965-1968, 1990, Sharon et al, PNAS, 87:4814-4817, 1990, Sharon et al, J. Immunol, 144:4863-4869, 1990, Kabat et al, J. Immunol, 147:1709-1719, 1991)。

[0261] 术语“一组 CDR”在本文中是指包含 CDR1、CDR2 和 CDR3。因此,一组 HC3 是指 HC31、HC32 和 HC33,而一组 LC3 是指 LC31、LC32 和 LC33。

[0262] 本发明的 VH 和 VL 结构域以及 CDR 的变体(包括本文中所列的氨基酸序列的那些,以及可以在针对 CD105 的靶向剂和抗体中使用的那些)可以通过序列改变或突变、并针对具有所需特征的抗原靶向进行筛查的方法来获得。所需特征的实例包括但不限于:相对于对抗原具有特异性的已知抗体,增加针对这种抗原的结合亲和性;相对于对抗原具有特异性的已知抗体,增加对抗原的活性(如果这种活性是已知的)的中和作用;在特定的摩尔比例下,与针对所述抗原的已知抗体或配体的特定的竞争能力;免疫沉淀配体-受体络合物的能力;与特定的抗原决定部位相结合的能力;线性抗原决定部位,例如采用肽结合扫描方法来鉴定的肽序列(例如在线性和/或束缚构象中筛查得到的肽);通过非连续的残基形成的构象抗原决定部位;调节 CD105 的新的生物学活性或下游分子的能力;结合和/或中和 CD105 的能力;和/或任何其他所需的性质。

[0263] 需要在 CDR、抗体 VH 或 VL 结构域以及抗原结合位点的氨基酸序列中进行取代的技术是本领域可利用的。在本发明中可以制备和使用本文所公开的抗体分子的变体。在将多元数据分析技术应用于结构/性质-活性关系中 (Wold, et al. Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984), 根据计算机化学的指引,可以采用公知的数学技术(例如统计回归方法、模式识别和分裂)来推导出抗体的活性-性质的定量关系 (Norman et al. Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (April 1998); Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995); Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper). Oxford University Press; (December 2000); Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999); Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002); Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery)。在一些情况下,可以由抗体序列、功能和三维结构的经验和理论模型(例如分析可能接触的残基或者计算物理化学性质)来推导出抗体的性质,并且可以单独地以及以结合方式考虑

这些性质。

[0264] 由 VH 结构域和 VL 结构域构成的抗体的抗原结合位点通常由 6 个多肽环形成：其中 3 个多肽环来自轻链可变结构域 (VL)，3 个来自重链可变重链结构域 (VH)。对已知的芳香族结构的抗体进行分析解释了抗体结合位点的序列与三维结构之间的关系。这些关系表明，除了 VH 结构域中的第三个区域（环）之外，结合位点环具有少数主链构造（标准结构 (canonical structure)）之一。已经显示，在特定的环中形成的标准结构可以通过其尺寸以及在环和构架区域中在关键位点处的某些残基的存在情况来确定。

[0265] 序列-结构关系的这种研究可以用于预测已知序列的抗体中的这些残基，而且能够预测未知的三维结构，这对保持 CDR 环的三维结构是重要的，并因此保持结合特异性。这些预测可以通过比较由先导优化试验得到的结果而得到支持。在结构方法中，可以使用任何可随意利用的或商业化的包装（例如 WAM）来创立抗体分子的模型。然后，可以使用蛋白质可视化及分析软件包（例如 Insight II (Accelrys, Inc.) 或 Deep View）来评价在 CDR 中的各位置处的可能的取代。然后，可以利用这些信息来进行取代，从而有可能对活性产生最小的或有利的效果，或者赋予其他所需的性质。

[0266] 如本文所用，术语“多肽片段”是指这样的多肽，该多肽具有删除了的氨基末端和/或羧基末端，但是在所述的末端，剩余的氨基酸序列与由例如全长 cDNA 序列推导出的天然存在的序列中相应位置处的氨基酸序列一致。片段通常为至少 5、6、8 或 10 个氨基酸的长度，优选的是为至少 14 个氨基酸的长度，更优选的是为至少 20 个氨基酸的长度，通常为至少 50 个氨基酸的长度，甚至更优选的是为至少 70 个氨基酸的长度。如本文所用，术语“类似物”是指这样的多肽，该多肽由与所推导出的氨基酸序列部分基本一致的至少 25 个氨基酸的片段构成，并且具有以下性质中的至少一者：(1) 在合适的结合条件下，与 CD105 特异性地结合，(2) 阻断合适的 TGF β /CD105 结合，或者 (3) 抑制 CD105 活性的能力。通常，多肽类似物包含相对于天然存在的序列的保守的氨基酸取代（或者添加或删除）。类似物通常为至少 20 个氨基酸的长度，优选的是为至少 50 个氨基酸的长度或更长，并且通常可以与全长的天然存在的多肽一样长。

[0267] 如同具有与模板肽的性质相似性质的非肽类药品，肽类似物通常用于制药工业中。这些非肽类化合物的类型被称为“肽模拟物”或“类肽物” (Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); 和 Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987), 这些文献以引用方式并入本文)。此类化合物通常借助于计算机化的分子模型而研发得到的。与可药用的肽具有结构相似性的肽模拟物可以用于产生相等的治疗或预防效果。通常，类肽物在结构上与范例多肽（即，具有生物化学性质或药理学活性的多肽，例如人类的抗体）相似，但是具有一个或多个可任选地被选自以下的键所替代（通过本领域公知的方法）的肽键： $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ （顺式和反式）、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 以及 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。具有相同类型的 D-氨基酸的相同序列的一个或多个氨基酸被系统性地取代（例如 D-赖氨酸代替 L-赖氨酸）可以用于产生更稳定的肽。此外，可以通过本领域已知的方法形成包含相同序列或者基本一致的相同序列的变化的束缚肽 (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992), 该文献以引用方式并入本文)；例如通过加入能够形成分子内二硫键（其使所述的肽环化）的内部半胱氨酸残基。

[0268] 抗体可以是单独的或者与通过已知的技术提供的其他氨基酸序列相结合的寡克隆抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR 移植抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、催化性抗体、嵌合抗体、人源化的抗体、全人源的抗体、抗独特型 (anti-idiotypic) 抗体、以及可以以溶解或结合形势标记的抗体, 以及它们的片段、变体或衍生物。抗体可以得自物种。

[0269] 如本文所用, 术语“一种抗体”和“多种抗体”(多种免疫球蛋白) 涵盖了单克隆抗体 (包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、camelised 抗体和嵌合抗体。如本文所用, 术语“一种抗体”或“多种抗体”是指由至少一个结合结构域构成的多肽或一类多肽, 其中所述的结合结构域是由具有三维结合空间 (具有与抗原的抗原决定簇的特征互补的内部表面形状和电荷分布) 的多肽链发生折叠而形成的。天然抗体通常为大约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白, 其由两条相同的轻 (L) 链和两条相同的重 (H) 链构成。各个轻链通过一个共价二硫键与重链连接, 而在不同免疫球蛋白二硫键同种型的重链之间二硫键的数量发生变化。各种重链和轻链还具有规则的间隔的链内二硫键。各个重链在一个末端处具有可变结构域 (VH), 其后跟有多个恒定结构域。各个轻链在一个末端处具有可变结构域 (VL) 而在另一个末端处具有恒定结构域; 所述的轻链的恒定结构域与所述的重链的可变结构域对齐。根据轻链恒定区的氨基酸序列, 轻链可以分为 λ 链或 γ 链。 γ 轻链的可变结构域在本文中还可以表示为 VK。术语“可变区”还可以用于描述重链或轻链的可变结构域。认为, 特定的氨基酸残基在轻链可变结构域和重链可变结构域之间形成了界面。各轻链/重链对的可变区形成了抗体结合位点。这种抗体可以得自任何哺乳动物, 包括但不限于人、猴、猪、马、兔、狗、猫、小鼠等。

[0270] 术语“一种抗体”或“多种抗体”包括本发明抗体的结合片段, 示例性的片段包括单链 Fvs (scFv)、单链抗体、单结构域的抗体、结构域抗体、Fv 片段、Fab 片段、F(ab') 片段、F(ab')₂ 片段、表现出所需生物学活性的抗体片段、二硫键稳定的可变区 (dsFv)、二聚可变区 (双功能抗体)、抗独特型抗体 (抗-Id) (包括例如针对本发明抗体的抗-Id 抗体)、细胞内抗体、线性抗体、单链抗体分子以及由抗体片段以及上文所述的任何一者的抗原结合片段形成的多特异性抗体。具体而言, 抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段, 即, 包含抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以为任何一种类型 (例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、种类 (例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或亚类。

[0271] 使用酶 (木瓜蛋白酶) 对抗体进行水解得到两条相同的抗原结合片段 (也称为“Fab”片段) 以及“Fc”片段 (其不具有抗原结合活性, 但具有结晶能力)。使用酶 (胃蛋白酶) 对抗体进行水解得到 F(ab')₂ 片段, 其中所述抗体分子的两个臂保持连接, 并包含两个抗原结合位点。F(ab')₂ 片段具有与抗原交联的能力。

[0272] “Fv”当在本文中用于指保留有抗原识别位点和抗原结合位点的最小的抗体片段。该区域由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域以紧密的非共价或共价的结合方式而形成的二聚体构成。正是在这种构造中, 各个可变结构域的三个 CDR 相互作用, 从而在 VH-VL 二聚体的表面上定义了抗原结合位点。总体而言, 六个 CDR 赋予所述的抗体以抗原结合特异性。但是, 虽然单个的可变结构域 (或者仅包含对抗原具有特异性的三个 CDR 的 Fv 的一半) 具有识别和结合抗原的能力, 但是与完整的结合位点相比, 亲和性较低。

[0273] “Fab”当在本文中用于指包含轻链的恒定结构域和重链的 CH1 结构域的抗体的片

段。

[0274] “dAb”当在本文中用于指作为人源抗体的最小功能结合单元的抗体片段。“dAb”为单结构域抗体,并且包含抗体重链的可变结构域(VH结构域)或抗体轻链的可变结构域(VL结构域)。各个dAb都包含六个天然存在的CDR中的三个(Ward et al, Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341,544-546(1989);Holt, et al, Domain antibodies: protein for therapy, *Trends Biotechnol.* 21,484-49(2003))。它们的分子量为11至15kDa,比抗原结合片段(Fab)2小四倍,并且是单链Fv(scFv)分子的一半。

[0275] “Camelid”当在本文中用于指抗体分子由重链二聚体构成,所述的二聚体缺少轻链,但是具有延伸的抗原结合组库(repertoire)(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R(1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363:446-448)。

[0276] 术语“双功能抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中所述的片段包含与在相同的多肽链(V_H - V_L)中的轻链可变结构域(V_L)相连的重链可变结构域(V_H)。通过使用连接体(该连接体太短以至于在 同一链中的两个结构域之间不能配对),迫使所述的结构域与一个链的互补结构域配对,并创建出两个抗原结合位点。在例如 EP 404,097;W0 93/11161;和 Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)中更全面地描述了双功能抗体。

[0277] 已经显示,整个抗体的片段可以执行结合抗原的功能。结合片段的实例为由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab(Ward, E. S. et al, (1989) *Nature* 341,544-546);由VH和CH1结构域组成的Fd片段(McCafferty et al(1990) *Nature*, 348,552-554);由单个抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段(Holt et al(2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490);以及(iv)dAb片段(Ward, E. S. et al, *Nature* 341,544-546(1989), McCafferty et al(1990) *Nature*, 348,552-554, Holt et al(2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490),其由VH或VL结构域组成;(v)分离的CDR区域;(vi)F(ab')₂片段,其为包含两个连接的Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH结构域和VL结构域通过肽连接体连接,其中所述的连接体使得两个结构域相结合,从而形成抗原结合位点(Bird et al, (1988) *Science*, 242,423-426, Huston et al, (1988) *PNAS USA*, 85,5879-5883);(viii)双特异性单链Fv二聚体(PCT/US92/09965);以及(ix)“双功能抗体”通过基因融合而构建的多价或多特异性片段(W094/13804;Holliger, P. (1993) et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448)。Fv、scFv或双功能抗体可以通过引入连接VH和VL结构域的二硫化物的键来稳定(Reiter, Y. et al, *Nature Biotech*, 14,1239-1245,1996)。此外,还可以制备包含与CH3结构域连接的scFv的微型抗体(Hu, S. et al, (1996) *Cancer Res*, 56, 3055-3061)。结合片段的其他实例为Fab'和Fab'-SH,其中Fab'通过在重链CH1结构域的羧基末端加入一些残基(包括得自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸)而与Fab片段不同,而Fab'-SH则为恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基基团的Fab'片段。

[0278] 术语“可变的”是指这样的事实,即,在抗体的序列中,可变结构域的某些部分有较大不同,并且这些部分是形成各特定抗体对特定抗原具有结合亲和性的原因。但是,所述的变化性并非均匀地分布于抗体的整个可变结构域中。在轻链和重链的可变结构域中,所述

的部分集中在被称为互补性决定区 (CDR) 的节段中。保守性更高的可变结构域部分被称为构架区 (FR)。天然重链和轻链的可变结构域均包含四个 FR 区域,其主要采用 β -片构造,并通过三个 CDR 连接,其中所述的三个 CDR 形成了环连接,并且在某些情况下形成了 β -片结构的一部分。在各链中的 CDR 通过 FR 区域以紧密接近的方式被保持在一起,并且如果具有得自其他链的 CDR 则有助于形成抗体的抗原结合位点 (参见 Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。恒定结构域通常不直接涉及抗原的结合,但是可以影响抗原结合的亲和性并且表现出多种效应器功能,例如在 ADCC、CDC 和 / 或细胞凋亡中抗体参与。

[0279] 术语“高变区”在本文中用于指与抗体与抗原的结合有关的抗体的氨基酸残基。高变区涵盖了“互补性决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (例如轻链可变结构域的残基 24-46 (L1)、50-56 (L2) 以及 89-97 (L3) 和重链可变区的残基 31-35 (H1)、50-65 (H2) 以及 95-102 (H3); Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)), 和 / 或得自高变区的那些残基 (例如轻链可变结构域的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 以及 91-96 (L3) 和重链可变区的残基 26-32 (H1)、53-55 (H2) 以及 96-101 (H3); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol, 196 :901-917 (1987))。“构架”或“FR”残基为在 CDR 侧翼的那些可变结构域残基。FR 残基存在于嵌合抗体、人源化的抗体、人源抗体、结构域抗体、双特异性抗体、vaccibody、线性抗体以及双功能抗体。

[0280] 如本文所用,靶向结合剂、靶向结合蛋白质、特异性结合蛋白质等术语是指优选地与靶向位点结合的抗体或其结合片段。在一个实施方案中,所述的靶向结合剂仅对一个靶向位点是特异性的。在其他实施方案中,所述的靶向结合剂对多于一个的靶向位点是特异性的。在一个实施方案中,所述的靶向结合剂可以是单克隆抗体,并且所述的靶向位点可以是抗原决定部位。

[0281] “结合片段”是通过重组 DNA 技术或者通过完整抗体的酶解或化学断裂而制备抗体的。结合片段包括 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb 以及单链抗体。除了“双特异性”或“双功能”抗体以外的抗体可以理解为具有其每个结合位点都是相同的。当过量的抗体将受体与反受体结合的数量减少至少大约 20%、40%、60% 或 80%, 并且更通常大于大约 85% 时 (在体外竞争性结合测试方法中测定), 抗体基本上抑制了受体对反受体的附着。

[0282] 术语“抗原决定部位”包括能够与免疫球蛋白或 T 细胞受体特异性结合的蛋白质决定簇。抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团 (例如氨基酸或糖的侧链) 组成, 并且可以但不总是具有特异的三维结构特征以及特异的电荷特征。当解离常数为 $\leq 1 \mu\text{M}$, 优选为 $\leq 100\text{nM}$ 并且最优选为 $\leq 10\text{nM}$ 时, 认为抗体特异性地与抗原结合。

[0283] 术语“试剂”在本文中用于指化学化合物、化学化合物的混合物、生物学大分子或者由生物学材料制得的提取物。

[0284] 关于 CD105 多肽的“活性的”或“活性”是指具有天然 CD105 多肽的生物学或免疫学活性的 CD105 多肽部分。“生物学”在本文中用于指由天然 CD105 多肽的活性得到的生物学功能。优选的 CD105 生物学活性包括例如 CD105 诱导的细胞粘附和侵入和 / 或血管生成和 / 或增殖。

[0285] “哺乳动物”在本文中用于指被认为是哺乳动物的任何动物。优选的是,所述的哺乳动物为人。

[0286] “动物”在本文中涵盖了被认为是哺乳动物的动物。优选的是,所述的动物为人。

[0287] 术语“mAb”是指单克隆抗体。

[0288] “脂质体”在本文中用于指可以用于将药品传递给哺乳动物的小囊泡,其中所述的药品可以包括本发明的 CD105 多肽或者是针对这种 CD105 多肽的抗体。

[0289] “标记”或“标记的”在本文中用于指向多肽中加入可检测的部分,例如放射性标记、荧光标记、酶标记、化学发光标记或生物素基团。放射性同位素或放射性核可以包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ; 荧光标记可以包括若丹明、镧系元素、磷或 FITC; 酶标记可以包括辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶。

[0290] 其他标记包括(为了说明而并非进行限定):酶,例如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(“G6PDH”)、 α -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖淀粉酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、溶菌酶、苹果酸酯脱氢酶和过氧化物酶;染料;其他荧光标记或荧光剂,包括例如荧光素及其衍生物、荧光染料、GFP(GFP 即“绿色荧光蛋白质”)、丹黄酰类、伞形酮、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛以及荧光胺;荧光团,例如镧系穴状化合物及螯合物,如 Europium 等(Perkin Elmer 和 Cis Biointernational);化学发光标记或化学发光试剂(chemiluminescer),例如异氨基苯二酰肼、发光氨和二噁烷;感光剂;辅酶;酶底物;颗粒,例如乳胶颗粒或碳颗粒;金属溶胶;微晶;脂质体;细胞等,其可以进一步用染料、催化剂或其他可检测的基团进行标记;分子,例如生物素、地高辛或 5-溴脱氧尿苷;毒素部分,例如选自假单胞菌外毒素(PE、或者其细胞毒素的片段或突变体)、白喉(Diphtheria)毒素或者其细胞毒素的片段或突变体、肉毒杆菌毒素 A、B、C、D、E 或 F、蓖麻毒素或者其细胞毒素的片段(例如蓖麻毒素 A)、相思豆毒素或者其细胞毒素的片段、皂草素或者其细胞毒素的片段、商陆抗病毒毒素或者其细胞毒素的片段、异株泻根毒蛋白 1(bryodin)或者其细胞毒素的片段中的毒素部分。

[0291] 术语“药剂或药品”在本文中用于指当适当地对患者进行给药时能够诱导所需的治疗作用的化学化合物或组合物。根据本领域的常规用法,本文中还是有了其他化学术语,如 The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(Parker, S, Ed, McGraw-Hill, San Francisco(1985))(该文献以引用方式并入本文)中举例的那些。

[0292] 如本文所用,“基本上为纯的”是指目标物种为存在的主要物种(即,以摩尔计,在所述的组合物中,目标物种比任何其他单个物种都更加丰富),并且优选的是基本上为纯的部分为其中目标物种包含所有存在的大分子物种的至少大约 50%(以摩尔计)的组合物。通常,基本上为纯的组合物包含所述组合物中存在的所有大分子物种的大于大约 80%,更优选的是大于大约 85%、90%、95%和 99%。更优选的是,将目标物种纯化至基本为同质性的(通过常规的检测方法不能再所述的组合物中检测到污染物种),其中所述的组合物基本由单一的大分子物种组成。

[0293] 术语“患者”包括人和兽医的受试对象。

[0294] “抗体依赖的细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达 Ig Fc 受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶向细胞上的结合抗体,并随后使得所述的靶向细胞溶解。用于

介导 ADCC 的首要细胞 (NK 细胞) 仅表达 $Fc\gamma RIII$, 而单核细胞表达 $Fc\gamma RI$ 、 $Fc\gamma RII$ 以及 $Fc\gamma RIII$ 。造血细胞上 FcR 的表达概括于 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92(1991) 的 464 页表 3 中。为了估测所关注分子的 ADCC 活性, 可以进行体外 ADCC 测试, 例如在美国专利 No. 5, 500, 362 或 5, 821, 337 中所描述的方法。用于这种测试的可用的效应器细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和自然杀伤 (NK) 细胞。可选择地或此外, 可以在体内 (例如在 Clynes et al. *PNAS(USA)* 95:652-656(1988) 如中所公开的动物模型中) 估测所关注分子的 ADCC 活性。“补体依赖的细胞毒性”和“CDC”是指抗体实施它们的细胞杀死功能所采用的机制。该机制是通过 $C1q$ (其为补体的第一成分的构成部分) 与 Igs 、 IgG 或 IgM (其与抗原形成络合物) 的 Fc 结构域相结合而引发的 (Hughes-Jones, N. C, and B. Gardner. 1979. *Mol. Immunol.* 16:697)。 $C1q$ 为存在于人血清中浓度为 $70\mu g/ml$ 的 $\sim 410kDa$ 的大型络合结构的糖蛋白 (Cooper, N. R. 1985. *Adv. Immunol.* 37:151)。 $C1q$ 与两种丝氨酸蛋白酶 ($C1r$ 和 $C1s$) 在一起形成的络合物 $C1$ (补体的第一成分)。为了使 $C1$ 活化, 必须使 $C1q$ 的至少两个 N 末端球形头与 Igs 的 Fc 结合, 因此启动补体的级联反应 (Cooper, N. R. 1985. *Adv. Immunol.* 37:151)。

[0295] 如本文所用, 术语“抗体的半衰期”是指抗体的药代动力学性质, 其为在给药之后抗体分子的平均存活时间的量度。抗体的半衰期可以表示为消除已知量的免疫球蛋白的 50% 所需要的时间, 其中所述的免疫球蛋白得自患者身体或其特定的区室 (compartment) (例如在血清或血浆中测定 (即, 循环半衰期) 或在其他组织中)。一种免疫球蛋白或一类免疫球蛋白与另一种免疫球蛋白或一类免疫球蛋白的半衰期可以是不同的。通常, 对于所给药的抗体而言, 在循环中, 抗体半衰期的增长使得平均停留时间 (MRT) 增长。

[0296] 术语“同种型”是指抗体重链或轻链恒定区的分类。抗体的恒定结构域与抗原的结合无关, 但是表现出多种效应器功能。根据重链恒定区的氨基酸序列, 给定人源抗体或免疫球蛋白可以指定为免疫球蛋白的五个主要种类 (IgA 、 IgD 、 IgE 、 IgG 和 IgM) 中的一种。这些种类中的若干个种类可以进一步分为亚种 (同种型), 例如 $IgG1(\gamma 1)$ 、 $IgG2(\gamma 2)$ 、 $IgG3(\gamma 3)$ 和 $IgG4(\gamma 4)$ 以及 $IgA1$ 和 $IgA2$ 。与免疫球蛋白的不同种类相应的重链恒定区分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类的免疫球蛋白的结构和三维构造是公知的。在多种人源免疫球蛋白种类中, 已知仅有人源 $IgG1$ 、 $IgG2$ 、 $IgG3$ 、 $IgG4$ 和 IgM 能够活化补体。已知在人类中, 人 $IgG1$ 和 $IgG3$ 是可以介导的。人源轻链恒定区可以分为两个主要的种类: γ 和 λ 。

[0297] 如果需要的话, 例如利用不同同种型的生物学性质, 特异性结合 CD105 的抗体的同种型可以被转变。例如, 在某些环境下, 在关于作为对抗 CD105 的治疗性抗体的抗体的生成中, 可能理想的是所述的抗体能够结合补体并参与补体依赖的细胞毒性 (CDC)。存在有大量的能够结合补体并参与依赖的细胞毒性的同种型抗体, 包括但不限于以下这些: 鼠 IgM 、鼠 $IgG2a$ 、鼠 $IgG2b$ 、鼠 $IgG3$ 、人 IgM 、人 IgA 、人 $IgG1$ 和人 $IgG3$ 。在另一个实施方案中, 在关于作为对抗 CD105 的治疗性抗体的抗体的生成中, 可能理想的是所述的抗体能够结合效应器细胞上的 Fc 受体, 并参与抗体依赖的细胞毒性 (ADCC)。存在有大量的能够结合效应器细胞上的 Fc 受体并参与抗体依赖的细胞毒性的同种型抗体, 包括但不限于以下这些: 鼠 $IgG2a$ 、鼠 $IgG2b$ 、鼠 $IgG3$ 、人 $IgG1$ 和人 $IgG3$ 。应该理解的是, 所生成的抗体最开始并非必须具有这种同种型, 但是所述的所生成的抗体可以具有任何同种型, 并且该抗体可以为在采

用本领域公知的常规技术之后而被改变的同种型。此类技术包括使用定点重组技术（例如参见美国专利 No. 4, 816, 397）、细胞 - 细胞融合技术（例如参见美国专利 No. 5, 916, 771 和 6, 207, 418）等。

[0298] 例如，本文所讨论的抗 CD105 的抗体为全人源抗体。如果所具有的抗体需要与 CD105 相结合，可以在仍具有相同的可变区（其定义了抗体的特异性和部分亲和性）的同时，容易地为被改变从而形成人 IgM、人 IgG1 或人 IgG3 同种型的同种型。然后，此类分子能够结合补体并参与 CDC；和 / 或能够结合效应器细胞上的 Fc 受体并参与 ADCC。

[0299] “全血测试”使用了未分级的血液作为天然效应器的来源。血液的血浆中包含补体、以及表达 FcR 的细胞效应器（例如多形性核细胞（PMN）和单核细胞（MNC））。因此，全血测试可以同时评价体外 ADCC 和 CDC 效应器机制的协同作用。

[0300] 如本文所用，“治疗有效”量为向受试对象提供某些改善或益处的量。换言之，“治疗有效”量为在至少一个临床症状中提供一定程度的减缓、减轻和 / 或降低的量。与可以通过本发明的方法治疗的紊乱相关的临床症状是本领域的技术人员所公知的。此外，本领域的技术人员可以理解的是治疗效果并非必须是完全的或治愈的，只要提供给受试对象某些益处即可。

[0301] 如本文所用，术语“和 / 或”被认为是两种特定的特征或成分中的每一种（包括另一种或不包括另一种）的具体的公开。例如“A 和 / 或 B”被认识是 (i)A、(ii)B 和 (iii)A 和 B 中的每一种的具体公开，如同每一种都在本文中单独列出一样。

[0302] 抗体的结构

[0303] 已知，抗体的基本结构包含四聚体。每个四聚体都由两个相同的多肽链对构成，每个多肽链对都具有一条“轻”链（大约 25kDa）和一条“重”链（大约 50-70kDa）。每条链的氨基末端都包含主要用于抗原识别的大约 100 至 110 或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基末端都定义了主要用于效应器功能的恒定区。人源轻链可以分为 γ 和 λ 轻链。重链可以分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 和 ϵ ，并且将抗体的同种型分别定义为 IgM、IgD、IgA 和 IgE。在轻链和重链中，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区相连，而重链还包含大约 10 以上的氨基酸的“D”区。通常参见 Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W, ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989))（该文献以引用方式并入本文以用于所有目的）。各轻链 / 重链对的可变区形成可抗体的结合位点。

[0304] 因此，完整的抗体具有两个结合位点。除了双功能或双特异性抗体以外，所述的两个结合位点是相同的。

[0305] 所述的链都表现为相对保守的构架区（FR）通过三个高变区（也称为 CDR）相连的相同的常规结构。得自各多肽对的两条链的 CDR 通过构架区对其，从而能够结合特异性的抗原决定部位。由 N 末端至 C 末端，轻链和重链都包含结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。分配在各结构域中的氨基酸根据了 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 和 1991))，或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196 :901-917 (1987) ; Chothia et al. Nature 342 :878-883 (1989) 的定义。

[0306] 双特异性或双功能抗体为具有两条不同的重链 / 轻链对和两个不同的结合位点的人工杂交抗体。在一个例子中，本发明的双特异性抗体为具有对于至少两个不同 CD105

抗原决定部位具有结合特异性的抗体。由于本发明的多种 CD105 靶向结合剂具有不同抗原决定部位或具有部分或重叠抗原决定部位,因此涵盖本发明的双特异性抗体可包括具有不同或重叠抗原决定部位的 CD105 靶向结合剂的任意组合。例如,6A6 和 6B10 具有与 4D4 和 10C9 不同的抗原决定部位。在一个例子中,双特异性抗体具有 6A6 或 6B10 的高变区或与其具有至少 50,60,70,80 或 90%同源性的区域,以及 4D4 或 10C9 的可变或高变区或与其具有至少 50,60,70,80 或 90%同源性的区域。

[0307] 双特异性或双功能抗体为具有两条不同的重链/轻链对和两个不同的结合位点的人工杂交抗体。双特异性抗体可以通过多种方法(包括杂交瘤细胞的融合或者链接 Fab' 片段)制备。例如参见 Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79 :315-321(1990), Kostelny et al. J. Immunol. 148 :1547-1553(1992)。在具有单结合位点的片段形式(例如 Fab、Fab' 和 Fv)中,不存在双特异性抗体。通常,VH 结构域与 VL 结构域配对,从而提供了抗体的抗原结合位点,但是单独的 VH 或 VL 结构域也可以用于结合抗原。VH 结构域(参见表 2)可以与 VL 结构域(参见表 2)配对,这样形成了包含 VH 和 VL 结构域的抗体的抗原结合位点。

[0308] 通常,双特异性抗体是具有对于至少两个不同抗原决定部位具有结合特异性的抗体。示例性双特异性抗体可结合 CD105 蛋白的两个不同抗原决定部位。其他这样的抗体可含有对于另一单位具有结合位点的 CD105 结合位点。可选择地,抗-CD105 臂可联合结合白血球上引发分子的臂,例如 T-细胞受体分子(例如 CD3),或 IgG(Fc γ R)的 Fc 受体例如 Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和 Fc γ RIII(CD16),以使细胞防御机理聚集和定位至 CD105-表达细胞。双特异性抗体还可用于使细胞毒素剂定位至表达 CD105 的细胞。这些抗体具有 CD105-结合臂与结合细胞毒素剂的臂(例如皂草素、抗-干扰素- α 、长春花生物碱、蓖麻毒素 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)。双特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段(例如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的(例如参见 Millstein et al., Nature, 305 :537-539(1983); Traunecker et al., EMBO J., 10 :3655-3659(1991); Suresh et al., Methods in Enzymology, 121 :210(1986); Kostelny et al., J. Immunol., 148(5) :1547-1553(1992); Hollinger et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 90 :6444-6448(1993); Gruber et al., J. Immunol., 152 :5368(1994); 美国专利 No. 4,474,893 ;4,714,681 ;4,925,648 ;5,573,920 ;5,601,819 ;5,731,168 ;4,676,980 ;5,897,861 ;5,660,827 ;5,811,267 ;5,849,877 ;5,948,647 ;5,959,084 ;6,106,833 ;6,143,873 与 4,676,980, WO 94/04690 ;和 WO 92/20373)。

[0309] 全长双特异性抗体的传统制备基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两个链具有不同的特异性(Millstein et al., Nature, 305 :537-539(1983))。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(quadromas)产生 10 种不同抗体分子的潜在混合物,其中仅有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(其通常通过亲和色谱步骤来进行)是相当不方便的,并且产物收率较低。类似的工序公开在下列文献中:WO 93/08829 和 Traunecker et al., EMBO J., 10 :3655-3659(1991)。

[0310] 根据不同方案,具有期望的结合特异性(抗体-抗原联合位点)的抗体可变结构域融合免疫球蛋白恒定结构域序列。优选地,融合与 Ig 重链恒定结构域进行,该结构域包含铰链区 C_H2 和 C_H3 的至少一部分。优选的是,含有用于轻链结合所必需的位点的第一重链

恒定区 (C_H1) 存在于融合物的至少一种中。编码免疫球蛋白重链 (如果需要, 免疫球蛋白轻链) 融合物的 DNA 插入单独的表达载体中, 并且共转染到合适的宿主细胞中。这在下列方面中提供更大的灵活性: 当在构建中使用的不相等比例的三种多肽链提供期望的双特异性抗体的最优收率时, 调节在这些实施方案中三种多肽片段的相互比例。然而, 当相等比例的至少两种多肽链的表达导致较高收率或者当比例对于所述期望的链组合的收率没有显著影响时, 可以将用于两种或所有三种多肽链的编码序列插入单一表达载体中。

[0311] 在该方案的一个实施方案中, 双特异性抗体由下列构成: 在一个臂具 有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链, 和在另一臂的杂交免疫球蛋白重链 - 轻链对 (提供第二结合特异性)。该不对称结构可促进期望的双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链组合的分离, 因为在仅一半双特异性分子中存在免疫球蛋白轻链提供一种容易的分离方式。对于产生双特异性抗体的进一步细节, 参见例如 Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986)。

[0312] 根据美国专利 No. 5, 731, 168 中所述的另一方案, 一对抗体分子之间的界面可工程化以从重组细胞培养基中回收的异源二聚体的百分率最大化。优选的界面包含 C_H3 结构域的至少一部分, 在该方法中, 来自第一抗体分子的界面的一种或多种小氨基酸侧链被更大侧链 (例如酪氨酸或色氨酸) 取代。通过使用较小侧链 (例如丙氨酸或苏氨酸) 来取代大氨基酸侧链, 和大侧链相同或类似尺寸的补偿“腔”产生在第二抗体分子的界面上。这提供下列机理: 相对于其他不需要的最后产物例如同源二聚体, 异源二聚体的收率增加。

[0313] 双特异性抗体包括交联或“异源缀合物”抗体。例如, 异源缀合物中的一种抗体可耦合抗生物素蛋白, 另一种则耦合生物素。这些抗体例如已经被提出来靶向免疫系统细胞至不需要的细胞 (美国专利 No. 4, 676, 980) 和用于治疗 HIV 传染 (美国专利 No. 5, 897, 861)。异源缀合物抗体可使用任何便捷的交联方法来制备。合适的交联剂是本领域已知的, 并连同一些交联技术公开在美国专利 No. 4, 676, 980。

[0314] 从抗体片段来产生双特异性抗体的技术也已经在文献中有所描述。例如, 双特异性抗体可使用化学交联来制备。Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) 描述了这样的方法, 其中完整抗体被蛋白水解分裂以产生 $F(ab')_2$ 片段。这些片段在二巯基络合物例如亚砷酸钠存在下减少以稳定附近双硫醇并且防止二硫化物形成。然后, 产生的 Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸酯 (TNB) 衍生物。然后一种 $Fab' - TNB$ 通过用巯基乙胺还原而重新转化为 $Fab' -$ 硫醇, 并且和等摩尔量的其他 $Fab' - TNB$ 衍生物混合以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作用于选择酶的固定的试剂。

[0315] 近年的进展促进了从 *E. coli* 直接回收 $Fab' - SH$ 片段, 其可化合耦合以形成双特异性抗体。Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) 描述了全 人源化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的制备。各 Fab' 片段单独选自 *E. coli*, 并且体外进行指导的化合耦合以形成双特异性抗体。这样形成的双特异性抗体能够结合过度表达 ErbB2 受体的细胞和正常人 T 细胞, 以及引发人细胞毒性淋巴细胞对于人乳腺癌靶点的溶胞活性。

[0316] 已近描述了直接从重组细胞培养基制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如, 双特异性抗体使用亮氨酸拉链来制备。Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)。来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合连接两种不同抗体的 Fab' 部分。抗体同源二聚体在铰链区较少以形成单体, 然后重新氧化以形成抗体异源二

聚体。该方法还可用于抗体同源二聚体的制备。由 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :6444-6448(1993) 描述的“双特异抗体 (diabody)”技术提供用于制备双特异性抗体片段的可选择机理。片段包含通过接头连接 V_L 的 V_H , 其太短而不允许在相同链上的两个结构域之间进行配对。因此, 一个片段的 V_H 和 V_L 结构域被迫使与另一片段的互补 V_L 和 V_H 结构域配对, 从而形成两个抗原-结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体来制备双特异性抗体片段的另一策略。参见 Gruber et al., J. Immunol., 152 :5368(1994) 和美国专利 No. 5, 591, 828 ;4, 946, 778 ;5, 455, 030 ;和 5, 869, 620。

[0317] 人源抗体和抗体的人源化

[0318] 人源抗体避免了与具有鼠或大鼠可变区和 / 或恒定区的抗体有关的一些问题。这种鼠或大鼠的衍生蛋白质的存在可以使得所述的抗体被快速清除, 或者可以使患者产生对抗所述抗体的免疫应答。为了避免使用鼠或大鼠的衍生抗体, 可以通过将功能人源抗体的基因座引入到啮齿动物、其他哺乳动物或动物中来生成全人源抗体, 使得啮齿动物、其他哺乳动物或动物产生全人源抗体。

[0319] 用于生成全人源抗体的一种方法为使用 XenoMouse® 品系的小鼠, 该小鼠经过基因工程操作而包含人源重链基因座和 γ 轻链基因座的、至多且少于 1000kb 尺寸的种系改装片段。参见 Mendez et al. Nature Genetics 15 :146-156(1997) 以及 Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188 :483-495(1998)。XenoMouse® 品系的小鼠得自 Amgen 公司 (Fremont, California, U. S. A)。

[0320] 然后, 这种小鼠能够产生人源免疫球蛋白分子和抗体, 并且在鼠免疫球蛋白分子和抗体的制备中具有缺陷。用于取得上述结果的技术在 1996 年 12 月 3 日提交的美国专利申请系列 No. 08/759, 620 和 1998 年 6 月 11 日公开的国际专利申请 No. WO 98/24893 和 2000 年 12 月 21 日公开的 WO 00/76310 中有所公开, 这些文献的公开内容以引用方式并入本文。此外, 参见 Mendez et al. Nature Genetics 15 :146-156(1997), 该文献的公开内容以引用方式并入本文。

[0321] 在 1990 年 1 月 12 日提交的美国专利申请系列 No. 07/466, 008、1990 年 11 月 8 日提交的 07/610, 515、1992 年 7 月 24 日提交的 07/919, 297、1992 年 7 月 30 日提交的 07/922, 649、1993 年 3 月 15 日提交的 08/031, 801、1993 年 8 月 27 日提交的 08/112, 848、1994 年 4 月 28 日提交的 08/234, 145、1995 年 1 月 20 日提交的 08/376, 279、1995 年 4 月 27 日提交的 08/430, 938、1995 年 6 月 27 日提交的 08/430, 938、1995 年 6 月 5 日提交的 08/464, 584、1995 年 6 月 5 日提交的 08/464, 582、1995 年 6 月 5 日提交的 08/463, 191、1995 年 6 月 5 日提交的 08/462, 837、1995 年 6 月 5 日提交的 08/486, 853、1995 年 6 月 5 日提交的 08/486, 857、1995 年 6 月 5 日提交的 08/486, 859、1995 年 6 月 5 日提交的 08/462, 513、1995 年 10 月 2 日提交的 08/724, 752、1996 年 12 月 3 日提交的 08/759, 620、2001 年 11 月 30 日提交的美国公开 2003/0093820、以及美国专利 No. 6, 162, 963、6, 150, 584、6, 114, 598、6, 075, 181 和 5, 939, 598 及日本专利 No. 3068180 B2、3 068 506 B2 和 3 068 507 B2 中, 进一步讨论和描述了 XenoMouse® 品系的小鼠的制备。此外, 参见 1996 年 6 月 12 日公开授予的欧洲专利 No, EP 0 463 151 B1、1994 年 2 月 3 日公开的国际专利申请 No, WO 94/02602、1996 年 10 月 31 日公开的国际专利申请 No, WO 96/34096、1998 年 6 月 11 日公开的 WO 98/24893、2000 年 12 月 21 日公开的 WO 00/76310。上文所述专利、申请和参考文献的各个

公开内容在此均以引用方式全文并入本文。

[0322] 在可选择的方法中,其他人(包括GenPharm International公司)采用了“迷你基因座”的方法。在迷你基因座方法中,通过包含得自Ig基因座的片段(单个基因)而模仿了外源Ig基因座。因此,在构建体(construct)中形成一个或多个V_H基因、一个或多个D_H基因、一个或多个J_H基因、 μ 恒定区以及通常的第二恒定区(优选为 γ 恒定区),以用于插入到动物中。这种方法在Surani et al.的美国专利No. 5,545,807、均属于Lonberg和Kay的美国专利No. 5,545,806,5,625,825,5,625,126,5,633,425,5,661,016,5,770,429,5,789,650,5,814,318,5,877,397,5,874,299和6,255,458、Krimpenfort和Berns的美国专利No. 5,591,669和6,023,010、Berns et al的美国专利No. 5,612,205,5,721,367和5,789,215、以及Choi和Dunn的美国专利No. 5,643,763;以及1990年8月29日提交的GenPharm国际美国专利申请系列No. 07/574,748、1990年8月31日提交的07/575,962、1991年12月17日提交的07/810,279、1992年3月18日提交的07/853,408、1992年6月23日提交的07/904,068、1992年12月16日提交的07/990,860、1993年4月26日提交的08/053,131、1993年7月22日提交的08/096,762、1993年11月18日提交的08/155,301、1993年12月3日提交的08/161,739、1993年12月10日提交的08/165,699、1994年3月9日提交的08/209,741中有所描述,这些文献的公开内容均以引用方式并入本文。此外,参见欧洲专利No. 0 546 073 B1、国际专利申请No. WO 92/03918,WO 92/22645,WO 92/22647,WO 92/22670,WO 93/12227,WO 94/00569,WO 94/25585,WO 96/14436,WO 97/13852和WO 98/24884以及美国专利No. 5,981,175,这些文献的公开内容均以引用方式全文并入本文。进一步参见Taylor et al,1992,Chen et al,1993,Tuailon et al,1993,Choi et al,1993,Lonberg et al,(1994),Taylor et al,(1994)和Tuailon et al,(1995),Fishwild et al,(1996),这些文献的公开内容均以引用方式全文并入本文。

[0323] Kirin还论证了得自小鼠的人源抗体的生成,其中通过微细胞融合而引入大片的染色体或整条染色体。参见欧洲专利申请No. 773 288和843 961,该文献的公开内容以引用方式并入本文。此外,已经产生了KMTM-小鼠,其为Kirin的Tc小鼠与Medarex的迷你基因座(Humab)小鼠的杂交育种的结果。这些小鼠具有Kirin小鼠的人源IgH导入染色体和Genpharm小鼠的 γ 链转基因(Ishida et al,Cloning Stem Cells,(2002)4:91-102)。

[0324] 人源抗体还可以通过体外方法衍生得到。合适的实例包括但不限于噬菌体展示(Medimmune, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion(formerly Proliferon), Affimed)、核糖体展示(Medimmune)、酵母菌展示等。

[0325] 抗体的制备

[0326] 如本文所述,通过使用XenoMouse[®]技术(下文中详细描述)来制备抗体。这种小鼠能够产生人源免疫球蛋白分子和抗体,并且在鼠免疫球蛋白分子和抗体的产生中是有缺陷的。用于取得上述结果的技术在本文的背景技术部分公开的专利、申请和参考文献中有所公开。但是具体而言,小鼠和所得的抗体的转基因制备的优选实施方案在1996年12月3日提交的美国专利申请系列No. 08/759,620、1998年6月11日公开的国际专利申请No. WO 98/24893和2000年12月21日公开的WO 00/76310中有所描述,这些文献的公开内容以引用方式并入本文。此外,参见Mendez et al.Nature Genetics 15:146-156(1997),该文献的公开内容以引用方式并入本文。

[0327] 通过采用这些技术,已经制备出针对多种抗原的全人源单克隆抗体。基本上为,使用所关注的抗原(例如 CD105)免疫 XenoMouse[®]系小鼠,由超免疫的小鼠中回收淋巴细胞(例如 B 细胞),并将回收的淋巴细胞与骨髓类细胞系融合,从而制备得到无限增殖的杂交瘤细胞系。对这些杂交瘤细胞系进行筛选和选择,从而鉴定出能够产生特异性地针对所关注的抗原的抗体的杂交瘤细胞系。本文提供了用于产生能够生成对 CD105 具有特异性的抗体的多发性杂交瘤细胞系的方法。此外,本文提供了由所述的这种细胞系产生的抗体的特征,包括所述抗体的重链和轻链的核苷酸和氨基酸序列分析。

[0328] 可选择地,不采用将 B 细胞融合到骨髓瘤细胞中以产生杂交瘤细胞的方法,可以直接测试 B 细胞。例如,可以由超免疫的 XenoMouse[®]小鼠中分离 CD19+B 细胞,并使其增殖和分化形成分泌抗体的浆细胞。然后,针对对抗 CD105 免疫原的反应性,通过 ELISA 来筛查得自细胞上清液中的抗体。还可以针对对抗 CD105 的片段的免疫反应性来筛查上清液,从而进一步针对与 CD105 上的所关注的功能结构域的结合情况来进一步绘制(map)不同的抗体。抗体还可以筛选其他相关人糖苷内切酶和针对大鼠、小鼠与非人灵长动物例如短尾猴、CD105 同源物,后者确定种类的交叉反应性。得自装有所关注抗体的孔中的 B 细胞可以通过多种方法而形成无限增殖的,包括进行融合从而由单个的或由合并的孔制得杂交瘤细胞,或者使用 EBV 进行感染或通过已知的无限增殖基因进行转染,然后平板接种于合适的培养基中。可选择地,然后采用 CD105 特异性的溶血空斑测试来分离具有所需特异性的分泌抗体的单种浆细胞(例如参见 Babcook et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-48(1996))。靶向溶解的细胞优选为使用 CD105 抗原涂覆的绵羊红血细胞(SRBC)。

[0329] 在包含浆细胞(其分泌所关注的免疫球蛋白和补体)的 B 细胞培养物存在的条件下,斑点的形成表明包围所关注的浆细胞的绵羊血液红细胞发生了特异性的 CD105 介导的水解。可以分离出处于所述斑点中心的单个的抗原特异性浆细胞,并且由单个的浆细胞中分离得到编码了抗体的特异性的遗传信息。采用逆转录以及随后的 PCR(RT-PCR),可以克隆编码所述抗体的重链可变区和轻链可变区的 DNA。然后,可以将这种克隆的 DNA 进一步插入到合适的表达载体中,优选的是载体盒,例如 pcDNA,更优选的是例如包含免疫球蛋白重链和轻链的恒定结构域的 pcDNA 载体。然后,可以将所生成的载体转染到宿主细胞(例如 HEK293 细胞、CHO 细胞)中,并在常规营养培养基(按照适用于诱导转录、选择转化子或扩增编码所需序列的基因的条件进行修改)中进行培养。

[0330] 如所理解的那样,特异性结合 CD105 的抗体可以在除了杂交瘤细胞系以外的细胞系中表达。编码特定抗体的序列可以用于转化合适的哺乳动物宿主细胞。转化可以通过任何已知的用于将多核苷酸引入到宿主细胞中或通过本领域中已知的转染过程的方法(例如包括将所述的多核苷酸包装到病毒中(或病毒载体中)并用所述的病毒(或载体)转导宿主细胞,如在美国专利 No. 4, 399, 216, 4, 912, 040, 4, 740, 461 和 4, 959, 455 中示例说明的那样,这些专利文献在此以引用方式并入本文)进行。所采用的转化过程取决于待转化的宿主。用于将异源多核苷酸引入到哺乳动物细胞中的方法是本领域公知的,并包括右旋糖酐介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸囊封与脂质体中以及将 DNA 直接微注射到核中。

[0331] 可以用作用于表达的宿主的哺乳动物细胞是本领域公知的,并且包括得自美国典型培养物保藏中心(ATCC)中的许多无限增殖的细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵细胞

(CHO)、HeLa 细胞、幼地鼠肾细胞 (BHK)、猴肾细胞 (COS)、人肝细胞的癌细胞 (例如 Hep G2)、人上皮肾 293 细胞、以及多种其他细胞系。通过测定哪种细胞系具有高的表达水平并产生具有构成性 CD105 结合性质的抗体来选择特定优选的细胞系。

[0332] 在细胞-细胞融合技术中,制备拥有具有任何所需同种型的重链的骨髓瘤、CHO 细胞或其他细胞系,并制备拥有轻链的另一种骨髓瘤、CHO 细胞或其他细胞系。因此,这种细胞可以被融合,并且可以分离出表达完整抗体的细胞系。

[0333] 因此,当生成满足上文所述的所需“结构”特性的抗体候选物时,通常可以通过同种型改变来提供具有至少某些所需“功能”特性的抗体候选物。

[0334] 治疗给药和配制物

[0335] 本发明的实施方案包括可用作疾病治疗的抗 CD105 抗体的无菌药物配制物。这种配制物会抑制天然 CD105 特异性配体例如 TGF- β 与 CD105 的结合,从而因此会有效地治疗其中例如血清或组织 CD105 的表达异常升高的病理学状况。抗 CD105 的抗体优选的是具有足够的亲和性,从而有效地抑制天然 CD105 特异性配体例如 TGF- β , 并且优选的是所述的抗体足够的作用时间,从而在人中较少的进行定量给药。持久的作用时间可以通过交替的肠胃外途径 (例如皮下注射或肌肉内注射) 而具有较低频率和更加方便的定量给药时间表。

[0336] 例如,可以通过在抗体的冻干和再构建之前或之后滤过无菌滤膜而创建得到。所述的抗体通常以冻干形式储存或储存于溶液中。通常,将治疗抗体的组合物放置在具有无菌通道口 (例如静脉输液袋) 的容器中,或者具有适配器 (其可以取回所述的配制物,例如可通过皮下注射针穿孔的阻塞物) 的瓶子。

[0337] 抗体的给药途径根据已知方法进行,例如通过静脉、腹膜内、大脑内、肌肉内、眼内、动脉内、膜内注射或注入,吸入或病灶内途径,直接注射到肿瘤位点,或者通过以下所述的缓释系统。所述的抗体优选的是通过注入或通过团注而进行连续地给药。

[0338] 待治疗用的抗体的有效量取决于 (例如) 治疗目标、给药途径以及患者的状况。因此,优选的是治疗专家对计量进行效价,并按照需要来修改给药途径以获得最佳的治疗效果。通常,临床医生给药抗体,直到达到取得所需效果的剂量为止。这种治疗过程可以通过常规的测试方法或通过本文所述的测试方法容易地监测。

[0339] 可以在具有可药用的载体中制备本文所述的抗体。这种治疗组合物可以通过静脉内给药,或者通过鼻或肺的形式 (优选的是以液体或粉末气雾剂 (冻干的) 的形式) 进行给药。还可以根据需要在肠胃外或皮下方式给药所述的组合物。当进行系统给药时,所述的治疗组合物应该是无菌的,无热原的,并且为适当考虑了 pH、等渗性和稳定性的可肠胃外用药的溶液形式。所述的这些状况是本领域的技术人员已知的。简言之,制备本文所述化合物的剂量配制物,以用于储存或通过具有所需纯度的化合物与可药用的载体、赋形剂或稳定剂混合来进行给药。所述的这种材料在所使用的剂量和浓度下对受试者是非独显的,并且包括缓冲剂,例如 TRIS HCl、磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐和其他有机酸盐;抗氧化剂,例如聚精氨酸、蛋白质 (例如血清白蛋白)、凝胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如 EDTA;糖醇,例如甘露醇或山梨醇;抗衡离子,例如钠和/或非离子表面活性剂,例如 TWEEN、PLURONICS 或聚乙二醇。

[0340] 可以根据在 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (2003)) 中所述的常规的制药实践来配制用于注射的无菌组合物。例如,所述的活性化合物溶解或悬浮于可药用的载体(例如水、天然存在的植物油(如芝麻油、花生油或棉籽油)、或者合成的脂肪媒介物(如油酸乙酯等))中可能是理想的。根据可药用的实践并入缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂等。

[0341] 缓释制备物的合适实例包括含有多肽的固态疏水性聚合物的半透性基质,其中所述的基质为成形制品、膜或微囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)如 Langer et al, J. Biomed Mater. Res, (1981) 15:167-277 and Langer, Chem. Tech, (1982) 12:98-105 所述,或者聚(乙烯醇))、聚乳酸(美国专利 No. 3,773,919、EP 58,481)、L-谷氨酸与 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman et al, Biopolymers, (1983) 22:547-556)、不可降解的乙烯-醋酸乙烯(Langer et al, 上文)、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(例如 LUPRON DepotTM, 由乳酸-乙醇酸共聚物与醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)、以及聚-D-(-)-3-羟丁酸(EP 133,988)。

[0342] 虽然诸如乙烯-醋酸乙烯和乳酸-乙醇酸之类的聚合物能够在 100 天的时间内释放分子,但是某些水凝胶在较短的时间内释放蛋白质。当囊封的蛋白质在体内长时间保持时,作为在 37°C 下暴露于潮湿环境的结果,它们会变性或聚集,从而导致生物学活性的损失以及免疫原性可能发生的变化。可以根据所涉及的机制,针对蛋白质的稳定来设计合理的策略。例如,如果发现聚集机制为通过二硫键的互换而在分子内形成 S-S 键,则可以通过对巯基残基进行修饰、由酸性溶液中冻干、控制含水量、使用合适的添加剂以及研发特定的聚合物基质组合物来取得稳定。

[0343] 缓释组合物还包括在合适的配制物(能够在悬浮溶液中保持为晶体)中悬浮的抗体晶体的制备。当这些制备物采用皮下或腹膜内的方式进行注射时,其能够产生缓释效果。其他组合物还包括脂质体包封抗体。包含这种抗体的脂质体本身可以通过已知的方法制备:美国专利 No. DE 3,218,121; Epstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692; Hwang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; 142,641; 日本专利申请 83-118008; 美国专利 No. 4,485,045 和 4,544,545; 以及 EP 102,324。

[0344] 通过主治医生考虑已知的多种因素来修改药品的作用来确定用于给定患者的抗体配制物的剂量,其中所述的因素包括疾病的严重程度和类型、体重、性别、日常饮食、给药的时间和途径、其他药剂以及其他相关的临床因素。可以通过体外或体内方法来确定治疗有效的剂量。

[0345] 待治疗用的本文所述的抗体的有效量取决于(例如)治疗目标、给药途径以及患者的状况。因此,优选的是治疗专家对计量进行效价,并按照需要来修改给药途径以获得最佳的治疗效果。根据上文提及的因素,常规的每日剂量可以为患者体重的大约 0.0001mg/kg、0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kg、10mg/kg 至最多 100mg/kg、1000mg/kg、10000mg/kg 或更多。根据上文提及的因素,所述的剂量可以为患者体重的 0.0001mg/kg 至 20mg/kg、0.0001mg/kg 至 10mg/kg、0.0001mg/kg 至 5mg/kg、0.0001 至 2mg/kg、0.0001 至 1mg/kg、0.0001mg/kg 至 0.75mg/kg、0.0001mg/kg 至 0.5mg/kg、0.0001mg/kg 至 0.25mg/kg、0.0001 至 0.15mg/kg、0.0001 至 0.10mg/kg、0.001 至 0.5mg/kg、0.01 至 0.25mg/kg 或者

0.01 至 0.10mg/kg。通常,临床医生给药治疗性的抗体,直到达到取得所需效果的剂量为止。这种治疗过程可以通过常规的测试方法或通过本文所述的测试方法容易地监测。

[0346] 本发明抗体的单次剂量可以重复,并且给药操作可以间隔至少 1 天、2 天、3 天、5 天、10 天、15 天、30 天、45 天、2 个月、75 天、3 个月或至少 6 个月。

[0347] 应该理解的是,根据本文所述的组合物和方法对治疗实体的给药操作可以与合适的载体、赋形剂以及其他试剂(其被并入到配制物中以提供改善的转移、传递、耐受等)一起给予。这些配制物包括(例如)粉末、糊状物、软膏、胶状物、蜡、油、脂质、包含囊泡(例如 Lipofectin™)的脂质(阳离子或阴离子)、DNA 缀合物、无水吸附糊状物、水包油及油包水的乳液、聚乙二醇(各种分子量的聚乙烯醇)、半固体凝胶、以及包含聚乙二醇的半固体混合物。根据本发明,在进行处理和/或治疗中,任何之前所述的混合物都是合适的,只要配制物中的活性组分没有因配制过程而失活并且所述的配制物是生理学相容的并耐受给药途径。此外参见 Baldrick P. “Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance.” *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32(2):210-8(2000), Wang W. “Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.” *Int. J. Pharm.* 203(1-2):1-60(2000), Charman WN “Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts.” *J Pharm Sci.* 89(8):967-78(2000), Powell et al. “Compendium of excipients for parenteral formulations” *PDA J Pharm Sci Technol.* 52:238-311(1998), 并且其中用于与配制物、赋形剂和载体有关的其他信息的引文都是药物化学剂所公知的。

[0348] 其他疗法的设计和产生

[0349] 根据本发明并基于本文中针对 CD105 所产生并表征的抗体的活性,设计抗体部分以外的其他治疗形式是方便的。这种形式包括但不限于改进的抗体疗法,例如双特异性抗体、免疫毒素和放射性标记疗法;单结构域抗体;抗体片段,例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 dAb;肽疗法的形成;新型支架中的 CD105 结合结构域;基因疗法;特定的细胞内抗体;反义疗法;以及小分子。

[0350] 可以通过在非抗体蛋白质支架(例如纤维连接蛋白或细胞色素 B 等)上排布 CDR(Haan & Maggos(2004) *BioCentury*, 12(5):A1-A6; Koide et al. (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284:1141-1151; Nygren et al. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7:463-469), 或者通过随机排列或突变位于蛋白质支架中环的氨基酸残基以赋予针对所需靶物的结合特异性来提供抗原结合位点。Nygren et al. 对于蛋白质中的新型结合位点进行基因工程的支架进行了详细的综述(Nygren et al. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7:463-469)。用于抗体模拟物的蛋白质支架在 WO/0034784(该文献以引用方式全文并入本文)中有所公开,其中发明人描述了具有至少一个随机排列的环的纤维连接蛋白 III 型结构域的蛋白质(抗体模拟物)。其中移植有一个或多个 CDR(例如一组 HCDR)的合适的支架可以由免疫球蛋白的基因超家族的任何结构域成员来提供。所述的支架可以为人或非人蛋白质。非抗体蛋白质的优点在于其可以在支架分子中提供抗原结合位点,其中所述的支架分子比至少某些抗体分子更小和/或更容易制造。小尺寸的结合成员可以赋予有用的生理学性质,例如能够进入细胞,深入地渗透到组织中或到达位于其他结构中的靶物中,或者在靶向抗原的蛋白质空腔中结合。在 Wess, 2004

中对抗原结合位点在非抗体蛋白质支架中的用途进行了综述 (Wess, L. In :BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004)。具有稳定的主链以及一个或多个可变环的蛋白质是典型的, 其中所述环的氨基酸序列发生特异性的随机的突变, 从而创建出能够结合靶向抗原的抗原结合位点。所述的这种蛋白质包括得自 *S. aureus* 的蛋白质的 IgG 结合结构域、铁传递蛋白、白蛋白、四连接素、纤维连接蛋白 (例如, 第 10 个纤维连接蛋白的 III 型结构域)、脂钙蛋白以及 γ 结晶性和其他 Affilin™ 支架 (Sci1 蛋白质)。其他方法的实例包括基于具有分子内二硫键的环蛋白-小蛋白质的合成“微体”、微蛋白 (Versabodies™, Amunix) 以及锚蛋白重复蛋白质 (DARPin, 分子配体)。

[0351] 除了抗体序列和 / 或抗原结合位点以外, 根据本发明的靶向结合剂可以包含例如形成肽或多肽 (例如支架结构域) 或者赋予所述分子除了结合抗原的能力之外的其他功能特征的其他氨基酸。本发明的靶向结合剂可以带有可检测的标记, 或者可以与毒素、靶向部分或酶 (例如通过肽键或连接体) 缀合。例如, 靶向结合剂可以包含催化位点 (例如在酶结构域中) 以及抗原结合位点, 其中所述的抗原结合位点与所述的抗原结合并因此使催化位点靶向所述的抗原。所述的催化位点可以抑制所述抗原的生物学功能 (例如通过裂解)。

[0352] 关于早期抗体疗法 (其中补体结合为理想的特性) 的产生, 可以在通过使用 (例如) 双特异性抗体、免疫毒素或放射性标记来杀死细胞时避免对补体的依赖。

[0353] 例如, 可以生成双特异性抗体, 其包含 (i) 两个抗体, 其中一个抗体对 CD105 具有特异性, 而与第一个抗体缀合连接的另一个抗体对第二分子具有特异性, (ii) 单个抗体, 其具有对 CD105 具有特异性的一条链以及对第二分子具有特异性的第二条链; 或者 (iii) 单链抗体, 其对 CD105 和其他分子具有特异性。可以采用公知的技术来生成这种双特异性抗体, 例如 (i) 和 (ii) 例如参见 Fanger et al. Immunol Methods 4:72-81(1994) and Wright and Harris, 上文; 以及 (iii) 例如参见 Traunecker et al. Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 51-52(1992)。在各种情况下, 可以制得针对重链活性受体的第二特异性, 包括但不限于 CD16 或 CD64 (例如参见 Deo et al. Immunol. Today 18:127(1997))、或者 CD89 (例如参见 Valerius et al. Blood 90:4485-4492(1997))。

[0354] 还可以采用本领域公知的技术对抗体进行修饰, 从而起到免疫毒素的作用。例如参见 Vitetta Immunol Today 14:252(1993)。此外, 参见美国专利 No. 5, 194, 594。关于放射性标记抗体的制备, 还可以采用本领域公知的技术容易地制备这种经过修饰的抗体。例如参见 Junghans et al. in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds, Lippincott Raven(1996))。此外, 参见专利 No. 4, 681, 581, 4, 735, 210, 5, 101, 827, 5, 102, 990 (RE 35, 500), 5, 648, 471 以及 5, 697, 902。各种免疫毒素或放射性标记的分子还可能杀死表达所需多聚体蛋白酶亚基的寡聚结构域的细胞。

[0355] 当抗体与试剂 (例如放射性同位素、药物组合物或毒素) 连接时, 预计所述的试剂具有选自抗有丝分裂剂、烷化剂、抗代谢物试剂、抗血管增生试剂、细胞凋亡试剂、生物碱试剂、COX-2 试剂、抗生素试剂以及他们的组合的药物性质。所述的药品可以选自氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸酯、亚硝酸类、三氮烯、叶酸类似物、蒽环类抗生素、紫杉烷类、COX-2 抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗代谢物、抗生素、酶、表鬼臼毒素、铂配位络合物、长春花生物碱、取代的脒、甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、拮抗剂、内皮他丁、紫杉醇、喜树碱、奥沙利铂、阿霉素以及它们的类似物和组合。

[0356] 在一个特定例子中,本发明的靶向剂缀合治疗剂或毒素,例如烯二炔分子家族的成员(例如次孢霉素和埃斯培拉霉素)。化学毒素还可以得自倍癌霉素(参见美国专利 No. 5,703,080 和美国专利 No. 4,923,990)、甲氨蝶呤、阿霉素、美法仑、苯丁酸氮芥、ARA-C、去乙酰长春酰胺、丝裂霉素 C、顺铂、依托泊苷、博来霉素以及 5-氟尿嘧啶。化学治疗剂的实例还包括阿霉素、亚德里亚霉素、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷(Ara-C)、环磷酰胺、塞替派、泰素帝(多西他奇)、白消安、细胞毒素、紫杉醇、甲氨蝶呤、顺铂、美法仑、长春碱、博来霉素、依托泊苷、道诺霉素、洋红霉素、氨喋呤、放线菌素、丝裂霉素、埃斯波霉素(美国专利 No. 4,675,187)、美法仑和其他相关氮芥。

[0357] 在某些实施方案中,本发明的靶向剂缀合细胞抑制、细胞毒性或免疫抑制剂。在一个实施方案中,细胞毒性剂选自:烯二炔、lexitropsin、倍癌霉素、紫杉烷、cryptophysin、巴卡亭衍生物、鬼臼毒素、嘌呤、多拉司他汀、maytansinoid、多拉司他汀和长春花生物碱。在特定实施方案中,细胞毒性剂是紫杉醇、多西紫杉醇、CC-1065、trichothene、SN-38、托泊替康、吗啉-阿霉素、根霉素、cyanomorpholino-阿霉素、多拉司他汀-10、棘霉素、考布他汀、加利车霉素、长春新碱、长春碱、长春地辛、长春瑞滨、VP-16、喜树碱、epithilone A、epithilone B、诺考达唑、coichicine、colcimid、雌氮芥、西马多丁、盘皮海绵内酯、软珊瑚醇、美登素 DM-1、auristatin E、AEB、AEVB、AEFP、MMAE 或纺锤菌素(US 公开 No. 2005/0238649)、以及它们的衍生物。

[0358] 在某些其他实施方案中,细胞毒性剂是美登素或类美登素(Maytansinoid)及其衍生物,其中本发明的靶向剂缀合一个或多个类美登素分子。类美登素是有丝分裂抑制剂,其通过抑制微管蛋白聚合而发挥作用。美登素首先分离自东部非洲灌木 *Maytenus serrata*(美国专利 No. 3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生类美登素,例如美登醇和 C-3 美登醇酯(美国专利 No. 4,151,042)。合成美登醇及其衍生物和类似物公开在例如美国专利 No. 4,137,230;4,248,870;4,256,746;4,260,608;4,265,814;4,294,757;4,307,016;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,313,946;4,315,929;4,317,821;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,364,866;4,424,219;4,450,254;4,362,663;和 4,371,533。在试图改善它们的治疗指数的过程中,美登素和类美登素缀合特异性结合肿瘤细胞抗原的抗体。含有类美登素的免疫缀合物和它们的治疗用途公开在(例如)美国专利 No. 5,208,020,5,416,064 和欧洲专利 EP 0 425 235 B1。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623(1996) 描述了免疫缀合物,包含连接单克隆抗体 C242 的类美登素(表示为 DM1),所述单克隆抗体 C242 定向针对于人结肠直肠癌。缀合物被发现针对培养的结肠癌细胞具有较高细胞毒性,并且在体内肿瘤生长测定中显示出抗肿瘤活性。Chari et al. Cancer Research 52:127-131(1992) 描述了免疫缀合物,其中类美登素通过二硫化物接头缀合鼠抗体 A7,所述鼠抗体 A7 结合人结肠癌细胞系上的抗原,或缀合另一鼠单克隆抗体 TA.1,所述鼠单克隆抗体 TA.1 结合 HER-2/neu 癌基因。TA.1-类美登素缀合物的细胞毒性在体外在人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 上进行测试,其表达 3×10^5 HER-2 表面抗原/细胞。药物缀合物获得类似于游离类美登素药物的细胞毒性程度,这可通过增加类美登素分子数/抗体分子来增强。A7-类美登素缀合物在小鼠中显示出较低系统细胞毒性。因此,本发明涵盖用于某些癌症的治疗性疗法的缀合类美登素剂的靶向剂。

[0359] 在某些其他实施方案中,包含本发明的靶向剂的另一目标免疫缀合物缀合于一

个或多个加利车霉素分子。抗体加利车霉素的家族能够产生在亚皮克 (sub-picomolar) 浓度的双链 DNA 断裂。为了制备加利车霉素家族的缀合物, 参见美国专利 No. 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (均是 American Cyanamid Company 的)。可使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^I , γ_2^I , γ_3^I , N-乙酰基- γ_1^I , PSAG 和 θ^I (Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342(1993), Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928(1998) 和 American Cyanamid 的上述美国专利)。抗体可缀合的另一种抗肿瘤药物是 QFA, 其是抗叶酸剂。加利车霉素和 QFA 具有细胞内作用位点, 并且不容易穿过质膜。因此, 通过抗体介导的内在化, 这些药剂的细胞摄取极大地增强了它们的细胞毒性效果。

[0360] 可在本发明的缀合物中使用的其他毒素包括有毒凝集素、植物毒素例如蓖麻毒素、相思豆毒素、莨菪根毒素、肉毒杆菌毒素和白喉毒素。当然, 各种毒素的联合也可耦合一种抗体分子, 从而容纳可变的细胞毒性。适于本发明的联合疗法的示意性毒素是蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶、DNase I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和绿脓杆菌内毒素。例如参见 Pastan et al., Cell, 47: 641(1986) 和 Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians, 44:43(1994)。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、莨菪根毒素 A 链、 α -八叠球菌、*Aleurites fordii* 蛋白、石竹素蛋白、*Phytolacca americana* 蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、*Momordica charantia* 抑制剂、泻果素、巴豆毒素、*Sapaonaria officinalis* 抑制剂、白树毒素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯。

[0361] 合适的毒素和化疗剂在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995) 中和 Goodman And Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985) 中有所描述。其他合适的毒素和 / 或化疗剂是本领域的技术人员所公知的。

[0362] 放射性同位素的实例包括可以用于定位和 / 或治疗的 γ -发光器、正电子发光器、以及 X 射线发光器; 以及可以用于治疗的 β -发光器和 α -发光器。可用于诊断、预防和分期的之前所述的放射性同位素还可以用于治疗。

[0363] 抗癌或抗白血病试剂的非限定性实例包括蒽环类抗生素, 例如亚德里亚霉素 (阿霉素)、道诺霉素 (正定霉素)、去甲氧正定霉素、地托比星、洋红霉素、表柔比星、依索比星以及它们的吗啉代和取代衍生物、组合及修饰物。药剂的实例包括顺铂、紫杉醇、烯二炔类抗生素、长春新碱、阿糖胞苷 (Ara-C)、环磷酰胺、泼尼松、道诺霉素、去甲氧正定霉素、氟达拉滨、苯丁酸氮芥、干扰素 α 、羟基脲、替莫唑胺、镇静剂、博来霉素、以及它们的衍生物、组合物和修饰物。优选的是, 所述的抗癌或抗白血病药物为亚德里亚霉素、吗啉代亚德里亚霉素或吗啉代道诺霉素。

[0364] 本发明的抗体还涵盖了在哺乳动物 (优选为人) 中具有半衰期 (例如血清半衰期) 的抗体 (其半衰期大于未经修饰的抗体的半衰期)。所述抗体的半衰期可以大于大约 15 天、大于大约 20 天、大于大约 25 天、大于大约 30 天、大于大约 35 天、大于大约 40 天、大于大约 45 天、大于大约 2 个月、大于大约 3 个月、大于大约 4 个月或者大于大约 5 个月。本发明的抗体或其片段在哺乳动物 (优选为人) 中半衰期的增大使得所述抗体或抗体片段在

所述哺乳动物中的血清效价更高,因此,减少了所述抗体或抗体片段的给药频率和/或降低了所述抗体或抗体片段的给药浓度。可以通过本领域的技术人员已知的技术来制备体内半衰期增大的抗体或其片段。例如,通过对氨基酸残基(其按照与Fc结构域与FcRn受体之间的相互作用有关的方法鉴定)进行修饰(例如取代、删除或添加)来制备体内半衰期增大的抗体或其片段(例如参见国际公开No. WO 97/34631和WO 02/060919,该文献以引用方式全文并入本文)。可以通过将所述的抗体或其片段附着在聚合物分子(例如高分子量的聚乙二醇(PEG))上来制备体内半衰期增大的抗体或其片段。可以通过PEG与所述抗体或抗体片段的N末端或C末端形成位点特异性的缀合或者通过赖氨酸残基上存在的ε-氨基而使得PEG附着在具有多功能连接体或不具有多功能连接体的所述抗体或抗体片段。可以使用使得生物学活性损失最小的线性或支状聚合物的衍生物。可以通过SDS-PAGE和质谱来密切监测缀合程度,以确保PEG分子与所述抗体形成适度的缀合。通过例如尺寸排阻色谱或离子交换色谱来由抗体-PEG缀合物种分离未反应的PEG。

[0365] 如本领域的技术人员所理解的那样,在上述实施方案中,尽管亲和性值可能是重要的,但是其他因素可能与亲和性值一样重要或者更重要,这取决于所述抗体的特定功能。例如,对免疫毒素(与抗体有关的毒素)而言,抗体与靶物的结合作用可能是有用的,但是在某些实施方案中,使所述毒素内化入所述的细胞才是所需的最终结果。这样,在这种情况下,具有高的百分内化率的抗体可能是理想的。因此,在一个实施方案中,考虑具有高的内化效率的抗体。可以按照内化抗体的百分率来测定高效的内化率,并且可以为较低的值至100%。例如,在改变的实施方案中,0.1-5、5-10、10-20、20-30、30-40、40-45、45-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-99和99-100%可以为高效的。如本领域的技术人员所理解的那样,在不同的实施方案中,理想的效率可以是不同的,这取决于(例如)相关试剂、可能给药至一定区域的抗体的量、抗体-试剂络合物的副作用、待处理的问题的类型(例如癌症的类型)和严重程度。

[0366] 在其他实施方案中,本文所公开的抗体提供了用于检测哺乳动物组织或细胞中CD105的表达情况的测试试剂盒,以便针对与CD105的表达变化相关的疾病或紊乱进行筛查。所述的试剂盒包括与CD105结合的抗体以及用于表明所述抗体与所述抗原(如果存在的话)的反应情况的手段。

[0367] 结合物

[0368] 本文所定义的靶向结合剂或抗体可以以单独疗法的形式施加或者可以涉及常规的手术或者放疗或化疗(除了本发明的化合物以外)。这种化疗可以包括一种或多种以下类别的抗肿瘤试剂:

[0369] (i) 如在医学肿瘤学中使用的其他抗增殖/抗增生药品及其结合物,例如烷化剂(例如顺铂、奥沙利铂、卡波铂、环磷酰胺、氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、替莫唑胺和亚硝基脲);抗代谢物(例如2,2-二氟脱氧胞嘧啶核苷和抗叶酸素,如羟基脲(如5-氟尿嘧啶和喃氟啶)、甲氨蝶呤、胞核嘧啶、阿拉伯糖苷和羟基脲);抗肿瘤抗生素(例如蒽环类制剂,如阿霉素、博来霉素、亚德里亚霉素、道诺霉素、表柔比星、去甲氧正定霉素、丝裂霉素C、放线菌素和光神霉素);抗有丝分裂剂(例如长春花生物碱(如长春新碱、长春碱、去乙酰长春酰胺和长春瑞滨)、紫杉烷(如紫杉醇和泰索帝)以及polokinese抑制剂);以及拓扑异构酶抑制剂(例如表鬼臼毒素(如依托泊苷和替尼泊苷)、安吡啶、托泊替康和喜树

碱)；

[0370] (ii) 细胞生长抑制剂,例如抗雌激素(例如三苯氧胺、氟维司群、比卡鲁胺、雷洛昔芬、屈洛昔芬和 iodoxyfene)、抗雄激素(例如比卡鲁胺、氟他胺、安得乐和醋酸去乙酰环丙氯地孕酮)、LHRH 拮抗剂或 LHRH 激动剂(例如性激素阻滞药、亮丙瑞林和布舍瑞林)、孕激素(例如醋酸甲地孕酮)、芳香酶抑制剂(例如阿纳托唑、来曲唑、伏氯唑以及依西美坦)以及 5- 还原酶的抑制剂(例如非那司提)；

[0371] (iii) 抗侵入剂(例如 c-Src 激酶家族的抑制剂,如 4-(6- 氯-2,3- 亚甲基二氧苯胺)-7-[2-(4- 甲基哌嗪-1-基) 乙氧基]-5- 四氢吡喃-4- 基羟喹唑啉(AZD0530 ;国际专利申请 WO 01/94341) 和 N-(2- 氯-6- 甲基苯基)-2-{6-[4-(2- 羟乙基) 哌嗪-1- 基]-2- 甲基嘧啶-4- 基氨基} 噻唑-5- 氨甲酰(dasatinib, BMS-354825 ;J. Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661) ;以及金属蛋白酶抑制剂(如马马司他、尿激酶血纤维蛋白溶酶原活化剂受体功能的抑制剂、组织蛋白酶的抑制剂、丝氨酸蛋白酶(如蛋白裂解酶、hepsin、尿激酶)的抑制剂)、类肝素酶的抑制剂)；

[0372] (iv) 细胞毒性剂,例如氟达拉滨、2- 氯脱氧腺苷、苯丁酸氮芥或亚德里亚霉素,以及它们的组合,例如氟达拉滨+环磷酰胺 ;CVP :环磷酰胺+长春新碱+泼尼松 ;ACVBP :亚德里亚霉素+环磷酰胺+去乙酰长春酰胺+博来霉素+泼尼松 ;CHOP :环磷酰胺+亚德里亚霉素+长春新碱+泼尼松 ;CNOP :环磷酰胺+米托蒽醌+长春新碱+泼尼松 ;m-BACOD :甲氨蝶呤+博来霉素+亚德里亚霉素+环磷酰胺+长春新碱+地塞米松+甲酰四氢叶酸 ;MACOP-B :甲氨蝶呤+亚德里亚霉素+环磷酰胺+长春新碱+固定剂量的泼尼松+博来霉素+甲酰四氢叶酸 ;或者 ProMACE CytaBOM :泼尼松+亚德里亚霉素+环磷酰胺+依托泊苷+阿糖胞苷+博来霉素+长春新碱+甲氨蝶呤+甲酰四氢叶酸。

[0373] (v) 生长因子功能的抑制剂,例如这种抑制剂包括生长因子抗体和生长因子受体抗体(例如抗 erbB2 抗体曲妥单抗 [HerceptinTM]、抗 EGFR 抗体 帕尼单抗、抗 erbB1 抗体西妥昔单抗 [Erbix, C225] 以及 Stern et al. Critical reviews in oncology/haematology, 2005, Vol. 54, pp 11-29 所公开的任何生长因子或生长因子受体抗体) ;这种抑制剂还包括酪氨酸激酶抑制剂,例如表皮生长因子家族的抑制剂(例如 EGFR 家族酪氨酸激酶抑制剂,如 N-(3- 氯-4- 氟苯基)-7- 甲氧基-6-(3- 吗啉代丙氧基) 喹唑啉-4- 胺(吉非替尼, ZD1839)、N-(3- 乙炔基苯基)-6,7- 双(2- 甲氧基乙氧基) 喹唑啉-4- 胺(埃罗替尼, OSI-774) 以及 6- 丙烯氨基 N-(3- 氯-4- 氟苯基)-7-(3- 吗啉代丙氧基)- 喹唑啉-4- 胺(CI 1033) ;erbB2 酪氨酸激酶抑制剂,如拉帕替尼 ;肝细胞生长因子家族的抑制剂 ;血小板衍生的生长因子家族的抑制剂,如伊马替尼 ;丝氨酸 / 苏氨酸激酶的抑制剂(例如 Ras/Raf 信号传导抑制剂,如法呢基转移酶抑制剂,如索拉非尼(BAY 43-9006)) ;通过 MEK 和 / 或 AKT 激酶的细胞信号传导的抑制剂 ;肝细胞生长因子家族的抑制剂 ;c-kit 抑制剂 ;ab1 激酶抑制剂 ;IGF 受体(胰岛素样生长因子) 激酶抑制剂 ;aurora 激酶抑制剂(例如 AZD1152, PH739358, VX-680, MLN8054, R763, MP235, MP529, VX-528 和 AX39459) ;细胞周期依赖的激酶抑制剂,例如 CDK2 和 / 或 CDK4 抑制剂 ;以及存活信号传导蛋白质的抑制剂,例如 Bcl-1、Bcl-XL(如 ABT-737) ;

[0374] (vi) 抗血管增生的试剂,例如抑制血管内皮生长因子的作用的那些[例如抗血管内皮细胞生长因子的抗体贝伐单抗 (AvastinTM) ;苹果酸舒尼替尼 (SutentTM) ;索拉非

尼 (Nexavar™) 以及 VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂, 例如 4-(4- 溴 -2- 氟苯氨基) -6- 甲氧基 -7-(1- 甲基哌啶 -4- 基甲氧基) 喹唑啉 (ZD6474 ;WO 01/32651 的实施例 2) ; 4-(4- 氟 -2- 甲基咪唑 -5- 基氧基) -6- 甲氧基 -7-(3- 吡咯 -1- 基丙氧基) 喹唑啉 (AZD2171 ;WO 00/47212 的实施例 240) ;瓦他拉尼碱 (PTK787 ;WO 98/35985) ;SU11248 (舒尼替尼 ;WO 01/60814) ;化合物, 如在国际专利申请 W097/22596, W0 97/30035, W0 97/32856, W0 98/13354, W000/47212 和 W001/32651 中所公开的那些 ;以及通过其他机制工作的化合物 (例如利诺胺、干扰素 α v β 3 功能的抑制剂以及血管增生抑制素)] 或集落刺激因子 1 (CSF1) 或 CSF1 受体 ;

[0375] (vii) 血管破坏试剂, 例如考布他汀 A4 以及在国际专利申请 W0 99/02166、W0 00/40529、W0 00/41669、W0 01/92224、W0 02/04434 以及 W0 02/08213 中公开的化合物 ;

[0376] (viii) 反义疗法, 例如定向于上文所列的靶物的那些, 例如 G-3139 (Genasense), 抗 bcl2 的反义疗法 ;

[0377] (ix) 基因疗法, 包括例如替代畸变基因的方法, 例如畸变 p53 或畸变 BRCA1 或 BRCA2、GDEPT (基因定向酶前体药品疗法) ;使用了胞核嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或细菌硝基还原酶的那些方法 ;以及增加患者对化疗或放疗的耐受性的疗法, 例如多药品抗性基因疗法 ;以及

[0378] (x) 免疫疗法, 包括例如使用阿仑单抗 (campath-1H™, 其为定位于 CD52 的单克隆抗体) 的治疗或者使用定位于 CD22 的抗体的治疗 ;增加患者肿瘤细胞的免疫原性的体外和体内方法 ;使用诸如白细胞介素 2、白细胞介素 4 或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子之类的细胞因子进行的转染 ;降低 T 细胞无效能的方法, 例如使用单克隆抗体抑制 CTLA-4 的功能的治疗 ;使用转染的免疫细胞 (例如细胞因子转染的支状细胞) 的方法 ;使用细胞因子转染的肿瘤细胞系的方法以及使用抗独特型抗体的方法。

[0379] (xi) 蛋白质降解的抑制剂, 例如蛋白酶体抑制剂, 如 Velcade (硼替佐米)。

[0380] (xii) 生物治疗的治疗方法, 例如使用了肽或蛋白质 (例如抗体或可溶性外部受体结构域的构建体) 的那些, 其中肽或蛋白质隔断了受体与配体 (阻断配体与受体的结合) 或者降低受体的信号传导 (例如由于受体降解的增强或者表达水平的降低)。

[0381] 在一个实施方案中, 本文所定义的抗肿瘤治疗除了本发明的化合物以外, 还涉及使用其他抗增殖 / 抗增生药品及其结合物的治疗, 如在医学肿瘤学中使用的, 例如烷化剂 (例如顺铂、奥沙利铂、卡波铂、环磷酰胺、氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、替莫唑胺和亚硝基脲) ;抗代谢物 (例如 2,2- 二氟脱氧胞嘧啶核苷和抗叶酸素 (如氟嘧啶, 如 5- 氟尿嘧啶和喃氟啶)、雷替曲塞、甲氨蝶呤、胞核嘧啶、阿拉伯糖苷以及羟基脲) ;抗肿瘤抗生素 (例如蒽环类抗生素, 如阿霉素、博来霉素、亚德里亚霉素、道诺霉素、表柔比星、去甲氧正定霉素、丝裂霉素 C、放线菌素和光神霉素) ;抗有丝分裂剂 (例如长春花生物碱, 如长春新碱、长春碱、去乙酰长春酰胺和长春瑞滨 ;紫杉烷, 如紫杉醇和泰素帝 ;以及 polokinese 抑制剂) ;以及拓扑异构酶抑制剂 (例如表鬼臼毒素 (如依托泊苷和替尼泊苷)、安吖啶、托泊替康和喜树碱)。

[0382] 在一个实施方案中, 本文所定义的抗肿瘤治疗除了本发明的化合物外, 还涉及 2,2- 二氟脱氧胞嘧啶核苷的治疗。

[0383] 通过同时、依次或间隔定量给药所述治疗的单个成分可以取得所述的结合治疗。

这种结合产品使用了本发明的化合物或其剂量范围如上文所述的可药用的盐, 以及其剂量范围被认可的其他药物活性试剂。

实施例

[0384] 提供以下实施例(包括所实施的试验以及所取得的结果)仅是为了说明的目的, 不能解释为通过本文的教导进行了限定。

[0385] 实施例 1

[0386] 免疫和效价

[0387] 细胞和转染

[0388] 小鼠前 B 细胞系 B300-19 培养在 RPMI 1640 培养基中, 其含有 10% 胎牛血清, 50 μ M 2-巯基乙醇, 100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素。HEK 293F 细胞生长在 DMEM/F12(50/50 混合物) 培养基中, 其补充有 10% FBS, 2mM L-谷氨酰胺, 50 μ M BME, 100 单位青霉素 -g/ml, 100 单位 MCG 链霉素 /ml。根据生产商的说明, 使用 LipofectAMINE 2000 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 将人 CD105 表达质粒转染到 HEK 293F 或 B300. 19 细胞中。转染进行 48 小时, 然后使用 1mg/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 选择两星期。稳定的 G418 耐性克隆用初次小鼠抗 - 人 CD105 单克隆抗体染色, 并通过 FACS 进行分析。B300. 19 稳定的转染子用于免疫, 而 HEK293F 稳定的转染子用于筛选。

[0389] 免疫

[0390] 使用重组可溶性 CD105 (R&D Systems, Catalog Number :1097-EN-025/CF) 或稳定转染的 B300. 19 细胞表达人 CD105 来进行免疫。

[0391] 为了使用重组可溶性 CD105 进行免疫, 使用 XenoMouse™ strains XM3B3L3:IgG1KL 和 XM3C1L3:IgG4KL 对 10 μ g 可溶性蛋白 / 小鼠进行依次免疫, 然后对 5 μ g / 小鼠进行加强免疫。对于使用 B300. 19 转染子细胞稳定地表达人 CD105 进行免疫, 单克隆抗体通过顺序免疫 XenoMouse™ strains XM3C1L3:IgG4KL 和 XMG2L3:IgG2KL 来显色。对于所有注射, XenoMouse 动物通过足垫途径经过常规方式来免疫。各注射的总体积为 50 μ l / 小鼠, 25 μ l / 足垫。

[0392] 根据下列文献中公开的方法来进行免疫: 于 1996 年 12 月 3 日提交的美国专利申请序列 No. 08/759, 620、以及于 1998 年 6 月 11 日提交的国际专利申请 No. WO 98/24893 和于 2000 年 12 月 21 日提交的 WO 00/76310, 公开内容通过引用的方式并入本文。免疫程序概括于表 3 中。

[0393] 通过效价选择收获动物

[0394] 使用人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 通过用于天然抗原结合的 FACS 染色来测试抗体针对人 CD105 的效价。在免疫程序结束时, 借助于实施例 2 中所述的电穿孔, 使用从免疫小鼠的脾脏和淋巴结中分离的小鼠骨髓瘤细胞和淋巴细胞来进行融合。

[0395] 表 3: 免疫程序概述

[0396]

活动	组别	免疫原	菌株	小鼠数量	免疫途径
1	1	重组可溶性 CD105(R&D Systems: Catalog#: 1097-EN-025/CF)	IgG1	10	足垫, 两次/周, x 4 周
1	1	重组可溶性 CD105(R&D Systems: Catalog#: 1097-EN-025/CF)	IgG4	10	足垫, 两次/周, x 4 周
2	2	B300.19/人 CD105	IgG2	10	IP/尾巴/BIP, 两次/周, x 8 周, 然后 IP/尾巴/BIP, 1 次/每 2 周, x 6 周
2	2	B300.19/人 CD105	IgG4	10	IP/尾巴/BIP, 两次/周, x 8 周, 然后 IP/尾巴/BIP, 1 次/每 2 周, x 6 周

[0397] “IP”是指“腹膜内”

[0398] “BIP”是指“尾巴 / 腹膜内的基础”

[0399] 实施例 2

[0400] 淋巴细胞的回收、B 细胞的分离以及杂交瘤细胞的融合和生成

[0401] 通过颈椎脱臼法处死免疫小鼠, 收获引流淋巴结, 并将各组 (cohort) 汇集起来。该过程实施了四次获取。

[0402] 通过在 DMEM 中研磨以便从所述的组织中释放所述的细胞来离解淋巴细胞, 并将所述的细胞悬浮在 DMEM 中。计数所述的细胞, 并将 0.9ml DMEM/100 百万淋巴细胞加入到细胞球中, 从而使细胞温和且完整地重新悬浮。使用 100 μ l CD90+ 磁珠 /100 百万细胞, 通过在 4°C 下与磁珠温育 15 分钟来标记所述的细胞。将包含最多 10^8 个 (或者总细胞个数最多 2×10^9) 阳性细胞的磁性标记细胞悬浮溶液加载到 LS+ 柱上, 并用 DMEM 洗涤该柱。收集总的流出液作为 CD90 的阴性部分 (预计这些细胞的大部分为 B 细胞)。

[0403] 通过将经过洗涤并富集的第 6 天的 B 细胞与得自 ATCC, 编号 # CRL 1580 (Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) 的非分泌性骨髓瘤 P3X63Ag8.653 细胞以 1 : 4 的比例相混合来进行融合。通过在 400Xg 下离心 4 分钟使得所述的细胞混合物通常形成球状。在倒出上清液之后, 使用 1ml 的吸管温和地进行混合。缓慢加入预热的 PEG (1ml/ 10^6 个 B 细胞) 并温和搅拌 1 分钟, 然后混合 1 分钟。然后, 在 2 分钟内加入预热的 IDMEM (2ml/ 10^6 个 B 细胞), 并温和搅拌。最后, 在 3 分钟内加入预热的 IDMEM (8ml/ 10^6 个 B 细胞)。

[0404] 将融合细胞在 400Xg 下旋转离心 6 分钟, 并且每 10^6 个 B 细胞悬浮于 20ml 选择培养基 [DMEM (Invitrogen), 15% 的 FBS (Hyclone), 补充有 L- 谷氨酸、青霉素 / 链霉素、MEM 非必需氨基酸、丙酮酸钠、2- 巯基乙醇 (均得自 Invitrogen), HA- 重氮丝氨酸次黄嘌呤和 OPI (草酰乙酸盐、丙酮酸盐和牛胰岛素) (均得自 Sigma), 以及 IL-6 (Boehringer Mannheim)] 中。将细胞在 37°C 下温育 20-30 分钟, 然后悬浮于 200ml 的选择培养基中, 并在 T175 的烧瓶中培养 3-4 天。

[0405] 在融合后 3 天时, 收集所述的细胞, 在 400xg 旋转离心 8 分钟, 并且每 10^6 个融合 B 细胞再次悬浮于 10ml 选择培养基中。对杂交瘤细胞的群体进行 FACS 分析, 然后将该细胞冷冻。

[0406] 杂交瘤细胞以常规方式在选择培养基中生长。将全部的上清液 (得自潜在地产生抗人源 CD105 抗体的杂交瘤细胞) 经历随后的筛查测试。

[0407] 实施例 3

[0408] 通过 FMAT 和 FACS 选择候选抗体

[0409] 在培养 14 天后,通过微量荧光检测技术 (FMAT) 来筛选杂交瘤上清液的 CD105- 特异性抗体。针对 HEK293F 转染子细胞稳定表达人 CD105 筛选杂交瘤上清液,并且针对亲本 HEK293F 细胞进行反向筛选。

[0410] 除去来自 CD105- 阳性杂交瘤细胞的培养上清液 (基于初次筛选),并且将 CD105 阳性杂交瘤细胞用新鲜杂交瘤培养基悬浮,并且转移至 24 孔板。在培养基中 2 天后,这些上清液在次级确认筛选中进行评价。在次级确认筛选中,之前鉴定阳性的细胞利用两组或三组单独使用的检测抗体在 HUVEC 细胞上通过 FMAT 和 / 或 FACS 进行筛选:对于人 gamma 链检测,1.25ug/ml GAH-Gamma Cy5 (JIR#109-176-098);对于人 kappa 轻链检测,1.25ug/ml GAH-Kappa PE (S. B. #2063-09),对于人 lambda 轻链检测,1.25ug/ml GAH-lambda PE (S. B. #2073-09),从而证实抗 -CD105 抗体是完全人源的。

[0411] 如通过 FMAT 使用 HEK293F 转染子细胞稳定表达人 CD105 所确定的,从第一活动中鉴定总共 824 个全人源抗 -CD105 抗体。对于次级免疫活动,如通过 FMAT 使用 HEK293F 转染子细胞稳定表达人 CD105 所确定的,产生总共 788 个全人源抗 -CD105 抗体。对于两种活动,抗体随后在 HUVEC 细胞上通过 FMAT 和 / 或 FACS 进行筛选,并且评价和食蟹猴与鼠 CD105 直向同源物的交叉反应性。衍生自直向同源猴和小鼠的 CD105 被克隆并表达在 HEK293F 细胞的表面上以用于交叉反应性研究。表现出对食蟹猴和小鼠具有交叉反应性的抗体继续进行并进一步在功能测定中评价。

[0412] 表 4. 全人源 CD105 特异性单克隆抗体。

[0413]

活动	抗原	FMAT (HEK293/huCD105)	FMAT/FACS (HUVEC 细胞)	FMAT/FACS 食蟹猴	FMAT/FACS 小鼠
1	可溶性 CD105	824	621	140	9
2	B300.19/huCD105	788	461	416	8

[0414] 实施例 4

[0415] 抗 - 增殖活性

[0416] 为了筛选和鉴定在 HUVEC 细胞系中表现出抗增殖活性的抗体系,进行 Alamar Blue 测定。简言之, HUVEC 细胞得自 Cambrex Corp. 并保持在 EGM2 培养基中,其补充有 0.5% FBS。在 96 孔板中以 1000 细胞 / 孔 (90 μ l / 孔) 的浓度接种细胞。将细胞在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育 72 小时。72 小时后终止反应,加入抗体并进行 Alamar Blue 测定。将细胞用浓度为 50 μ g/ml 的抗体进行处理。处理样品的存活百分率的测定基于使对照样品 (即未处理) 归一化至 100% 可行性。

[0417] 分析揭示出大部分抗 -CD105 抗体杂交瘤系不表现出抗增殖活性。如图 1 中所示,来自活动 1,鉴定两种杂交瘤,表示为 4.120 和 4.37,在 50 μ g/ml 的浓度下表现出细胞增殖的显著抑制。

[0418] 从活动 2,8 种另外的细胞系被鉴定并在增殖测定中进行测试。如图 2 和表 5 所示,

细胞增殖抑制率的范围为 8% 至 20%。

[0419] 表 5

[0420]

m Ab	% 抑制 试验 1	% 抑制 试验 2	% 抑制 试验 3	% 抑制 试验 4	% 抑制 试验 5	% 抑制 试验 6	% 抑制 试验 7	% 抑制 试验 8	% 抑制 平均值	St Dev
4D4.1	22.15	27	16	14.53	14.81	29.15	15.8	18.31	19.9	5.61
6A6.2	9.57	28.35	21.12	21.5	15.33	20.52	19.38	18.4	19.27	5.37
6B1.1	13.14	-4.12	15.47	5.27	9.05	7.33	11.74	6.07	7.99	6.05
6B10.1	14.05	21.56	17.58	10.65	8.65	10.68	5.1	11.96	12.58	5.15
11H2.1	14.24	32.05	11.7	25.22	16.9	11.54	20.8	4.11	17.09	8.78
9H10.2	21.41	27.47	11.02	28.09	11.85	16.87	17.22	12.98	18.35	6.72
3C1.1	14.51	25.31	5.6	22.8	11.35	15.37	19.62	10.03	15.55	6.59
10C9.2	11.2	8.35	1.63	15.45	11.41	14.49	0.31	3.54	8.3	5.84

[0421] 实施例 5

[0422] SMAD2 磷酸化测定

[0423] 为了确定是否抗 -CD105 抗体介导 Smad2 磷酸化的增加, 进行 Smad2 磷酸化测定。简言之, 将 90,000 HUVEC 细胞接种在 6 孔板上。将细胞在 EGM2 培养基中培养, 其补充有 0.5% FBS。将细胞用浓度增加的抗体 (0.5, 1.0 和 2.0 μ g/ml) 处理 24 小时, 然后进行 Western 印迹分析。磷酸 -Smad2 的检测使用 pSmad2 特异性抗体 (Cell Signaling Cat #3101) 来进行。使用特异性抗体 (Cell Signaling Cat #3102) 检测全部 Smad2 水平。结果显示, 抗体 4.37 介导 Smad2 磷酸化的剂量依赖性抑制。这些发现证实 4.120, 4D4, 6B10, 6A6 和 9H10 也是如此。重要的是注意, 已经报道 Smad2 磷酸化以抑制内皮细胞增殖和转移 (Goumans M-J et al., EMBO J 2002 ;21 :1743-1753)。

[0424] 实施例 6

[0425] CD105 抑制抗体减少体外管的形成

[0426] 测试 CD105 抑制抗体在体外共培养测定中减小内皮细胞管的形成的能力 (TCS Cell Works Cat no. ZHA-1000)。在第 1 天, 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和人二倍体成纤维细胞在 24 孔板中获得为共培养物。CD105 阻断抗体在第 1 天引入培养基中, 并且在 11 天内以 50 μ g/mL 的抗体浓度的规则间隔。培养基在第 4, 7 和 9 天补充。共培养模型保持在 TCS 优化的培养基 (供应共培养测定) 或 MCDB131 培养基 (补充 2% 胎牛血清 (FCS), 1% 谷氨酰胺和 1% 青霉素 / 链霉素) 中 (下文中称为 2% FS MCDB131 培养基)。共培养模型保持在 37°C、湿润的 5% CO₂/95% 空气气氛中。

[0427] 在第 11 天进行管的形成, 然后固定并根据生产商的说明使用小管染色试剂盒 (TCS Cell Works Cat no. ZHA-1225) 来进行对小管 CD31 的染色。简言之, 细胞用冰冷的 70% 乙醇在室温 (RT) 下固定 30 分钟。当细胞被抗 -人 CD31 在 RT 下处理 60 分钟后, 细胞被阻断。将板洗涤, 并且用缀合碱性磷酸酶 (AP) 的山羊抗 -小鼠 IgG 在 RT 下处理 60 分钟。在和 AP- 缀合的次级抗体孵育后, 见板洗涤并加入 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶基磷酸酯 / 氮蓝四唑 (BCIP/NBT) 底物约 10 分钟。在 10 分钟内暗紫色的显色反映管的形成。随后将板洗涤并放置风干。

[0428] 管生长的定量通过全细胞图像分析法使用 Zeiss KS400 3.0 图像分析仪来进行。

在定量方法学中测定的形态学参数是总管的长度。在各 24 孔内所有管的形成都被测量,除了 100 μ m 深度的边缘以避免边缘收缩的人工制品。

[0429] 如图 3 中所示,mAb 6B10 体外有效地抑制内皮细胞管的形成。相对于同种型对照,该抗体抑制血管长度约 24%,并抑制分叉数量 47%。数据显示该抗体在模拟生成血管过程的功能测定中是有效的。

[0430] 实施例 7

[0431] 肌动蛋白调制测定

[0432] 为了确定是否来自活动 1 和 2 的抗 -CD105 抗体组影响人内皮细胞的细胞支架结构,进行肌动蛋白调制测定。简言之,将 HUVEC 细胞接种到 4- 孔腔式载玻片中 (40,000 细胞 / 孔),并保持在补充有 0.5% FBS 的 EGM2 培养基中。抗 -CD105 抗体和 HUVEC 细胞在 30 μ g/ml 的抗体浓度下孵育 72 小时。在抗体孵育后,将细胞用 4% 甲醛固定 10 分钟,然后用 0.5% Triton X-100 透化 10 分钟。在透化后,将细胞在室温下用 Alexa Fluor 488 毒伞素 (Phalloidin,Molecular Probes,#A12379) 染色 30 分钟。将细胞用 PBS 洗涤,然后染色和使用聚焦显微镜进行检查。单克隆抗体 10C9,3C1,6B1,4.120,4.37 和 6B10 在 HUVEC 细胞中介导肌动蛋白细胞支架结构的显著调制。

[0433] 实施例 8

[0434] 和抗体 sn6 (HUVEC) 相比,xenomouse 单克隆抗 -CD105 抗体的抗原决定部位结合

[0435] 在人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 上进行 FACS- 基结合分析以确定是否 xenomouse 抗体的组交叉竞争市售 SN6 抗体。Seon 实验室首先产生 SN6 抗体;该抗体是 mAbs 的组中的一种,表示为 SN6 系列,其报道以剂量依赖性方式抑制人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的生长 (She X et al., Int. J. Cancer, 2004, 108 :251-7)。

[0436] 简言之,使用用 FITC 荧光标记的 SN6 抗体 (Abcam) 来对 HUVEC 细胞进行滴定。用于结合的 EC₅₀ 浓度确定为 2 μ g/ml。随后,HUVEC 细胞和未标记的 xenomouse 抗 -CD105mAbs 的滴定物孵育,洗涤,然后用 2 μ g/ml 的 SN6 抗体孵育。如图 4 中所示,SN6 抗体的结合百分率表示在存在 50 μ g/ml 的未标记 xenomouse mAbs 的条件下。

[0437] 惊奇地,抗体 6A6 和 6B10 证实 SN6 结合的显著抑制,从而表明这些 mAbs 竞争相同抗原决定部位。其他抗体部分竞争 SN6,这表明部分或重叠抗原决定部位。抗体 4D4 和 10C9 显示出较弱阻断,从而暗示这些 mAbs 可能并不和 SN6 抗体享有相同的抗原决定部分。同样重要的是,这些结果表明,该 xenomouse 抗 -CD105 抗体和 SN6 抗体享有相同的抗原决定部分。同样重要的是,这些结果表明,该组的 xenomouse 显示出宽的抗原决定部分特异性。

[0438] 实施例 9

[0439] 在 cd105ki/ko 小鼠中的 Colo205 基质胶塞测定

[0440] 为了检查 xenomouse mAbs 的体内活性,进行基质胶塞测定。由于缺少抗 -CD105 抗体的小鼠的交叉反应性,该研究在 CD105 KI/KO-SCID 动物中进行。

[0441] 简言之,将混合 matrigel™ 的五百万 Colo205 肿瘤细胞移植到 CD105 KI/KO-SCID 小鼠中。小鼠在 10mpk 的抗体剂量下 i. p. 使小鼠接受每周两次的抗体处理。在第 8 天分离塞并通过 IHC 和血红蛋白含量来分析 CD31 表达。IHC 染色使用抗 -CD31 抗体 (BD, Cat 550274) 来进行。将样品在锌固定剂中固定,并嵌入石蜡块中。使用 Ventana automation 将组织切片使用 CD31 抗体来染色。使用 Aperio 成像系统来扫描图像。IHC- 阳性染色使用

Aperio 颜色卷积成像软件来进行分析。

[0442] 对于血红蛋白含量,基于塞的重量 (5.0ml/g),将去离子水加入基质胶样品管中。然后基质胶样品使用 Polytron 匀浆机来匀化。随后将样品以 3700rpm 离心 10min。使 250uL 等分上清液混合等体积的 2x Drabkin's 溶液。将混合物涡旋并再次离心。将 200uL 的等分该混合物置于 96 孔板中以用于分析。在 540nm 处测定吸光度。平行地,使用在 1x Drabkin's 溶液中的血红蛋白标准品来进行标准曲线稀释。从标准曲线来确定样品浓度。

[0443] 如图 5 中所示,该研究的结果证实 mAbs 4D4,6B10,4.120 和 4.37 介导血红蛋白含量降低。抗体 6B10 和 4.37 还介导 CD31 染色的降低 (图 6),这表示这些抗体在体内显示出抗血管原活性。

[0444] 实施例 10

[0445] CD105 抗体的结构分析

[0446] 抗体的可变重链和可变轻链被测序以确定它们的 DNA 序列。抗 -CD105 抗体的全部序列信息提供具有用于各 gamma 和 kappa 链组合的核苷酸和氨基酸序列的序列表中。可变重链序列被分析以确定 VH 家族、D- 区域序列和 J- 区域序列。然后,所述序列被翻译以确定初级氨基酸序列,并比较种系 VH、D 和 J- 区域序列以评价体细胞高度突变。

[0447] 表 2 是这样的表,其比较抗体重链区域和它们的同源种系重链区域,以及比较抗体 kappa 轻链区域和它们的同源种系轻链区域。还应该意识到,如果特定抗体在氨基酸水平上不同于其各自的种系序列,抗体序列可突变回到种系序列。这些矫正突变可使用标准的分子生物学技术发生在 1、2、3 或更多个位置或任何突变位置的组合。通过非限制性例子的方式,表 5 示出了 4.37 的重链序列 (SEQ ID NO. :26),其通过位 31 的 D 至 S (突变 1) 和位 102 的 F 至 Y (突变 2) 而不同于相应的种系序列 (参见表 2)。因此,编码 4.37 的重链的氨基酸或核苷酸序列可在所有这些位点中的任一个进行修饰。下面表 5-9 示出从 4.37, 6B10, 4.120 的种系的这些变化的位置。各行表示种系和非种系残基在由粗体表示的位置的独特组合。

[0448] 在另一个实施方案中,本发明包括取代序列中的任何的结构文库,所述序列可能影响本发明的抗体的异源性。这些文库包括糖基化位点、未配对的半胱氨酸、表面暴露的蛋氨酸等。为了减少这种异源性的风险,建议进行改变以除去这些结构文库中的一个或多个。

[0449] “优化的”序列本文中是指公开在表 2 中的抗体序列,所述序列已经突变使得非种系序列在一个或多个残基处突变回到种系序列,并且可进一步被修饰以从序列例如糖基化位点中除去结构文库。

[0450] 在本发明的一些实施方案中,靶向结合剂或抗体包含具有 SEQ ID NO. :26 的序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO. :26 包含由表 5 的各行表示的种系和非种系残基的组合中的任一种。在一些实施方案中,SEQ ID NO. :26 包含由表 5 中表示的种系残基中的任一个、任两个或所有两个。在某些实施方案中,SEQ ID NO. :26 包含由表 5 的各行表示的种系和非种系残基的独特组合中的任一个。在其他实施方案中,靶向结合剂或抗体衍生自具有 VH3-33, D6-13 和 JH6 结构域的种系序列,其中一个或多个残基突变以在该位置产生相应的种系残基。

[0451] 表 6 :在表示的残基号 4.37 重链 (SEQ ID NO :26) 示例性突变至种系

[0452]

31	102
D	F
S	F
D	Y
S	Y

[0453] 在本发明的一些实施方案中,靶向结合剂或抗体包含具有 SEQ ID NO. :28 的序列。在某些实施方案中, SEQ ID NO. :28 包含由表 6 的各行表示的种系和非种系残基的组合中的任一种。在一些实施方案中, SEQ ID NO. :28 包含由表 6 中表示的种系残基中的任一个、任两个、所有两个、任三个或所有三个。在某些实施方案中, SEQ ID NO. :28 包含由表 6 的各行表示的种系和非种系残基的独特组合中的任一个。在其他实施方案中,靶向结合剂或抗体衍生自具有 VK A3/A19 和 JK3 结构域的种系序列,其中一个或多个残基突变以在该位置产生相应的种系残基。

[0454] 表 7 :在表示的残基号 4.37 轻链 (SEQ ID NO :28) 示例性突变至种系

[0455]

31	90	95
Y	L	R
H	L	R
Y	V	R
H	V	R
Y	L	Q
H	L	Q
Y	V	Q
H	V	Q

[0456]

[0457] 在本发明的一些实施方案中,靶向结合剂或抗体包含具有 SEQ ID NO. :30 的序列。在某些实施方案中, SEQ ID NO. :30 包含由表 7 的各行表示的种系和非种系残基的组合中的任一种。在一些实施方案中, SEQ ID NO. :30 包含由表 7 中表示的种系残基中的任一个、任两个、任三个、任四个、任五个、任六个、任七个或所有七个。在某些实施方案中, SEQ ID NO. :30 包含由表 7 的各行表示的种系和非种系残基的独特组合中的任一个。在其他实施方案中,靶向结合剂或抗体衍生自具有 VH3-30*01, D3-10 和 JH4 结构域的种系序列,其中一个或多个残基突变以在该位置产生相应的种系残基。

[0458] 表 8 :在表示的残基号 6B10 重链 (SEQ ID NO :30) 示例性突变至种系

[0459]

2	23	31	34	49	57	109
E	T	N	I	T	K	Y
V	T	N	I	T	K	Y
E	A	N	I	T	K	Y
V	A	N	I	T	K	Y
E	T	S	I	T	K	Y
V	T	S	I	T	K	Y
E	A	S	I	T	K	Y
V	A	S	I	T	K	Y
E	T	N	M	T	K	Y
V	T	N	M	T	K	Y
E	A	N	M	T	K	Y

V	A	N	M	T	K	Y
E	T	S	M	T	K	Y
V	T	S	M	T	K	Y
E	A	S	M	T	K	Y
V	A	S	M	T	K	Y
E	T	N	I	A	K	Y

[0460]

V	T	N	I	A	K	Y
E	A	N	I	A	K	Y
V	A	N	I	A	K	Y
E	T	S	I	A	K	Y
V	T	S	I	A	K	Y
E	A	S	I	A	K	Y
V	A	S	I	A	K	Y
E	T	N	M	A	K	Y
V	T	N	M	A	K	Y
E	A	N	M	A	K	Y
V	A	N	M	A	K	Y
E	T	S	M	A	K	Y
V	T	S	M	A	K	Y
E	A	S	M	A	K	Y
V	A	S	M	A	K	Y
E	T	N	I	T	N	Y
V	T	N	I	T	N	Y
E	A	N	I	T	N	Y
V	A	N	I	T	N	Y
E	T	S	I	T	N	Y
V	T	S	I	T	N	Y
E	A	S	I	T	N	Y
V	A	S	I	T	N	Y
E	T	N	M	T	N	Y
V	T	N	M	T	N	Y
E	A	N	M	T	N	Y
V	A	N	M	T	N	Y
E	T	S	M	T	N	Y
V	T	S	M	T	N	Y
E	A	S	M	T	N	Y
V	A	S	M	T	N	Y
E	T	N	I	A	N	Y
V	T	N	I	A	N	Y
E	A	N	I	A	N	Y
V	A	N	I	A	N	Y
E	T	S	I	A	N	Y
V	T	S	I	A	N	Y
E	A	S	I	A	N	Y
V	A	S	I	A	N	Y
E	T	N	M	A	N	Y
V	T	N	M	A	N	Y

[0461]

E	A	N	M	A	N	Y
V	A	N	M	A	N	Y
E	T	S	M	A	N	Y

V	T	S	M	A	N	Y
E	A	S	M	A	N	Y
V	A	S	M	A	N	Y
E	T	N	I	T	K	H
V	T	N	I	T	K	H
E	A	N	I	T	K	H
V	A	N	I	T	K	H
E	T	S	I	T	K	H
V	T	S	I	T	K	H
E	A	S	I	T	K	H
V	A	S	I	T	K	H
E	T	N	M	T	K	H
V	T	N	M	T	K	H
E	A	N	M	T	K	H
V	A	N	M	T	K	H
E	T	S	M	T	K	H
V	T	S	M	T	K	H
E	A	S	M	T	K	H
V	A	S	M	T	K	H
E	T	N	I	A	K	H
V	T	N	I	A	K	H
E	A	N	I	A	K	H
V	A	N	I	A	K	H
E	T	S	I	A	K	H
V	T	S	I	A	K	H
E	A	S	I	A	K	H
V	A	S	I	A	K	H
E	T	N	M	A	K	H
V	T	N	M	A	K	H
E	A	N	M	A	K	H
V	A	N	M	A	K	H
E	T	S	M	A	K	H
V	T	S	M	A	K	H
E	A	S	M	A	K	H
V	A	S	M	A	K	H
E	T	N	I	T	N	H
V	T	N	I	T	N	H
E	A	N	I	T	N	H

[0462]

V	A	N	I	T	N	H
E	T	S	I	T	N	H
V	T	S	I	T	N	H
E	A	S	I	T	N	H
V	A	S	I	T	N	H
E	T	N	M	T	N	H
V	T	N	M	T	N	H
E	A	N	M	T	N	H
V	A	N	M	T	N	H
E	T	S	M	T	N	H
V	T	S	M	T	N	H
E	A	S	M	T	N	H
V	A	S	M	T	N	H

E	T	N	I	A	N	H
V	T	N	I	A	N	H
E	A	N	I	A	N	H
V	A	N	I	A	N	H
E	T	S	I	A	N	H
V	T	S	I	A	N	H
E	A	S	I	A	N	H
V	A	S	I	A	N	H
E	T	N	M	A	N	H
V	T	N	M	A	N	H
E	A	N	M	A	N	H
V	A	N	M	A	N	H
E	T	S	M	A	N	H
V	T	S	M	A	N	H
E	A	S	M	A	N	H
V	A	S	M	A	N	H
E	T	N	I	T	K	Y
V	T	N	I	T	K	Y
E	A	N	I	T	K	Y
V	A	N	I	T	K	Y
E	T	S	I	T	K	Y
V	T	S	I	T	K	Y
E	A	S	I	T	K	Y
V	A	S	I	T	K	Y
E	T	N	M	T	K	Y
V	T	N	M	T	K	Y
E	A	N	M	T	K	Y
V	A	N	M	T	K	Y

[0463]

E	T	S	M	T	K	Y
V	T	S	M	T	K	Y
E	A	S	M	T	K	Y
V	A	S	M	T	K	Y
E	T	N	I	A	K	Y
V	T	N	I	A	K	Y
E	A	N	I	A	K	Y
V	A	N	I	A	K	Y
E	T	S	I	A	K	Y
V	T	S	I	A	K	Y
E	A	S	I	A	K	Y
V	A	S	I	A	K	Y
E	T	N	M	A	K	Y
V	T	N	M	A	K	Y
E	A	N	M	A	K	Y
V	A	N	M	A	K	Y
E	T	S	M	A	K	Y
V	T	S	M	A	K	Y
E	A	S	M	A	K	Y
V	A	S	M	A	K	Y
E	T	N	I	T	N	Y
V	T	N	I	T	N	Y
E	A	N	I	T	N	Y

V	A	N	I	T	N	Y
E	T	S	I	T	N	Y
V	T	S	I	T	N	Y
E	A	S	I	T	N	Y
V	A	S	I	T	N	Y
E	T	N	M	T	N	Y
V	T	N	M	T	N	Y
E	A	N	M	T	N	Y
V	A	N	M	T	N	Y
E	T	S	M	T	N	Y
V	T	S	M	T	N	Y
E	A	S	M	T	N	Y
V	A	S	M	T	N	Y
E	T	N	I	A	N	Y
V	T	N	I	A	N	Y
E	A	N	I	A	N	Y
V	A	N	I	A	N	Y
E	T	S	I	A	N	Y

[0464]

V	T	S	I	A	N	Y
E	A	S	I	A	N	Y
V	A	S	I	A	N	Y
E	T	N	M	A	N	Y
V	T	N	M	A	N	Y
E	A	N	M	A	N	Y
V	A	N	M	A	N	Y
E	T	S	M	A	N	Y
V	T	S	M	A	N	Y
E	A	S	M	A	N	Y
V	A	S	M	A	N	Y
E	T	N	I	T	K	H
V	T	N	I	T	K	H
E	A	N	I	T	K	H
V	A	N	I	T	K	H
E	T	S	I	T	K	H
V	T	S	I	T	K	H
E	A	S	I	T	K	H
V	A	S	I	T	K	H
E	T	N	M	T	K	H
V	T	N	M	T	K	H
E	A	N	M	T	K	H
V	A	N	M	T	K	H
E	T	S	M	T	K	H
V	T	S	M	T	K	H
E	A	S	M	T	K	H
V	A	S	M	T	K	H
E	T	N	I	A	K	H
V	T	N	I	A	K	H
E	A	N	I	A	K	H
V	A	N	I	A	K	H
E	T	S	I	A	K	H
V	T	S	I	A	K	H

[0465]

E	A	S	I	A	K	H
V	A	S	I	A	K	H
E	T	N	M	A	K	H
V	T	N	M	A	K	H
E	A	N	M	A	K	H
V	A	N	M	A	K	H
E	T	S	M	A	K	H
V	T	S	M	A	K	H

E	A	S	M	A	K	H
V	A	S	M	A	K	H
E	T	N	I	T	N	H
V	T	N	I	T	N	H
E	A	N	I	T	N	H
V	A	N	I	T	N	H
E	T	S	I	T	N	H
V	T	S	I	T	N	H
E	A	S	I	T	N	H
V	A	S	I	T	N	H
E	T	N	M	T	N	H
V	T	N	M	T	N	H
E	A	N	M	T	N	H
V	A	N	M	T	N	H
E	T	S	M	T	N	H
V	T	S	M	T	N	H
E	A	S	M	T	N	H
V	A	S	M	T	N	H
E	T	N	I	A	N	H
V	T	N	I	A	N	H
E	A	N	I	A	N	H
V	A	N	I	A	N	H
E	T	S	I	A	N	H
V	T	S	I	A	N	H
E	A	S	I	A	N	H
V	A	S	I	A	N	H
E	T	N	M	A	N	H
V	T	N	M	A	N	H
E	A	N	M	A	N	H
V	A	N	M	A	N	H
E	T	S	M	A	N	H
V	T	S	M	A	N	H
E	A	S	M	A	N	H
V	A	S	M	A	N	H
E	T	N	I	T	K	Y
V	T	N	I	T	K	Y
E	A	N	I	T	K	Y
V	A	N	I	T	K	Y
E	T	S	I	T	K	Y
V	T	S	I	T	K	Y
E	A	S	I	T	K	Y

[0466]

V	A	S	I	T	K	Y
---	---	---	---	---	---	---

E	T	N	M	T	K	Y
V	T	N	M	T	K	Y
E	A	N	M	T	K	Y
V	A	N	M	T	K	Y
E	T	S	M	T	K	Y
V	T	S	M	T	K	Y
E	A	S	M	T	K	Y
V	A	S	M	T	K	Y
E	T	N	I	A	K	Y
V	T	N	I	A	K	Y
E	A	N	I	A	K	Y
V	A	N	I	A	K	Y
E	T	S	I	A	K	Y
V	T	S	I	A	K	Y
E	A	S	I	A	K	Y
V	A	S	I	A	K	Y
E	T	N	M	A	K	Y
V	T	N	M	A	K	Y
E	A	N	M	A	K	Y
V	A	N	M	A	K	Y
E	T	S	M	A	K	Y
V	T	S	M	A	K	Y
E	A	S	M	A	K	Y
V	A	S	M	A	K	Y
E	T	N	I	T	N	Y
V	T	N	I	T	N	Y
E	A	N	I	T	N	Y
V	A	N	I	T	N	Y
E	T	S	I	T	N	Y
V	T	S	I	T	N	Y
E	A	S	I	T	N	Y
V	A	S	I	T	N	Y
E	T	N	M	T	N	Y
V	T	N	M	T	N	Y
E	A	N	M	T	N	Y
V	A	N	M	T	N	Y
E	T	S	M	T	N	Y
V	T	S	M	T	N	Y
E	A	S	M	T	N	Y
V	A	S	M	T	N	Y

[0467]

E	T	N	I	A	N	Y
V	T	N	I	A	N	Y
E	A	N	I	A	N	Y
V	A	N	I	A	N	Y
E	T	S	I	A	N	Y
V	T	S	I	A	N	Y
E	A	S	I	A	N	Y
V	A	S	I	A	N	Y
E	T	N	M	A	N	Y
V	T	N	M	A	N	Y
E	A	N	M	A	N	Y

V	A	N	M	A	N	Y
E	T	S	M	A	N	Y
V	T	S	M	A	N	Y
E	A	S	M	A	N	Y
V	A	S	M	A	N	Y
E	T	N	I	T	K	H
V	T	N	I	T	K	H
E	A	N	I	T	K	H
V	A	N	I	T	K	H
E	T	S	I	T	K	H
V	T	S	I	T	K	H
E	A	S	I	T	K	H
V	A	S	I	T	K	H
E	T	N	M	T	K	H
V	T	N	M	T	K	H
E	A	N	M	T	K	H
V	A	N	M	T	K	H
E	T	S	M	T	K	H
V	T	S	M	T	K	H
E	A	S	M	T	K	H
V	A	S	M	T	K	H
E	T	N	I	A	K	H
V	T	N	I	A	K	H
E	A	N	I	A	K	H
V	A	N	I	A	K	H
E	T	S	I	A	K	H
V	T	S	I	A	K	H
E	A	S	I	A	K	H
V	A	S	I	A	K	H
E	T	N	M	A	K	H

[0468]

V	T	N	M	A	K	H
E	A	N	M	A	K	H
V	A	N	M	A	K	H
E	T	S	M	A	K	H
V	T	S	M	A	K	H
E	A	S	M	A	K	H
V	A	S	M	A	K	H
E	T	N	I	T	N	H
V	T	N	I	T	N	H
E	A	N	I	T	N	H
V	A	N	I	T	N	H
E	T	S	I	T	N	H
V	T	S	I	T	N	H
E	A	S	I	T	N	H
V	A	S	I	T	N	H
E	T	N	M	T	N	H
V	T	N	M	T	N	H
E	A	N	M	T	N	H
V	A	N	M	T	N	H
E	T	S	M	T	N	H
V	T	S	M	T	N	H

E	A	S	M	T	N	H
V	A	S	M	T	N	H
E	T	N	I	A	N	H
V	T	N	I	A	N	H
E	A	N	I	A	N	H
V	A	N	I	A	N	H
E	T	S	I	A	N	H
V	T	S	I	A	N	H
E	A	S	I	A	N	H
V	A	S	I	A	N	H
E	T	N	M	A	N	H
V	T	N	M	A	N	H
E	A	N	M	A	N	H
V	A	N	M	A	N	H
E	T	S	M	A	N	H
V	T	S	M	A	N	H
E	A	S	M	A	N	H
V	A	S	M	A	N	H

[0469] 在本发明的一些实施方案中,靶向结合剂或抗体包含具有 SEQ ID NO. : 32 的序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO. :32 包含由表 8 的各行表示的种系和非种系残基的组合中的任一种。在一些实施方案中,SEQ ID NO :32 包含由表 8 中表示的种系残基中的任一个、任两个、任三个、任四个、任五个、任六个、任七个、任八个、任九个、或所有九个。在某些实施方案中,SEQ ID NO. :32 包含由表 8 的各行表示的种系和非种系残基的独特组合中的任一个。在其他实施方案中,靶向结合剂或抗体衍生自具有 Vk, Vk08/018 和 JK4 结构域的种系序列,其中一个或多个残基突变以在该位置产生相应的种系残基。

[0470] 表 9 :在表示的残基号 6B10 轻链 (SEQ ID NO :32) 示例性突变至种系

[0471]

30	31	32	39	45	83	85	87	103
Y	K	S	R	K	F	R	F	R
S	K	S	R	K	F	R	F	R
Y	N	S	R	K	F	R	F	R
S	N	S	R	K	F	R	F	R
Y	K	Y	R	K	F	R	F	R
S	K	Y	R	K	F	R	F	R
Y	N	Y	R	K	F	R	F	R
S	N	Y	R	K	F	R	F	R
Y	K	S	K	K	F	R	F	R
S	K	S	K	K	F	R	F	R
Y	N	S	K	K	F	R	F	R
S	N	S	K	K	F	R	F	R
Y	K	Y	K	K	F	R	F	R
S	K	Y	K	K	F	R	F	R
Y	N	Y	K	K	F	R	F	R
S	N	Y	K	K	F	R	F	R
Y	K	S	R	N	F	R	F	R
S	K	S	R	N	F	R	F	R
Y	N	S	R	N	F	R	F	R
S	N	S	R	N	F	R	F	R
Y	K	Y	R	N	F	R	F	R
S	K	Y	R	N	F	R	F	R
Y	N	Y	R	N	F	R	F	R
S	N	Y	R	N	F	R	F	R
Y	K	S	K	N	F	R	F	R
S	K	S	K	N	F	R	F	R
Y	N	S	K	N	F	R	F	R

[0472]

S	N	S	K	N	F	R	F	R
Y	K	Y	K	N	F	R	F	R
S	K	Y	K	N	F	R	F	R
Y	N	Y	K	N	F	R	F	R
S	N	Y	K	N	F	R	F	R
Y	K	S	R	K	I	R	F	R
S	K	S	R	K	I	R	F	R
Y	N	S	R	K	I	R	F	R
S	N	S	R	K	I	R	F	R
Y	K	Y	R	K	I	R	F	R
S	K	Y	R	K	I	R	F	R
Y	N	Y	R	K	I	R	F	R
S	N	Y	R	K	I	R	F	R
Y	K	S	K	K	I	R	F	R
S	K	S	K	K	I	R	F	R
Y	N	S	K	K	I	R	F	R
S	N	S	K	K	I	R	F	R
Y	K	Y	K	K	I	R	F	R
S	K	Y	K	K	I	R	F	R
Y	N	Y	K	K	I	R	F	R
S	N	Y	K	K	I	R	F	R
Y	K	S	R	N	I	R	F	R
S	K	S	R	N	I	R	F	R
Y	N	S	R	N	I	R	F	R
S	N	S	R	N	I	R	F	R
Y	K	Y	R	N	I	R	F	R
S	K	Y	R	N	I	R	F	R
Y	N	Y	R	N	I	R	F	R
S	N	Y	R	N	I	R	F	R
Y	K	S	K	N	I	R	F	R
S	K	S	K	N	I	R	F	R
Y	N	S	K	N	I	R	F	R
S	N	S	K	N	I	R	F	R
Y	K	Y	K	N	I	R	F	R
S	K	Y	K	N	I	R	F	R
Y	N	Y	K	N	I	R	F	R
S	N	Y	K	N	I	R	F	R
Y	K	S	R	K	F	T	F	R
S	K	S	R	K	F	T	F	R
Y	N	S	R	K	F	T	F	R
S	N	S	R	K	F	T	F	R
Y	K	Y	R	K	F	T	F	R

[0473]

S	K	Y	R	K	F	T	F	R
Y	N	Y	R	K	F	T	F	R
S	N	Y	R	K	F	T	F	R
Y	K	S	K	K	F	T	F	R
S	K	S	K	K	F	T	F	R
Y	N	S	K	K	F	T	F	R
S	N	S	K	K	F	T	F	R
Y	K	Y	K	K	F	T	F	R
S	K	Y	K	K	F	T	F	R
Y	N	Y	K	K	F	T	F	R
S	N	Y	K	K	F	T	F	R
Y	K	S	R	N	F	T	F	R
S	K	S	R	N	F	T	F	R
Y	N	S	R	N	F	T	F	R
S	N	S	R	N	F	T	F	R
Y	K	Y	R	N	F	T	F	R
S	K	Y	R	N	F	T	F	R
Y	N	Y	R	N	F	T	F	R
S	N	Y	R	N	F	T	F	R
Y	K	S	K	N	F	T	F	R
S	K	S	K	N	F	T	F	R
Y	N	S	K	N	F	T	F	R
S	N	S	K	N	F	T	F	R
Y	K	Y	K	N	F	T	F	R
S	K	Y	K	N	F	T	F	R
Y	N	Y	K	N	F	T	F	R
S	N	Y	K	N	F	T	F	R
Y	K	S	R	K	I	T	F	R
S	K	S	R	K	I	T	F	R
Y	N	S	R	K	I	T	F	R
S	N	S	R	K	I	T	F	R
Y	K	Y	R	K	I	T	F	R
S	K	Y	R	K	I	T	F	R
Y	N	Y	R	K	I	T	F	R
S	N	Y	R	K	I	T	F	R
Y	K	S	K	K	I	T	F	R
S	K	S	K	K	I	T	F	R
Y	N	S	K	K	I	T	F	R
S	N	S	K	K	I	T	F	R
Y	K	Y	K	K	I	T	F	R
S	K	Y	K	K	I	T	F	R
Y	N	Y	K	K	I	T	F	R

[0474]

S	N	Y	K	K	I	T	F	R
Y	K	S	R	N	I	T	F	R
S	K	S	R	N	I	T	F	R
Y	N	S	R	N	I	T	F	R
S	N	S	R	N	I	T	F	R
Y	K	Y	R	N	I	T	F	R
S	K	Y	R	N	I	T	F	R
Y	N	Y	R	N	I	T	F	R
S	N	Y	R	N	I	T	F	R
Y	K	S	K	N	I	T	F	R
S	K	S	K	N	I	T	F	R
Y	N	S	K	N	I	T	F	R
S	N	S	K	N	I	T	F	R
Y	K	Y	K	N	I	T	F	R
S	K	Y	K	N	I	T	F	R
Y	N	Y	K	N	I	T	F	R
S	N	Y	K	N	I	T	F	R
Y	K	S	R	K	F	R	Y	R
S	K	S	R	K	F	R	Y	R
Y	N	S	R	K	F	R	Y	R
S	N	S	R	K	F	R	Y	R
Y	K	Y	R	K	F	R	Y	R
S	K	Y	R	K	F	R	Y	R
Y	N	Y	R	K	F	R	Y	R
S	N	Y	R	K	F	R	Y	R
Y	K	S	K	K	F	R	Y	R
S	K	S	K	K	F	R	Y	R
Y	N	S	K	K	F	R	Y	R
S	N	S	K	K	F	R	Y	R
Y	K	Y	K	K	F	R	Y	R
S	K	Y	K	K	F	R	Y	R
Y	N	Y	K	K	F	R	Y	R
S	N	Y	K	K	F	R	Y	R
Y	K	S	R	N	F	R	Y	R
S	K	S	R	N	F	R	Y	R
Y	N	S	R	N	F	R	Y	R
S	N	S	R	N	F	R	Y	R
Y	K	Y	R	N	F	R	Y	R
S	K	Y	R	N	F	R	Y	R
Y	N	Y	R	N	F	R	Y	R
S	N	Y	R	N	F	R	Y	R
Y	K	S	K	N	F	R	Y	R

[0475]

S	K	S	K	N	F	R	Y	R
Y	N	S	K	N	F	R	Y	R
S	N	S	K	N	F	R	Y	R
Y	K	Y	K	N	F	R	Y	R
S	K	Y	K	N	F	R	Y	R
Y	N	Y	K	N	F	R	Y	R
S	N	Y	K	N	F	R	Y	R
Y	K	S	R	K	I	R	Y	R
S	K	S	R	K	I	R	Y	R
Y	N	S	R	K	I	R	Y	R
S	N	S	R	K	I	R	Y	R
Y	K	Y	R	K	I	R	Y	R
S	K	Y	R	K	I	R	Y	R
Y	N	Y	R	K	I	R	Y	R
S	N	Y	R	K	I	R	Y	R
Y	K	S	K	K	I	R	Y	R
S	K	S	K	K	I	R	Y	R
Y	N	S	K	K	I	R	Y	R
S	N	S	K	K	I	R	Y	R
Y	K	Y	K	K	I	R	Y	R
S	K	Y	K	K	I	R	Y	R
Y	N	Y	K	K	I	R	Y	R
S	N	Y	K	K	I	R	Y	R
Y	K	S	R	N	I	R	Y	R
S	K	S	R	N	I	R	Y	R
Y	N	S	R	N	I	R	Y	R
S	N	S	R	N	I	R	Y	R
Y	K	Y	R	N	I	R	Y	R
S	K	Y	R	N	I	R	Y	R
Y	N	Y	R	N	I	R	Y	R
S	N	Y	R	N	I	R	Y	R
Y	K	S	K	N	I	R	Y	R
S	K	S	K	N	I	R	Y	R
Y	N	S	K	N	I	R	Y	R
S	N	S	K	N	I	R	Y	R
Y	K	Y	K	N	I	R	Y	R
S	K	Y	K	N	I	R	Y	R
Y	N	Y	K	N	I	R	Y	R
S	N	Y	K	N	I	R	Y	R
Y	K	S	R	K	F	T	Y	R
S	K	S	R	K	F	T	Y	R
Y	N	S	R	K	F	T	Y	R

[0476]

S	N	S	R	K	F	T	Y	R
Y	K	Y	R	K	F	T	Y	R
S	K	Y	R	K	F	T	Y	R
Y	N	Y	R	K	F	T	Y	R
S	N	Y	R	K	F	T	Y	R
Y	K	S	K	K	F	T	Y	R
S	K	S	K	K	F	T	Y	R
Y	N	S	K	K	F	T	Y	R
S	N	S	K	K	F	T	Y	R
Y	K	Y	K	K	F	T	Y	R
S	K	Y	K	K	F	T	Y	R
Y	N	Y	K	K	F	T	Y	R
S	N	Y	K	K	F	T	Y	R
Y	K	S	R	N	F	T	Y	R
S	K	S	R	N	F	T	Y	R
Y	N	S	R	N	F	T	Y	R
S	N	S	R	N	F	T	Y	R
Y	K	Y	R	N	F	T	Y	R
S	K	Y	R	N	F	T	Y	R
Y	N	Y	R	N	F	T	Y	R
S	N	Y	R	N	F	T	Y	R
Y	K	S	K	N	F	T	Y	R
S	K	S	K	N	F	T	Y	R
Y	N	S	K	N	F	T	Y	R
S	N	S	K	N	F	T	Y	R
Y	K	Y	K	N	F	T	Y	R
S	K	Y	K	N	F	T	Y	R
Y	N	Y	K	N	F	T	Y	R
S	N	Y	K	N	F	T	Y	R
Y	K	S	R	K	I	T	Y	R
S	K	S	R	K	I	T	Y	R
Y	N	S	R	K	I	T	Y	R
S	N	S	R	K	I	T	Y	R
Y	K	Y	R	K	I	T	Y	R
S	K	Y	R	K	I	T	Y	R
Y	N	Y	R	K	I	T	Y	R
S	N	Y	R	K	I	T	Y	R
Y	K	S	K	K	I	T	Y	R
S	K	S	K	K	I	T	Y	R
Y	N	S	K	K	I	T	Y	R
S	N	S	K	K	I	T	Y	R
Y	K	Y	K	K	I	T	Y	R

[0477]

S	K	Y	K	K	I	T	Y	R
Y	N	Y	K	K	I	T	Y	R
S	N	Y	K	K	I	T	Y	R
Y	K	S	R	N	I	T	Y	R
S	K	S	R	N	I	T	Y	R
Y	N	S	R	N	I	T	Y	R
S	N	S	R	N	I	T	Y	R
Y	K	Y	R	N	I	T	Y	R
S	K	Y	R	N	I	T	Y	R
Y	N	Y	R	N	I	T	Y	R
S	N	Y	R	N	I	T	Y	R
Y	K	S	K	N	I	T	Y	R
S	K	S	K	N	I	T	Y	R
Y	N	S	K	N	I	T	Y	R
S	N	S	K	N	I	T	Y	R
Y	K	Y	K	N	I	T	Y	R
S	K	Y	K	N	I	T	Y	R
Y	N	Y	K	N	I	T	Y	R
S	N	Y	K	N	I	T	Y	R
Y	K	S	R	K	F	R	F	K
S	K	S	R	K	F	R	F	K
Y	N	S	R	K	F	R	F	K
S	N	S	R	K	F	R	F	K
Y	K	Y	R	K	F	R	F	K
S	K	Y	R	K	F	R	F	K
Y	N	Y	R	K	F	R	F	K
S	N	Y	R	K	F	R	F	K
Y	K	S	K	K	F	R	F	K
S	K	S	K	K	F	R	F	K
Y	N	S	K	K	F	R	F	K
S	N	S	K	K	F	R	F	K
Y	K	Y	K	K	F	R	F	K
S	K	Y	K	K	F	R	F	K
Y	N	Y	K	K	F	R	F	K
S	N	Y	K	K	F	R	F	K
Y	K	S	R	N	F	R	F	K
S	K	S	R	N	F	R	F	K
Y	N	S	R	N	F	R	F	K
S	N	S	R	N	F	R	F	K
Y	K	Y	R	N	F	R	F	K
S	K	Y	R	N	F	R	F	K
Y	N	Y	R	N	F	R	F	K

[0478]

S	N	Y	R	N	F	R	F	K
Y	K	S	K	N	F	R	F	K
S	K	S	K	N	F	R	F	K
Y	N	S	K	N	F	R	F	K
S	N	S	K	N	F	R	F	K
Y	K	Y	K	N	F	R	F	K
S	K	Y	K	N	F	R	F	K
Y	N	Y	K	N	F	R	F	K
S	N	Y	K	N	F	R	F	K
Y	K	S	R	K	I	R	F	K
S	K	S	R	K	I	R	F	K
Y	N	S	R	K	I	R	F	K
S	N	S	R	K	I	R	F	K
Y	K	Y	R	K	I	R	F	K
S	K	Y	R	K	I	R	F	K
Y	N	Y	R	K	I	R	F	K
S	N	Y	R	K	I	R	F	K
Y	K	S	K	K	I	R	F	K
S	K	S	K	K	I	R	F	K
Y	N	S	K	K	I	R	F	K
S	N	S	K	K	I	R	F	K
Y	K	Y	K	K	I	R	F	K
S	K	Y	K	K	I	R	F	K
Y	N	Y	K	K	I	R	F	K
S	N	Y	K	K	I	R	F	K
Y	K	S	R	N	I	R	F	K
S	K	S	R	N	I	R	F	K
Y	N	S	R	N	I	R	F	K
S	N	S	R	N	I	R	F	K
Y	K	Y	R	N	I	R	F	K
S	K	Y	R	N	I	R	F	K
Y	N	Y	R	N	I	R	F	K
S	N	Y	R	N	I	R	F	K
Y	K	S	K	N	I	R	F	K
S	K	S	K	N	I	R	F	K
Y	N	S	K	N	I	R	F	K
S	N	S	K	N	I	R	F	K
Y	K	Y	K	N	I	R	F	K
S	K	Y	K	N	I	R	F	K
Y	N	Y	K	N	I	R	F	K
S	N	Y	K	N	I	R	F	K
Y	K	S	R	K	F	T	F	K

[0479]

S	K	S	R	K	F	T	F	K
Y	N	S	R	K	F	T	F	K
S	N	S	R	K	F	T	F	K
Y	K	Y	R	K	F	T	F	K
S	K	Y	R	K	F	T	F	K
Y	N	Y	R	K	F	T	F	K
S	N	Y	R	K	F	T	F	K
Y	K	S	K	K	F	T	F	K
S	K	S	K	K	F	T	F	K
Y	N	S	K	K	F	T	F	K
S	N	S	K	K	F	T	F	K
Y	K	Y	K	K	F	T	F	K
S	K	Y	K	K	F	T	F	K
Y	N	Y	K	K	F	T	F	K
S	N	Y	K	K	F	T	F	K
Y	K	S	R	N	F	T	F	K
S	K	S	R	N	F	T	F	K
Y	N	S	R	N	F	T	F	K
S	N	S	R	N	F	T	F	K
Y	K	Y	R	N	F	T	F	K
S	K	Y	R	N	F	T	F	K
Y	N	Y	R	N	F	T	F	K
S	N	Y	R	N	F	T	F	K
Y	K	S	K	N	F	T	F	K
S	K	S	K	N	F	T	F	K
Y	N	S	K	N	F	T	F	K
S	N	S	K	N	F	T	F	K
Y	K	Y	K	N	F	T	F	K
S	K	Y	K	N	F	T	F	K
Y	N	Y	K	N	F	T	F	K
S	N	Y	K	N	F	T	F	K
Y	K	S	R	K	I	T	F	K
S	K	S	R	K	I	T	F	K
Y	N	S	R	K	I	T	F	K
S	N	S	R	K	I	T	F	K
Y	K	Y	R	K	I	T	F	K
S	K	Y	R	K	I	T	F	K
Y	N	Y	R	K	I	T	F	K
S	N	Y	R	K	I	T	F	K
Y	K	S	K	K	I	T	F	K
S	K	S	K	K	I	T	F	K
Y	N	S	K	K	I	T	F	K

[0480]

S	N	S	K	K	I	T	F	K
Y	K	Y	K	K	I	T	F	K
S	K	Y	K	K	I	T	F	K
Y	N	Y	K	K	I	T	F	K
S	N	Y	K	K	I	T	F	K
Y	K	S	R	N	I	T	F	K
S	K	S	R	N	I	T	F	K
Y	N	S	R	N	I	T	F	K
S	N	S	R	N	I	T	F	K
Y	K	Y	R	N	I	T	F	K
S	K	Y	R	N	I	T	F	K
Y	N	Y	R	N	I	T	F	K
S	N	Y	R	N	I	T	F	K
Y	K	S	K	N	I	T	F	K
S	K	S	K	N	I	T	F	K
Y	N	S	K	N	I	T	F	K
S	N	S	K	N	I	T	F	K
Y	K	Y	K	N	I	T	F	K
S	K	Y	K	N	I	T	F	K
Y	N	Y	K	N	I	T	F	K
S	N	Y	K	N	I	T	F	K
Y	K	S	R	K	F	R	Y	K
S	K	S	R	K	F	R	Y	K
Y	N	S	R	K	F	R	Y	K
S	N	S	R	K	F	R	Y	K
Y	K	Y	R	K	F	R	Y	K
S	K	Y	R	K	F	R	Y	K
Y	N	Y	R	K	F	R	Y	K
S	N	Y	R	K	F	R	Y	K
Y	K	S	K	K	F	R	Y	K
S	K	S	K	K	F	R	Y	K
Y	N	S	K	K	F	R	Y	K
S	N	S	K	K	F	R	Y	K
Y	K	Y	K	K	F	R	Y	K
S	K	Y	K	K	F	R	Y	K
Y	N	Y	K	K	F	R	Y	K
S	N	Y	K	K	F	R	Y	K
Y	K	S	R	N	F	R	Y	K
S	K	S	R	N	F	R	Y	K
Y	N	S	R	N	F	R	Y	K
S	N	S	R	N	F	R	Y	K
Y	K	Y	R	N	F	R	Y	K

[0481]

S	K	Y	R	N	F	R	Y	K
Y	N	Y	R	N	F	R	Y	K
S	N	Y	R	N	F	R	Y	K
Y	K	S	K	N	F	R	Y	K
S	K	S	K	N	F	R	Y	K
Y	N	S	K	N	F	R	Y	K
S	N	S	K	N	F	R	Y	K
Y	K	Y	K	N	F	R	Y	K
S	K	Y	K	N	F	R	Y	K
Y	N	Y	K	N	F	R	Y	K
S	N	Y	K	N	F	R	Y	K
Y	K	S	R	K	I	R	Y	K
S	K	S	R	K	I	R	Y	K
Y	N	S	R	K	I	R	Y	K
S	N	S	R	K	I	R	Y	K
Y	K	Y	R	K	I	R	Y	K
S	K	Y	R	K	I	R	Y	K
Y	N	Y	R	K	I	R	Y	K
S	N	Y	R	K	I	R	Y	K
Y	K	S	K	K	I	R	Y	K
S	K	S	K	K	I	R	Y	K
Y	N	S	K	K	I	R	Y	K
S	N	S	K	K	I	R	Y	K
Y	K	Y	K	K	I	R	Y	K
S	K	Y	K	K	I	R	Y	K
Y	N	Y	K	K	I	R	Y	K
S	N	Y	K	K	I	R	Y	K
Y	K	S	R	N	I	R	Y	K
S	K	S	R	N	I	R	Y	K
Y	N	S	R	N	I	R	Y	K
S	N	S	R	N	I	R	Y	K
Y	K	Y	R	N	I	R	Y	K
S	K	Y	R	N	I	R	Y	K
Y	N	Y	R	N	I	R	Y	K
S	N	Y	R	N	I	R	Y	K
Y	K	S	K	N	I	R	Y	K
S	K	S	K	N	I	R	Y	K
Y	N	S	K	N	I	R	Y	K
S	N	S	K	N	I	R	Y	K
Y	K	Y	K	N	I	R	Y	K
S	K	Y	K	N	I	R	Y	K
Y	N	Y	K	N	I	R	Y	K

[0482]

S	N	Y	K	N	I	R	Y	K
Y	K	S	R	K	F	T	Y	K
S	K	S	R	K	F	T	Y	K
Y	N	S	R	K	F	T	Y	K
S	N	S	R	K	F	T	Y	K
Y	K	Y	R	K	F	T	Y	K
S	K	Y	R	K	F	T	Y	K
Y	N	Y	R	K	F	T	Y	K
S	N	Y	R	K	F	T	Y	K
Y	K	S	K	K	F	T	Y	K
S	K	S	K	K	F	T	Y	K
Y	N	S	K	K	F	T	Y	K
S	N	S	K	K	F	T	Y	K
Y	K	Y	K	K	F	T	Y	K
S	K	Y	K	K	F	T	Y	K
Y	N	Y	K	K	F	T	Y	K
S	N	Y	K	K	F	T	Y	K
Y	K	S	R	N	F	T	Y	K
S	K	S	R	N	F	T	Y	K
Y	N	S	R	N	F	T	Y	K
S	N	S	R	N	F	T	Y	K
Y	K	Y	R	N	F	T	Y	K
S	K	Y	R	N	F	T	Y	K
Y	N	Y	R	N	F	T	Y	K
S	N	Y	R	N	F	T	Y	K
Y	K	S	K	N	F	T	Y	K
S	K	S	K	N	F	T	Y	K
Y	N	S	K	N	F	T	Y	K
S	N	S	K	N	F	T	Y	K
Y	K	Y	K	N	F	T	Y	K
S	K	Y	K	N	F	T	Y	K
Y	N	Y	K	N	F	T	Y	K
S	N	Y	K	N	F	T	Y	K
Y	K	S	R	K	I	T	Y	K
S	K	S	R	K	I	T	Y	K
Y	N	S	R	K	I	T	Y	K
S	N	S	R	K	I	T	Y	K
Y	K	Y	R	K	I	T	Y	K
S	K	Y	R	K	I	T	Y	K
Y	N	Y	R	K	I	T	Y	K
S	N	Y	R	K	I	T	Y	K
Y	K	S	K	K	I	T	Y	K

[0483]

S	K	S	K	K	I	T	Y	K
Y	N	S	K	K	I	T	Y	K
S	N	S	K	K	I	T	Y	K
Y	K	Y	K	K	I	T	Y	K
S	K	Y	K	K	I	T	Y	K
Y	N	Y	K	K	I	T	Y	K
S	N	Y	K	K	I	T	Y	K
Y	K	S	R	N	I	T	Y	K
S	K	S	R	N	I	T	Y	K
Y	N	S	R	N	I	T	Y	K
S	N	S	R	N	I	T	Y	K
Y	K	Y	R	N	I	T	Y	K
S	K	Y	R	N	I	T	Y	K
Y	N	Y	R	N	I	T	Y	K
S	N	Y	R	N	I	T	Y	K
Y	K	S	K	N	I	T	Y	K
S	K	S	K	N	I	T	Y	K
Y	N	S	K	N	I	T	Y	K
S	N	S	K	N	I	T	Y	K
Y	K	Y	K	N	I	T	Y	K
S	K	Y	K	N	I	T	Y	K
Y	N	Y	K	N	I	T	Y	K
S	N	Y	K	N	I	T	Y	K

[0484] 在本发明的一些实施方案中,靶向结合剂或抗体包含具有 SEQ ID NO. :2 的序列。在某些实施方案中,SEQ ID NO. :2 包含由表 9 的各行表示的种系和非种系残基的组合中的任一种。在一些实施方案中,SEQ ID NO :2 包含由表 9 中表示的种系残基中的任一个、任两个、任三个、任四个、任五个、任六个、或所有六个。在某些实施方案中,SEQ ID NO. :2 包含由表 9 的各行表示的种系和非种系残基的独特组合中的任一个。在其他实施方案中,靶向结合剂或抗体衍生自具有 VH4-59, D5-12, JH4 结构域的种系序列,其中一个或多个残基突变以在该位置产生相应的种系残基。

[0485] 表 10 :在表示的残基号 4, 120 重链 (SEQ ID NO :2) 示例性突变至种系

[0486]

41	50	54	69	101	106
A	R	T	M	G	G
P	R	T	M	G	G

[0487]

A	Y	T	M	G	G
P	Y	T	M	G	G
A	R	Y	M	G	G
P	R	Y	M	G	G
A	Y	Y	M	G	G
P	Y	Y	M	G	G
A	R	T	I	G	G
P	R	T	I	G	G
A	Y	T	I	G	G
P	Y	T	I	G	G
A	R	Y	I	G	G
P	R	Y	I	G	G
A	Y	Y	I	G	G
P	Y	Y	I	G	G
A	R	T	M	V	G
P	R	T	M	V	G
A	Y	T	M	V	G
P	Y	T	M	V	G
A	R	Y	M	V	G
P	R	Y	M	V	G
A	Y	Y	M	V	G
P	Y	Y	M	V	G
A	R	T	I	V	G
P	R	T	I	V	G
A	Y	T	I	V	G
P	Y	T	I	V	G
A	R	Y	I	V	G
P	R	Y	I	V	G
A	Y	Y	I	V	G
P	Y	Y	I	V	G
A	R	T	M	G	Y
P	R	T	M	G	Y
A	Y	T	M	G	Y
P	Y	T	M	G	Y
A	R	Y	M	G	Y
P	R	Y	M	G	Y
A	Y	Y	M	G	Y
P	Y	Y	M	G	Y
A	R	T	I	G	Y
P	R	T	I	G	Y
A	Y	T	I	G	Y
P	Y	T	I	G	Y

[0488]

A	R	Y	I	G	Y
P	R	Y	I	G	Y
A	Y	Y	I	G	Y
P	Y	Y	I	G	Y
A	R	T	M	V	Y
P	R	T	M	V	Y
A	Y	T	M	V	Y
P	Y	T	M	V	Y
A	R	Y	M	V	Y
P	R	Y	M	V	Y
A	Y	Y	M	V	Y
P	Y	Y	M	V	Y
A	R	T	I	V	Y
P	R	T	I	V	Y
A	Y	T	I	V	Y
P	Y	T	I	V	Y
A	R	Y	I	V	Y
P	R	Y	I	V	Y
A	Y	Y	I	V	Y
P	Y	Y	I	V	Y

[0489] 本领域技术人员将知道有可选择的方法来限定 CDR 边界。表 2a 中的 VH CDR1 的起始残基已经根据 Scaviner D, Barbie V, Ruiz M, Lefranc M-P. Protein Displays of the Human Immunoglobulin Heavy, Kappa and Lambda Variable and Joining Regions. Exp Clin Immunogenet 1999, 16:234-240 中所述的方法来限定。表 2 中残留 CDR 边界根据 Kabat 定义来限定。

[0490] 表 2 中的所有 CDR 边界根据 Kabat 定义来限定。

[0491] 实施例 11

[0492] FACS KD 测定

[0493] 抗-CD105 抗体的亲和性通过 FACS 来测定。简言之, HUVEC 细胞表达 CD105 以约 5 百万细胞/mL 的浓度重新悬浮在 FACS 缓冲液 (2% FBS, 0.05% Na₃) 中。细胞保持在冰上。纯化的抗体以过滤的 1xPBS (2x) 穿过 96-孔板中的 11 个孔来连续稀释。各行中的第 12 个孔只含缓冲液。细胞和 1xPBS 加入各 mAb 孔, 使得最终体积为 30 μL/孔, 并且各孔含有约 100,000 细胞。将板在 4°C 下放置在板振摇器上 3 小时, 然后旋转并用 PBS 洗涤 3 次。荧光染料标记的二次山羊 α-人多克隆抗体以 200 μL 体积加入各孔中。然后将板在 4°C 下孵育 40 分钟, 然后旋转并用 PBS 洗涤 3 次。

[0494] 各 mAb 浓度的 10,000 细胞的几何平均荧光数 (GMF) 使用 FACSCalibur 仪器来确定。GMF 作为分子 mAb 的浓度的函数的非线性图使用下列等式利用 Scientist 软件来拟合:

$$[0495] \quad F = P \cdot \frac{(K_D + L_T + 1) - \sqrt{((K_D + L_T + 1))^2 - 4(L_T)}}{2}$$

[0496] 在上式中, F = 几何平均荧光数, L_t = 总分子 mAb 浓度, P' = 涉及结合 mAb 的任意荧光单位的比例常数, 以及 K_D = 平衡解离常数。对于各 mAb, 估计用于 K_D 的值获得为 P' , 并且 K_D 被允许在非线性分析中自由地浮动。下表列出各 mAb 的所得 K_D 。

[0497]

mAb	K_D (pM)
4D4. 1	622. 2
3C1. 1	871. 5
6A6. 2	< 1150
6B1. 1	2300
6B10. 1	< 149. 06
9H10. 2	< 583. 75
10C9. 2	< 748. 01
11H2. 1	337. 7
4. 12	770. 1
4. 37 κ	< 716. 79

[0498] 实施例 12

[0499] CD105 抗体的 ADCC 和 CDC 活性

[0500] (1) ADCC 测定

[0501] 使用 RosetteSep[®] Human NK cell enrichment cocktail 和方案 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC 来进行从 PMBC 的 NK 的富集。简言之, 来自供体的全血收集在肝素化或 EDTA 涂覆的管中, 并且根据 RosetteSep[®] 方案, 和 2. 25ml 的 RosetteSep[®] Human NK Cell Enrichment cocktail (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC) 在室温下孵育 20 分钟。然后样品使用相同体积的 PBS 来稀释, 所述 PBS 含有 2% FBS 和 30mL 血液混合物, 其在 15mL Ficoll (Amersham Biosciences) 锥形管内分层。管以 2150rpm 在室温下离心 30 分钟, 并且界面层转移至干净 50mL 锥形管中。加入含有 2% FBS 的 PBS, 然后在 1200rpm 离心 10 分钟。抛弃上清液, 沉淀重新悬浮在 1mL PBS 中并且储存在冰上。使用血球计来对细胞进行计数, 并且测定 NK 受体在每毫升溶液中的浓度。

[0502] 钙黄绿素-AM 是钙黄绿素的细胞可透视形式。当钙黄绿素-AM 渗透到细胞质中时, 其通过细胞中的酯酶水解为保留在细胞内部的钙黄绿素。使用的可变测量是可靠的, 并且和标准 ^{51}Cr - 释放测定非常关联。简言之, 靶细胞 (HUVEC 细胞) 被收获并以 1×10^6 细胞 / mL 收获并重新悬浮在培养基中。钙黄绿素-AM (Sigma C1359) 加入至最终浓度为 $10 \mu\text{M}$ (在 2mL 细胞内孔的 $5 \mu\text{L}$)。细胞在 37°C 下孵育 45 分钟。然后细胞以 1200RPM 旋转 10 分钟, 丢弃上清液, 沉淀重新悬浮在新鲜生长培养基 (2x) 中。所述沉淀重新悬浮至 10, 000 细胞 / $75 \mu\text{L}$ 的生长介质。靶细胞以 $75 \mu\text{L}$ (10, 000 细胞 / 孔) 接种在圆底烧瓶。然后抗体以 $10 \mu\text{g/mL}$ 在培养基中以 $50 \mu\text{L}$ 孔稀释加入靶细胞, 并且使其在室温下孵育 30 分钟。孵育后, $75 \mu\text{L}$ 的效应子细胞已经以 100, 000 细胞 / 孔加入, 并且允许在 37°C 孵育 4 小时。在接种后, 将板以 1200RPM 旋转 5 分钟。将上清液 ($100 \mu\text{L}$) 转移到平坦、黑色、清澈圆底板 (Costar, cat. no. 3603) 并且测量一些荧光数。洋地黄皂苷用作阳性对照以测量最大钙黄绿素释放。

[0503] 数据 (示于图 7) 表示所有 10 个 mAbs 曲线都显示出 ADCC 活性, 其中 mAbs 4D4, 9H10 和 6B10 显示出最高水平的溶胞活性。

[0504] (2) CDC 测定

[0505] 由于 CD105 的表达已经记录在白血病细胞中 (Haruta, Y. et al, 1986, PNAS, 83 :

7898-7902), 我们制得抗-CD105mAbs 对于穿过数个白血病细胞系的互补活性的曲线。简言之, 白血病细胞系 (KG1, REH, KG1a, U937) 以 100,000 细胞 / 孔接种到 Costar 96 孔平坦圆底板 (Corning Inc. Life Sciences, Lowell, MA)。10 种抗-CD105 mAb (10 μ g/ml) 加入组织培养基中, 并且使其在室温下孵育 10 分钟。正常人血清以 10 至 50% 之间的浓度加入, 并且使用生长培养基来稀释。血清允许在 37°C 孵育 1 小时。将 CellTiter Glo 试剂 (Promega Corp., Madison, WI) 加入细胞中, 并且在室温下以黑暗和可读的方式按照方案说明来孵育 10 分钟。数据 (图 8) 表示仅 mAb 4.120 穿过所有检查的白血病细胞系引诱互补活性。

[0506] 实施例 13

[0507] CD105 抗体的抗体内在化

[0508] 进行抗体内在化研究以确定是否抗-CD105mAbs 可以诱导 CD105 在 HUVEC 细胞中的内在化。进行下列内在化测定。HUVEC 细胞以 300,000 细胞 / 反应等分, 并且和 10 μ g/ml 的各抗-CD105mAbs 的在 4°C 下孵育 1 小时。细胞用 FACS 缓冲液 (2% FCS, 在 PBS 中) 洗涤两次, 随后在 4°C 在 FACS 缓冲液中和缀合 FITC 的 5 μ g/ml 山羊 Fab 抗-人 (重链 + 轻链) 次级抗体孵育 45 分钟。然后 HUVEC 细胞用 200 μ L 的 FACS 缓冲液洗涤。两管各个样品在 4°C 孵育 1 小时, 一管在 37°C 下孵育, 之后细胞用 200 μ L FACS 缓冲液洗涤一次。然后, 100 μ L 的 200mM Tris (2-羧基以及) 膦酸盐 (TCEP) 在 4°C 下加入一个样品中, 在 37°C 下加入另一样, 并且样品在 4°C 孵育 30 分钟。最后, 细胞使用 FACS 缓冲液洗涤一次, 并且通过流式细胞术来读取。内在化百分率从下式的几何平均数来确定: 内在化百分率 = $((37^\circ\text{C} + \text{TCEP}) - (4^\circ\text{C} + \text{TCEP})) / ((4^\circ\text{C} - \text{TCEP}) - (4^\circ\text{C} + \text{TCEP})) \times [100]$ 。

[0509] 结果表明, 所有抗-CD105mAbs 介导内在化, 并且约 25 至 30% 的细胞表面抗体通过其和 CD105 在一小时内的相互作用而内在化 (参见图 9)。快速内在化 1C1 抗体用作阳性对照 (Jackson, D. et al., 2008, Cancer Res., 68 :9367-74)。结果表明约 40% 的细胞表面抗体用 1C1 抗体内在化。

[0510] 因此, 这些数据暗示上述抗-CD105mAbs 可以是用于递送毒素至细胞表达 CD105 抗原的免疫缀合物的有效药剂。

[0511] 引用并入

[0512] 本文所引用的所有参考文献, 包括专利、专利申请、论文、书籍等, 以及其中所引用的参考文献, 在尚未的情况下在此均以引用方式全文并入本文。

[0513] 同等原则

[0514] 认为之前所写的说明书足以使本领域的技术人员实施本发明。之前的说明书和实施例详细描述了本发明某些优选的实施方案, 并且描述了本发明人认为的最佳模式。但是, 应该意识到, 无论文中之前的描述看起来有多详细, 都可以以多种方式实施本发明, 并且应该根据所附的权利要求书及其等价形式来解释本发明。

[0001]

序列表

<110> 阿斯利康

<120> 定向于 CD105 的靶向结合剂及其用途

<130> 103523

<150> 61/098,685

<151> 2008-09-19

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc	120
gccgggaagg gactggagtg gattgggcgt atctatacca gtgggagcac caactacaac	180
ccctccctca agagtcgagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag aagggatata	300
ggggctacga ttaagggctt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca	360

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

[0002]

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

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

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

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

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

Arg Arg Asp Ile Gly Ala Thr Ile Lys Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccccacctt cggccaaggg 300

[0003]

acacgactgg agattaag

318

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 5

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

[0004]

caggtgcaac tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cgccttcatt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggactg ggtggcagtt atatcatatg atggtagtaa taaatactat 180
acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcta 300
atgggagcta ccttatttga caactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ile Asn Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0005]

Ala Arg Asp Leu Met Gly Ala Thr Leu Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

tcctatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggtcagac ggccaggatt 60
tcctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggttcagca gaagccaggc 120
caggccccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggtt ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc 300
ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

[0006]

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 9
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagg agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctggat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg 300
atagcagcag cccgctacta caacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 10
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

[0007]

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Ile Ala Ala Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gccatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca ataataagaa ctacttagct 120

[0008]

tggtaccagc agaaaccagg acaacctcct aatctactct ttctactgggc atctaccggg 180
gaatccgggg tccctgatcg cttcagtgtc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagtagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatgattct 300
ccgctcactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaa 339

<210> 12
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Asn Leu Leu Phe Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Val Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asp Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

[0009]

Lys

<210> 13

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagtactg 300

ggagctacgg ggggttacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 14

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0010]

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Gly Ala Thr Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
.
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgcttgct ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcccctg tgctgggcat ctatcaagat atcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaagtctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgtggtatt cggcggaggg 300
accaagctga ccgtccta 318
.

<210> 16
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

[0011]

<400> 16

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Ile Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 17

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggct cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cagcttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggactg ggtggcaatt atatggtatg atggaagtta taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtct 240

[0012]

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtat attactgtgc gagagatgga 300

aagtatccct ttgactactg gggccaggga accctgggtca cegtctctc a 351

<210> 18

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Lys Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

[0013]

<210> 19
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60
acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
caggccccctg tgctgggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatcgtagta gtgatcatgt ggtattcggc 300
ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

[0014]

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Ser Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 21

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagagactat 300

agtagtggct ggtactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 22

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0015]

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 23

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

tcctatgagc tgacacagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60

acctgctctg gagatgcctt gccaaaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120

caggcccctg tgttgggtcat ctatgaggac agcaaacgac cctccgggat ccctgagaga 180

ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggaa 240

gatgaagctg actactcctg ttactcaata gacagcagtg ttaatcatgt ggtattcggc 300

ggaggggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 24

[0016]

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Ser Cys Tyr Ser Ile Asp Ser Ser Val Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 25

<211> 362

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt gactatggca tgcaactgggt ccgccaggct 120

[0017]

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcagct 300
ggcttctact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tc 362

<210> 26
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Ala Gly Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

[0018]

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 336
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 27
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg tatagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggc 180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt gggtcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggctt tattactgca tgcgagctct acaaactcca 300
ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaa 336

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

[0019]

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Arg Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 29

<211> 358

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

caggagcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtacag cctctggatt caccttcagt aactatggca tacactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacagtt atatcatatg atggaagtaa aaaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcgttt 300

tctactatgg ttcggggagt tgaccactgg ggccagggaa cctgggtcac cgtctcct 358

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

[0020]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Phe Ser Thr Met Val Arg Gly Val Asp His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc aggcgagtcg ggacatttac aaatctttaa attggtatca gcagagacca 120

gggaaagccc ctaacctcct gatctacgat gcttccaatt tggaacacagg ggtcccatca 180

aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240

[0021]

gaggatTTTg caagatattt ctgtcagcaa tatgataatc tccctctcac tttcggcggt 300

gggaccaggg tggagatcaa a 321

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Lys Ser

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Arg Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 33

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

[0022]

<400> 33
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcactg 300

ggagttaccg ggggttacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 34
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0023]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Leu Gly Val Thr Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 35
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgtttggt ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcccctg tgttgggtcat ctatcaagat agcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actattgctg tcaggcgtgg gacagcagca ctgtggtatt cggcggaggg 300
accaagctga ccgtccta 318

<210> 36
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

[0024]

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Cys Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 37

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

gaggtgcaac tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaact attagtgggt gtgggtcatag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtct attactgtgc gcgtatagca 300

ccggctggtc cccactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

[0025]

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly His Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Pro His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaactttc 60

[0026]

tcctgcaccc gcagcagtgg cagcattgcc agcaactttg tgcagtggta ccagcaacgc 120
ccgggcagtt cccccaccac tgtgatctat gaacataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccagttctg cctccctcac catctctgga 240
ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtttt atgatcgcaa cagtcattgg 300
gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 40
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Phe Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
20 25 30

Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu His Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Phe Tyr Asp Arg
85 90 95

Asn Ser His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

[0027]

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

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

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

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

Arg Arg Asp Ile Gly Ala Thr Ile Lys Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 107
<212> PRT

[0028]

<213> Homo sapiens

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 43

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[0029]

	20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Gly Ala Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 44			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 44			
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln			
1	5	10	15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val			
20	25	30	
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr			
35	40	45	

[0030]

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 45

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0031]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Ala Ala Ala Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

[0032]

Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 47

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[0033]

115

120

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 49

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

[0034]

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser'
115

<210> 50

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

[0035]

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 51
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0036]

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90 95
Ala Arg Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
	100	105 110
Val Ser Ser		
	115	
<210>	52	
<211>	108	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<400>	52	
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln		
1	5	10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala		
	20	25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr		
	35	40 45
Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
	50	55 60
Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu		
65	70	75 80

[0037]

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 53

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Ala Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

[0038]

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 55
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

[0039]

<400> 55

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Met Val Arg Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

[0040]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 57
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0041]

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0042]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 59

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ile Ala Ala Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0043]

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 60		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 60		
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys		
1 5 10 15		
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn		
20 25 30		
Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val		
35 40 45		
Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
50 55 60		
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly		
65 70 75 80		
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser		
85 90 95		
Ser Asn Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
100 105 110		

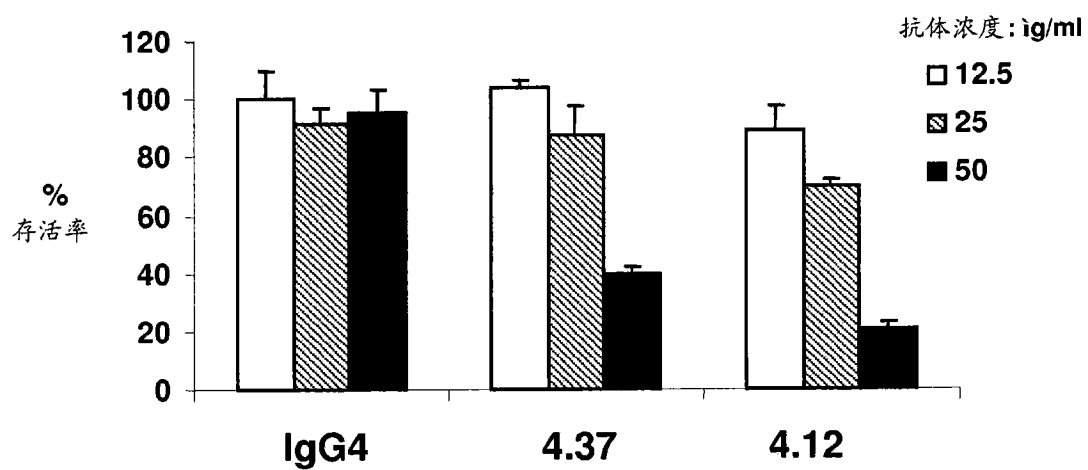
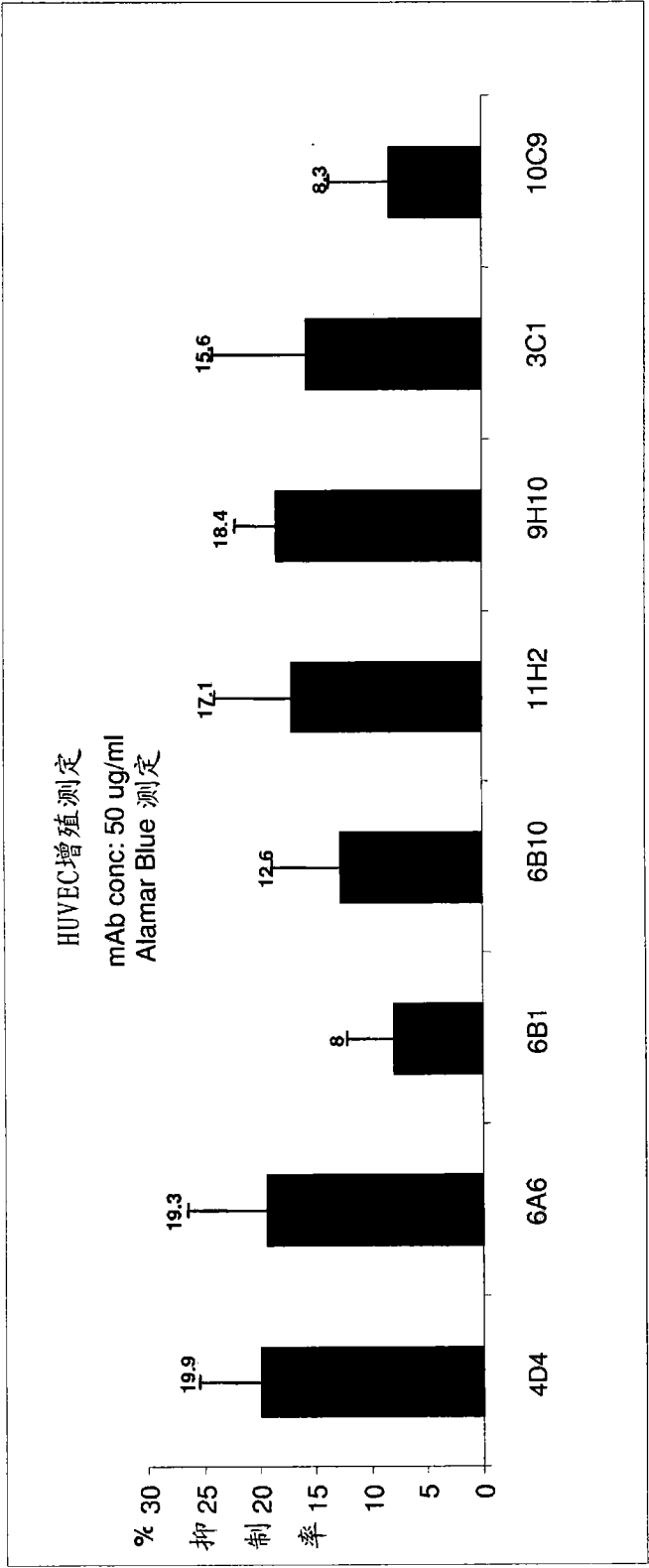


图 1



* 归一化至IgG4和IgG2同种型对照。8个试验的数据概括。

图 2

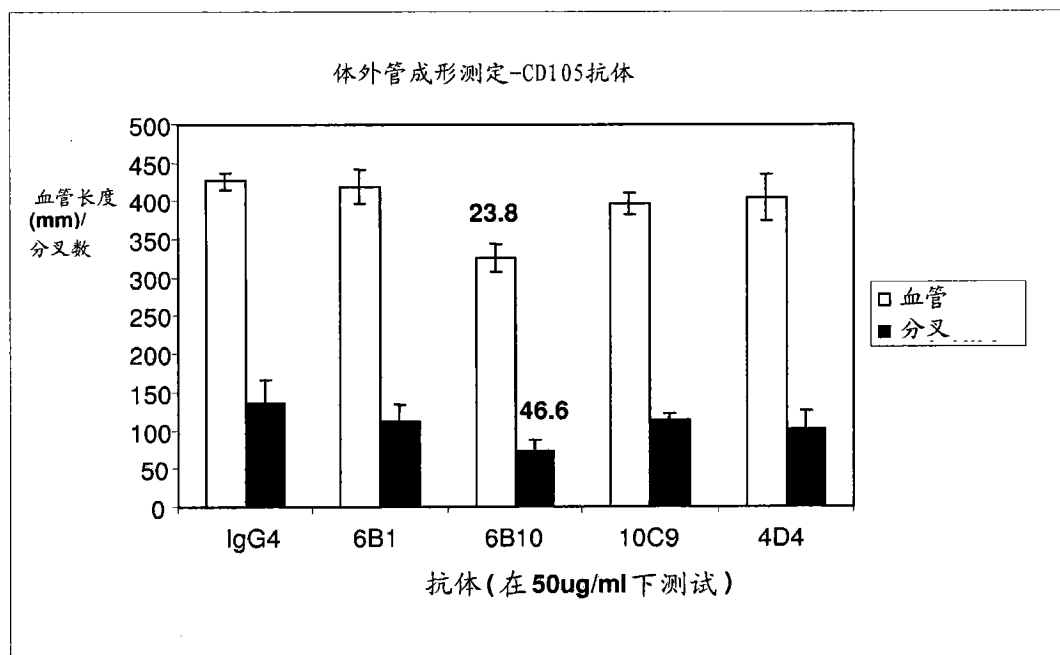


图 3

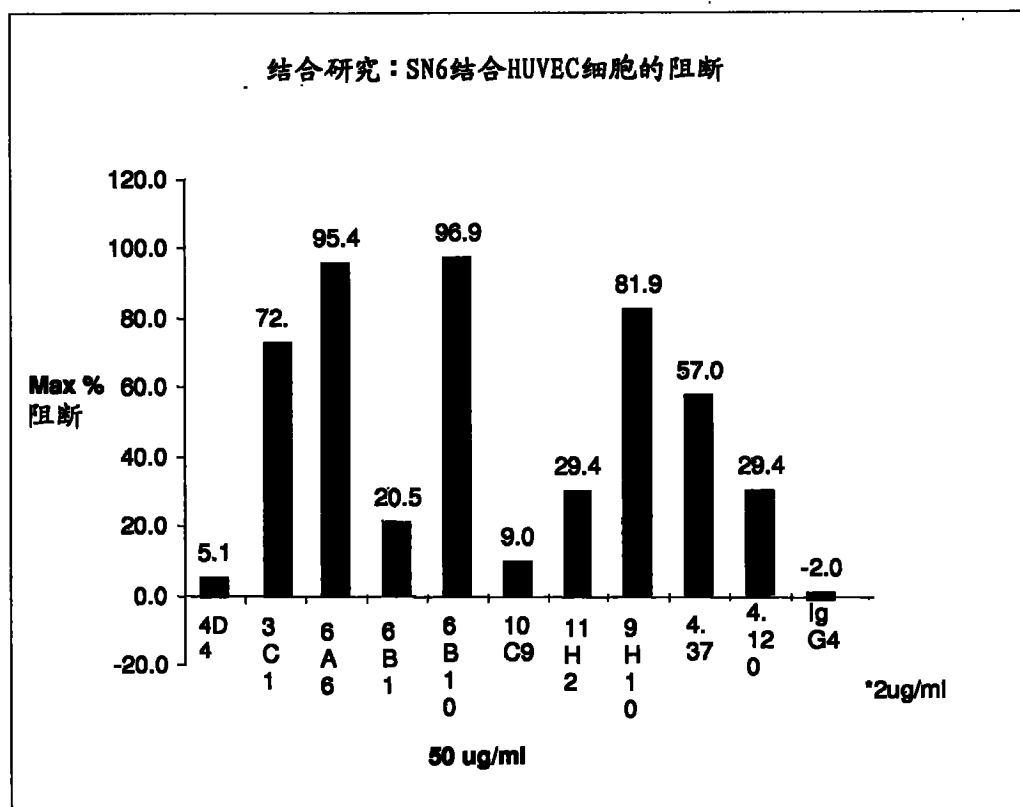


图 4

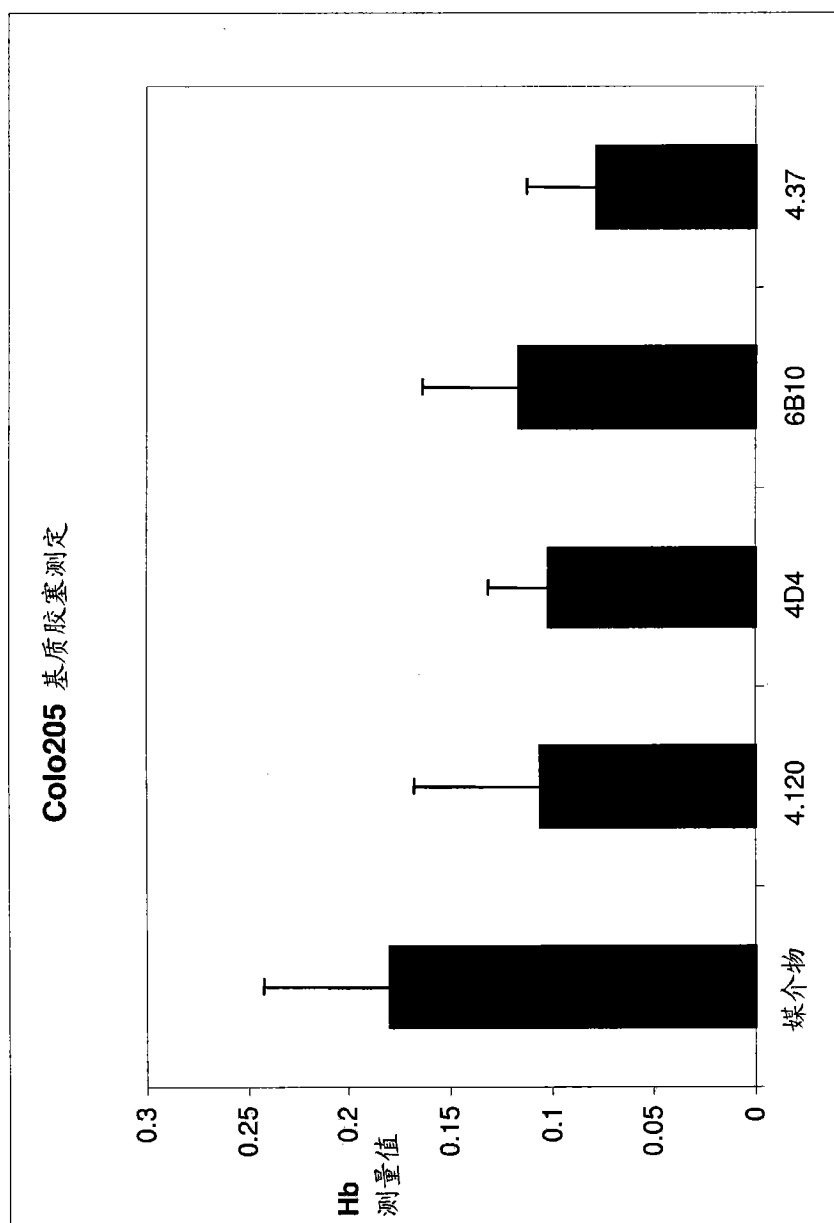


图 5

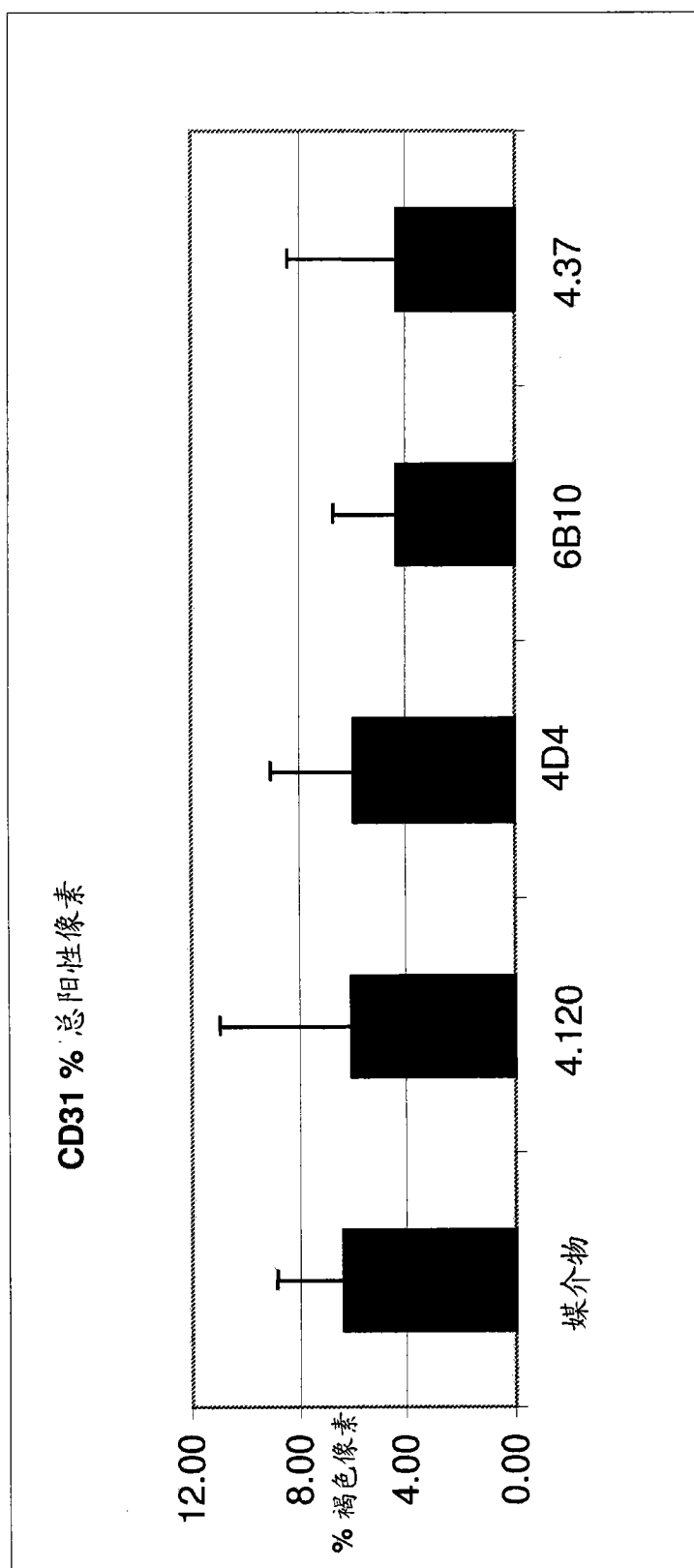


图 6

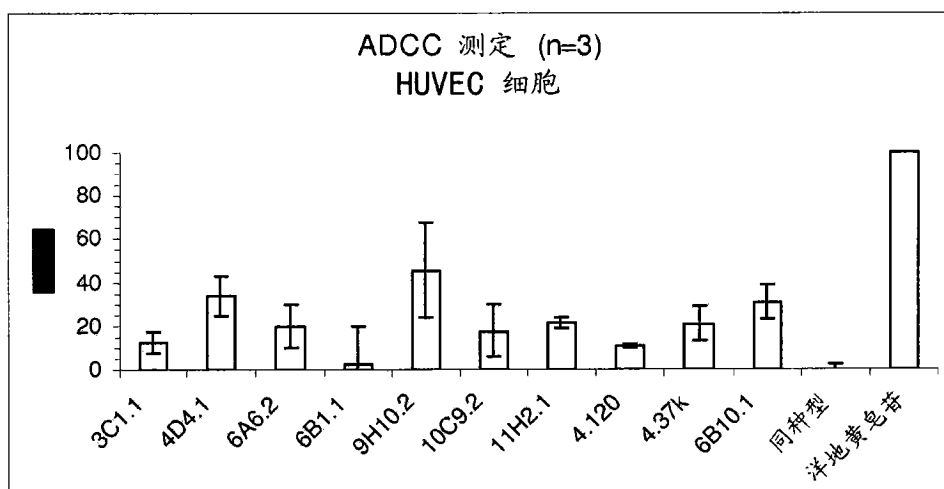


图 7

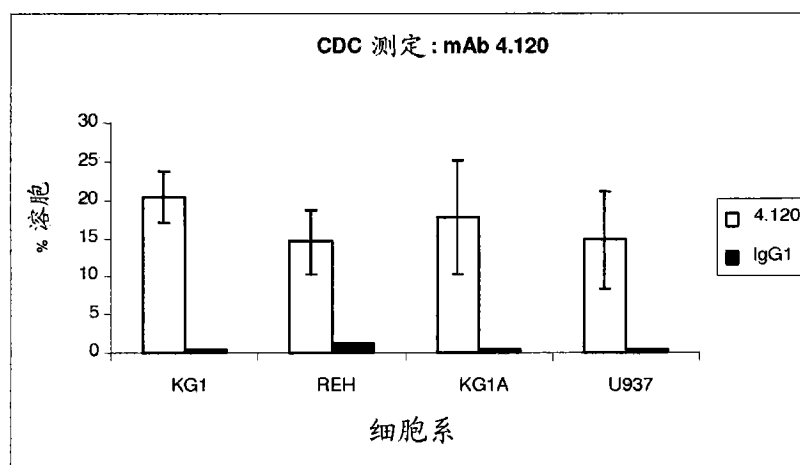


图 8

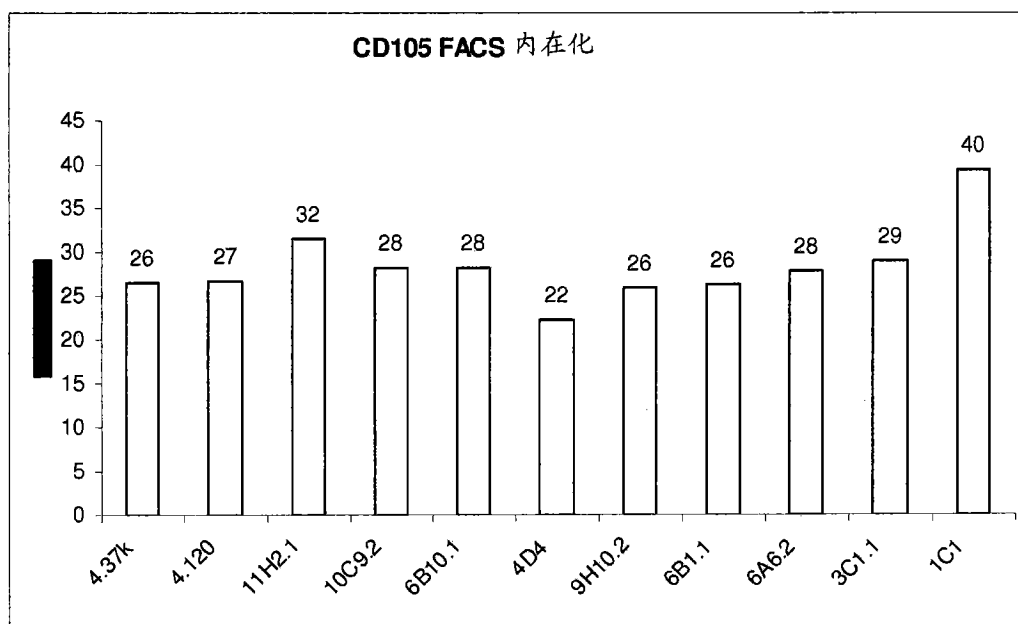


图 9