(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117946267 A
(43)申请公布日 2024.04.30

(21)申请号 202311258010.0
(22)申请日 2018.12.19
(30)优先权数据
62/607,877 2017.12.19 US
62/680,508 2018.06.04 US
(62)分案原申请数据
201880086636.9 2018.12.19
(71)申请人 瑟罗泽恩奥普瑞汀公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 李阳 袁之邺 亚伦·肯·佐藤
叶文琛 鲁成钢
帕塔萨拉蒂·桑帕库玛
克劳迪娅·伊冯·贾达
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
A61P 9/04(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 19/08(2006.01)

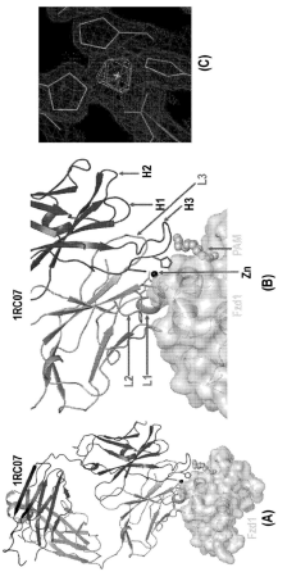
权利要求书1页 说明书97页
序列表（电子公布） 附图11页

(54)发明名称

抗卷曲蛋白抗体和使用方法

(57)摘要

本发明提供了抗Fzd单克隆抗体和相关组合物,所述抗Fzd单克隆抗体和相关组合物可以在用于治疗疾病的各种治疗方法中的任一种治疗方法中使用。



CN 117946267 A

1.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与一种或多种卷曲蛋白受体结合,其包括包含以下的序列:

(i)针对表1A的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;

(ii)针对表1A的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列;

和/或

(iii)表2中所示的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3序列,

或所述抗体或其抗原结合片段的变体,所述变体包括一个或多个氨基酸修饰,其中所述变体在所述CDR序列中包括少于8个氨基酸取代。

2.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与根据权利要求1所述的抗体竞争与人卷曲蛋白结合。

3.一种分离的多核苷酸,其对根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段进行编码。

4.一种表达载体,其包括根据权利要求3所述的分离的多核苷酸。

5.一种分离的宿主细胞,其包括根据权利要求4所述的表达载体。

6.一种药物组合物,其包括生理学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂以及治疗有效量的根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段。

7.一种用于激动细胞中的Wnt信号传导通路的方法,所述方法包括使所述细胞与根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段接触。

8.一种用于抑制细胞中的Wnt信号传导通路的方法,所述方法包括使所述细胞与根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段接触。

9.一种用于治疗患有与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路的激动剂。

10.一种用于治疗患有与Wnt信号传导增加或增强相关的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求6所述的药物组合物,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路的抑制剂。

抗卷曲蛋白抗体和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年12月19日提交的美国临时申请第62/607,877号和于2018年6月4日提交的美国临时申请第62/680,508号的优先权,所述两个美国临时申请都通过全文引用的方式并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式提供以代替纸质副本,并且在此通过引用并入本说明书中。含有序列表的文本文件的名称为SRZN_004_02WO_ST25.txt。文本文件为527KB,创建于2018年12月19日并且通过EFS-Web以电子方式提交。

技术领域

[0005] 本发明总体上涉及抗卷曲蛋白抗体和其抗原结合片段、组合物以及所述抗卷曲蛋白抗体和其抗原结合片段、组合物的使用方法。此类抗体可用于例如调节Wnt信号传导通路。

背景技术

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

[0007] 将调节Wnt信号传导作为治疗的挑战之一是存在多种Wnt配体和Wnt受体、卷曲蛋白1-10(Fzd1-10),其中许多组织表达多种Fzd和重叠的Fzd。典型的Wnt信号还涉及作为共受体的低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)或低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白6(LRP6),除了Fzd之外,所述共受体也在各种组织中广泛表达。因此,在本领域中显然需要与一种或多种Fzd、LRP5或LRP6特异性结合的结合部分,如抗体。本发明解决了此需要。

发明内容

[0008] 在各个实施例中,本发明提供了抗Fzd抗体和其抗原结合片段以及相关使用方法。

[0009] 在一个实施例中,本公开提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与一种或多种卷曲蛋白受体结合,其包括包含以下的序列:(i)针对表1A的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;和/或(ii)针对表1A的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列,或所述抗体或其抗原结合片段的变体,所述变体包括一个或多个氨基酸修饰,其中所述变体在所述CDR序列中包括少于8个氨基酸取代。在特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包括:包括与SEQ ID NO:1-37、66或68中的任一个所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列的重链可变区;或包括SEQ ID NO:1-37、66或68中的任一个所示的氨基酸序列的重链可变区。在特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包括:包括与SEQ ID NO:38-65、67或69中的任一个所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序

列的轻链可变区;或包括SEQ ID NO:38-65、67或69中的任一个所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0010] 在特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段是人源化的。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段是单链抗体、scFv、缺乏铰链区的单价抗体、VHH或单结构域抗体(sdAb)或迷你体。在特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段是Fab或Fab'片段。

[0011] 在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段是融合蛋白。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段与结合LRP5或LRP6的多肽序列融合。在某些实施例中,结合LRP5或LRP6的所述多肽序列是与LRP5或LRP6结合的抗体或其抗原结合片段。

[0012] 在所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段的特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段与以下中的一种或多种结合:卷曲蛋白1(Fzd1)、卷曲蛋白2(Fzd2)、卷曲蛋白3(Fzd3)、卷曲蛋白4(Fzd4)、卷曲蛋白5(Fzd5)、卷曲蛋白6(Fzd6)、卷曲蛋白7(Fzd7)、卷曲蛋白8(Fzd8)、卷曲蛋白9(Fzd9)和卷曲蛋白10(Fzd10)。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段与以下中的两种或更多种结合:卷曲蛋白1(Fzd1)、卷曲蛋白2(Fzd2)、卷曲蛋白3(Fzd3)、卷曲蛋白4(Fzd4)、卷曲蛋白5(Fzd5)、卷曲蛋白6(Fzd6)、卷曲蛋白7(Fzd7)、卷曲蛋白8(Fzd8)、卷曲蛋白9(Fzd9)和卷曲蛋白10(Fzd10)。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;(xi)Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8或(xii)Fzd1、Fzd2、Fzd4、Fzd5、Fzd7和Fzd8。

[0013] 在相关实施例中,本公开提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与本文公开的抗体中的任一种抗体竞争与人Fzd受体结合。

[0014] 在特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段以50μM或更低的KD与Fzd结合。

[0015] 在特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段调节细胞,任选地,哺乳动物细胞中的Wnt信号传导通路。在特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段增加了通过细胞中的Wnt信号传导通路的信号传导。在特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段中的任一种抗体或其抗原结合片段减少了通过细胞中的Wnt信号传导通路的信号传导。在某些实施例中,所述Wnt信号传导通路是典型的Wnt信号传导通路或非典型的Wnt信号传导通路。

[0016] 在另外的相关实施例中,本公开提供了一种对本文公开的抗体或其抗原结合片段进行编码的分离的多核苷酸。在某些实施例中,本公开提供了一种包括分离的多核苷酸的表达载体和包括所述表达载体的分离的宿主细胞。

[0017] 在另一个实施例中,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括生理学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂以及治疗有效量的本文公开的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0018] 在另外的实施例中,本公开提供了一种用于激动细胞中的Wnt信号传导通路的方法,所述方法包括使所述细胞与本文公开的增加Wnt信号传导的分离的抗体或其抗原结合片段接触。在特定实施例中,所述抗体或其抗原结合片段是包括结合LRP5或LRP6的多肽序列的融合蛋白。

[0019] 在另一个实施例中,本公开提供了一种用于抑制细胞中的Wnt信号传导通路的方法,所述方法包括使所述细胞与本文公开的抑制Wnt信号传导的分离的抗体或其抗原结合片段接触。

[0020] 在另一个实施例中,本公开包括一种用于治疗患有与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包括本文公开的作为Wnt信号传导通路的激动剂的分离的抗体或其抗原结合片段。在特定实施例中,所述疾病或病症选自由以下组成的组:骨折、应力性骨折、椎体压缩性骨折、骨质疏松症、骨质疏松性骨折、不愈合骨折、延迟愈合骨折、脊柱融合、脊柱外科手术的术前优化、骨坏死、植入物或矫形装置的骨整合、成骨不全症、骨移植、腱修复、腱-骨整合、牙齿生长和再生、颌面外科手术、牙种植、牙周病、颌面重建,颌、髋或股骨头坏死,无血管性坏死、脱发、听觉损失、前庭功能减退、黄斑变性、年龄相关性黄斑变性(AMD)、玻璃体视网膜病变、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、视网膜变性疾病、富克斯氏营养不良(Fuchs' dystrophy)、角膜疾病、中风、创伤性脑损伤、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、影响血脑屏障(BBB)的疾病、脊髓损伤、脊髓疾病、口腔粘膜炎、短肠综合征、炎性肠病(IBD)、克罗恩氏病(CD)、溃疡性结肠炎(UC),具体地是伴有瘘管形成的CD、代谢综合征、血脂异常、糖尿病、胰腺炎、胰腺外分泌功能不全、伤口愈合、糖尿病足溃疡、褥疮、静脉性下肢溃疡(venous leg ulcer)、大疱表皮松解、皮肤发育不全、心肌梗塞、冠状动脉疾病、心力衰竭、造血细胞病症、免疫缺陷、移植物抗宿主病、急性肾损伤、慢性肾脏疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化、所有原因的急性肝衰竭、药品诱导的急性肝衰竭、酒精性肝病、所有原因的慢性肝衰竭、肝硬化、所有原因的肝纤维化、门脉高压、所有原因的慢性肝功能不全、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)(脂肪肝)、酒精性肝炎、丙型肝炎病毒诱导的肝病(HCV)、乙型肝炎病毒诱导的肝病(HBV)、其它病毒性肝炎(例如,甲型肝炎病毒诱导的肝病(HAV)和丁型肝炎病毒诱导的肝病(HDV))、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎、肝脏外科手术(livery surgery)、肝损伤、肝移植、肝脏外科手术和移植中的“小肝(small for size)”综合征、先天性肝脏疾病和病症,由遗传疾病、变性、老化、药品或损伤引起的任何其它肝脏病症或疾病。

[0021] 在另一个相关实施例中,本公开提供了一种用于治疗或预防有需要的受试者的骨疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者提供有效量的药物组合物,所述药物组合物包括本文公开的作为Wnt信号传导通路的激动剂的分离的抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合Fzd1、Fzd2和FZD7。在某些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合Fzd1、Fzd2、FZD7、Fzd5和Fzd8。与另外的Fzd受体结合的其它Fzd分子也可以与LRP5和/或LRP6结合物一起使用。

[0022] 在另一个相关实施例中,本公开提供了一种用于增加有需要的受试者的骨矿物质密度、增加所述受试者的骨体积、增加所述受试者的骨皮质厚度、增加所述受试者的骨矿物质沉积率、增加所述受试者的骨刚度、增加所述受试者的骨生物力学强度、增加所述受试者

对骨折的抵抗力或减少所述受试者的与骨质疏松症相关的骨质流失的方法,所述方法包括向所述受试者提供有效量的药物组合物,所述药物组合物包括本文公开的作为Wnt信号传导通路的激动剂的分离的抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合Fzd1、Fzd2和FZD7。在某些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合Fzd1、Fzd2、FZD7、Fzd5和Fzd8。

[0023] 在相关实施例中,本公开提供了一种用于治疗患有与Wnt信号传导增加或增强相关的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包括本文公开的作为Wnt信号传导通路的抑制剂的分离的抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,所述疾病或病症选自由以下组成的组:肿瘤和癌症、变性病症、纤维化、心力衰竭、冠状动脉疾病、异位骨化、骨硬化病和先天性高骨量病症。

[0024] 在另外的相关实施例中,本公开提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合一种或多种卷曲蛋白受体,其中所述抗体或其抗原结合片段结合:卷曲蛋白1的包括氨基酸残基115-230或由其组成的区域内的表位;卷曲蛋白3的包括氨基酸残基29-78或由其组成的区域内的表位;卷曲蛋白4的包括氨基酸残基50-147或由其组成的区域内的表位;卷曲蛋白5的包括氨基酸残基37-149或由其组成的区域内的表位;卷曲蛋白8的包括氨基酸残基55-137或由其组成的区域内的表位;卷曲蛋白9的包括氨基酸残基59-152或由其组成的区域内的表位;卷曲蛋白10的包括氨基酸残基35-124或由其组成的区域内的表位。

[0025] 在某些实施例中,本公开提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合一种或多种卷曲蛋白受体,其中所述抗体或其抗原结合片段以小于5埃的距离在表3中指示的氨基酸残基的组中的任一个组处接触所述卷曲蛋白受体。

附图说明

[0026] 图1.(A)示出了Fzd1:1RC07复合物的图形描绘。Fzd1以浅灰色示出,并且1RC07的重链和轻链分别为中灰色和深灰色,(B)是Fzd1:1RC07接合部的近视图,其中标记了CRD环的位置,(C)是分别以蓝色和黄色网格示出的与$2mF_o$-DF_c结合的Zn^{+2}(在2.0σ处)和异常差异图(在15.0σ处)的近视图。

[0027] 图2.(A)Fzd1:R2M9复合物的整体结构。Fzd1的分子表面被示出为浅灰色透明表面。R2M9的重链和轻链分别以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd1:R2M9接合部的近视图,其中标记了重链的CDR环H1、H2、H3和轻链的L1、L2和L3的位置。

[0028] 图3.(A)Fzd4:003S-D10复合物的整体结构。Fzd4的分子表面被示出为浅灰色透明表面。3SD10的重链和轻链以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd4:3SD10接合部的近视图,其中标记了了CRD环的位置。

[0029] 图4.(A)Fzd5:R2M3复合物的整体结构。Fzd5的分子表面被示出为浅灰色透明表面。R2M3的重链和轻链分别以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd5:R2M3接合部的近视图,其中标记了重链的CDR环H1、H2、H3和轻链的L1、L2和L3的位置。

[0030] 图5.(A)Fzd8:005S-H05复合物的整体结构。Fzd8的分子表面被示出为浅灰色透明

表面。005S-H05的重链和轻链分别以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd8:005S-H05接合部的近视图,其中标记了重链的CDR环H1、H2、H3和轻链的L1、L2和L3的位置。

[0031] 图6.(A)Fzd5:004S-E05复合物的整体结构。Fzd5的分子表面被示出为浅灰色透明表面。004S-E05的重链和轻链分别以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd5:004S-E05接合部的近视图,其中标记了重链的CDR环H1、H2、H3和轻链的L1、L2和L3的位置。

[0032] 图7.(A)Fzd5:4A12复合物的整体结构。Fzd5的分子表面被示出为浅灰色透明表面。4A12的重链和轻链分别以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd5:4A12接合部的近视图,其中标记了重链的CDR环H1、H2、H3和轻链的L1、L2和L3的位置。

[0033] 图8.(A)Fzd9:014S-B06复合物的整体结构。Fzd5的分子表面被示出为浅灰色透明表面。014S-B06的重链和轻链分别以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd5:014S-B06接合部的近视图,其中标记了重链的CDR环H1、H2、H3和轻链的L1、L2和L3的位置。

[0034] 图9.(A)Fzd10:005S-A07复合物的整体结构。Fzd5的分子表面被示出为浅灰色透明表面。005S-A07的重链和轻链分别以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd10:005S-A07接合部的近视图,其中标记了重链的CDR环H1、H2、H3和轻链的L1、L2和L3的位置。

[0035] 图10.(A)Fzd10:005S-E12复合物的整体结构。Fzd5的分子表面被示出为浅灰色透明表面。005S-E12的重链和轻链分别以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd10:005S-E12接合部的近视图,其中标记了重链的CDR环H1、H2、H3和轻链的L1、L2和L3的位置。

[0036] 图11.(A)Fzd3:029S-E03复合物的整体结构。Fzd5的分子表面被示出为浅灰色透明表面。029S-E03的重链和轻链分别以深黑色和浅黑色的色度着色。在Wnt8:Fzd8(PDB码:4F0A)的结构中观察到的脂质(棕榈油酸;PAM)以浅灰色球体示出。(B)Fzd3:029S-E03接合部的近视图,其中标记了重链的CDR环H1、H2、H3和轻链的L1、L2和L3的位置。

具体实施方式

[0037] 本公开涉及与一种或多种Fzd受体特异性结合的抗体和其抗原结合片段,所述抗体和其抗原结合片段包含具有特定Fzd受体特异性和/或功能性质的抗体。本发明的一个实施例涵盖能够与一种或多种Fzd受体结合并调节下游Wnt通路信号传导和相关生物学效应的特异性人源化抗体和其片段。

[0038] 本发明的实施例涉及抗Fzd抗体或其抗原结合片段在诊断、评定和治疗与Wnt信号传导通路相关的疾病和病症中的用途。在某些实施例中,主题抗体和其抗原结合片段用于调节细胞或组织中的Wnt信号传导通路。在某些实施例中,主题抗体和其抗原结合片段用于治疗或预防与Wnt信号传导异常或失调(例如,增加或减少)相关的疾病和病症或针对其减少或增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病和病症。

[0039] 除非特别相反地指出,否则本发明的实践将采用本领域范围内的病毒学、免疫学、

微生物学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法,其中许多方法在下文中出于说明的目的而描述。此类技术在文献中进行了充分解释。参见例如,《现代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》或《现代免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》,纽约州纽约市的约翰威利父子公司(John Wiley&Sons,New York,N.Y.)(2009);Ausubel等人,《精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology)》,第3版,威利父子公司,1995;Sambrook和Russell,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(第3版,2001);Maniatis等人《分子克隆:实验室手册》(1982);《DNA克隆:实用方法(DNA Cloning:A Practical Approach)》第I和II卷(D.Glover编辑);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(N.Gait编辑,1984);《核酸杂交(Nucleic Acid Hybridization)》(B.Hames和S.Higgins编辑,1985);《转录和翻译(Transcription and Translation)》(B.Hames和S.Higgins编辑,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.Freshney编辑,1986);Perbal,《分子克隆实用指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)》(1984)以和其它相似参考文献。

[0040] 如在本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个”、“一种”以及“所述”包含复数指代,除非上下文另有明确指示。

[0041] 贯穿本说明书,除非上下文另外要求,否则词语“包括”或如“包括了”或“包括着”等变体应当理解为意指包含一个所述的要素或整体、或多个要素或整体的组,但不排除任何其他一个要素或整体、或多个要素或整体的组。

[0042] 除非另外明确地说明,否则本说明书中的每个实施例在进行必要的修改后适用于所有其它实施例。

[0043] 标准技术可以用于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书执行,或者如本领域通常实现的或如本文所述的执行。这些和相关的技术和程序通常可以根据本领域熟知的并且如在本说明书通篇引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所描述的常规方法执行。除非提供具体的定义,否则与本文所述的分子生物学、分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学结合使用的命名和所述分子生物学、分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学的实验室程序和技术是本领域公知和常用的那些。标准技术可以用于重组技术、分子生物学、微生物学、化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及受试者的治疗。

[0044] 本发明的实施例涉及与一种或多种Fzd受体结合的抗体和其抗原结合片段。表1A和SEQ ID NO:1-65示出了说明性抗体或其抗原结合片段或其互补决定区(CDR)的序列。

[0045] 如本领域众所周知的,抗体是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个表位识别位点特异性结合如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等靶标的免疫球蛋白分子。如本文所使用的,所述术语不仅涵盖完整多克隆或单克隆抗体,而且涵盖其片段(如dAb、Fab、Fab’、F(ab’)$_2$、Fv)、单链(scFv)、VHH或sdAb(也称为纳米体)、其合成变体、天然存在的变体、包括抗体或其抗原结合片段的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体以及包括具有所需特异性的抗原结合位点或片段(表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰构型。通过基因融合构建的“双体”多价或多特异性片段(WO94/13804;P.Holliger等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》906444-6448,1993)也是本文设想的抗体的特定形式。本文还包含包括连接到CH3结构域的scFv的迷你体(S.Hu等人,《癌症研究

(Cancer Res.)》,56,3055-3061,1996)。参见例如Ward,E.S.等人,《自然(Nature)》341,544-546(1989);Bird等人,《科学(Science)》,242,423-426,1988;Huston等人,《美国国家科学院院刊(PNAS USA)》,85,5879-5883,1988;PCT/US92/09965;WO94/13804;P.Holliger等人,《美国国家科学院院刊》90 6444-6448,1993;Y.Reiter等人,《自然生物技术(Nature Biotech)》,14,1239-1245,1996;S.Hu等人,《癌症研究》,56,3055-3061,1996。

[0046] 如本文所使用的术语“抗原结合片段”是指含有与关注的抗原,特别是一种或多种Fzd受体结合的免疫球蛋白重链和/或轻链的至少一个CDR的多肽片段。在这方面,本文所描述的抗体的抗原结合片段可以包括本文所示的来自结合一种或多种Fzd受体的抗体的VH和VL序列的1个、2个、3个、4个、5个或所有6个CDR。本文所描述的Fzd特异性抗体的抗原结合片段能够与Fzd受体结合。如本文所使用的,所述术语不仅涵盖分离的片段,而且涵盖包括本文所公开的抗体的抗原结合片段的多肽,例如包括本文所公开的抗体的抗原结合片段的融合蛋白。

[0047] 在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段调节与所述抗体或其抗原结合片段接触的细胞中的Wnt信号传导事件。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段增加Wnt信号传导,而在其它实施例中,抗体或其抗原结合片段减少Wnt信号传导。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段特异性结合和/或调节人Wnt信号传导通路的生物学活性。

[0048] 术语“抗原”是指能够由如抗体等选择性结合剂结合并且另外能够在动物中使用以产生能够结合所述抗原的表位的抗体的分子或分子的一部分。在某些实施例中,当抗体在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其靶抗原时,所述抗体被认为与抗原特异性结合。在某些实施例中,当平衡解离常数≤10^{-7}或10^{-8}M时,抗体被认为与抗原特异性结合。在一些实施例中,平衡解离常数可以≤10^{-9}M或≤10^{-10}M。

[0049] 在某些实施例中,如本文所描述的抗体和其抗原结合片段包含分别插入重链与轻链框架区(FR)组之间的重链和轻链CDR组,所述FR组提供对CDR的支持并且限定CDR相对于彼此的空间关系。如本文所使用的,术语“CDR组”是指重链或轻链V区的三个超变区。从重链或轻链的N端出发,这些区分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此,抗原结合位点包含六个CDR,其包括来自重链和轻链V区中的每个的CDR组。包括单个CDR(例如,CDR1、CDR2或CDR3)的多肽在本文中被称为“分子识别单元”。对多种抗原-抗体复合物的晶体学分析已经证明CDR的氨基酸残基形成与结合的抗原的广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3的抗原接触。因此,分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0050] 如本文所使用的,术语“FR组”是指框住重链或轻链V区的CDR组中的CDR的四个侧翼氨基酸序列。一些FR残基可以接触结合的抗原;然而,FR主要负责将V区折叠成抗原结合位点,特别是与CDR直接相邻的FR残基。在FR内,某些氨基酸残基和某些结构特征是非常高度保守的。在这方面,所有V区序列含有具有大约90个氨基酸残基的内部二硫环。当V区折叠成结合位点时,CDR被展示为形成抗原结合表面的突出的环基序。通常认识到存在FR的保守结构区,所述保守结构区将CDR环的折叠形状变成某些“典型”结构——无论精确的CDR氨基酸序列如何。进一步地,已知某些FR残基参与非共价域间接触,所述非共价域间接触使抗体重链和轻链的相互作用稳定。

[0051] 免疫球蛋白CDR和可变结构域的结构和位置可通过参考目前可在因特网(immuno.bme.nwu.edu)上获得的Kabat,E.A.等人,《具有免疫学益处的蛋白质的序列

(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》第4版.美国卫生与人类服务部(US Department of Health and Human Services).1987和其更新来确定。可替代地,可以通过使用可在http://www.imgt.org获得的“IMGT®(国际ImMunoGeneTics信息系统®)”来确定CDR(参见例如,Lefranc,M.-P.等人(1999)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,27:209-212;Ruiz,M.等人(2000)《核酸研究》,28:219-221;Lefranc,M.-P.(2001)《核酸研究》,29:207-209;Lefranc,M.-P.(2003)《核酸研究》,31:307-310;Lefranc,M.-P.等人(2004)《计算机生物学(In Silico Biol.)》,5,0006[Epub],5:45-60(2005)];Lefranc,M.-P.等人(2005)《核酸研究》,33:D593-597;Lefranc,M.-P.等人(2009)《核酸研究》,37:D1006-1012;Lefranc,M.-P.等人(2015)《核酸研究》,43:D413-422)。

[0052] “单克隆抗体”是指均匀抗体群,其中单克隆抗体包括表位的选择性结合中涉及的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一表位。术语“单克隆抗体”不仅涵盖完整单克隆抗体和全长单克隆抗体,而且涵盖其片段(如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv)、单链(scFv)、VHH或sdAb、其变体、包括单克隆抗体的抗原结合片段的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体以及包括具有所需特异性的抗原结合片段(表位识别位点)和结合表位的能力的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰构型。不旨在限制关于抗体的源或其形成的方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)。术语包含整个免疫球蛋白以及以上在“抗体”定义下描述的片段等。

[0053] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割IgG分子以产生若干片段,所述片段(F(ab)片段)中的两个各自包括包含完整抗原结合位点的共价异二聚体。胃蛋白酶能够切割IgG分子以提供若干片段,包含包括两个抗原结合位点的$F(ab')_2$片段。用于根据本发明的某些实施例使用的Fv片段可以通过IgM的优先蛋白水解切割来产生,并且在极少的情况下可以通过IgG或IgA免疫球蛋白分子的优先蛋白水解切割来产生。然而,Fv片段更常见地是使用本领域已知的重组技术来衍生。Fv片段包含非共价$V_H::V_L$异二聚体,其包含保留天然抗体分子的许多抗原识别和结合能力的抗原结合位点。Inbar等人(1972)《美国国家科学院院刊》69:2659-2662;Hochman等人(1976)《生物化学(Biochem)》15:2706-2710;以及Ehrlich等人(1980)《生物化学》19:4091-4096。

[0054] 在某些实施例中,设想单链Fv或scFV抗体。例如,Kappa体(Ill等人,《蛋白质工程(Prot.Eng.)》10:949-57(1997));迷你体(Martin等人,《欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J)》13:5305-9(1994));双体(Holliger等人,《美国国家科学院院刊》90:6444-8(1993));或Janusins(Traunecker等人,《欧洲分子生物学学会杂志》10:3655-59(1991)以及Traunecker等人,《国际癌症杂志增刊(Int.J.Cancer Suppl.)》7:51-52(1992))可以使用遵循本申请关于选择具有期望特异性的抗体的教导的标准分子生物学技术来制备。在其它实施例中,可以制备涵盖本公开的配体的双特异性或嵌合抗体。例如,嵌合抗体可以包括来自不同抗体的CDR和框架区,同时可以产生通过一个结合结构域与一种或多种Fzd受体特异性结合并通过第二结合结构域与第二分子特异性结合的双特异性抗体。这些抗体可以通过重组分子生物学技术来产生或者可以物理地缀合在一起。

[0055] 单链Fv(scFv)多肽是共价连接的$V_H::V_L$异二聚体,其根据包含通过肽编码接头连接的V_H和V_L编码基因的基因融合表达。Huston等人(1988)《美国国家科学院院刊》85(16):5879-5883。已经描述了多种方法来辨别用于将天然聚合但是化学分离的轻多肽链和重多

肽链从抗体V区转换成scFv分子的化学结构,所述scFv分子将折叠成基本上与抗原结合位点的结构类似的三维结构。参见例如Huston等人的美国专利第5,091,513号和第5,132,405号;和Ladner等人的美国专利第4,946,778号。

[0056] 在某些实施例中,如本文所描述的Fzd结合抗体采用双体的形式。双体是多肽的多聚体,每个多肽包括第一结构域和第二结构域,所述第一结构域包括免疫球蛋白轻链的结合区,所述第二结构域包括免疫球蛋白重链的结合区,所述两个结构域被连接(例如,通过肽接头)但是不能彼此缔合以形成抗原结合位点:抗原结合位点通过多聚体内一个多肽的第一结构域与多聚体内另一个多肽的第二结构域的缔合而形成(WO94/13804)。

[0057] 抗体的dAb片段由VH结构域组成(Ward,E.S.等人,《自然》341,544-546(1989))。

[0058] 在使用双特异性抗体的情况下,这些可以是常规的双特异性抗体,其可以以各种方式制造(Holliger,P.和Winter G.《现代生物技术评论(Current Opinion Biotechnol.)》4,446-449(1993)),例如可以用化学方法制备或由杂交杂交瘤制备,或者可以是上述双特异性抗体片段中的任一种双特异性抗体片段。可以仅使用可变结构域来构建没有Fc区的双体和scFv,从而潜在地减少抗独特型反应的影响。

[0059] 与双特异性完整抗体形成对照,双特异性双体也可以是特别有用的,因为所述双特异性双体可以容易地构建并且表达于大肠杆菌(E.coli.)中。可以使用噬菌体展示(WO94/13804)来从文库中容易地选择具有合适结合特异性的双体(和许多其它多肽,如抗体片段)。如果双体的一个臂保持恒定,例如,具有针对抗原X的特异性,则可以产生其中另一个臂变化的文库并且选择具有合适特异性的抗体。双特异性完整抗体可以通过杵臼(knobs-into-holes)工程化方法来产生(J.B.B.Ridgeway等人,《蛋白质工程》,9,616-621,1996)。

[0060] 在某些实施例中,本文所描述的抗体可以以UniBody®形式提供。UniBody®是去除了铰链区的IgG4抗体(参见GenMab Utrecht,荷兰;还参见例如,US20090226421)。此专利抗体技术产生具有比当前小抗体形式预期更长的治疗窗的稳定更小抗体形式。IgG4抗体被认为是惰性的,并且因此不与免疫系统相互作用。完整人类IgG4抗体可以通过消除抗体的铰链区进行修饰以获得具有相比于相应完整IgG4不同的稳定性质的半分子片段(GenMab,Utrecht)。二等分IgG4分子使得仅将一个区域留在可以结合同源抗原(例如,疾病目标)的UniBody®上,并且UniBody®因此单价地仅结合靶标细胞上的一个位点。

[0061] 在某些实施例中,本公开的抗体可以采用VHH或sdAb的形式。VHH或sdAb技术最初是在发现和鉴定骆驼科(例如,骆驼和美洲驼)具有仅由重链组成并且因此缺乏轻链的全功能抗体后才开发的。这些仅有重链的抗体含有单个可变结构域(V_{HH})和两个恒定结构域(C_H2、C_H3)。克隆和分离的单个可变结构域具有完整的抗原结合能力并且非常稳定。具有其独特的结构和功能性质的这些单个可变结构域形成“VHH或sdAb”的基础。VHH或sdAb由单一基因编码,并且在几乎所有原核和真核宿主,例如,大肠杆菌(参见例如,美国专利第6,765,087号)、霉菌(例如,曲霉(Aspergillus)或木霉(Trichoderma))和酵母(例如,酵母菌(Saccharomyces)、克鲁维酵母菌(Kluyvermyces)、汉逊酵母(Hansenula)或毕赤酵母(Pichia))(参见例如美国专利第6,838,254号)中高效地产生。生产工艺是可放大的,并且已经产生多个千克量的VHH或sdAb。可以将VHH或sdAb配制为具有长保质期的即用型溶液。Nanoclone®方法(参见例如,WO 06/079372)是一种用于基于B细胞的自动化高吞吐量选

择,针对期望靶标来产生VHH或sdAb的专利方法。VHH或sdAb是骆驼科特异性的仅有重链的抗体的单结构域抗原结合片段。VHH或sdAb通常具有大约15kDa的小尺寸。

[0062] 在某些实施例中,本文公开的抗Fzd抗体或其抗原结合片段是人源化的。这涉及通常使用重组技术制备的嵌合分子,所述嵌合分子具有衍生自来自非人类物种的免疫球蛋白的抗原结合位点以及分子的基于人类免疫球蛋白的结构和/或序列的剩余免疫球蛋白结构。抗原结合位点可以包括融合到恒定结构域上的完整可变结构域或者仅包括接枝到可变结构域中的适当框架区上的CDR。表位结合位点可以是野生型或者由一个或多个氨基酸取代修饰。这消除了作为人类个体的免疫原的恒定区,但是仍然存在对外来可变区的免疫应答的可能性(LoBuglio,A.F.等人,(1989)《美国国家科学院院刊》86:4220-4224;Queen等人,《美国国家科学院院刊》(1988)86:10029-10033;Riechmann等人,《自然》(1988)332:323-327)。用于人源化本文公开的抗Fzd抗体的说明性方法包含美国专利第7,462,697号中描述的方法。

[0063] 另一种方法不仅着重于提供人类衍生的恒定区,而且着重于修饰可变区以便将其重塑成尽可能接近人类形式。已知重链和轻链的可变区含有三个互补决定区(CDR),所述CDR响应于讨论的表位而变化并且决定结合能力,被四个框架区(FR)侧接,所述FR在给定物种中相对保守并且推定地为CDR提供支架。当关于特定表位制备非人类抗体时,可以通过将衍生自非人类抗体的CDR接枝到存在于待修饰的人类抗体中的FR上来对可变区进行“重塑”或“人源化”。已经通过以下报道了将此方法应用于各种抗体:Sato,K.等人,(1993)《癌症研究》53:851-856.Riechmann,L.,等人,(1988)《自然》332:323-327;Verhoeyen,M.,等人,(1988)《科学》239:1534-1536;Kettleborough,C.A.,等人,(1991)《蛋白质工程》4:773-3783;Maeda,H.,等人,(1991)《人抗体杂交瘤》2:124-134;Gorman,S.D.,等人,(1991)《美国国家科学院院刊》88:4181-4185;Tempest,P.R.,等人,(1991)《生物/技术(Bio/Technology)》9:266-271;Co,M.S.,等人,(1991)《美国国家科学院院刊》88:2869-2873;Carter,P.,等人,(1992)《美国国家科学院院刊》89:4285-4289;以及Co,M.S.等人,(1992)《免疫学杂志(J Immunol)》148:1149-1154。在一些实施例中,人源化抗体保留所有CDR序列(例如,含有来自小鼠抗体的所有六个CDR的人源化小鼠抗体)。在其它实施例中,人源化抗体具有关于原始抗体改变的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),也称为“衍生自”来自原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0064] 在某些实施例中,本公开的抗体可以是嵌合抗体。在这方面,嵌合抗体包括抗Fzd抗体的可操作地连接或以其它方式融合到不同抗体的异源Fc部分的抗原结合片段。在某些实施例中,异源Fc结构域是人源。在其它实施例中,异源Fc结构域可以来自来源于亲本抗体的不同Ig类别,包含IgA(包含子类别IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(包含子类别IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)以及IgM。在另外的实施例中,异源Fc结构域可以包括来自不同Ig类别中的一种或多种的CH2和CH3结构域。如以上关于人源化抗体所述,嵌合抗体的抗Fzd抗原结合片段可以仅包括本文所描述的抗体的CDR中的一个或多个(例如,本文所描述的抗体的1个、2个、3个、4个、5个或6个CDR),或者可以包括整个可变结构域(VL、VH或两者)。

[0065] 在某些实施例中,本文公开的抗体或其抗原结合片段包含融合蛋白,例如Wnt信号传导通路激动剂融合蛋白,在本文中也被称为“Wnt替代物”。本发明的Wnt替代物通常在与同源的卷曲蛋白受体结合方面具有生物学活性,并且在Wnt信号传导的激活方面具有生物

学活性,即,所述替代物是Wnt激动剂。术语“Wnt激动剂活性”是指激动剂模拟Wnt蛋白与卷曲蛋白结合的作用或活性的能力。本发明的激动剂模拟Wnt活性的能力可以通过多种测定法来证实。本发明的激动剂通常引发与受体的天然配体引发的反应或活性相似或相同的反应或活性。具体地,本发明的激动剂增强了典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导通路。如本文所使用的,术语“增强”是指Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平与在不存在本发明的激动剂的情况下的水平相比的可测量增加。

[0066] 在特定实施例中,Wnt信号传导通路激动剂融合蛋白(或Wnt替代物)包括本文公开的与特异性结合LRP5和/或LRP6的多肽融合的抗Fzd抗体或其抗原结合片段。在特定实施例中,与LRP5和/或LRP6特异性结合的多肽是抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,其是于2017年12月19日提交的题为“抗LRP5/6抗体和使用方法(Anti-LRP5/6antibodies and Methods of Use)”、代理人案卷号为SRZN-005/00US的美国临时专利申请第62/607,879号中公开的抗体或其抗原结合片段,所述美国临时专利申请通过全文引用的方式并入本文。

[0067] 适合的LRP5/6结合结构域包含但不限于从头设计的LRP5/6结合蛋白、抗体衍生的结合蛋白(例如,scFv、Fab等)以及与一种或多种Fzd蛋白特异性结合的抗体的其它部分;VHH或sdAb衍生的结合结构域;基于打结素(knottin)的工程化支架;天然存在的LRP5/6,包含但不限于DKK1、DKK2、DKK3、DKK4、硬化蛋白;Wise;包括以上中的任一种的融合蛋白;以上中的任一种的衍生物;以上中的任一种的变体;以及以上中的任一种的生物活性片段等。可以亲和选择LRP5/6结合结构域以增强结合。

[0068] Dickkopf(DKK)基因家族的成员(参见Krupnik等人(1999)《基因(Gene)》238(2):301-13)包含DKK-1、DKK-2、DKK-3和DKK-4,并且DKK-3相关蛋白Soggy(Sgy).hDKK 1-4含有两个不同的富半胱氨酸的结构域,其中10个半胱氨酸残基的位置在家族成员之间高度保守。人DKK基因和蛋白质的示例性序列是公开可用的,例如,Genbank登录号NM_014419(soggy-1);NM_014420(DKK4);AF177394(DKK-1);AF177395(DKK-2);NM_015881(DKK3);和NM_014421(DKK2)。在本发明的一些实施例中,Lrp6结合部分是DKK1肽,包含但不限于人DKK1的C端结构域。C端结构域可以包括以下序列:KMYHTKGQEGSVCLRSSDCASGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLEIFQRCYCGEGLSCRIQKDHHQASNSSRLHTCQRH(SEQ ID NO:70;参见Genbank登录号NP_036374)或其生物活性片段。

[0069] 例如在以下中讨论了DKK蛋白与LRP5/6的结合:Brott和Sokol《分子与细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》22(17),6100-6110(2002);以及Li等人《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》277(8),5977-5981(2002),所述文献各自通过引用的方式具体并入本文。人DKK2(Genbank参考NP_055236)的对应区域可以包括以下序列:KMSHIKGHEGDPCLRSSDCIEGFCCARHFWTKICKPVLHQGEVCTKQRKKGSHGLEIFQRCDCAKGLSCKVWKDATYSSKARLHVCQK(SEQ ID NO:71)或其生物活性片段。

[0070] 与LRP5或LRP6特异性地结合的抗体是本领域中已知的并且可商购获得或者可以从头产生。LRP5、LRP6或其片段可以用作免疫原或用于筛选测定法以开发抗体。已知抗体的实例包含但不限于:Gong等人(2010)《公共科学图书馆期刊(PLoS One)》.5(9):e12682;Ettenberg等人(2010)《美国国家科学院院刊》.107(35):15473-8中描述的那些;以及可商购自例如Santa Cruz生物技术抗体克隆1A12的那些,其针对人类来源的合成LRP5/6产生并且与小鼠和人类来源的LRP 6和LRP 5的全长和蛋白水解片段两者结合;单克隆抗体2B11;

对LRP5(D80F2)具有特异性的细胞信号传导抗体,目录号5731;等。

[0071] 在一些实施例中,LRP5/6结合结构域或元件可以选自以高亲和力,例如至少约1×10^{-7}M、至少约1×10^{-8}M、至少约1×10^{-9}M、至少约1×10^{-10}M的K_D结合LRP5/6的任何结构域。适合的LRP5/6结合结构域包含但不限于:从头设计的LRP5/6结合蛋白、抗体衍生的结合蛋白(例如scFv、Fab等)以及与一种或多种Fzd蛋白特异性地结合的抗体的其它部分;VHH或sdAb衍生的结合结构域;基于打结素的工程化支架;天然存在的LRP5/6结合蛋白或多肽,包含但不限于Norrin、DKK1、DKK2、DKK3、DKK4、硬化蛋白;等。在某些实施例中,LRP5/6结合结构域是DKK1的C端部分。可以亲和选择LRP5/6结合结构域以增强结合。

[0072] 抗Fzd抗体或其抗原结合片段和LRP5/6结合结构域可以直接连接或者可以被接头(例如,多肽接头或非肽接头等)分开。结合一种或多种Fzd受体的Wnt替代物的区域和结合LRP5和/或LRP6的多肽可以是连续的或者被接头(例如,多肽接头或非肽接头等)分开。接头的长度以及因此结合结构域之间的间隔可以用于调节信号强度并且可以根据Wnt替代物的期望用途进行选择。结合结构域之间的加强距离可以有所变化,但在某些实施例中可以小于约100埃、小于约90埃、小于约80埃、小于约70埃、小于约60埃或小于约50埃。在一些实施例中,接头是刚性接头,在其它实施例中,接头是柔性接头。在接头是肽接头的情况下,接头在长度上可以为约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个氨基酸,并且具有足够的长度和氨基酸组成来加强结合结构域之间的距离。在一些实施例中,接头包括一个或多个甘氨酸和/或丝氨酸残基或由其组成。

[0073] Wnt替代物可以例如通过Fc结构域、借助于级联、卷曲螺旋、多肽拉链、生物素/抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素多聚化等来进行多聚化。Wnt替代物还可以与本领域中已知的如PEG、Fc等部分连接以增强体内稳定性。

[0074] 在某些实施例中,Wnt替代物通过与一种或多种Fzd蛋白和LRP5/6结合,特别是通过与细胞表面(例如,人类细胞的表面)上的这些蛋白结合而直接激活典型的Wnt信号传导。Wnt替代物对Wnt信号传导的直接激活与Wnt信号传导的加强相反,其仅在存在天然Wnt蛋白时才增强活性。

[0075] 本Wnt替代物例如通过模拟Wnt蛋白与卷曲蛋白结合的作用或活性来激活Wnt信号传导。本发明的Wnt替代物模拟Wnt活性的能力可以通过多种测定法来证实。Wnt替代物通常引发与受体的天然配体引发的反应或活性相似或相同的反应或活性。具体地,本发明的Wnt替代物增强了典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导通路。如本文所使用的,术语"增强"是指与不存在本发明的Wnt替代物的情况相比,Wnt/β-连环蛋白信号传导水平的可测量增加。

[0076] 在某些实施例中,本文公开的抗体或其抗原结合片段抑制Wnt通路信号传导。在特定实施例中,抗Fzd抗体或其抗原结合片段的结合阻断或抑制内源性Wnt与细胞表面上的一种或多种Fzd受体的结合,从而减少或抑制Wnt信号传导。

[0077] 在本领域中已知多种用于测量典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导水平的方法。这些方法包含但不限于测量以下的测定法:Wnt/β-连环蛋白靶基因表达;TCF报告基因表达;β-连环蛋白稳定;LRP磷酸化;Axin从细胞质易位到细胞膜并且结合LRP。典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导通路最终通过转录因子TCF7、TCF7L1、TCF7L2(又称TCF4)和LEF引起基因表达的变化。在许多细胞和组织中已经表征了对Wnt激活的转录应答。由此,通过本领域众所周知

的方法进行的全局转录谱可以用于评定Wnt/β-连环蛋白信号传导激活或抑制。

[0078] Wnt应答性基因表达的变化通常由TCF和LEF转录因子介导。TCF报告基因测定法评定TCF/LEF控制基因的转录变化以确定Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平。TCF报告基因测定法最早由Korinek,V.等人,1997描述。此方法也称为TOP/FOP,其涉及使用位于最小c-Fos启动子驱动荧光素酶表达上游的最佳TCF基序CCTTTGATC的三个拷贝或突变基序CCTTTGGCC的三个拷贝(分别为pTOPFI_ASH和pFOPFI_ASH),以确定内源性p-连环蛋白/TCF4的反式激活活性。这两个报告基因活性的较高比率(TOP/FOP)指示较高的β-连环蛋白/TCF4活性,而这两个报告基因活性的较低比率指示较低的β-连环蛋白/TCF4活性。

[0079] 对Wnt信号进行应答的各种其它报告转基因在动物中完整存在,并且因此有效地反映了内源性Wnt信号传导。这些报道基因基于多聚化的TCF结合位点,所述多聚的TCF结合位点驱动LacZ或GFP的表达,这可通过本领域已知的方法容易地检测。这些报告基因包含:TOP-GAL、BAT-GAL、ins-TOPEGFP、ins-TOPGAL、LEF-EGFP、Axin2-LacZ、Axin2-d2EGFP、Lgr5tm1(cre/ERT2)、TOPdGFP。

[0080] 在某些情况下,由与TCF转录因子和TNIK形成复合物介导的去磷酸化β-连环蛋白向膜的募集、β-连环蛋白的稳定化和磷酸化状态以及β-连环蛋白向细胞核的易位(Klapholz-Brown Z等人,《公共科学图书馆期刊》2(9)e945,2007)是Wnt信号传导通路中的关键步骤。稳定化由抑制“破坏”复合物的Disheveled家族蛋白介导,因此减少了细胞内β-连环蛋白的降解,并且此后β-连环蛋白易位到细胞核。因此,测量细胞中β-连环蛋白的水平和位置很好地反映了Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平。这种测定法的非限制性实例是“Biolmageβ-连环蛋白重分布测定法”(赛默科技(Thermo Scientific)),其提供稳定表达与增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的C端融合的人β-连环蛋白的重组U2OS细胞。利用荧光显微镜或HCS平台执行成像和分析,从而允许EGFP-β-连环蛋白的水平和分布可视化。

[0081] 抑制破坏复合物的另一种方式是通过将Axin募集到Wnt共受体LRP的细胞质尾区来去除Axin。Axin已经表现出优先结合LRP尾区的磷酸化形式。因此,例如用GFP-Axin融合蛋白可视化Axin易位是用于评定Wnt/β-连环蛋白信号传导水平的另一种方法。

[0082] 在某些实施例中,如在上述测定法中测量的,例如在TOPFIash测定法中测量的,与中性物质诱导的β-连环蛋白信号传导或阴性对照相比,Wnt信号传导通路激动剂将典型的Wnt通路信号传导(例如,β-连环蛋白信号传导)增强或增加至少30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、150%、200%、250%、300%、400%或500%。阴性对照可以包含在这些测定法中。在特定实施例中,在上述测定法中测量时,例如在TOPFIash测定法或本文提及的其它测定法中的任一种测定法中测量时,与不存在激动剂的情况下的活性相比,Wnt激动剂可以将β-连环蛋白信号传导增强2倍、5倍、10倍、100倍、1000倍、10000倍或更多倍。

[0083] 在某些实施例中,如在上述测定法中测量的,例如在TOPFIash测定法中测量的,与存在中性物质的情况下观察到的β-连环蛋白信号或阴性对照相比,Wnt信号传导通路拮抗剂或抑制剂将典型的Wnt通路信号传导(例如,β-连环蛋白信号传导)抑制或减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%或100%。在这些测定法中可以包含阳性对照。

[0084] 当在本文中使用时,“Wnt基因产物”或“Wnt多肽”涵盖天然序列Wnt多肽、Wnt多肽

变体、Wnt多肽片段和嵌合Wnt多肽。在特定实施例中,Wnt多肽是天然人全长成熟Wnt蛋白。

[0085] 例如,本申请中关注的人天然序列Wnt蛋白包含以下:Wnt-1(GenBank登录号NM_005430);Wnt-2(GenBank登录号NM_003391);Wnt-2B(Wnt-13)(GenBank登录号NM_004185(同种型1)、NM_024494.2(同种型2))、Wnt-3(RefSeq.:NM_030753)、Wnt3a(GenBank登录号NM_033131)、Wnt-4(GenBank登录号NM_030761)、Wnt-5A(GenBank登录号NM_003392)、Wnt-5B(GenBank登录号NM_032642)、Wnt-6(GenBank登录号NM_006522)、Wnt-7A(GenBank登录号NM_004625)、Wnt-7B(GenBank登录号NM_058238)、Wnt-8A(GenBank登录号NM_058244)、Wnt-8B(GenBank登录号NM_003393)、Wnt-9A(Wnt-14)(GenBank登录号NM_003395)、Wnt-9B(Wnt-15)(GenBank登录号NM_003396)、Wnt-10A(GenBank登录号NM_025216)、Wnt-10B(GenBank登录号NM_003394)、Wnt-11(GenBank登录号NM_004626)、Wnt-16(GenBank登录号NM_016087))。尽管每个成员与家族具有不同程度的序列同一性,但是所有成员均对含有间距高度保守的23-24个保守半胱氨酸残基的较小(即,39-46kD)、酰化、棕榈酰化、分泌的糖蛋白进行编码(McMahon,A P等人、《遗传学趋势(Trends Genet.)》1992;8:236-242;Miller,J R.《基因组生物学(Genome Biol.)》2002;3(1):3001.1-3001.15)。关注的其它天然序列Wnt多肽包含来自任何哺乳动物的上述直系同源物,所述哺乳动物包含家养和农场动物以及动物园、实验室或宠物动物,如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔、大鼠、小鼠、青蛙、斑马鱼、果蝇、蠕虫等。

[0086] 本文使用的“Wnt通路信号传导”或“Wnt信号传导”指代生物活性Wnt通过其对细胞施加其作用以调节细胞的活性的机制。Wnt蛋白通过与Wnt受体结合来调节细胞活性,所述Wnt受体包含来自蛋白质的卷曲蛋白(Fzd)家族的蛋白质、来自蛋白质的ROR家族的蛋白质、来自蛋白质的LRP家族的蛋白LRP5、LRP6、蛋白FRL1/crypto和蛋白Derailed/Ryk。一旦通过Wnt结合激活,一种或多种Wnt受体就将激活一个或多个细胞内信号传导级联。这些包含典型的Wnt信号传导通路;Wnt/平面细胞极性(Wnt/PCP)通路;Wnt-钙(Wnt/Ca^{2+})通路(Giles,RH等人(2003)《生物化学与生物物理学报(Biochim Biophys Acta)》1653,1-24;Peifer,M.等人(1994)《发育(Development)》120:369-380;Papkoff,J.等人(1996)《分子与细胞生物学》16:2128-2134;Veeman,M.T.等人(2003)《发育细胞(Dev.Cell)》5:367-377);以及如本领域所公知的其它Wnt信号传导通路。

[0087] 例如,典型的Wnt信号传导通路的激活引起细胞内蛋白β-连环蛋白的磷酸化的抑制,从而导致β-连环蛋白在细胞溶质中积累,并随后易位到细胞核,在所述细胞核处,β-连环蛋白与转录因子(例如,TCF/LEF)相互作用以激活靶基因。Wnt/PCP通路的激活会激活RhoA、c-Jun N端激酶(JNK)和nemo样激酶(NLK)信号传导级联,以控制如组织极性和细胞运动等生物过程。通过结合Wnt-4、Wnt-5A或Wnt-11激活Wnt/Ca^{2+}引起细胞内钙离子的释放,这激活了钙敏感酶,如蛋白激酶C(PKC)、钙-钙调素依赖性激酶II(CamKII)或钙调磷酸酶(CaCN)。通过测定上述信号传导通路的活性,可以容易地确定抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)的生物学活性。

[0088] 在某些实施例中,抗Fzd抗体和其抗原结合片段的功能性质可以使用技术人员已知的多种方法来评定,所述多种方法包含例如使用体外或体内模型(包含但不限于本文所述的任何体外或体内模型)应答于Wnt、癌细胞和/或肿瘤生长抑制的亲和力/结合测定法(例如,表面等离子体共振、竞争性抑制测定法)、细胞毒性测定法、细胞活力测定法、细胞增

殖或分化测定法。其它测定法可以测试本文所述抗体阻断正常Wnt/Fzd介导的应答的能力。还可以测试本文所述的抗体和其抗原结合片段对Fzd受体内在化、体外和体内功效等的影响。可以使用技术人员已知的公认的方案或可商购的试剂盒执行此类测定(参见例如《现代分子生物学实验指南》(格林出版联合公司(Greene Publ.Assoc.Inc.)和纽约州纽约市的约翰威利父子公司);《现代免疫学实验指南》(由纽约州纽约市的约翰威立父子公司的John E.Coligan、Ada M.Kruisbeek、David H.Margulies、Ethan M.Shevach、Warren Strober 2001编辑)。

[0089] 在某些实施例中,Fzd结合抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)包括本文所述抗体的CDR中的一个或多个CDR。在这方面,已表明在一些情况下可以执行抗体的仅VHCDR3的转移,同时仍保留期望的特异性结合(Barbas等人,《美国国家科学院院刊》(1995)92:2529-2533)。还参见McLane等人,《美国国家科学院院刊》(1995)92:5214-5218,Barbas等人,《美国化学学会杂志(J.Am.Chem.Soc.)》(1994)116:2161-2162。

[0090] Marks等人(《生物/技术》,1992,10:779-783)描述了产生抗体可变结构域的组库的方法,其中针对在可变结构域的5'端或邻近5'端处的通用引物用于连接通用引物到人VH基因的第三框架区,以提供缺少CDR3的VH可变结构域的组库。Marks等人进一步描述了此组库如何与特定抗体的CDR3组合。使用类似的技术,可以用缺少CDR3的VH或VL结构域的组库改组目前描述的抗体的CDR3衍生的序列,并且将改组的完整VH或VL结构域与同源的VL或VH结构域组合以提供结合一种或多种Fzd受体的抗体或其抗原结合片段。然后,可以在适合的宿主系统(如WO92/01047的噬菌体展示系统)中展示此组库,以便可以选择适合的抗体或其抗原结合片段。组库可以由至少约10^4个单个成员且提高若干个数量级,例如到约10^6个到10^8个或10^{10}个或更多个成员组成。Stemmer(《自然》,1994,370:389-391)也公开了类似的改组或组合技术,他描述了与β-内酰胺酶基因有关的技术,但观察到所述方法可以用于抗体的产生。

[0091] 另外的替代方案是使用一个或多个选择的VH和/或VL基因的随机诱变来产生携带本文所述的发明实施例的一个或多个CDR衍生的序列的新颖的VH或VL区,以在整个可变结构域内产生突变。这种技术由使用了易错PCR的Gram等人(1992,《美国国家科学院院刊》,89:3576-3580)描述。可以使用的另一种方法是将诱变引导到VH或VL基因的CDR区。此类技术由Barbas等人(1994,《美国国家科学院院刊》,91:3809-3813)和Schier等人(1996,《分子生物学杂志》263:551-567)公开。

[0092] 在某些实施例中,本文所述的抗体的特异性VH和/或VL可以用于筛选互补可变结构域的文库,以鉴定具有期望性质(如对一种或多种Fzd受体具有增加的亲和力)的抗体。此类方法例如在Portolano等人,《免疫学杂志》(1993)150:880-887;Clarkson等人,《自然》(1991)352:624-628中描述。

[0093] 也可以使用其它方法来混合和匹配CDR,以鉴定具有期望结合活性(如与一种或多种Fzd受体结合)的抗体。例如:Klimka等人,《英国癌症杂志(British Journal of Cancer)》(2000)83:252-260描述了使用小鼠VL和人VH文库的筛选工艺,其中CDR3和FR4从小鼠VH保留。在获得抗体后,针对人VL文库筛选VH以获得结合抗原的抗体。Beiboer等人,《分子生物学杂志》(2000)296:833-849描述了使用完整的小鼠重链和人轻链文库的筛选工艺。在获得抗体后,将一个VL与人VH文库组合,其中保留了小鼠的CDR3。获得了能够结合抗原的抗体。Rader等人,《美国国家科学院院刊》(1998)95:8910-8915描述了与上述Beiboer

等人类似的工艺。

[0094] 这些刚刚描述的技术本身在本领域中是已知的。然而,本领域技术人员将能够使用本领域常规方法,根据本文所述的本发明的若干个实施例,使用此类技术来获得抗体或其抗原结合片段。

[0095] 本文还公开了一种用于获得对Fzd受体具有特异性的抗体或抗原结合结构域的方法,所述方法包括通过氨基酸序列中的一个或多个氨基酸的添加、缺失、取代或插入来提供本文所示的VH结构域或作为VH结构域的氨基酸序列变体的VH结构域;任选地将由此提供的VH结构域与一个或多个VL结构域组合;以及测试VH结构域或一个或多个VH/VL组合以鉴定特异性结合成员或对一种或多种Fzd受体具有特异性并任选地具有一种或多种期望性质的抗体抗原结合结构域。VL结构域可以具有基本上如本文所示的氨基酸序列。可以采用类似的方法,其中将本文公开的VL结构域的一个或多个序列变体与一个或多个VH结构域组合。

[0096] 在特定实施例中,抗Fzd抗体和其抗原结合片段是水溶性的。“水溶性”意指在不存在清洁剂的情况下可溶于水性缓冲液,通常以提供生物有效剂量的多肽的浓度可溶的组合物。水溶性的组合物形成基本上均质的组合物,所述基本上均质的组合物的比活性为所述基本上均质的组合物从其纯化的起始材料的比活性的至少约5%,通常为起始材料的比活性的至少约10%、20%或30%,更通常为起始材料的比活性的约40%、50%或60%,并且可以为约50%、约90%或更大。本发明的抗Fzd抗体和其抗原结合片段(包含Wnt替代物)通常形成浓度为至少25μM或更高,例如,至少25μM、40μM或50μM,通常至少60μM、70μM、80μM或90μM,有时多达100μM、120μM或150μM的基本上均质的水溶液。换句话说,本发明的组合物通常形成浓度为约0.1mg/ml、约0.5mg/ml、约1mg/ml或更大的基本上均质的水溶液。

[0097] 与抗体或其抗原结合片段“特异性结合”或“优先结合”(在本文中可互换使用)的抗原或表位是本领域中公知的术语,并且用于确定这种特异性或优先结合的方法也是本领域中公知的。如果分子与特定细胞或物质比其与替代性细胞或物质更频繁地、更快速地、持续时间更长地和/或亲和力更大地反应或缔合,则所述分子被称为展现出“特异性结合”或“优先结合”。如果抗体比其与其它物质亲和力更大地、亲合性更高地、更容易地和/或持续时间更长地结合,则所述抗体与靶抗原(例如,Fzd受体)“特异性结合”或“优先结合”。例如,与Fzd1受体特异性结合或优先结合的抗体是比其结合其它Fzd受体或非Fzd蛋白亲和力更大地、亲合性更高地、更容易地和/或持续时间更长地结合Fzd1受体的抗体。通过阅读此定义还应理解,例如特异性或优先结合第一靶标的抗体(或部分或表位)可以或可以不特异性或优先结合第二靶标。如此,“特异性结合”或“优先结合”不一定需要(尽管其可以包含)排他结合。通常,但不是必然地,提及结合意指优先结合。

[0098] 在一些实施例中,抗Fzd抗体或其抗原结合片段结合一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同的卷曲蛋白,例如,人卷曲蛋白Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9、Fzd10中的一种或多种人卷曲蛋白。在一些实施例中,基于抗体的信号传导激动剂与Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8结合。在各个实施例中,抗Fzd抗体或其抗原结合片段与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;(xi)Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8;或(xii)Fzd1、Fzd4、Fzd5、Fzd7和Fzd8。在一些实施例中,卷曲蛋白

结合部分对关注的一种或多种卷曲蛋白具有选择性,例如相对于其它卷曲蛋白,针对所述一种或多种期望的卷曲蛋白具有至少10倍、25倍、50倍、100倍、200倍或更多倍的特异性。

[0099] 免疫结合通常是指在免疫球蛋白分子与抗原之间发生的类型的非共价相互作用,例如通过说明而非限制的方式,由于静电的、离子的、亲水的和/或疏水的吸引力或排斥力、空间力、氢键结合、范德华力和其它相互作用,免疫球蛋白对所述抗原具有特异性。可以在相互作用的解离常数(K_D)方面表达免疫结合相互作用的强度或亲和力,其中更小的K_D表示更大的亲和力。可以使用本领域中公知的方法对所选多肽的免疫结合性质定量。一个这种方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力并且取决于同样在两个方向上影响速率的几何参数。因此,可以通过计算缔合和解离的浓度和实际速率来确定"缔合速率常数"(K_{on})和"解离速率常数"(K_{on})。K_{off}/K_{on}的速率实现消除与亲和力无关的所有参数,并且因此等于解离常数K_D。通常参见Davies等人,(1990)《生物化学年鉴(Annual Rev.Biochem.)》59:439-473。在某些实施例中,抗Fzd抗体以小于或等于约1×10^{-4}M、小于或等于约1×10^{-5}M、小于或等于约1×10^{-6}M、小于或等于约1×10^{-7}M、小于或等于约1×10^{-8}M、小于或等于约1×10^{-9}M或至少约1×10^{-10}M的K_D结合一种或多种Fzd受体。在某些实施例中,本文所述的抗Fzd抗体以小于约10,000nM、小于约1000nM、小于约100nM、小于约10nM、小于约1nM或小于约0.1nM的K_D结合一种或多种Fzd受体,并且在一些实施例中,抗体可以具有对一种或多种Fzd受体甚至更高的亲和力。在某些实施例中,本文所述的抗Fzd抗体具有约100皮摩尔、150皮摩尔、155皮摩尔、160皮摩尔、170皮摩尔、175皮摩尔、180皮摩尔、185皮摩尔、190皮摩尔、191皮摩尔、192皮摩尔、193皮摩尔、194皮摩尔、195皮摩尔、196皮摩尔、197皮摩尔、198皮摩尔或199皮摩尔的亲和力K_D,并且在一些实施例中,抗体可以具有对一种或多种Fzd受体甚至更高的亲和力。

[0100] 根据某些实施例的抗体或其抗原结合片段包含:与本文所述的任一种抗体竞争与一种或多种Fzd受体结合的抗体和其抗原结合片段,所述抗体和其抗原结合片段均(i)特异性结合一种或多种Fzd受体,和/或(ii)包括本文公开的VH和/或VL结构域(或VH和/或VL CDR组),或(iii)包括本文公开的VH CDR3;或这些抗体和其抗原结合片段中的任一种抗体和其抗原结合片段的变体。可以例如使用ELISA和/或通过将特定的报告分子标记到可以在其它未标记抗体的存在下检测到的一种抗体,以实现结合相同表位或重叠表位的特异性抗体的鉴定来在体外容易地测定抗体之间的竞争。因此,本文提供了一种特异性抗体或其抗原结合片段,其包括与本文所述的与一种或多种Fzd受体结合的抗体竞争的人抗体抗原结合位点。

[0101] 在这方面,如本文所使用的,术语"与……竞争"、"抑制结合"和"阻断结合"(例如,指代抑制/阻断Wnt与一种或多种Fzd受体的结合或者指代抑制/阻断Wnt抗Fzd抗体与Fzd受体的结合)可互换使用并且涵盖部分和完全抑制/阻断。Wnt对一种或多种Fzd受体的抑制/阻断优选地降低或改变当在没有抑制或阻断的情况下Wnt结合Fzd受体时发生的细胞信号传导的正常水平或类型。抑制和阻断还旨在包含与配体未与抗Fzd抗体接触相比,在与本文所述的抗Fzd抗体接触时Wnt与Fzd受体结合的任何可测量的降低,例如,将Wnt与Fzd受体的结合阻断至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0102] 免疫球蛋白的恒定区表现出比可变区少的序列多样性,并且负责结合许多天然蛋白以引发重要的生化事件。在人类中,存在五种不同类别的抗体,包含IgA(其包含亚类IgA1

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

[0103] 抗体的Fc区与许多Fc受体和配体相互作用,从而赋予一系列重要的被称为效应子功能的功能能力。对于IgG,Fc区包括Ig结构域CH2和CH3以及通向CH2的N端铰链。IgG类别的Fc受体的重要家族是Fcγ受体(FcγR)。这些受体介导抗体与免疫系统的细胞免疫部分(cellular arm)之间的通讯(Raghavan等人,1996,《细胞和发育生物学年度评论(Annu Rev Cell Dev Biol)》12:181-220;Ravetch等人,2001,《免疫学年度评论(Annu Rev Immunol)》19:275-290)。在人类中,此蛋白家族包含:FcγRI(CD64),其包含同种型FcγRIa、FcγRIb和FcγRIc;FcγRII(CD32),其包含同种型FcγRIIa(包含同种异型H131和R131)、FcγRIIb(包含FcγRIIb-1和FcγRIIb-2)和FcγRIIc;以及FcγRIII(CD16),其包含同种型FcγRIIIa(包含同种异型V158和F158)和FcγRIIIb(包含同种异型FcγRIIIb-NA1和FcγRIIIb-NA2)(Jefferis等人,2002,《免疫学快报(Immunol Lett)》82:57-65)。这些受体通常具有介导与Fc结合的细胞外结构域、跨膜区域和可以介导细胞内的一些信号传导事件的细胞内结构域。这些受体在各种免疫细胞中表达,所述免疫细胞包含单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、B细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞和T细胞。Fc/FcγR复合物的形成将这些效应细胞募集到结合抗原的位点,从而通常产生细胞内的信号传导事件和重要的后续免疫应答,如炎症介质的释放、B细胞激活、内吞作用、吞噬作用和细胞毒性攻击。

[0104] 介导细胞毒性和吞噬效应子功能的能力是抗体破坏靶细胞的潜在机制。其中表达FcγR的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞裂解的细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)(Raghavan等人,1996,《细胞和发育生物学年度评论》12:181-220;Ghetie等人,2000,《免疫学年度评论》18:739-766;Ravetch等人,2001,《免疫学年度评论》19:275-290)。其中表达FcγR的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞吞噬作用的细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。所有FcγR在Cg2(CH2)结构域和之前的铰链的N端处结合Fc上的相同区域。这种相互作用在结构上得到了很好的表征(Sondermann等人,2001,《分子生物学杂志》309:737-749),并且已经解决了与人FcγRIIIb细胞外结构域结合的人Fc的若干种结构(pdb登录码1E4K)(Sondermann等人,2000,《自然》406:267-273)。(pdb登录码1IIS和1IIX)(Radaev等人,2001,《生物化学杂志》276:16469-16477)。

[0105] 不同的IgG亚类对FcγR具有不同的亲和力,与IgG2和IgG4相比,IgG1和IgG3通常明显更好地与受体结合(Jefferis等人,2002,《免疫学快报》82:57-65)。所有FcγR都结合IgG Fc上的相同区域,但具有不同的亲和力:高亲和力结合物FcγRI针对IgG1的K_d为$10^{-8}M^{-1}$,而低亲和力受体FcγRII和FcγRIII通常分别以10^{-6}和10^{-5}结合。FcγRIIIa和FcγRIIIb的细胞外结构域具有96%的同一性;然而,FcγRIIIb不具有细胞内信号传导结构域。此外,虽然FcγRI、FcγRIIa/c和FcγRIIIa是免疫复合物触发激活的正调节物(所述正调节物的特征在于具有细胞内结构域,所述细胞内结构域具有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)),但是FcγRIIb具有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)并且因此是抑制性的。因此,前者被称为激活受体并且FcγRIIb被称为抑制受体。受体在不同免疫细胞上的表达方式和水平也不同。复杂性的另一个层次是人类蛋白质组中存在许多FcγR多态性。具有临

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

[0106] Fc区也参与补体级联的激活。在经典的补体通路中,C1利用其C1q亚基结合已与一个或多个抗原形成复合物的IgG或IgM的Fc片段。在本发明的某些实施例中,对Fc区的修饰包括改变(增强或降低)本文所述的Fzd特异性抗体激活补体系统的能力的修饰(参见例如美国专利7,740,847)。为了评定补体激活,可以执行补体依赖性细胞毒性(CDC)测定法(参见例如Gazzano-Santoro等人,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》,202:163(1996))。

[0107] 因此,在某些实施例中,本发明提供了具有经修饰的Fc区的抗Fzd抗体,其具有改变的功能性质,如降低或增强的CDC、ADCC或ADCP活性或增强的对特定Fc γ R的结合亲和力或增加的血清半衰期。本文设想的其它经修饰的Fc区描述于例如已公布的美国专利7,317,091;7,657,380;7,662,925;6,538,124;6,528,624;7,297,775;7,364,731;公开的美国申请US2009092599;US20080131435;US20080138344;以及公开的国际申请WO 2006/105338;WO 2004/063351;WO 2006/088494;WO 2007/024249中。

[0108] 在某些实施例中,Fc区可以衍生自各种不同的Fc中的任一种,包含但不限于野生型或经修饰的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其它同种型,例如野生型或经修饰的人IgG1、人IgG2、人IgG3、人IgG4、人IgG4Pro(包括防止IgG4半分子的形成的核心铰链区中的突变)、人IgA、人IgE、人IgM或被称为IgG1 LALAPG的经修饰的IgG1。已经表明L235A、P329G(LALA-PG)变体消除鼠IgG2a和人IgG1两者中的补体结合和固定以及Fc-γ依赖性抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在本文公开的IgG中的任一种的特定实施例中,IgG包括以下氨基酸取代中的一个或多个:N297G、N297A、N297E、L234A、L235A或P236G。

[0109] 因此,在某些实施例中,将具有期望结合特异性的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。在某些实施例中,融合是与包括铰链区、C_H2和C_H3区的至少部分的Ig重链恒定结构域融合。优选的是具有含有融合中的至少一个融合中存在的轻链键合所必需的位点的第一重链恒定区(C_H1)。将对免疫球蛋白重链融合和(如果需要)免疫球蛋白轻链进行编码的DNA插入单独的表达载体中,并且共转染到适合的宿主细胞中。当在构建中使用的三个多肽链的不相等比率提供期望双特异性抗体的最佳得率时,这在调节实施例中的三个多肽片段的相互比例方面提供了更大的灵活性。然而,当至少两个多肽链以相等的比率表达引起高得率时或者当比率对期望的链组合的得率没有明显影响时,可以将两个或全部三个多肽链的编码序列插入单个表达载体中。

[0110] 还可以修饰本发明的抗体(和其抗原结合片段和变体)以包含例如用于纯化或诊断应用的表位标签或标记。存在许多本领域已知的用于制备抗体缀合物的连接基团,包含例如在美国专利第5,208,020号或EP专利0 425 235B1和Chari等人,《癌症研究》52:127-

131(1992)中公开的那些。如上述专利中所公开的,连接基团包含二硫基、硫醚基、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团或酯酶不稳定基团,优选二硫基和硫醚基。

[0111] 在另一个设想的实施例中,本文所述的Fzd特异性抗体或其抗原结合片段可以与在本文中被称为缀合物的另一种治疗化合物缀合或可操作地连接。缀合物可以是细胞毒性剂、化学治疗剂、细胞因子、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、毒素、放射性同位素或其它治疗活性剂。上面已经描述了化学治疗剂、细胞因子、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂和其它治疗剂,并且所有这些上述治疗剂都可以用作抗体缀合物。

[0112] 可以使用如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基四氢噻吩(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二亚氨盐二甲酯HCL)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺)、醛(如戊二醛)、双-叠氮基化合物(如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮基衍生物(如双-(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如2,6-二异氰酸甲苯酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)等双功能蛋白偶联剂制备免疫缀合物。特定偶联剂包含N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)(Carlsson等人,《生物化学杂志(Biochem.J.)》173:723-737[1978])和N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)以提供二硫键。接头可以是促进一种或多种可切割组分的释放的“可切割接头”。例如,可以使用酸不稳定接头(《癌症研究》52:127-131(1992);美国专利第5,208,020号)。

[0113] 在某些实施例中,抗LRP5/6抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。在某些实施例中,其是人源化的。

[0114] 在某些实施例中,本发明进一步提供了对本文所述的抗体或其抗原结合片段进行编码的分离的核酸,例如,对本文所述的一个或多个CDR或VH或VL结构域进行编码的核酸。核酸包含DNA和RNA。这些和相关的实施例可以包含对结合本文所述的一种或多种Fzd受体的抗体进行编码的多核苷酸。如本文所使用的术语“分离的多核苷酸”应意指基因组、cDNA或合成来源的多核苷酸或其某种组合,由于其来源,分离的多核苷酸(1)不与多核苷酸的全部或一部分缔合,(2)与其天然未连接的多核苷酸连接,或(3)作为较大序列的一部分在自然界中不存在。

[0115] 术语“可操作地连接”意指所述术语所应用的组分处于允许它们在适当条件下执行其固有功能的关系。例如,将与蛋白质编码序列“可操作地连接”的转录控制序列连接到其上,从而在与控制序列的转录活性相容的条件下实现蛋白质编码序列的表达。

[0116] 如本文所使用的术语“控制序列”是指可以影响与其连接或可操作地连接的编码序列的表达、加工或细胞内定位的多核苷酸序列。此类控制序列的性质可以取决于宿主生物体。在特定实施例中,原核生物的转录控制序列可以包含启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。在其它特定实施例中,真核生物的转录控制序列可以包含启动子,所述启动子包括针对转录因子、转录增强子序列、转录终止序列和聚腺苷酸化序列的一个或多个识别位点。在某些实施例中,“控制序列”可以包含前导序列和/或融合配偶体序列。

[0117] 本文所提及的术语“多核苷酸”意指单链或双链核酸聚合物。在某些实施例中,包括多核苷酸的核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一种核苷酸类型的经修饰形式。所述修饰包含碱基修饰,如溴尿嘧啶核苷、核糖修饰,如阿拉伯糖苷和2',3'-二脱氧核糖以及核苷酸间键合修饰,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、硫

代苯胺磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phoshoraniladate)和氨基磷酸酯。术语“多核苷酸”具体包含DNA的单链和双链形式。

[0118] 术语“天然存在的核苷酸”包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“经修饰的核苷酸”包含具有经修饰的或取代的糖基等的核苷酸。术语“寡核苷酸键”包含寡核苷酸键,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、硫代苯胺磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等。参见例如LaPlanche等人,1986,《核酸研究》,14:9081;Stec等人,1984,《美国化学学会杂志》,106:6077;Stein等人,1988,《核酸研究》16:3209;Zon等人,1991,《抗癌症药物设计(Anti-Cancer Drug Design)》,6:539;Zon等人,1991,《寡核苷酸和类似物:实用方法(OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES:A PRACTICAL APPROACH)》,第87到108页(F.Eckstein编辑),英国牛津的牛津大学出版社(Oxford University Press,Oxford England);Stec等人,美国专利第5,151,510号;Uhlmann和Peyman,1990,《化学评论(Chemical Reviews)》,90:543,所述文献的公开内容出于任何目的通过引用的方式特此并入。寡核苷酸可以包含可检测标记以使得能够检测寡核苷酸或其杂交。

[0119] 术语“载体”用于指代用于将编码信息转移到宿主细胞的任何分子(例如,核酸、质粒或病毒)。术语“表达载体”是指适合于转化宿主细胞并含有引导和/或控制插入的异源核酸序列的表达的核酸序列的载体。如果存在内含子,则表达包含但不限于如转录、翻译和RNA剪接等过程。

[0120] 如本领域技术人员将理解的,多核苷酸可以包含表达或可以适于表达蛋白质、多肽、肽等的基因组序列、基因组外和质粒编码的序列以及较小的工程化基因节段。此类节段可以是天然分离的或者由本领域技术人员合成修饰。

[0121] 如本领域技术人员还将认识到的,多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链的,并且可以是DNA(基因组、cDNA或合成的)或RNA分子。RNA分子可以包含含有内含子并以一对一方式对应于DNA分子的HnRNA分子,以及不含有内含子的mRNA分子。另外的编码或非编码序列可以但不必存在于根据本公开的多核苷酸内,并且多核苷酸可以但不必连接到其它分子和/或支持材料。多核苷酸可以包括天然序列或可以包括对此序列的变体或衍生物进行编码的序列。

[0122] 因此,根据这些和相关的实施例,本公开还提供了对本文所述的抗Fzd抗体和其抗原结合片段进行编码的多核苷酸。在某些实施例中,提供了多核苷酸,其包括对本文所述的抗体或其抗原结合片段进行编码的多核苷酸序列中的一些或全部多核苷酸序列,以及此类多核苷酸的补体。

[0123] 本领域的普通技术人员应理解,由于遗传密码的简并性,存在许多对本文所述的抗体进行编码的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些多核苷酸与对结合Fzd受体的抗体进行编码的天然或原始多核苷酸序列的核苷酸序列具有最小的序列同一性。然而,本公开明确设想了由于密码子使用的差异而变化的多核苷酸。在某些实施例中,具体设想了已经针对哺乳动物表达进行了密码子优化的序列。

[0124] 因此,在本发明的另一个实施例中,如位点特异性诱变等诱变方法可以用于制备本文所述的抗体的变体和/或衍生物。通过这种方法,多肽序列的特异性修饰可以通过诱变对其进行编码的基础多核苷酸来进行。这些技术提供了一种用于通过将一个或多个核苷酸序列改变引入多核苷酸中来制备和测试序列变体(例如,包括了上述考虑因素中的一个或

多个考虑因素)的直接方法。

[0125] 位点特异性诱变允许通过以下来产生突变体:使用对期望突变的DNA序列进行编码的特异性寡核苷酸序列以及足够数量的相邻核苷酸,以提供具有足够大小和序列复杂性的引物序列,从而形成在遍历的缺失连接部两侧的稳定双链体。可以在所选的多核苷酸序列中采用突变以改善、改变、减少、修饰或以其它方式改变多核苷酸本身的性质和/或改变所编码多肽的性质、活性、组成、稳定性或一级序列。

[0126] 在某些实施例中,本发明人设想了诱变对本文公开的抗体或其抗原结合片段进行编码的多核苷酸序列,以改变编码的多肽的一种或多种性质,如抗体或其抗原结合片段的结合亲和力或特定Fc区的功能或Fc区对特定Fc γ R的亲和力。位点特异性诱变技术是本领域中公知的,并且广泛用于产生多肽和多核苷酸的变体。例如,位点特异性诱变通常用于改变DNA分子的特定部分。在此类实施例中,采用在长度上通常包括约14个到约25个核苷酸左右的引物,其中在序列的连接部的两侧上约5个到约10个残基被改变。

[0127] 如本领域技术人员将理解的,位点特异性诱变技术通常采用以单链和双链形式存在的噬菌体载体。可用于定点诱变的典型载体包含如M13噬菌体等载体。这些噬菌体可以容易地商购获得,并且其用途通常是本领域技术人员公知的。双链质粒还通常用于消除了将目的基因从质粒转移到噬菌体的步骤的定点诱变。

[0128] 使用定点诱变制备所选的编码肽的DNA节段的序列变体提供了一种产生潜在有用物种的手段,但并不意味着进行限制,因为还存在可以获得肽和对其进行编码的DNA序列的序列变体的其它方法。例如,可以用如羟胺等诱变剂处理对期望肽序列进行编码的重组载体以获得序列变体。关于这些方法和方案的具体细节可以在Maloy等人,1994;Segal,1976;Prokop和Bajpai,1991;Kuby,1994;以及Maniatis等人,1982的教导中找到,所述文献各自出于所述目的通过引用的方式并入本文。

[0129] 在许多实施例中,将对主题单克隆抗体进行编码的核酸直接引入宿主细胞种,并且在足以诱导编码的抗体的表达的条件下培育细胞。使用本领域技术人员公知的标准技术并与本文提供的多肽和核酸序列组合来制备本公开的抗体。多肽序列可以用于确定对由此公开的特定抗体进行编码的适当核酸序列。根据本领域技术人员公知的标准方法,可以优化核酸序列以反映各种表达系统的特定密码子“偏好”。

[0130] 根据某些相关实施例,提供了一种重组宿主细胞,所述重组宿主细胞包括一种或多种本文所述的构建体;对任何抗体、CDR、VH或VL结构域或其抗原结合片段进行编码的核酸;以及产生编码产物的方法,所述方法包括从针对其的编码核酸表达。通过在适当条件下培养含有核酸的重组宿主细胞可以方便地实现表达。在通过表达产生后,抗体或其抗原结合片段可以使用任何适合的技术分离和/或纯化,并且然后根据需要使用。

[0131] 如本文提供的抗体或其抗原结合片段以及编码核酸分子和载体可以例如从其天然环境中分离和/或纯化,其呈基本上纯净或均质的形式,或者在核酸的情况下,不含或基本上不含除了对具有期望功能的多肽进行编码的序列以外的原始核酸或基因。核酸可以包括DNA或RNA,并且可以是全部或部分合成的。除非上下文另外要求,否则提及本文所示的核苷酸序列涵盖具有指定序列的DNA分子,并且涵盖具有其中U取代了T的指定序列的RNA分子。

[0132] 用于在各种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是公知的。适合的宿主细胞包含细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。在本领域中可获得的用于表达异源多肽的哺

乳动物细胞系包含中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NSO小鼠黑素瘤细胞等。常见的优选细菌宿主是大肠杆菌。

[0133] 在本领域中已很好地建立了如大肠杆菌等原核细胞中的抗体和其抗原结合片段的表达。对于综述,参见例如Pluckthun,A.《生物/技术》9:545-551(1991)。作为产生抗体或其抗原结合片段的选择方案,本领域技术人员也可获得在培养物中的真核细胞中的表达,参见最近的综述,例如Ref,M.E.(1993)《生物技术当前观点(Curr.Opinion Biotech.)》4:573-576;Trill J.J.等人(1995)《生物技术当前观点》6:553-560。

[0134] 可以选择或构建适合的载体,所述载体含有合适的调控序列,包含启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标志基因和其它合适的序列。载体可以根据需要是质粒、病毒,例如噬菌体或噬菌粒。对于另外的细节,参见例如《分子克隆:实验室手册》:第2版,Sambrook等人,1989,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)。《现代分子生物学实验指南》,第二版,Ausubel等人编辑,约翰威利父子公司,1992或其后续更新详细描述了用于例如在制备核酸构建体、诱变、测序、将DNA引入细胞中和基因表达以及蛋白质分析中操控核酸的许多已知技术和方案。

[0135] 术语“宿主细胞”用于指代在其中已经引入或能够引入对本文所述抗体中的一种或多种抗体进行编码的核酸序列的细胞,并且所述细胞进一步表达或能够表达关注的所选基因,如对任何本文所述抗体进行编码的基因。所述术语包含亲本细胞的子代,无论所述子代是否在形态上或遗传构成上与原始亲本相同,只要存在所选基因即可。因此,还设想了包括将这种核酸引入宿主细胞中的方法。引入可以采用任何可用的技术。对于真核细胞,适合的技术可以包含磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其它病毒(例如,牛痘或针对昆虫细胞的病毒、杆状病毒)的转导。对于细菌细胞,适合的技术可以包含氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。在引入之后,可以引起或允许例如通过在表达基因的条件下培养宿主细胞从核酸表达。在一个实施例中,核酸被整合到宿主细胞的基因组(例如,染色体)中。根据标准技术,可以通过包含促进与基因组重组的序列来促进整合。

[0136] 在某些实施例中,本发明还提供了一种方法,所述方法包括在表达系统中使用如上所述的构建体以表达特定多肽,如本文所述的Fzd特异性抗体。术语“转导”用于指代基因通常通过噬菌体从一种细菌转移到另一种细菌。“转导”还指代通过逆转录病毒获取和转移真核细胞序列。术语“转染”用于指代细胞对外来或外源DNA的摄取,并且当外源DNA已经被引入细胞膜内部时,细胞已经被“转染”。许多转染技术是本领域中公知的并且在本文中公开。参见例如Graham等人,1973,《病毒学(Virology)》52:456;Sambrook等人,2001,《分子克隆,实验室手册(MOLECULAR CLONING,A LABORATORY MANUAL)》,冷泉港实验室;Davis等人,1986,《分子生物学的基本方法(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY)》,爱思唯尔(Elsevier);以及Chu等人,1981,《基因(Gene)》13:197。此类技术可以用于将一个或多个外源DNA部分引入适合的宿主细胞中。

[0137] 如本文所使用的术语“转化”是指细胞遗传特性的改变,并且当细胞已经被修饰以含有新的DNA时,所述细胞已经被转化。例如,在将细胞从其天然状态进行遗传修饰的情况下,所述细胞被转化。在转染或转导后,转化DNA可以通过物理整合到细胞的染色体中而与细胞的DNA重组,或者可以作为附加型元件短暂地维持而不被复制,或者可以作为质粒独立

复制。当DNA随着细胞分裂而复制时,认为细胞已经稳定转化。当与如核酸分子、多肽、宿主细胞等生物材料结合使用时,术语“天然存在的”或“天然的”是指在自然界发现并且未被人类操控的材料。类似地,如本文所使用的“非天然存在的”或“非天然的”是指在自然界中未发现或已被人类结构修饰或合成的材料。

[0138] 术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”以及“糖蛋白”可互换使用并且意指不限于任何特定长度的氨基酸的聚合物。所述术语不排除如豆蔻酰化、硫酸化、糖基化、磷酸化和信号序列的添加或缺失等修饰。术语“多肽”或“蛋白质”意指一个或多个氨基酸链,其中每个链包括通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白质可以包括多个通过肽键非共价和/或共价连接且具有天然蛋白质序列的链,即,由天然存在的以及特别是非重组细胞、或基因工程或重组细胞产生的蛋白质,并且包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子、或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的分子。术语“多肽”和“蛋白质”具体涵盖与本公开的Fzd受体结合的抗体,或具有抗Fzd抗体的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的序列。因此,“多肽”或“蛋白质”可以包括一个(称为“单体”)或多个(称为“多聚体”)氨基酸链。

[0139] 本文提及的术语“分离的蛋白质”或“分离的抗体”意指主题蛋白质或抗体:(1)不含至少一些其它蛋白质,通常将使用所述至少一些其它蛋白质在自然界中发现所述主题蛋白质;(2)基本上不含来自相同来源,例如,来自相同物种的其它蛋白质;(3)由来自不同物种的细胞表达;(4)已与至少约50%的多核苷酸、脂质、碳水化合物或与其天然缔合的其它物质分离;(5)不和与“分离的蛋白质”天然缔合的蛋白质部分缔合(通过共价或非共价相互作用);(6)和不与其天然缔合的多肽可操作地缔合(通过共价或非共价相互作用);或(7)在自然界中不存在。这种分离的蛋白质可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其它RNA编码,或者可以具有合成来源,或其任何组合。在某些实施例中,分离的蛋白质基本上不含在其天然环境中会发现的且会干扰其使用(治疗、诊断、预防、研究或其它)的蛋白质或多肽或其它污染物。

[0140] 设想了本文描述的抗体的一个或多个氨基酸序列修饰。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学性质。例如,可以通过将适当的核苷酸改变引入对抗体或其链进行编码的多核苷酸中或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包含例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终抗体,条件是最终构建体具有期望特性(例如,与一种或多种Fzd受体结合的高亲和力)。氨基酸变化还可以改变抗体的翻译后过程,如改变糖基化位点的数量或位置。上文针对本发明的多肽描述的变化和修饰中的任何变化和修饰可以包含在本发明的抗体中。

[0141] 本公开提供了本文公开的抗体和其抗原结合片段的变体。在某些实施例中,此类变体抗体或抗原结合片段或其CDR与一种或多种Fzd受体的结合为相对于本文具体所示的抗体序列与一种或多种Fzd受体的结合的至少约50%、至少约70%以及在某些实施例中至少约90%。在另外的实施例中,此类变体抗体或抗原结合片段或其CDR以比本文所示的抗体更大的亲和力与一种或多种Fzd受体结合,例如,其结合定量地为相对于本文具体所示的抗体序列的结合的至少约105%、106%、107%、108%、109%或110%。

[0142] 在特定实施例中,抗体或其抗原结合片段(例如,Fab、scFv、VHH或sdAb或Wnt替代物)可以包括:a)重链可变区,所述重链可变区包括:i.氨基酸序列与本文所述的所选抗体的重链CDR1区相同的CDR1区;ii.氨基酸序列与所选抗体的重链CDR2区相同的CDR2区;和

iii.氨基酸序列与所选抗体的重链CDR3区相同的CDR3区;和/或b)轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括:i.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR1区相同的CDR1区;ii.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR2区相同的CDR2区;和iii.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR3区相同的CDR3区;其中抗体特异性结合所选靶标(例如,一种或多种Fzd受体)。在另外的实施例中,所述抗体或其抗原结合片段是变体抗体或其抗原结合片段,其中除了VH和VL区的CDR区中的至多8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代之外,所述变体包括与所选抗体相同的重链和轻链。在这方面,在所选抗体的CDR区中可以存在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个氨基酸取代,或者在某些实施例中,可以存在9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代。取代可以在VH和/或VL区中的CDR中。(参见例如Muller,1998,《结构(Structure)》6:1153-1167)。

[0143] 在特定实施例中,主题抗体或其抗原结合片段(例如,Fab、scFv、VHH或sdAb或Wnt替代物)可以具有:a)重链可变区,所述重链可变区具有与本文所述的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的重链可变区具有至少80%同一性、至少95%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或至少98%同一性或99%同一性的氨基酸序列;和/或b)轻链可变区,所述轻链可变区具有与本文所述的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的轻链可变区具有至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或至少98%同一性或99%同一性的氨基酸序列。其说明性抗原结合片段的氨基酸序列在SEQ ID NO:1-65中示出。

[0144] 在特定实施例中,抗体或其抗原结合片段(例如,Fab、scFv、VHH或sdAb或Wnt替代物)可以包括表1A中针对任何特定抗体鉴定的CDR中的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个或六个CDR。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段包括:CDRH1,其包括SEQ ID NO:72-312或1327-1347中的任一个或由其组成;CDRH2,其包括SEQ ID NO:313-574或1348-1360中的任一个或由其组成;CDRH3,其包括SEQ ID NO:575-930、1361-1387或1436-1443中的任一个或由其组成;CDRL1,其包括SEQ ID NO:931-1060或1388-1406中的任一个或由其组成;CDRL2,其包括SEQ ID NO:1061-1158或1407-1419中的任一个或由其组成;和/或CDRL3,其包括SEQ ID NO:1159-1326、1420-1435或1444-1453中的任一个或由其组成。

[0145] 多肽与另一种多肽具有一定的“序列同一性”百分比,这意味着在进行比对时,当比较两个序列时,氨基酸的百分比是相同的。序列相似性可以通过多种不同的方式来确定。为了确定序列同一性,可以使用包含可通过万维网ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/获得的BLAST在内的方法和计算机程序来比对序列。另一种比对算法是FASTA,可从牛津分子集团有限公司(Oxford Molecular Group,Inc.)的全资子公司、来自美国威斯康星州麦迪逊市(Madison,Wis.,USA)的遗传学计算机集团(Genetics Computing Group)(GCG)的软件包中获得。以下中描述了用于比对的其它技术:《酶学方法(Methods in Enzymology)》,第266卷:用于大分子序列分析的计算机方法(Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis)(1996),Doolittle编,学术出版社有限公司(Academic Press,Inc.),美国加利福尼亚州圣地亚哥哈考特布瑞斯公司(Harcourt Brace&Co.,San Diego,Calif.,USA)的分公司。特别关注了允许序列中有空位的比对程序。Smith-Waterman是允许序列比对中有空位的一种类型的算法。参见《(分子生物学方法(Meth.Mol.Biol.)》70:173-187(1997)。而且,可以利用使用Needleman和Wunsch比对方法的GAP程序来比对序列。参见《分

子生物学杂志》48:443-453(1970)

[0146] 关注了使用Smith和Waterman的局部同源性算法(《应用数学进展(Advances in Applied Mathematics)》2:482-489(1981))来确定序列同一性的BestFit程序。空位生成罚分的范围通常将为1到5,经常为2到4并且在许多实施例中将为3。空位生成罚分的范围通常将为0.01到0.20并且在许多情况下将为0.10。程序具有由输入以进行比较的序列确定的默认参数。优选地,序列同一性是使用由程序确定的默认参数来确定的。此程序也可从来自美国威斯康星州麦迪逊市的遗传学计算集团(GCG)的软件包获得。

[0147] 关注的另一个程序是FastDB算法。以下中描述了FastDB:序列比较和分析的当前方法(Current Methods in Sequence Comparison and Analysis),《大分子测序与合成所选方法与应用(Macromolecule Sequencing and Synthesis,Selected Methods and Applications)》,第127-149页,1988,Alan R.Liss有限公司(Alan R.Liss,Inc.)。基于以下参数通过FastDB来计算序列同一性百分比:不匹配罚分:1.00;空位罚分:1.00;空位大小罚分:0.33;以及连接罚分:30.0。

[0148] 在特定实施例中,抗体可以包括:a)重链可变区,所述重链可变区包括:i.氨基酸序列与本文所述的所选抗体的重链CDR1区相同的CDR1区;ii.氨基酸序列与所选抗体的重链CDR2区相同的CDR2区;和iii.氨基酸序列与所选抗体的重链CDR3区相同的CDR3区;b)轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括:i.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR1区相同的CDR1区;ii.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR2区相同的CDR2区;和iii.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR3区相同的CDR3区;其中所述抗体特异性结合所选靶标(例如,如Fzd1等Fzd受体)。在另外的实施例中,抗体或其抗原结合片段是变体抗体,其中除了VH和VL区的CDR区中的至多8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代之外,所述变体包括与所选抗体相同的重链和轻链。在这方面,在所选抗体的CDR区中可以存在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个氨基酸取代,或者在某些实施例中,可以存在9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代。取代可以在VH和/或VL区中的CDR中。(参见例如Muller,1998,《结构》6:1153-1167)。

[0149] 代表性多肽(例如,本文提供的变体Fzd特异性抗体,例如,具有本文提供的抗原结合片段的抗体蛋白)的三维结构的确定可以通过常规方法进行,使得例如,利用所选的天然或非天然氨基酸进行的一个或多个氨基酸的取代、添加、缺失或插入可以出于确定如此衍生的结构变体是否保留当前公开的物种的空间填充性质的目的来虚拟地建模。参见例如Donate等人,1994《蛋白质科学(Prot.Sci.)》3:2378;Bradley等人,《科学》309:1868-1871(2005);Schueler-Furman等人,《科学》310:638(2005);Dietz等人,《美国国家科学院院刊》103:1244(2006);Dodson等人,《自然》450:176(2007);Qian等人,《自然》450:259(2007);Raman等人《科学》327:1014-1018(2010)。可以用于这些和相关实施例(如用于本文提供的其Fzd特异性抗体抗原结合结构域的合理设计)的计算机算法的一些另外非限制性实例包含VMD,其是用于使用3-D图形和内置脚本显示、动画化并分析大生物分子系统的分子可视化程序,(参见伊利诺伊大学厄巴纳-香槟分校的理论和计算生物物理小组(the Theoretical and Computational Biophysics Group,University of Illinois at Urbana-Champagne)的网站ks.uiuc.edu/Research/vmd/。许多其它计算机程序是本领域已知的并且是技术人员可获得的,并且允许从能量最小化的构象的空间填充模型(范德华半

径)确定原子尺寸;GRID,其试图确定对不同化学基团具有高亲和力,从而增强结合的区域;蒙特卡洛(Monte Carlo)搜索,其计算数学比对;以及CHARMM(Brooks等人(1983)《计算化学杂志(J.Comput.Chem.)》4:187-217)和AMBER(Weiner等人(1981)《计算化学杂志》106:765),其评定力场计算和分析(还参见Eisenfield等人(1991)《美国生理学杂志(Am.J.Physiol.)》261:C376-386;Lybrand(1991)《比利时制药学杂志(J.Pharm.Belg.)》46:49-54;Froimowitz(1990)《生物技术(Biotechniques)》8:640-644;Burbam等人(1990)《蛋白质(Proteins)》7:99-111;Pedersen(1985)《环境健康展望(Environ.Health Perspect.)》61:185-190;以及Kini等人(1991)《生物分子结构与动力学杂志(J.Biomol.Struct.Dyn.)》9:475-488)。各种合适的计算计算机程序也可以商购自例如Schrödinger(德国慕尼黑(Munich,Germany))。

[0150] 在特定实施例中,本公开内容提供了在表3中描述的区域处与一种或多种Fzd受体的区域结合的抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,其与LRP6的包括氨基酸残基637-878或由其组成的区域结合,其中氨基酸序列和编号与实例中描述的一致。在某些实施例中,其与LRP6的包括氨基酸637-878的区域内的表位结合。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段在表3中公开的任何或所有接触点处与LRP6接触。在一个实施例中,LRP6上的核心相互作用位点或表位(Lrp6E3E4与VHH26之间的原子间距离小于或等于5.0 Å)包含:LRP6的Arg639、Ala640、Lys622、Glu663、Ile681、Ser682、Lys684、Asp705、Tyr706、Glu708、Thr724、Gly725、Arg751、Try767、Gly768、Gly769、Arg792、Leu810、Asp811、His834、Phe836、Trp850、Ser851、Arg853、Asp874、Tyr875和Met877。在另一个实施例中,核心相互作用位点(Lrp6E3E4与VHH36之间的原子间距离小于或等于5.0 Å)包含:LRP6的Glu663、Ser665、Ile681、Tyr706、Glu708、Thr724、Ser749、Arg751、Trp767、Gly768、Arg792、Leu810、Asn813、Pro833、His834、Phe836、Trp850、Ser851、Arg853、Asp874、Try875和Met877。

[0151] 本公开还提供了在特定接触点与一种或多种卷曲蛋白受体结合的抗体和其抗原结合片段,所述特定接触点包含指示了用于结合各种抗Fzd抗体或其片段的接触点的具体组的表3中公开的那些中的任一个。

[0152] 在本发明的另一个实施例中,抗Fzd抗体和其人源化形式衍生自兔单克隆抗体,并且具体地使用RabMAb®技术产生。这些抗体是有利的,因为它们需要最少的序列修饰,从而有助于在使用突变谱系指导的(MLG)人源化技术进行人源化后保留功能性质(参见例如美国专利第7,462,697号)。因此,用于制备本公开的抗Fzd抗体的说明性方法包含例如在美国专利5,675,063和7,429,487中描述的RabMab®兔单克隆抗体技术。在这方面,在某些实施例中,本公开的抗Fzd抗体在兔中产生。在特定实施例中,将能够与兔脾细胞融合的兔衍生的永生B淋巴细胞用于产生杂交细胞,所述杂交细胞产生抗体。永生B淋巴细胞不以可检测地的方式表达内源性免疫球蛋白重链,并且在某些实施例中可以含有改变的免疫球蛋白重链编码基因。

[0153] 组合物

[0154] 还公开了药物组合物,所述药物组合物包括本文所描述的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)以及一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。在特定实施例中,所述药物组合物进一步包括一种或多种Wnt多肽或Norrin多肽。

[0155] 在另外的实施例,还公开了药物组合物,所述药物组合物包括多核苷酸以及一种

或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂,所述多核苷酸包括核酸序列,所述核酸序列对本文所描述的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码。在特定实施例中,药物组合物进一步包括一种或多种多核苷,所述一种或多种多核苷酸包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。在某些实施例中,对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于同一多核苷酸中。

[0156] 在另外的实施例,还公开了药物组合物,所述药物组合物包括表达载体(例如,病毒载体)以及一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂,所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括核酸序列,所述核酸序列对本文所描述的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码。在特定实施例中,药物组合物进一步包括表达载体(例如,病毒载体),所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于同一多核苷酸(例如,表达盒)中。

[0157] 本发明进一步设想了包括细胞和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物,所述细胞包括表达载体,所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括与对本文所描述的抗Fzd抗体和其抗原结合片段进行编码的核酸操作性地连接的启动子。在特定实施例中,药物组合物进一步包括细胞,所述细胞包括表达载体,所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括与对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列操作性地连接的启动子。在某些实施例中,对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于同一多核苷酸(例如,表达盒)中和/或同一细胞中。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0158] 本公开设想了药物组合物,所述药物组合物包括作为第一活性剂的用于递送抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)的第一分子和用于递送Wnt多肽或Norrin多肽的第二分子。第一分子和第二分子可以是相同类型的分子或不同类型的分子。例如,在某些实施方案中,第一分子和第二分子可以各自独立地选自以下类型的分子:多肽、有机小分子、对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸(任选地,DNA或mRNA,任选地,经修饰的RNA)、包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的载体(任选地,表达载体或病毒载体)以及包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的细胞(任选地,表达盒)。

[0159] 单独的或组合的主题分子可以与可用于制备通常安全、无毒且理想的配制物的药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂和试剂进行组合,并且包含可接受以供哺乳动物例如人或灵长类动物使用的赋形剂。此类赋形剂可以是固体、液体、半固体或在气雾组合物的情况下为气态的。此类载剂、稀释剂和赋形剂的实例包含但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。补充性活性化合物也可以并入配制物中。用于配制物的溶液或悬浮液可以包含:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它

合成溶剂;抗菌化合物,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合化合物,如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;清洁剂,如用于防止聚合的吐温20;以及用于调节渗透压的化合物,如氯化钠或右旋糖。可以用如盐酸或氢氧化钠等酸或碱调整pH。在特定实施例中,药物组合物是无菌的。

[0160] 药物组合物可以进一步包含无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,适合的载剂包含生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在某些情况下,组合物是无菌的,并且应该是流体以允许被抽吸到注射器中并使用注射器提供给受试者。在某些实施例中,组合物在制造和储存的条件下是稳定的,并且抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而保存。载剂可以是例如溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及其适合的混合物。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散体的情况下维持所需的颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持恰当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现防止微生物的作用。在许多情况下,组合物中包含等渗剂(例如糖、如甘露醇、山梨醇等多元醇、氯化钠)是优选的。可以通过在组合物中包含延缓吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现内部组合物的延长吸收。

[0161] 无菌溶液可以通过根据需要将所需量的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(或编码多核苷酸或包含其的细胞)与上文所列举的成分中的一种成分或其组合并入适当的溶剂中、随后过滤灭菌来制备。通常,通过将活性化合物并入无菌媒剂中来制备分散液,所述无菌媒剂含有基础分散介质和来自上文所列举的那些成分的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法为真空干燥和冷冻干燥,所述方法从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何另外所希望成分的粉末。

[0162] 在一个实施例中,药物组合物与保护抗体或其抗原结合片段免于从体内快速消除的载剂一起制备,如控释配制物,包含植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这种配制物的方法对于本领域技术人员而言将是显而易见的。材料也可以商购获得。脂质体悬浮液也可以用作药学上可接受的载剂。这些脂质体悬浮液可以根据本领域技术人员已知的方法制备。

[0163] 以易于施用和实现剂量均匀性的剂量单位形式来配制药物组合物可以是有利的。如本文所使用的,剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位;每个单位含有预定量的经计算结合所需药物载剂可产生所期望治疗作用的活性抗体或其抗原结合片段。剂量单位形式的规格由抗体或其抗原结合片段的独特特性和待实现的特定治疗效果以及本领域中在混配这种活性抗体或其抗原结合片段以用于治疗个体时固有的局限性决定并且直接依赖于此。

[0164] 药物组合物可以与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器(例如,注射器,例如载药注射器)中。

[0165] 本发明的药物组合物涵盖任何药学上可接受的盐、酯或这种酯的盐、或在施用于包括人的动物时能够(直接或间接)提供生物活性抗体或其抗原结合片段的任何其它化合物。

[0166] 本发明包含本文所述的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)的药学上

可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的生理学上和药学上可接受的盐:即,保留了母体化合物的期望生物学活性并且不赋予其不期望的毒理作用的盐。各种药学上可接受的盐是本领域已知的并且描述于例如以下中:《雷明顿药学大全(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第17版,Alfonso R.Gennaro(编),美国宾夕法尼亚州伊斯顿Mark出版公司(Mark Publishing Company,Easton,PA,USA),1985(以及其最近的版本);《制药技术百科全书(Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology)》,第3版,James Swarbrick(编),美国纽约州美国英富曼卫生保健(有限公司)(Informa Healthcare USA(Inc.),NY,USA),2007;以及《药物科学杂志(J.Pharm.Sci.)》66:2(1977)。而且,有关适合的盐的综述,参见Stahl和Wermuth的《“药用盐手册:性质、选择和使用(Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use)”》(Wiley-VCH,2002)。

[0167] 用如碱金属和碱土金属或有机胺等金属或胺形成药学上可接受的碱加成盐。用作阳离子的金属包括钠、钾、镁、钙等。胺包括N-N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、二环己胺、乙二胺、N-甲基葡糖胺和普鲁卡因(参见例如Berge等人,“药用盐(Pharmaceutical Salts)”、《药物科学杂志(J.Pharma Sci)》,1977,66,119)。酸性化合物的碱加成盐是通过使游离酸形式与足量的期望的碱相接触以常规方式产生盐来制备的。游离酸形式可以通过使盐形式与酸相接触并且以常规方式分离游离酸来再生。游离酸形式在某些物理性质方面如在极性溶剂中的溶解度与其各自的盐形式略有不同,但是出于本发明的目的,盐等同于其各自的游离酸。

[0168] 在一些实施例中,本文所提供的药物组合物包括与药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂混合的治疗有效量的本文所描述的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物),所述药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂例如盐水、磷酸盐缓冲盐水、磷酸盐和氨基酸、聚合物、多元醇、糖、缓冲剂、防腐剂和其它蛋白质。示例性氨基酸、聚合物和糖等是辛基苯氧基聚乙氧基乙醇化合物、聚乙二醇单硬脂酸酯化合物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、蔗糖、果糖、右旋糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露醇、葡聚糖、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、木糖醇、乳糖、海藻糖、牛或人血清白蛋白、柠檬酸盐、乙酸盐、林格氏和汉克氏(Hank's)溶液、半胱氨酸、精氨酸、肉毒碱、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯和乙二醇。优选地,此配制物在4℃下在至少六个月内是稳定的。

[0169] 在一些实施例中,本文所提供的药物组合物包括缓冲液,如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或磷酸钠/硫酸钠、tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、无菌水和普通技术人员已知的其它缓冲液,如Good等人(1966)《生物化学》5:467所描述的那些缓冲液。所述缓冲液的pH值可以处于6.5到7.75的范围内,优选地7到7.5,并且最优选地7.2到7.4。

[0170] 使用方法

[0171] 本公开还提供了用于使用本文公开的Fzd特异性抗体、其抗原结合片段(例如,Wnt替代物),例如来调节Wnt信号传导通路(例如,增加或减少Wnt信号传导)的方法,以及用于施用本文在多种治疗设置中公开的Fzd特异性抗体、其抗原结合片段和Wnt替代物的方法。本文提供了使用结合一种或多种Fzd受体的抗体或其抗原结合片段的治疗方法。在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段被提供给患有涉及不适当或失调的Wnt信号传导(例如,Wnt信号传导增加或减少)的疾病的受试者。

[0172] 增加Wnt通路信号传导和相关治疗方法

[0173] 在某些实施例中,抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)可以用于增加组织或细胞中的Wnt信号传导。因此,在一些方面,本发明提供了一种用于增加组织或细胞中的Wnt信号传导或增强组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与本文公开的有效量的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)接触,其中抗Fzd抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路激动剂。在一些实施例中,接触发生在体外、离体或体内。在特定实施例中,细胞是培养细胞,并且接触发生在体外。在某些实施例中,所述方法包括进一步使组织或细胞与一种或多种Wnt多肽或Norrin多肽接触。

[0174] 在相关方面,本发明提供了一种用于增加组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的包括本发明的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)的多核苷酸接触。在某些实施例中,还使靶组织或靶细胞与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的多核苷酸接触。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。在某些实施例中,对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于同一多核苷酸中。

[0175] 在相关方面,本发明提供了一种用于增加组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的载体接触,所述载体包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使组织或细胞与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的载体接触。在某些实施例中,载体是表达载体并且可以包括与核酸序列操作性地连接的启动子序列。在特定实施例中,载体是病毒载体。在某些实施例中,对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于同一载体(例如,同一表达盒)中。

[0176] 在相关方面,本发明提供了一种用于增加组织中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织与有效量的细胞接触,所述细胞包括对本发明的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使组织与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的细胞接触。在某些实施例中,对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于同一细胞中。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在某些实施例中,用包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)或Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的表达盒的载体转导细胞。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0177] 抗Fzd抗体和其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)可用于例如通过增加靶细胞、组织或器官中的Wnt信号传导来治疗疾病、病症或病况。因此,在一些方面,本发明提供了一种用于治疗有需要的受试者的疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使受试者与有效量的本公开的组合物接触。在特定实施例中,组合物是药物组合物,所述药物组合物包括以下中的任一种:抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物);包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列的多核苷酸,例如,DNA或mRNA,任选

地,经修饰的mRNA;包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列的载体,例如,表达载体或病毒载体;包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列的细胞,例如,用对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的表达载体或病毒载体进行转导的细胞。在特定实施例中,疾病或病况是病理性疾病或病症或者损伤,例如由伤口引起的损伤。在某些实施例中,伤口可能是另一种治疗性治疗的结果。在某些实施例中,疾病或病况包括受损组织修复、愈合或再生,或者会受益于增加的组织修复、愈合或再生。在一些实施例中,在体内发生接触,即,向受试者施用主题组合物。

[0178] 在某些实施例中,所述方法包括进一步使受试者与药物组合物接触,所述药物组合物包括一种或多种Wnt多肽或Norrin多肽。本公开设想使受试者与用于递送作为第一活性剂的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)的第一分子和用于递送Wnt多肽或Norrin多肽的第二分子接触。第一分子和第二分子可以是相同类型的分子或不同类型的分子。例如,在某些实施方案中,第一分子和第二分子可以各自独立地选自以下类型的分子:多肽、有机小分子、对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸(任选地,DNA或mRNA,任选地,经修饰的RNA)、包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的载体(任选地,表达载体或病毒载体)以及包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的细胞(任选地,表达盒)。

[0179] 在相关方面,本发明提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或者针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的多核苷酸的药物组合物接触,所述多核苷酸包括对本文公开的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使受试者与包括有效量的多核苷酸的药物组合物接触,所述多核苷酸包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。在某些实施例中,对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于同一多核苷酸中。

[0180] 在相关方面,本发明提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或者针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的载体的药物组合物接触,所述载体包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使受试者与包括有效量的载体的药物组合物接触,所述载体包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,载体是表达载体并且可以包括与核酸序列操作性地连接的启动子序列。在特定实施例中,载体是病毒载体。在某些实施例中,对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于同一载体(例如,同一表达盒)中。

[0181] 在相关方面,本发明提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或者针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所

述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的细胞的药物组合物接触,所述细胞包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使受试者与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的细胞接触。在某些实施例中,对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于同一细胞中。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在某些实施例中,用包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)或Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的表达盒的载体转导细胞。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0182] Wnt信号传导在干细胞的发育过程和维持中发挥着关键作用。Wnt信号的重新活化与损伤和疾病后大多数组织的再生和修复相关。预期抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)分子将响应损伤和疾病而提供愈合和组织修复的益处。组织损害和损失的原因包含但不限于老化、变性、遗传性病况、感染和炎症、创伤性损伤、毒素/代谢诱导的毒性、或其它病理性病况。已经显示Wnt信号和Wnt信号的增强子使成年组织驻留干细胞活化。在一些实施例中,施用本发明的化合物以用于治疗患病组织或受损组织、用于组织再生以及用于细胞生长和增殖和/或用于组织工程化。

[0183] 与Wnt通路的突变相关的人类疾病针对治疗和预防疾病中Wnt信号的增强提供了有力证据。临床前的体内和体外研究提供了Wnt信号参与许多疾病病况的另外证据,并且进一步支持将抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)用于各种人类疾病。

[0184] 与Wnt通路的突变相关的人类疾病针对治疗和预防疾病中Wnt信号的增强提供了有力证据。临床前体内和体外研究提供了许多疾病病况中涉及Wnt信号的另外的证据,并且进一步支持将Wnt替代分子用于各种人类疾病。例如,本发明的组合物可以用于促进或增加骨生长或再生、骨移植、骨折愈合、骨质疏松症和骨质疏松性骨折的治疗、脊柱融合、脊髓损伤(包含椎体压缩性骨折)、术前脊柱外科手术优化、矫形装置的骨整合、腱-骨整合、牙齿生长和再生、牙种植、牙周病、颌面重建和颌骨坏死。其也可以用于治疗脱发;增强感觉器官的再生(例如,治疗听力损失,包含内和外听觉毛细胞的再生)、治疗前庭功能减退、治疗黄斑变性、治疗视网膜病变(包含玻璃体视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、其它视网膜变性疾病)、富克斯氏营养不良、其它角膜疾病等;治疗中风、创伤性脑损伤、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、肌肉营养不良、因骨骼肌减少症或恶病质引起的肌肉萎缩以及其它影响血脑屏障的变性或完整性的病况。本发明的组合物还可以用于治疗口腔粘膜炎、治疗短肠综合征、炎性肠病(IBD)(包含克罗恩氏病(CD)和溃疡性结肠炎(UC),具体地是伴有瘘管形成的CD)、其它胃肠道病症;治疗代谢综合征、血脂异常、治疗糖尿病、治疗胰腺炎、外分泌或内分泌胰腺组织受损的病况;需要增强表皮再生的病况(例如表皮伤口愈合)、治疗糖尿病足溃疡、涉及牙齿、指甲或皮肤发育不全等的综合征、其中血管生成是有益的病况;治疗心肌梗塞、冠状动脉疾病、心力衰竭;增强造血细胞的生长(例如增强从骨髓的造血干细胞移植)、动员外周血、治疗免疫缺陷、移植物抗宿主疾病等;治疗急性肾损伤、慢性肾脏疾病;治疗肺部疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺纤维化(包含特发性肺纤维化)、增强肺组织的再生。本发明的组合物还可以用于增强肝细胞再生,例如肝再生、治疗肝硬化、增强肝移植、治疗急性肝功能衰竭、治疗经历丙型肝炎或乙型肝炎病毒感染或抗病毒后药物疗法的慢性肝病、酒精性肝病、酒精性肝炎、伴随脂肪变性或脂肪性肝炎的非酒精性肝病等。本发明的组合物可以

治疗疾病和病症,包含但不限于其中期望再生性细胞生长的病况。

[0185] 涉及Wnt信号传导组分中的功能丧失突变或功能获得突变的人类遗传学显示了支持增强Wnt信号以用于骨生长的有力证据。其中期望增强的骨生长的病况可以包含但不限于骨折、移植、在假体装置周围向内生长、骨质疏松症、骨质疏松性骨折、脊柱融合、椎体压缩性骨折、脊柱外科手术的术前优化、颌骨坏死、牙种植、牙周病、颌面重建等。抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)增强和促进了对促进骨再生至关重要的Wnt信号。用于使骨组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。在一些实施例中,使骨髓细胞暴露于本发明的分子,从而使得所述骨髓内的干细胞活化。

[0186] 在一些实施例中,通过使响应性细胞群(例如,骨髓、骨祖细胞、骨干细胞等)与有效剂量的本文公开的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)接触来增强骨再生。用于骨组织再生的方法受益于本文公开的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)的施用,所述施用可以是全身性的或局部化的。在一些这种实施例中,在体内执行接触。在其它这种实施例中,离体地执行接触。分子可以例如通过加载到任选地可生物降解的基质上而定位到作用位点,并且任选地提供活性剂的缓释。基质载剂包含但不限于可吸收的胶原海绵、陶瓷、水凝胶、高分子微球、纳米颗粒、骨水泥等。

[0187] 包括本文公开的一种或多种抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)的组合物可以用于体内治疗骨骼组织缺陷。“骨骼组织缺陷”意指骨骼或其它骨骼结缔组织在期望恢复骨骼或结缔组织的任何位点处的缺陷,无论缺陷是如何引起的,例如无论是手术干预、肿瘤切除、溃疡、植入、骨折还是其它创伤性或变性病况的结果。本发明的组合物可以用作用于恢复结缔组织的软骨功能、用于修复软骨组织的缺损或损伤的方案的一部分,所述软骨组织的缺损或损伤如变性磨损和关节炎、组织创伤、半月板撕裂移位、半月板切除、由韧带撕裂、关节不齐、骨折或遗传性疾病引起的关节脱位。

[0188] 抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)也可以用于治疗牙周病。牙周病是牙齿脱落的主要原因并且与多种全身性病况有关。在一些实施例中,通过接触响应性细胞群来增强牙齿或下层骨再生。在一些这种实施例中,在体内执行接触。在其它这种实施例中,离体地执行接触,随后植入活化的干细胞或祖细胞。分子可以例如通过加载到任选地可生物降解的基质上而定位到作用位点,并且任选地提供活性剂的缓释。基质载剂包含但不限于可吸收的胶原海绵、陶瓷、水凝胶、骨水泥、聚合物微球、纳米颗粒等。

[0189] 研究已经表明,Wnt信号传导和R-脊椎蛋白的生物学能够在损伤、老化或变性后促进内耳中的感觉毛细胞再生。听力丧失或前庭功能减退所涉及的内耳中感觉毛细胞的损失也可以受益于本发明的组合物。在内耳中,听觉器官容纳将声音振动转化为电脉冲所需的机械敏感毛细胞。包括半规管(SSC)、椭圆囊和球囊的前庭器官还含有感觉毛细胞,以检测头部位置和头部运动。本发明的组合物可以例如在输注中使用;在基质或其它药性持久的系统中使用;或在增强听觉再生的其它耳局部应用中使用。

[0190] 抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)也可以用于视网膜组织的再生。在成年哺乳动物视网膜中,穆勒神经胶质细胞(Muller glia cell)能够例如在体内神经毒性损伤后之后使视网膜细胞(包含光感受器)再生。Wnt信号传导和Wnt信号的增强子可以促进穆勒神经胶质源视网膜祖细胞在损害后或在变性期间增殖。本发明的组合物还可以用于使眼中的组织和其它细胞类型再生。例如,年龄相关性黄斑变性(AMD)、其它视网膜变性疾

病、角膜病、富克斯氏营养不良、玻璃体视网膜病变、遗传性疾病等可以受益于本发明的组合物。AMD的特征在于渐进性降低的中心视觉和视敏度。富克斯氏营养不良症的特征在于角膜内皮细胞逐渐丧失。Wnt信号和Wnt信号的增强可以促进眼部组织中角膜内皮、视网膜上皮等的再生。在其它实施例中,本发明的组合物可以例如在输注中使用;在基质或其它药性持久的系统中使用;或在用于视网膜再生和黄斑变性的治疗的其它眼局部应用中。

[0191] 已经通过谱系示踪研究鉴别出用于肝细胞的稳态更新的特定增殖细胞群,例如中心周围区域的Axin2阳性细胞。谱系示踪研究还鉴别出了另外可能的肝脏祖细胞,包含但不限于Lgr阳性细胞。包含Lgr5阳性细胞和Axin2阳性细胞在内的自我更新肝细胞和其它可能祖细胞群被鉴别为能够在损伤后响应于Wnt信号和/或R-脊椎蛋白进行再生。急性肝损伤和衰竭以及慢性肝病的许多临床前模型显示出肝细胞的恢复和再生受益于增强Wnt信号。本发明的组合物可以用于:治疗急性肝衰竭、急性酒精性肝损伤;治疗经历丙型肝炎或乙型肝炎病毒感染或抗病毒后药物疗法的慢性肝疾病、慢性酒精性肝病、酒精性肝炎、非酒精性脂肪肝疾病和非酒精性脂肪性肝炎(NASH);治疗肝硬化和所有原因的严重慢性肝病;以及增强肝细胞的再生。用于使肝组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。这些方法包含但不限于全身性施用方法和局部化施用方法,例如通过注射到肝组织中、通过注射到通向肝脏的静脉或血管中、通过植入缓释配制物等。

[0192] Wnt信号在各种上皮组织的再生中发挥着重要作用。各种表皮病况受益于用本发明的化合物进行的治疗。当附在胃肠道上的快速分开的上皮细胞破裂从而使粘膜组织易于溃疡和感染时,发生粘膜炎。上皮层(epithelial lining)的覆盖口腔的部分,被称为口腔粘膜,是身体最敏感的部位之一,并且特别容易受到化疗和放射的伤害。口腔粘膜炎可能是癌症治疗特别是化疗和放射中最常见的使人衰弱的并发症。另外,本发明的组合物还可以有益于治疗短肠综合征、炎性肠病(IBD)或其它胃肠病症。其它表皮病况包含表皮伤口愈合、糖尿病足溃疡、涉及牙齿、指甲或皮肤发育不全的综合征等。本发明的分子可以用于所有这些病况,其中再生性细胞与本发明的化合物接触。用于使上皮组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。接触可以是例如局部的,包含皮内、皮下,以施加在靶向位点等处的凝胶、洗剂、乳膏等形式。

[0193] 除皮肤和胃肠道外,Wnt信号以及Wnt信号的增强和促进还在临床前模型中在包含胰腺、肾和肺在内的组织的修复和再生中发挥着重要作用。抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)可以有益于涉及外分泌和内分泌胰腺、肾或肺的各种疾病。抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)可以用于治疗代谢综合征;治疗糖尿病;治疗急性或慢性胰腺炎、外分泌胰腺功能不全;治疗急性肾损伤、慢性肾病;治疗肺病包含但不限于慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化、导致肺上皮组织缺失的其它病况。用于使这些组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。

[0194] 与经由其它发育因子进行的信号传导协调的表皮Wnt信号传导对成人毛囊再生至关重要。脱发是常见问题,并且雄激素性脱发,通常称为男性型秃发,是男性最常见的脱发形式。在一些实施例中,通过使响应性细胞群与本发明的分子接触来增强毛囊再生。在一些这种实施例中,在体内执行接触。在其它这种实施例中,离体地执行接触。分子可以定位到作用位点处,例如外用洗剂、凝胶、乳膏等。

[0195] 可以用抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)治疗中风、创伤性脑损伤、

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

[0196] Wnt信号还在血管生成中发挥作用。抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如Wnt替代物)可能有益于血管生成有益的疾病,心肌梗塞,冠心病,心力衰竭,糖尿病性视网膜病等的治疗以及遗传性疾病的疾病。用于使这些组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。

[0197] 在某些实施例中,本发明的方法促进组织再生,例如在经受损害或者组织或细胞减少或损耗的组织中。损耗或损害可以是导致细胞数量减少的任何事物,包含疾病或损伤。例如,事故、自身免疫病症、治疗副作用或疾病况态可能会构成创伤。组织再生增加了组织内的细胞数量,并且优选地使组织的细胞之间能够重新建立连接,并且更优选地使组织能够重新获得功能。

[0198] 减少Wnt通路信号传导和相关治疗方法

[0199] 在某些实施例中,抗Fzd抗体或其抗原结合片段可以用于减少或抑制组织或细胞中的Wnt信号传导。因此,在一些方面,本发明提供了一种用于减少组织或细胞中的Wnt信号传导或抑制组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的本文公开的抗Fzd抗体或其抗原结合片段接触,其中抗Fzd抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路拮抗剂或抑制剂。在一些实施例中,接触发生在体外、离体或体内。在特定实施例中,细胞是培养细胞,并且接触发生在体外。

[0200] 在相关方面,本发明提供了一种用于减少或抑制组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的包括本发明的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的多核苷酸接触,其中抗Fzd抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路拮抗剂或抑制剂。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。

[0201] 在相关方面,本发明提供了一种用于减少或抑制组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的载体接触,所述载体包括对抗Fzd抗体或抗原结合片段进行编码的核酸序列,其中抗Fzd抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路拮抗剂或抑制剂。在某些实施例中,载体是表达载体并且可以包括与核酸序列操作性地连接的启动子序列。在特定实施例中,载体是病毒载体。

[0202] 在相关方面,本发明提供了一种用于减少或抑制组织中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织与有效量的细胞接触,所述细胞包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的核酸序列,其中抗Fzd抗体或其抗原结合片段是Wnt信号通路拮抗剂或抑制剂。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在某些实施例中,用包

括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的表达盒的载体转导细胞,其中抗Fzd抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路拮抗剂或抑制剂。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0203] 其中抗Fzd抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路拮抗剂或抑制剂的抗Fzd抗体和其抗原结合片段可以用于例如通过降低或抑制细胞、组织或器官中的Wnt信号传导来治疗疾病、病症或病况。因此,在一些方面,本发明提供了一种用于治疗有需要的受试者的疾病或病况(例如,与Wnt信号传导增加或失调相关的疾病或病症或者针对其减少Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使受试者与有效量的组合物接触,所述组合物包括抗Fzd抗体或其抗原结合片段,其中抗Fzd抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路拮抗剂或抑制剂。在特定实施例中,组合物是药物组合物,所述药物组合物包括以下中的任一种:抗Fzd抗体或其抗原结合片段;包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的核酸序列的多核苷酸,例如,DNA或mRNA,任选地,经修饰的mRNA;包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的核酸序列的载体,例如,表达载体或病毒载体;或包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的核酸序列的细胞,例如,用对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的表达载体或病毒载体转导的细胞。在特定实施例中,疾病或病况是病理性疾病或病症或者损伤。在一些实施例中,在体内发生接触,即,向受试者施用主题组合物。

[0204] 在相关方面,本发明提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导增加相关的疾病或病症或者针对其减少Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的多核苷酸的药物组合物接触,所述多核苷酸包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的核酸序列,其中抗体或其抗原结合片段是本文公开的Wnt信号传导通路拮抗剂或抑制剂。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。

[0205] 在相关方面,本发明提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导增加相关的疾病或病症或者针对其减少Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的载体的药物组合物接触,所述载体包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的核酸序列,其中抗体或其抗原结合片段是Wnt信号通路拮抗剂或抑制剂。在某些实施例中,载体是表达载体并且可以包括与核酸序列操作性地连接的启动子序列。在特定实施例中,载体是病毒载体。

[0206] 在相关方面,本发明提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导增加相关的疾病或病症或者针对其减少Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的细胞的药物组合物接触,所述细胞包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的核酸序列,其中抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路拮抗剂或抑制剂。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在某些实施例中,用包括对抗Fzd抗体或其抗原结合片段进行编码的表达盒的载体对细胞进行转导。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0207] 在某些实施例中,通过向受试者提供有效量的抗Fzd抗体或其抗原结合片段来治疗或预防有此需要的受试者的疾病或病症的方法可以用于治疗癌症或肿瘤,例如实体瘤或

液体瘤,其中抗体或抗原结合片段其片段是Wnt信号传导通路的抑制剂。可以治疗的癌症和肿瘤的实例包含但不限于:结肠肿瘤(例如,结肠癌或腺瘤)、胃肿瘤(例如,胃癌)、小肠肿瘤(例如,小肠癌)、肝肿瘤(例如,肝癌)、胰腺肿瘤(例如,胰腺癌)、肺肿瘤(例如,肺癌)、卵巢肿瘤(例如,卵巢癌)、肾肿瘤(例如,肾癌)、脑肿瘤(例如,脑癌)、脊髓肿瘤(例如,脊髓癌)、皮肤肿瘤(例如,皮肤癌或黑色素瘤)、头颈肿瘤(例如,头颈癌)、胃肠道肿瘤(例如,胃肠道癌、食道癌、口腔粘膜癌、舌癌、胃癌、肠道癌、结肠癌)、乳腺肿瘤(例如,乳腺癌)、前列腺肿瘤(例如,前列腺癌)、骨肿瘤(例如,骨癌)、血管肿瘤、Wilms肿瘤、白血病/淋巴瘤、软组织肿瘤(例如,软组织肉瘤或滑膜肉瘤)和转移性癌症等。

[0208] 在某些实施例中,通过向受试者提供有效量的抗Fzd抗体或其抗原结合片段来治疗或预防有此需要的受试者的疾病或病症的方法可以用于治疗变性疾病,其中所述抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路的抑制剂。可以治疗的变性疾病的实例包含但不限于骨关节炎、软骨变性、运动损伤(例如,软骨损伤)、视网膜病、动脉粥样硬化、神经变性病症和血管病症,例如,血管炎、血管生成异常的病况。

[0209] 在某些实施例中,通过向受试者提供有效量的抗Fzd抗体或其抗原结合片段来治疗或预防有此需要的受试者的疾病或病症的方法可以用于治疗纤维化,其中所述抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路的抑制剂。可以治疗的纤维化的实例包含但不限于肺纤维化(包含但不限于COPD和特发性肺纤维化)、肾纤维化(例如,终末期肾衰竭)、肝纤维化、先天性肝贮积病和心脏纤维化。

[0210] 在某些实施例中,通过向受试者提供有效量的抗Fzd抗体或其抗原结合片段来治疗或预防有此需要的受试者的疾病或病症的方法可以用于治疗心力衰竭(例如,充血性心力衰竭、收缩性心力衰竭、射血分数保留的心力衰竭)或冠状动脉疾病,其中抗体或其抗原结合片段是Wnt信号传导通路的抑制剂。

[0211] 在某些实施例中,通过向受试者提供有效量的抗Fzd抗体或其抗原结合片段来治疗或预防有此需要的受试者的疾病或病症的方法可以用于治疗异位骨化、骨硬化病或先天性高骨量病症,其中抗体或其抗原结合片段Wnt信号传导通路的抑制剂。

[0212] 如本文所使用的,术语“施用”或“引入”或“提供”是指向细胞、向受试者的细胞、组织和/或器官或者向受试者递送组合物。这种施用或引入可以在体内、在体外或离体地发生。

[0213] 在特定实施例中,药物组合物是肠胃外施用的,例如,静脉内、口服、直肠或通过注射施用。在一些实施例中,局部(locally),例如局部地(topically)或肌内地施用药物组合物。在一些实施例中,组合物施用于靶组织,例如骨、关节、耳组织、眼组织、胃肠道、皮肤、伤口部位或脊髓。可以在体内或离体地实践本发明的方法。在一些实施例中,离体地执行靶细胞或靶组织与组织特异性Wnt信号增强分子的接触,随后将细胞或组织例如活化的干细胞或祖细胞植入到受试者体内。技术人员可以基于正在治疗的疾病或病症确定适合的施用位点和施用途径。

[0214] 剂量和剂量方案可以取决于医师容易确定的各种因素,如疾病或病症的性质、受试者的特性和受试者的病史。在特定实施例中,向受试者施用或提供的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代物)的量的范围为受试者体重的约0.01mg/kg到约50mg/kg、0.1mg/kg到约500mg/kg或约0.1mg/kg到约50mg/kg。

[0215] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等在本文中用于通常意指获得期望的药理学和/或生理学效应。效果在完全或部分地预防疾病或其症状方面可以是预防性的,例如降低受试者体内发生疾病或其症状的可能性,和/或在部分或完全治愈疾病和/或由疾病引起的不良反应方面可以是治疗性的。如本文所使用的,“治疗”覆盖了对哺乳动物的疾病的任何治疗,并且包含:(a)预防疾病在可能倾向于患有疾病但尚未被诊断为患有疾病的受试者身上发生;(b)抑制疾病,即,阻止其发展;或(c)减轻疾病,即,使疾病消退。可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用治疗剂(例如,抗Fzd抗体或其抗原结合片段)。特别关注了对发展中的疾病的治疗,其中所述治疗稳定或减少了患者的不期望的临床症状。理想的是,在受影响组织的功能完全丧失之前执行这种治疗。理想的是,将在疾病的症状期期间并且在一些情况下在疾病的症状期之后施用主题治疗。在一些实施例中,主题方法产生了治疗益处,例如预防病症的发展、停止病症的进展、逆转病症的进展等。在一些实施例中,主题方法包括检测到已经达到治疗益处的步骤。本领域内普通技术人员应了解,治疗功效的这种量度将适用于正被修饰的特定疾病,并且应认识到用于测量治疗功效的适当检测方法。

[0216] 促进细胞、组织和类器官的生长和相关方法

[0217] 其它实施例部分涉及本文公开的Wnt替代分子用于例如通过使细胞或组织与任选地与Norrin或Rspondin多肽组合的一种或多种Wnt替代物接触来促进或增强细胞、组织和类器官的生长或增殖的用途。在某些实施例中,所述细胞或组织离体、体外或体内接触。此类方法可以用于产生细胞、组织或类器官以用于治疗用途,例如,将其植入或移植到受试者中。它们也可以用于产生细胞、组织或类器官以供研究使用。Wnt替代分子在非治疗方法,例如体外研究方法中具有广泛的应用。

[0218] 本发明提供了一种用于受损组织(如上述组织)的组织再生的方法,所述方法包括向细胞施用Wnt替代分子。可以将Wnt替代分子直接体内施用到细胞,口服、静脉内或通过本领域已知的其它方法施用到受试者或施用到离体细胞。在将Wnt替代分子施用到离体细胞的一些实施例中,可以在施用Wnt替代分子之前、之后或期间将这些细胞移植入受试者中。

[0219] Wnt信号传导是干细胞培养的关键组成部分。例如,在WO2010/090513、WO2012/014076、Sato等人,2011(《肠胃病学(GASTROENTEROLOGY)》201 1;141:1762-1772)以及Sato等人,2009(《自然》459,262-5)中描述的干细胞培养基。本文公开的Wnt替代分子是用于这些干细胞培养基的Rspondin的适合替代方案,或者可以与Rspondin组合。

[0220] 因此,在一个实施例中,本公开提供了一种用于增强干细胞增殖的方法,所述方法包括使干细胞与本文公开的一种或多种Wnt替代分子接触。在一个实施例中,本公开提供了一种细胞培养基,所述细胞培养基包括一种或多种本文公开的Wnt替代分子。在一些实施例中,细胞培养基可以是通常包括Wnt或Rspondin,但是其中Wnt或Rspondin被本文公开的一种或多种Wnt替代分子(全部或部分)替代或补充的本领域已知的任何细胞培养基。例如,培养基可以是如WO2010/090513、WO2012/014076、Sato等人,2011(《肠胃病学》201 1;141:1762-1772)以及Sato等人,2009(《自然》459,262-5)中描述的培养基,所述文献通过全文引用的方式特此并入。

[0221] 干细胞培养基通常包括另外的生长因子。因此,此方法可以另外包括向干细胞供应生长因子。细胞培养基中常用的生长因子包含表皮生长因子(EGF,(派普泰克

(Peprotech))、转化生长因子-α(TGF-α,派普泰克)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,派普泰克)、脑源性神经营养因子(BDNF,R&D系统)、肝细胞生长因子(HGF)和角质形成细胞生长因子(KGF,派普泰克,也被称为FGF7)。EGF是各种培养的外胚层和中胚层细胞的强效促有丝分裂因子,并且对体内和体外特定细胞以及细胞培养中某些成纤维细胞的分化具有深远的影响。EGF前体以膜结合分子的形式存在,所述膜结合分子通过蛋白水解方式切割以产生刺激细胞的53个氨基酸的肽激素。因此,EGF或其它促有丝分裂生长因子可以供应给干细胞。在干细胞培养期间,可以每两天将促有丝分裂生长因子添加到培养基,同时培养基优选地每四天更新一次。一般地,促有丝分裂因子选自:i)EGF、TGF-α和KGF,ii)EGF、TGF-α和FGF7;iii)EGF、TGF-α和FGF;iv)EGF和KGF;v)EGF和FGF7;vi)EGF和FGF;vii)TGF-α和KGF;viii)TGF-α和FGF7;或ix)TGF-α和FGF。在某些实施例中,本公开包含干细胞培养基,所述干细胞培养基包括例如任选地与本文所述的生长因子中的一种或多种生长因子或其组合进行组合的本文公开的Wnt替代分子。

[0222] 这些增强干细胞增殖的方法可以用于从干细胞中生长出新的类器官和组织,如例如在WO2010/090513、WO2012/014076、Sato等人,201 1(《肠胃病学》2011;141:1762-1772)以及Sato等人,2009(《自然》459,262-5)中描述的。

[0223] 在一些实施例中,Wnt替代分子用于增强干细胞再生。关注的说明性干细胞包含但不限于:肌肉卫星细胞;造血干细胞和由其衍生的祖细胞(美国专利第5,061,620号);神经干细胞(参见Morrison等人(1999)《细胞(Cell)》96:737-749);胚胎干细胞;间充质干细胞;中胚层干细胞;肝干细胞;脂肪组织衍生的干细胞等。

[0224] 诊断和相关方法

[0225] 本发明的其它实施例部分地涉及用于检测表达一种或多种Fzd受体的细胞或组织的存在的诊断应用。因此,本公开提供了检测样品中的一种或多种Fzd受体(如检测表达Fzd1的细胞或组织)的方法。此类方法可以以多种已知的检测形式应用,包含但不限于免疫组织化学(IHC)、免疫细胞化学(ICC)、原位杂交(ISH)、整装原位杂交(WISH)、荧光DNA原位杂交(FISH)、流式细胞术、酶免疫测定法(EIA)和酶联免疫测定法(ELISA)。在特定实施例中,方法包括使例如获自受试者的组织或细胞与本文公开的抗体或其抗原结合片段接触,并且然后确定抗体或其抗原结合片段与组织或细胞的结合量,从而确定组织或细胞中一种或多种Fzd受体的存在或其数量。

[0226] ISH是一种杂交类型,其使用标记的互补DNA或RNA链(即,主要结合剂)将特定DNA或RNA序列定位在细胞或组织(原位)的一部分或区段中,或者如果组织是足够小,则定位在整个组织中(整装ISH)。本领域普通技术人员将认识到,这与使用抗体作为主要结合剂将蛋白质定位在组织切片中的免疫组织化学不同。DNA ISH可以针对基因组DNA用于确定染色体的结构。荧光DNA ISH(FISH)可以例如用于医学诊断以评定染色体完整性。RNA ISH(杂交组织化学)用于测量和定位组织切片或整装中的mRNA和其它转录物。

[0227] 在各种实施例中,本文所述的抗体和其抗原结合片段与可以直接或间接检测的可检测标记缀合。在这方面,抗体“缀合物”是指与可检测标记共价连接的抗Fzd抗体或其抗原结合片段。在本发明中,DNA探针、RNA探针、单克隆抗体、其抗原结合片段和其抗体衍生物,如单链可变片段抗体或表位标记的抗体可以全部与可检测标记共价连接。在“直接检测”中,仅使用一种可检测抗体,即,第一可检测抗体。因此,直接检测意指可以在无需添加第二

抗体(第二抗体)的情况下检测本身与可检测标记缀合的抗体。

[0228] “可检测标记”是可以产生指示样品中标记的存在和/或浓度的可检测(如视觉上、以电子地方式或其它方式)信号的分子或材料。当与抗体缀合时,可检测标记可以用于定位和/或定量特异性抗体所针对的靶标。因此,可以通过检测由可检测标记产生的信号来检测样品中靶标的存在和/或浓度。可以直接或间接检测可检测标记,并且可以将与不同特异性抗体缀合的若干种不同可检测标记组合使用以检测一个或多个靶标。

[0229] 可以直接检测的可检测标记的实例包含荧光染料和放射性物质以及金属颗粒。相反,间接检测需要在应用第一抗体后应用一种或多种另外的抗体,即,第二抗体。因此,通过检测第二抗体或结合剂与第一可检测抗体的结合来执行检测。需要添加第二结合剂或抗体的第一可检测结合剂或抗体的实例包含酶可检测结合剂和半抗原可检测结合剂或抗体。

[0230] 在一些实施例中,可检测标记与包括第一结合剂的核酸聚合物缀合(例如,在ISH、WISH或FISH过程中)。在其它实施例中,可检测标记与包括第一结合剂的抗体缀合(例如,在IHC过程中)。

[0231] 可以与本公开的方法中使用的抗体缀合的可检测标记的实例包含荧光标记、酶标记、放射性同位素、化学发光标记、电化学发光标记、生物发光标记、聚合物、聚合物颗粒、金属颗粒、半抗原和染料。

[0232] 荧光标记的实例包含5-(和6)-羧基荧光素、5-或6-羧基荧光素、6-(荧光素)-5-(和6)-甲酰氨基已酸、异硫氰酸荧光素、若丹明、四甲基若丹明和染料(如Cy2、Cy3和Cy5)、任选的取代的香豆素(包含AMCA、PerCP)、藻胆蛋白(包含R-藻红蛋白(RPE)和别藻红蛋白(APC))、德克萨斯红、普林斯顿红(Princeton Red)、绿色荧光蛋白(GFP)和其类似物,以及R-藻红蛋白或别藻红蛋白的缀合物、无机荧光标记,如基于半导体材料的颗粒,如经涂覆的CdSe纳米微晶。

[0233] 聚合物颗粒标记的实例包含可以嵌入荧光染料或含有染料、酶或底物的聚合物胶束或胶囊的聚苯乙烯、PMMA或二氧化硅的微粒或胶乳颗粒。

[0234] 金属颗粒标记的实例包含可以通过银染转化的金颗粒和经涂覆的金颗粒。半抗原的实例包含DNP、异硫氰酸荧光素(FITC)、生物素和洋地黄毒苷。酶标记的实例包含辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP或AP)、β-半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶、β-葡萄糖醛酸苷酶、转化酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶和葡萄糖氧化酶(GO)。辣根过氧化物酶的常用底物实例包含3,3’-二氨基联苯胺(DAB)、具有镍增强作用的二氨基联苯胺、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、联苯胺二盐酸盐(BDHC)、汉克耶茨(Hanker-Yates)试剂(HYR)、靛蓝(IB)、四甲基联苯胺(TMB)、4-氯-1-萘酚(CN)、α-萘酚派洛宁(α-NP)、邻联茴香胺(OD)、5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯(BCIP)、硝基蓝四唑(NBT)、2-(对碘苯基)-3-对硝基苯基-5-苯基氯化四唑(INT)、四硝基蓝四唑(TNBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-半乳糖苷/铁-铁氰化物(BCIG/FF)。

[0235] 碱性磷酸酶的常用底物的实例包含萘酚-AS-B1-磷酸酯/坚牢红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸酯/坚牢红TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸酯/-坚牢红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸酯/坚牢TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸酯/新品红(NABP/NF)、溴氯吲哚磷酸酯/硝基蓝四唑(BCIP/NBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚基-b-d-吡喃半乳糖苷(BCIG)。

[0236] 发光标记的实例包含鲁米诺、异鲁米诺、吖啶酯、1,2-二氧杂环丁烷和吡啶并哒

嗪。电化学发光标记的实例包含钌衍生物。放射性标记的实例包含碘、钴、硒、氚、碳、硫和磷的放射性同位素。

[0237] 可检测标记可以与本文所述的抗体或特异性结合关注的生物标志物的任何其它分子,例如抗体、核酸探针或聚合物连接。此外,本领域普通技术人员将理解,可检测标记也可以与第二和/或第三和/或第四和/或第五结合剂或抗体等缀合。此外,技术人员将理解用于表征关注的生物学标志物的每种另外的结合剂或抗体都可以用作信号放大步骤。可以使用例如光学显微镜、荧光显微镜、电子显微镜在视觉上检测生物标志物,其中可检测物质是例如染料、胶体金颗粒、发光试剂。还可以使用分光光度计检测结合到生物标志物的视觉上可检测物质。当可检测物质是放射性同位素时,可以通过放射自显影法在视觉上进行检测,或使用闪烁计数器非视觉地进行检测。参见例如Larsson,1988,《免疫细胞化学:理论与实践(Immunocytochemistry:Theory and Practice)》(佛罗里达州波卡拉顿的CRC出版社(CRC Press,Boca Raton,Fla.));《分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)》,第80卷1998,John D.Pound(编)(新泽西州托托瓦的胡玛纳出版社(Humana Press,Totowa,N.J.))。

[0238] 本发明进一步提供了用于检测样品中一种或多种Fzd受体或表达一种或多种Fzd受体的细胞或组织的试剂盒,其中试剂盒含有至少一种本文所述的抗体、多肽、多核苷酸、载体或宿主细胞。在某些实施例中,试剂盒可以包括与本发明的抗体关联的缓冲液、酶、标记、底物、珠或其它表面等以及使用说明书。

[0239] 本说明书中提及的和/或在申请数据表中列出的所有上述美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过全文引用的方式并入本文中。

[0240] 根据前文应当理解,尽管出于说明的目的已经在本文中描述了本发明的具体实施例,但是可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下进行各种修改。因此,本发明仅由所附权利要求书限制。

[0241] 实例

[0242] 实例1

[0243] 抗FZD抗体的表征

[0244] 对本文公开的抗体Fab、scFv和VHH或sdAb片段进行测序并且将其亚克隆到哺乳动物表达载体中,用于表达、纯化以及相对于各种Fzd受体的结合亲和力的表征。

[0245] 根据制造商的说明书,通过将相应的表达载体转染到Expi293F细胞(马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA))中来制备可溶性重组蛋白。简言之,在转染后四天,在使细胞团块旋转减慢后收集细胞培养基。将培养基与蛋白A树脂(马萨诸塞州沃尔瑟姆的REPLIGEN(REPLIGEN,Waltham,MA))培育以收集含有人IgG-Fc部分的蛋白质,或者与镍亲和树脂(瑞士巴塞尔的罗氏(Roche,Basel,Switzerland))培育以收集与His标签缀合的蛋白质。蛋白质分别用10mM甘氨酸、pH 3.5从蛋白A树脂洗脱或用150mM咪唑、pH 7.4从镍亲和树脂洗脱。

[0246] 随后,将蛋白洗脱液分级,并且通过尺寸排阻色谱法(SEC)进一步纯化。通过快速蛋白质液相色谱法在HBS缓冲液(10mM HEPES,150mM NaCl,pH 7.4)中使用Superdex 200 Increase 10/300GL(宾夕法尼亚州匹兹堡市通用电气医疗集团(GE Healthcare,

Pittsburgh,PA))执行SEC。将每种蛋白质以475μl或500μl的体积注射到柱上。监测在280nm处的吸光度,并且收集所有洗脱液的500μl级分。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进一步分析主峰附近的每种收集的级分。使用Tris-HCl4-15%凝胶(加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐公司(Bio-Rad,Hercules,CA))在非还原和还原条件下执行SDS-PAGE。样品在Laemmli样品缓冲液中制备并在100℃下加热5分钟。

[0247] 使用NanoDrop分光光度计(赛默科技)通过直接UV A280方法确定蛋白质浓度。基于Beer-Lamber方程A＝ε l c,吸光度与蛋白质浓度的关系是线性的;A是吸光度值,ε是波长相关消光系数,l是以厘米为单位的路径长度,并且c是蛋白质浓度。所有产生的蛋白质的实验消光系数均通过其氨基酸序列来估算。

[0248] 通过生物层干涉测量法(BLI)、使用Octet Red 96(加利福尼亚州佛瑞蒙的PALL ForteBio(PALL ForteBio,Fremont,CA))仪器、在30℃、1000rpm下利用链霉亲和素(SA)生物传感器来确定抗体片段与多种Fzd半胱氨酸富集结构域(CRD)蛋白靶标(Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9和/或Fzd10 CRD)的结合动力学。将C端生物素化的Fzd CRD重组蛋白在运行缓冲液(PBS,0.05%吐温-20、0.5%BSA,pH 7.2)中稀释到20nM,并且捕获到SA生物传感器,直到偶联长度达到0.2nm。捕获Fzd CRD之后,将具有捕获的生物素化Fzd CRD的SA生物传感器浸入含有在处于运行缓冲液中的7种不同浓度(0nM、1.37nM、4.12nM、12.4nM、37nM、111.1nM、333.3nM、1000nM)下的相关抗体片段的孔以及仅将运行缓冲液作为参考通道的孔中。K_D是根据制造商建议的设置通过全局拟合、1:1结合模型确定的。

[0249] 表1A提供了所指示抗体克隆的重链CDR(CDRH1、CDRH2和CDRH3)和轻链CDR(CDRL1、CDRL2和CDRL3)。使用来自Distributed Bio的Abgenesis软件绘制以下所示的特异性决定区(SDR),所述特异性决定区包含CDR的Kabat定义(Padlan等人《美国实验生物学学会联合会杂志(FASEB J.)》9,133-139(1995)。

[0250] 在不提供轻链CDR的情况下,抗体片段不包括轻链,例如,抗体是Fab或VHH或sdAb。表1A还指示了抗体片段被示出为与其结合的初始Fzd受体。通过单剂量或剂量依赖性ELISA检测与固定在Nunc Maxisorb微量滴定板(马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技)上的靶抗原结合的噬菌体展示抗体片段来确定每个克隆被初始鉴定为与其结合的Fzd受体。通过抗M13-HRP抗体(宾夕法尼亚州匹兹堡市通用电气医疗集团)在415nm下通过TMB底物(马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技)的转换来以量热的方式确定结合的噬菌体的检测。当OD 450nm相对于背景的倍数大于阈值水平时,克隆被鉴定为与Fzd受体结合。

[0251] 表1A:克隆ID和CDR序列。

[0252]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
001S-A01	Fzd1	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CARASAWTPYGAFDIW	649	SGSSSNIGSHTVS	1052	SNYQRPS	1150	CAAWDGSLFGHWVF	1159
001S-B01	Fzd1	GSISSGGYSWS	195	GSIYHSGSTYYN	454	CARFYYDILTGYSYFDYW	715	RSSRSLLDTDDGNTYLD	1040	TLSHRAS	1153	CMQSIQLPWTF	1188
001S-E01	Fzd1	GSISNYYWS	194	GEIDRSGDTNYN	397	CARVRARRFLVSDRSAFDIW	842	SGNTLGSHYVS	1051	QDSKRPS	1140	CQVWDSSTVVF	1323

[0253]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
001S-F01	Fzd1	GSISGNNYYZG	193	GSIYFTGGTYYN	454	CARVMLITDAFDIW	839	RSSQSLLHSNGYNYLD	1036	LGSNRAS	1131	CMQGTHWPYTF	1182
001S-G01	Fzd1	GSISSSSYYWG	197	GYIYYSGSTYYN	496	CARATYGGDAFDIW	657	TRSSSNIGAGYDVH	1057	GNSIRPS	1114	CGTWDSSLSAWVF	1161
001S-H01	Fzd1	GSISSGGYYWS	196	GYIYYSGSTYYN	496	CARHAGFYGLADYFDYW	772	RSSQSLLHSNGYNYLD	1036	LGSKRAS	1130	CMQALQIPPTF	1174
001S-A02	Fzd1	GSISSGGYYWS	196	GYIYYSGSTYYN	496	CARGKGYSYGYGKDWFDPW	742	QASQDIGKYLN	938	DASNLET	1081	CQQNDYLPLTF	1223
001S-E02	Fzd1	GSISGNNYYWG	192	GSIYFTGGTYYN	454	CARVMLITDAFDIW	839	RSSQSLLHSNGYNYLD	1036	LGSNRAS	1131	CMQGTHWPYTF	1182
001S-G02	Fzd1	GAISGTSYFWG	179	GSIYYTGNTYYN	455	CARIGIAVAAPVDHW	779	RASQSVGTYLT	1008	DASNRAT	1084	CMQATQFPLTF	1178
001S-H02	Fzd1	GSISSSSYYWG	197	GYIYYSGSTYYN	496	CARATYGGDAFDIW	657	TRSSSNIGAGYDVH	1057	GNSIRPS	1114	CGTWDSSLSAWVF	1161
001S-A03	Fzd1	GSISSGGYYWS	196	GYIYYSGSTYYN	496	CARVRDYYDSSGYYYDYFDYW	843	RASRSISSYFN	1026	AASSLQS	1071	CQQADTFPPTF	1206
001S-B03	Fzd1	ASFSGHYWT	72	GEIDHTGSTNYE	396	CARGGQGGYDWGHYHGLDVW	732	SGDKVGHKYAS	1050	EDSQRPS	1095	CQAWDSSTDVVF	1194
001S-H08	Fzd5	RAFTDNVMA	239	ATISGGGGSTFDD	375	CAAASSLTSTPYDLW	575						
001S-A09	Fzd5	RSFRTNALG	243	AAISWTGGSTYYA	331	CNTVTYTGGSYKNYW	902						
001S-B09	Fzd5	SIDSINAMA	266	AALTSGGITYHA	337	CNVITIVRGMGPRAYW	903						
001S-C09	Fzd5	SIFSINAMG	267	ATIQSGGRTNYA	374	CNVITIVRGMGPRAYW	903						
001S-C07	Fzd8	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CARDGTPFYSGSYYGSW	669	QGDSLRTYYAS	949	GKNNRPS	1113	CNSRDNSGKHKVF	1193
001S-D07	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GRIIPILGIANYA	438	CARVPTSPYDILTGPFDYW	841	RSSQSLLHSNGFNYVD	1034	FGSYRAS	1100	CMQNLQTPWTF	1184
001S-E07	Fzd8	ASVSSNSAAWN	73	GRTYYRSKWYNDYA	451	CARWKNYFDPW	850	RASQGIRSDLA	967	AASTLES	1073	CLQDYSYPRTF	1167

[0254]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
001S-H07	Fzd8	FTFSSYAMS	141	STISGGGGSTYYA	553	CAKDLVPWGSSAFNIW	601	RASQSVSSYLA	1019	GASSRAT	1107	CQQYGSSPPTF	1302
004S-E05	Fzd5	FTFSTYEMN	156	SGVSWNGSRTHYV	525	CARGQSEKWWSGLYGMDVW	753	RASQGISSALA	973	AASALQS	1061	CQQTYSTPRTF	1286
004S-E03	Fzd5	GTFSTYAIS	210	GWINSGNGNTKYS	472	CWTGLLWFGESTDAFDIW	928	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-G06	Fzd5	GTFTYRYLH	218	GGIIPIFGTGNYA	410	CASSMVRVPYYYGMDVW	861	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
001S-D09	Fzd8	GPFNLFAMG	184	AGISRTGGNTGYA	354	CASKTTINSGWSREYHYW	855						
001S-E09	Fzd8	GPFNLFAMG	184	AGISRTGGNTGYA	354	CASKTTINSGWSREYHYW	855						
001S-F09	Fzd8	GFFSSFTMG	181	AAISRNGVYTRFA	318	CNALAPGVRGSW	884						
001S-G09	Fzd8	SLFRLNGMG	270	ATISTRGTTHYA	376	CTDEESW	908						
001S-H09	Fzd8	GPFNLLAMG	185	AGISRTGGNTGYA	354	CASKTTINSGWSREYHYW	855						
001S-A10	Fzd8	SVVNFVVMG	274	AAITSGGSTNYA	334	CNRVGSREYSYW	898						
001S-B10	Fzd8	RTSDLYTMG	262	AAIGYKVKWNGERTYYL	313	CNAVTYNGYTIW	891						
001S-G12	Fzd1	SIFSSNTIY	269	ALITTSGNTNYA	364	CNAGAPAWTYRMGTYYPQFGSW	883						
002S-A01	Fzd1	STFSTYAMG	272	AAISGSGENTYYA	317	CVKFGMNLGYSGYDYW	925						
002S-B01	Fzd1	STFSNYAMG	271	AAISWGGGSTFYS	320	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-C01	Fzd1	RMFSNYAMG	241	AAISSGGSGTYYS	319	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-D01	Fzd1	RTDGGYVMG	247	ATVTWRTGTTYYA	378	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-E01	Fzd1	RTFSSAAMG	255	AAISWSGSTAYYA	330	CATLTPYGTVASY	871						

[0255]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
002S-F01	Fzd1	RTFSSYAMG	257	AAVNWSGGSTYYA	339	CAAVFLSRNYEIQEYYRYQ	586						
002S-G01	Fzd1	RTFSSYAMG	257	AAISWSGGSTYYA	327	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-H01	Fzd1	RSFSTYPMG	246	TVISGSGGSTYYS	574	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-A02	Fzd1	RRFTTYGMG	242	AAVTWRSGSTYYA	345	CYLEGPLDVYW	929						
002S-B02	Fzd1	RTFNRHVMG	251	AAISWSGDSTYYA	324	CAKLGGSSWLREYDYW	621						
002S-C02	Fzd1	RTFRAYAMG	252	SAISWSGGSTYYA	510	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-D02	Fzd1	RTFSEYAMG	253	AAISWSGGSTHYA	326	CNADSLRGIDYW	881						
002S-E02	Fzd1	FTFREYAMT	113	SGISRDGGRTSYS	520	CAPRVLVTAPSGGMDYW	631						
002S-F02	Fzd1	GDFTNYAMA	180	AAVNWRGDGTYYS	338	CAAVFLSRNYEIQEYYRYQ	586						
002S-G02	Fzd1	RTFGTWAMG	250	AAISYNGFSTYYS	333	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-H02	Fzd1	RTFSSYAMG	257	AAISWSGGSTYYA	327	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-D03	Fzd1	RTFGSYAMG	249	AAISWSGGSTYYA	327	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-E03	Fzd1	SIFSIYAMG	268	AVVATGGATNYA	390	CNMRGNWYREGRPAEFLSW	897						
002S-F03	Fzd1	RTSSSYAMG	263	AAISWSGGSTYYA	327	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-G03	Fzd1	RTFGSYAMG	249	AAISWSGGSTYYA	327	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-H03	Fzd1	QTFTAYAMG	237	AAISWSGSATHYA	329	CNAWVLVAGSRGTSADYW	893						

[0256]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
002S-A04	Fzd1	RTFSSYAMG	257	AAISWSGRSTYYA	328	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
002S-B04	Fzd1	RTFSSYAMG	257	AAISWSGGSTYYA	327	CAAGPNYSWFMPSSSRLIW	579						
002S-C04	Fzd1	RRFTTYGMG	242	AAVTWRAGSTYYA	344	CSADKLDYLDDQPFKTWDYW	907						
002S-D04	Fzd1	GTSSTYAMG	220	AAINRSGGSTYYA	314	CAAVFLSRNYEIQEYYRYQ	586						
002S-E04	Fzd1	GTFSTYAMG	211	AAISWSGDSTYYL	325	CAAGPIARWYRGDMDYW	578						
004S-H04	Fzd5	GTFSSYAIS	207	GWISTYNGATNYA	484	CARGGAGRFGEGMDVW	723	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
001S-A04	Fzd5	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1157	CLLYLGRGIWVF	1165
001S-D03	Fzd5	GTFSSYAIS	207	GRIIPILGIANYA	438	CARLDPGYYYGMDVW	783	TGTSSDVGGYNSVS	1055	DVTKRPS	1092	CFSYAGSRF	1160
001S-F03	Fzd5	GTFSSYAIS	207	GGIIPIFGTANYA	408	CARVIFSTVTTTNDIW	836	TRSSGSIASNYVQ	1056	ENDKRPS	1096	CQSYDYDHRWVF	1322
004S-E04	Fzd5	YTFSGYYLH	284	GTVTPILGTANYA	456	CARVDGSGYYGIDYW	830	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-A06	Fzd5	GSFSNYAIS	190	GRIIPILGSANYA	439	CARTYLKAFDIW	827	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-F04	Fzd5	YTFTNNFMH	292	GRINPNSGGTNYA	446	CARDRFDNWFDPW	685	RASQGISSALA	973	AASTLQS	1075	CQQSYNTPWTF	1243
001S-C03	Fzd5	GTFSSYAIS	207	GRIIPILGIANYA	438	CAREGRSRVYGGNSFDYW	705	RSSQSLLRRNGHNYVD	1037	MGSNRAP	1132	CMHGLHPPFTF	1173
003S-A01	Fzd1	YIFTDYYMH	278	GGIIPIFGTANYA	408	CARMSSDYYDSSGYYRRGMDVW	792	RASQGISNNLN	969	GASTLQS	1109	CQQADSFPPTF	1205
003S-E01	Fzd1	YIFTDYYMH	278	GGIIPIFGTANYA	408	CARAWKGLWFGEGTFDYW	658	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-F01	Fzd1	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CARLAFDIW	782	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264

[0257]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
003S-A02	Fzd1	YTFTGYYMH	288	GWINAGNGNTTYA	465	CAKDRGNYGDYLDYW	604	RASQGISNYLA	971	EVSSVQG	1098	CQQSYSTPLAF	1262
003S-C02	Fzd1	FTFSNSDMN	128	ALISYDGSHTYYA	363	CTRGSRIGWFDPW	912	RASQSIGRWLA	982	AASRLQS	1067	CQQGFNFPLTF	1217
003S-E02	Fzd1	GTFSSYTIS	208	GGIIPISGKTDYA	414	CARARGGDSPLSL	646	RASQGISNNLN	969	TASSLQS	1152	CLQDYSYPYTF	1168
003S-F02	Fzd1	GTFRSYAIN	204	GGIIPIFGTANYA	408	CARGGWRPDYYGSGSYYSFDYW	737	RASQSVSSDLA	1013	GASTRAT	1111	CQQYETWPVLTF	1297
003S-G02	Fzd1	FTFGTYWVT	110	SGITGSGGRTFYA	523	CARMKDWFGAFDIW	791	RASESVSSSSFA	953	GASTRAT	1111	CQQYNNWPPNYTF	1312
003S-C03	Fzd1	FTFSRYAMS	134	SYISGDSGYTNYA	566	CARGLVIATNWFDPW	746	QANQDISNYLN	935	AASSLQS	1071	CQQTYNPPRTF	1281
003S-D03	Fzd1	YTFTSYYMH	301	GWINTYNGNTNYP	474	CAESLTSTADW	588	RASQGISNNLN	969	AASSLQR	1070	CQQSYSTPFTF	1260
003S-E03	Fzd1	YIFTDYYMH	278	GWVNPTTGNTGYA	493	CARNVEGATSFPEFDYW	795	RASQGISNNLN	969	SASNLQS	1146	CQQSYSPPPYTF	1256
003S-H03	Fzd1	GTFSSYAIS	207	GGIIPIFGTANYA	408	CAKDIGSSWYYYMDVW	598	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-A04	Fzd1	FTFGTYWVT	110	SGITGSGGRTFYA	523	CARMKDWFGAFDIW	791	RTSERSSISSFA	1046	GASTRAT	1111	CQQYNNWPRNYTF	1312
003S-C04	Fzd1	FAVSSSYMS	82	ASIWFDGSNQDYA	372	CAPNESGNVDYW	630	RASQGISNNLN	969	KASSLEN	1119	CQQSYSTPHTF	1261
003S-D04	Fzd1	FTFSSYAMH	141	SAISGSGGSTYYA	507	CARDHGSSWYQNTDAFDIW	671	QASQDIGNYLN	939	DVSNLER	1091	CQHLNSYPPGDTF	1197
003S-G04	Fzd1	FRFISHPIH	91	GRVIPILGVTNYA	453	CASSSDYGDYLKEPNYGMDVW	863	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-D05	Fzd2	FTFSNYAMT	130	SAIGTGGGTYYA	502	CATAYRRPGGLDVW	866	RSSQSLLHSDGKTYLY	1032	LGSNRAS	1131	CMQNTHWPLTR	1186
003S-E05	Fzd2	FTFSSYTMS	149	GRIKSKANGGTTDYA	444	CARGSSSWYDW	760	KSSQSLLHSDGKTYLY	932	LGSNRAS	1131	CMQNTHWPLTR	1186
003S-A06	Fzd2	FTFADYGMH	102	SYISSGSYTIYYS	567	CARGTFDWLLSPSYDYW	762	RASQGISNNLN	969	AASRLES	1066	CQQSYSTPLTF	1264

[0258]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
003S-C06	Fzd2	FTFSNYGMH	131	SAISNSGGSTYYA	508	CTSSFLTGSQPSGYW	915	RASQDISSYLA	962	AASSLQS	1071	CQQSYRTPLTF	1245
003S-G06	Fzd2	FTFSDYGMH	121	SSTSGSGGNSKYS	549	CARHNPGYMGYYYGMDVW	774	RASQSVSSNLA	1014	DASNRAT	1084	CQHRTSWPLTF	1200
003S-H06	Fzd2	GTFSSYTIS	208	GLVDPEDGETIYA	429	CTILPAAAAGTYYYYGMDVW	909	RASQRVGNNLA	981	DASIRAT	1080	CQQYKDWPTF	1307
003S-B07	Fzd2	FTFSDHYMS	119	SSITRTPSGGTTEYA	546	CARDGGYW	665	RASQSVGSYLA	1007	GSSNRAA	1115	CQQYGTSLLTF	1306
003S-D07	Fzd2	YTFTNNFMH	292	GIINPSGGSTSYA	422	CARATSLGRRYCSSTSCYPRDAFDIW	656	QASQGISNNLN	946	LGSDRAS	1127	CQQSYSTPFTF	1260
003S-E07	Fzd2	YTFTNNFMH	292	GWINPNSGGTKYA	470	CARSVGEVGATMLGIGVWYWFDPW	823	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPFTF	1260
003S-A08	Fzd2	FTFSNYAMT	130	SAIGTGGGTYYA	502	CATAYRRPGGLDVW	866	RSSQSLLHSDGKTYLY	1032	LGFNRAS	1126	CMQNTHWPLTR	1186
003S-C08	Fzd2	LTVSTNFMS	234	AGIGWDSTNIGYA	349	CARDLVAARPSNWDYW	679	RASQGIRNDLG	966	GASTLQR	1108	CQQSYSTPRVTF	1266
003S-E08	Fzd2	FTFRNSAMH	115	STISGSGGSTYYS	554	CARGGGYSSSW	726	RSSRSLLHSDGKTYLY	1041	LGSNRAS	1131	CMQSSHWPKTF	1191
003S-G09	Fzd4	FTFDHNPMN	108	SAIGAGGGTYYA	500	CASPTVTRR	857	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-C10	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CARHYYGSGSYPDW	777	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-D10	Fzd4	FNFGIYSMT	86	SYISGDSGYTNYA	566	CARVGPGGWFDPW	833	RASQGISSYLA	974	AASNLLG	1063	CQQTYSTPWTF	1288
003S-E10	Fzd4	FTFSSYAMH	141	AGISASGGSTYYA	351	CARPSTTGTKAFDIW	798	RASQSIGSNLD	983	AASTLET	1074	CQQSYSVPDTF	1272
003S-A11	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CARHYYGSGSYPDW	777	RASQSISZYZN	1001	ZASSLQS	1158	CQQSYSTPLTF	1264
003S-G11	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GRIIPIFGTVNYA	437	CARGARLDYW	717	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-H11	Fzd4	YTFTGYYMH	288	GGIIPIFGTPHYA	411	CASTDPSSGLDYW	864	RASQSIGSNLD	983	DASSLES	1085	CQQSFIMPLTF	1232

[0259]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
003S-C12	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GWINPNSGGTNYA	471	CARGGSSDVR	735	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-F12	Fzd4	FTFSSYAMH	141	SVISTSGDTVLYT	559	CARGGSSDVR	735	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-B01	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GIINPSGGSTSYA	422	CAKDGVVR	595	RAIQSISSYLN	951	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-C01	Fzd4	FTFSNHYTS	127	STISSSGGRTFYA	557	CARASRIDGGWPIIDHL	651	RASQDIRDELA	959	AASTLQS	1075	CQQADSFPLTF	1204
004S-D01	Fzd4	FTFTNYAMS	161	SAISGSGGSTYYA	507	CARATGFGTVVFDYW	654	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-E01	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CARHYYGSGSYPDW	777	ZACLRIISYLN	1059	FASSLQS	1099	CQQSYSTPLTF	1264
004S-F01	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CARDGVE	670	RASQGISNWLA	970	DASSLQS	1086	CQQSHITPYTF	1235
004S-H01	Fzd4	FTFSNYAMH	129	ALMSPDGTIIYYA	365	CAKGIVGDYGAFDIW	614	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-B02	Fzd4	FTFSSYGMH	143	SSINNSSRTVFYA	537	CAKDHLAVADAHGR	597	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-E02	Fzd4	FTFSSYAMH	141	AVISYDGSNEYYA	383	CAGGEVYEL	589	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-F02	Fzd4	FTFSTYAMH	155	AVISSDGNNKYYT	382	CAAPDVVVTADGYYW	582	RASQGISSALA	973	AASTLQS	1075	CQQANTVPFTF	1214
004S-G02	Fzd4	FTFANYAMN	104	ALISYDGGTKYYA	362	CAKTLVTSHALHIW	625	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-H02	Fzd4	FTFANYAMH	103	ALISYDGGNKYYA	361	CAKTLVTSHALHIW	625	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
001S-E03	Fzd5	GSFSGYYWH	188	GEINHSGSTNYN	398	CARGRRLVRFTVTSAFDIW	755	TGSSSNIGAGFGVH	1054	SDRNRPS	1149	CQSYDSSLRASVF	1321
001S-B05	Fzd5	GTFSSYAIS	207	GGIIPILGIANYA	413	CARIPKPRGYSYGDNGSW	780	RSSQSLLHSNGNTYLD	1035	LGSDRTS	1128	CMQSLQTPYTF	1190
004S-A07	Fzd6	GNFKNYGIT	183	GRIIPALGTANYA	434	CARQYCSGGSCYPDAFDIR	805	RASQDIRSALA	960	QASSLIS	1139	CQQSYSMPQTF	1253
004S-B07	Fzd6	FTFSSYSMN	146	GVISKDGDNKYYA	460	CASSRDGYNRLAFDIW	862	QASQDIRNYLN	940	AASSLQS	1071	CQQSSRFWTF	1238
004S-A08	Fzd6	GTFSSYAIS	207	GRIIPILGIANYA	438	CARDGGDYGMDVW	664	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264

[0260]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
004S-B08	Fzd6	YTFTNNFMH	292	GRINPNSGGTNYA	446	CASQNYYGSGSYPGFDYW	858	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-D08	Fzd6	YTFTYRYLH	303	GGIIPIFGTANYA	408	CATHDSSGYYSFDYW	870	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-E08	Fzd6	FSVSSNYMN	101	SAIGTGGGTYYA	502	CTTRTYDSSGYYETQNYYMDVW	921	RSSRSLLHSNGNTYLQ	1042	LGSNRAS	1131	CVQTTQSPLTF	1326
004S-G08	Fzd6	FTFSDYYMS	122	AAISYDESNKFYA	332	CARSAVAGAFDIW	813	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-A09	Fzd6	FTFRDYAMN	112	SGISWNSGSIGYA	522	CARRSGYSGSVYYYYGMDVW	810	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-B09	Fzd6	FTFSSFGMH	135	AGINWNGGSVVYA	350	CARGPSHQHTFDIW	751	RASQGISSALA	973	AASSLQS	1071	CQQSYSHTAFTF	1249
004S-C09	Fzd6	YTFTNNFMH	292	GGFDPEDGETIYA	401	CARVGRGYSFDYW	834	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-E09	Fzd6	DTFSNYVIS	77	GRISAYNGYKSYA	447	CARSSGYVGWFDPW	821	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-F09	Fzd6	FTFSNYYTS	132	SYISGAGGSTEYA	565	CARLPRRSGKGSAFDIW	785	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-H09	Fzd6	GTFSSYTIS	208	GWMNPNSGNTGYA	490	CARVGATSAGGMDVW	832	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-C10	Fzd6	YIFTDYYMH	278	GLVDPEDGETIYA	429	CAHSDFFSGLSFGDW	590	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-D10	Fzd6	FTFSNSDMN	128	SSISTSGGSTYYA	544	CARGSYW	761	RASQNINNYLA	979	RASTLQS	1143	CQQYSSYPYTI	1317
004S-E10	Fzd6	TTLNKYAIS	275	GRITPVVGVTNYA	448	CALSSSWYGGFDYW	628	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-F10	Fzd6	GFTFSDHY	182	ALVGYDGSQQFYG	367	CNTGIPMLYW	900	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-G10	Fzd6	FTFSDYYMS	122	SAISGSGFTYYA	506	CARVSRGFAFDYW	845	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-A11	Fzd6	GTFSSYAIS	207	GRIIPILGIANYA	438	CARESVNNYYYMDVW	710	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-C11	Fzd6	FTFSSYAMH	141	ALTSYDGSKKFYA	366	CAKTGRGYAFDIW	623	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264

[0261]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
004S-E11	Fzd6	FTFSSYNMN	145	GRIKSKANGGTTDYA	444	CAKAGQQLDW	593	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-H11	Fzd6	FTFTSSAMQ	162	GGIIPIFGTANYA	408	CATVQTNYYDSSGRFSYRAHYFDYW	874	RASQSISRWLA	992	AASSLQS	1071	CQQYVSYPLTF	1318
004S-A12	Fzd6	YTFTNNFMH	292	GRINPNSGGTNYA	446	CARGQGYSSGWYRGDAFDIW	752	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-D12	Fzd6	FAFDDYAMH	79	GFIRSKAYGGTTEYA	399	CAKDRGYSSGWYLDYW	605	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-H01	Fzd7	FNFSSYTMR	87	SVIYGGGNTNYA	561	CARGGSGGNLSYW	733	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-A02	Fzd7	GTFSSYAIS	207	GMIIPFLGITNYA	430	CTRPYDAFDIW	913	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-C02	Fzd8	YTFASYGMH	283	GWINAGNGNTTYA	465	CARLSVWKWEQVTNWFDPW	787	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-E02	Fzd8	GTFTSYAIS	216	GWINAGNGNTKYS	464	CTTGLFPYYRYNWNNDAFDIW	919	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-A03	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GWMNPNSGNTGYA	490	CAKWHIGATGNWFDPW	626	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-H03	Fzd8	YTFTNNFMH	292	GGIFPIYGISTYA	403	CARDRPTSSWYAFDYW	689	RASQGISNNLN	969	DASTLQT	1089	CQQSFSAPITF	1233
005S-F04	Fzd8	FSFSSTAMS	95	SYISSSGSITHYA	568	CARYGDYGDYW	851	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-H04	Fzd8	YTFTNNFMH	292	GWINAGNGNTTYA	465	CARVATGNAFDIW	829	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-B05	Fzd8	FTFSSYWMH	152	AGISGSGKTTFYA	353	CARGGLLFDYW	728	QASQDISNYLN	943	KASSLES	1120	CQQSYSTPRTF	1265
005S-F05	Fzd8	FTFTSSAVQ	164	GWMNPNSGNTGYA	490	CARRTAVAGTIDYW	811	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-G05	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GWISPYNGNTNYA	480	CARGGWTNYGGNLDYW	738	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-H05	Fzd8	YTFTSYYMH	301	GRINPNSGGTNYA	446	CARVPDFWSGYLDYW	840	RASQGISRTLZ	972	AASSLQS	1071	CQQTYSMPITF	1284

[0262]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
005S-D06	Fzd8	YTFTYRYLH	303	GGIIPIFGTANYA	408	CARDSYPYGMDVW	697	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-F06	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GRVIPILGVTNYA	453	CAREYLGSFDIW	712	RASQSVGSNLA	1006	GASSRAT	1107	CQQYGSSPPFTF	1301
005S-A07	Fzd9	FTFTGSAVQ	160	GGILPIYGTTKYA	418	CARGARLYGFDYW	719	RASQSVSRNLA	1012	GASTRAT	1111	CQQRSNWPITF	1226
005S-B07	Fzd9	FTFTSSAVQ	164	GWMNPNSGNTGYA	490	CARGRGQQWLTGYYGMDVW	754	RASQGISSALA	973	GASTLQS	1109	CLQDYNYPFTF	1166
005S-C07	Fzd9	FTFSSYSMN	146	SYIENDGSITTYA	562	CARAPYYYGSGSLFRLDYW	645	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-D07	Fzd9	GTFNSYAIA	203	GGIIPIFGTANYA	408	CARAGSGYYNFDYW	637	RASQSINRWLA	988	AASSLQS	1071	CQQTYNIPITF	1280
005S-F07	Fzd9	FSFSSYGMH	96	AYINSRGSLMYYA	392	CAKTKLPIW	624	RASQSINRNYLG	987	AASSRVT	1072	CQQYDSWPPTF	1294
005S-G07	Fzd9	GSFSGYAIN	186	GGIIPIFGTANYA	408	CATGYYYDYYFDYW	869	RASQGISNNLN	969	AASSLQS	1071	CQHYYNLPLTF	1202
005S-H07	Fzd9	GTFTNNFMH	214	GLVDPEDGETIYA	429	CARTYRIVGATPRYYYYGMDVW	828	RASQTINNQLA	1023	KASNLET	1118	CQQANSFPVTF	1210
005S-B08	Fzd9	YIFTDYYMH	278	GWINPNSGGTIYA	469	CARGPRDSGYYPGGAFDIW	750	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-D08	Fzd9	FAFSSHWMH	80	SAIDGSGGSTYYA	499	CARDRQLGWAHWYFDLW	691	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-G08	Fzd9	YTFTGYYMH	288	GWINAGNGNTTYA	465	CARDRDYW	684	QTSQDINNNLN	950	KASSLES	1120	CQQSYSSPPTF	1258
005S-C09	Fzd9	FTFSSYGMH	143	SAIGTGGGTYYA	502	CALLVGAARGISYYYYYGMDVW	627	QASQDISNYLN	943	AASTLQS	1075	CLQHKSFPTF	1170
005S-D09	Fzd9	YTFTSYAMH	298	GWINAGNGNTTYA	465	CARDRPYSSGWYYPAFDIW	690	RASQSVSSNQLA	1015	GASTRAT	1111	CQQRYNWPPSITF	1230
005S-E09	Fzd9	FNLRRYNMN	89	SRISNSGSLVYYA	534	CARDADSSGYYRYDAFDIW	659	RASQSVSSNLA	1014	DASNRAT	1084	CQQRNNWLYTF	1225
005S-A10	Fzd9	YTFTDYYMH	285	GIINPSGGSTSYA	422	CARHVYGSGTYNNWFDPW	775	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264

[0263]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
005S-D10	Fzd9	YTFTSYYMH	301	GWMSPNSANTGYA	490	CARGGPIHYYYYYMDVW	731	RASQGISNNLN	969	AASTLQS	1075	CQQTNLFPYTF	1277
005S-H10	Fzd9	GAFSTSSIS	178	GRIIPVLGTANYA	443	CAKGGWRSSFDPW	612	RASQSVSSNLA	1014	GASTRAT	1111	CQQYNSWPLTF	1313
005S-B11	Fzd9	YTFTSYDIN	299	GGFDPEDGETIYA	401	CAKAGDWGLYGMDVW	592	RASQSISRWLA	992	AASSLQS	1071	CQQTNTFPFTF	1278
005S-C11	Fzd9	FTFTGSAVQ	160	GGILPIYGTTKYA	418	CARGARLYGFDYW	719	RASQSVSRKLA	1011	GASTRAT	1111	CQQRSNWPITF	1226
005S-D11	Fzd9	YTFTNNFMH	292	GWINPNSGDTKFA	468	CAREANYDILTGYIRPDAFDIW	703	RASQSLRSKLA	1004	GASTRAT	1111	CQQYANSPWTF	1293
005S-E11	Fzd9	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTKYS	464	CTTTEYSSSPDYYYGMDVW	922	QASQDISNYLN	943	GASTLQS	1109	CQQLSRYPSLF	1222
005S-G11	Fzd9	GTFTRNSIS	215	GGIIPIFGTANYA	408	CARSSDLRIFDYW	819	RASQSVSSNLA	1014	GASNRPT	1103	CQQYGSSPYTF	1305
005S-H11	Fzd10	YTFASYDIH	282	GWINAGNGNTTYA	465	CARDGIWDIFDYW	666	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-E12	Fzd10	YIFTDYYMH	278	GVIFPVYPTPDYA	458	CARGGSTGYYGMDVW	736	RASQSVGRWMA	1005	AASSLQS	1071	CQQANTFPFTF	1213
005S-F12	Fzd10	GTFSSYAIS	207	GRIVPIVDVVKYA	450	CARDTCSSTSCSPDYW	698	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
006S-A01	Fzd10	FTFSSYSMN	146	SAIGTGGGTYYA	502	CAREGWFGESPFGMDVW	707	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
006S-F01	Fzd10	YTFTRYAVH	294	GWISTFNDNTNYA	483	CASPTGMTTNFDYW	856	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
006S-H01	Fzd10	YIFTDYYMH	278	GGIIPIFGTANYA	408	CAKGSYYYDSSGYYWDAFDIW	620	RASQGISNNLN	969	AASNLET	1062	CQQTSSTPLTF	1279
006S-A02	Fzd10	YIFTDYYMH	278	GGIIPLFGTTDYA	416	CARDITGADGMDVW	672	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
006S-D02	Fzd10	GTFSSYAIS	207	GRIIPTVGTANYA	442	CARDVCSGGSCSPDVW	699	RASQGISNNLN	969	DASSLES	1085	CQQTYNTPRTF	1282
006S-E02	Fzd10	FTFTSSATQ	163	GGIIPIFGTANYA	408	CARDGSSGWYSPNAFDIW	667	RASQGISNNLN	969	AASSLQS	1071	CLQHNGYPITF	1171

[0264]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
006S-H02	Fzd10	FTFRMYGMH	114	SRISPDGRTTTYA	535	CARSPRWYDAFDIW	817	RSSQSLLHSNGYNYLD	1036	RVSSRFS	1145	CMQGTHWPPTF	1182
006S-A03	Fzd10	YIFTDYYMH	278	GWINAGNGNTTYA	465	CARDPIMFGDQPGWFDPW	681	RASESVSSNLA	952	GASSRAT	1107	CQQYNKSPSF	1311
006S-B03	Fzd10	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTKYA	463	CAREGYDFWSGPYAFDIW	708	RASQTISRYLN	1024	EVSSLQG	1097	CQQSYSTPWTF	1270
006S-C03	Fzd10	GTFSSNVIS	205	GGIIPIFGTANYA	408	CARGGYYYGMDVW	740	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-B01	Fzd1	YIFTDYYMH	278	GGIIPIFGTANYA	408	CARMSSDYYDSSGYYRRGMDVW	792	RASQGISNNLN	969	GASTLQS	1109	CQQADSFPPTF	1205
014S-D01	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CARHYYGSGSYPDW	777	RASQSISSHZN	994	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-E01	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CARHYYGSGSYPDW	777	RASQSIZZYZN	1003	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-G01	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GWMNPNNGNTTYA	488	CARHYYGSGNYRDW	776	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPFTF	1260
014S-A02	Fzd4	FTFSSNAMH	137	SGISGSGGSTYYA	515	CAKPGIAAAGTNNWFDPW	622	RASQGISSALA	973	GASTVES	1112	CQQSYSTPRTF	1265
014S-B02	Fzd4	FTFSSYAMH	141	SGISGSGSSTYYA	518	CARPSTTSFGMDVW	799	RASQSVSSNLA	1014	GASTRAT	1111	CQQYDTPLRTF	1295
014S-C02	Fzd5	YTFTSYYMH	301	GRINPNSGGTNYA	446	CARVPDFWSGYLDYW	840	RASQGISSALA	973	AASSLQS	1071	CQQTYSMPITF	1284
014S-D02	Fzd5	GTFSTYAIS	210	GIINPSGGSTSYA	422	CARAKGSGWYVGSAFDIW	641	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-E02	Fzd5	FTFSDSYMS	120	GFIRSKAYGGTTEYA	399	CARATQELLLPYGMDVW	655	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-F02	Fzd5	YTFTSYYMH	301	GRINPNSGGTNYA	446	CARVPDFWSGYLDYW	840	RASQGVSTZLS	977	AASSLQS	1071	CQQTYSMPITF	1284
014S-G02	Fzd6	YTFTSYYMN	301	GIISPSGGSTSYA	425	CARWGDYGDLYYFDYW	848	RASQGISSALA	973	ATSTLQS	1079	CQQVNSYPPTF	1291

[0265]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
014S-H02	Fzd6	YIFTDYYMH	278	GRINPNSGGTNYA	446	CARARSSGWTDAFDIW	648	RASQSVSSWLA	1018	AASTLQT	1076	CQQSYSTPTF	1268
014S-A03	Fzd6	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CARHYYGSGSYPDW	777	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-B03	Fzd6	FTFSSYNMN	145	GRIKSKANGGTTDYA	444	CARAGDSPDYW	636	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-E03	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GWISPYNGYTKYA	481	CARAMWSYGQQNAFDIW	642	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-G03	Fzd8	FTFTSSAVQ	164	GWMNPNSGNTGYA	490	CARRTAVAGTIDYW	811	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-H03	Fzd8	YTFTSSAIH	296	GRINPNSGGTNYA	446	CARVKWELAIDYW	837	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-B04	Fzd8	YIFTDYYMH	278	GWMNPNSGNTGYA	490	CARGGSRYDFWSGHWYFDLW	734	RASQGISNYLA	971	AASSLQS	1071	CQQSYSTPFTF	1260
014S-E04	Fzd8	YTFTGYYMH	288	GRINPNSGGTNYA	446	CARDVPKLVTRGVAYGMDVW	701	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-F04	Fzd8	YSFTTYGMN	281	GWINAGNGNTTYA	465	CARAAGSYGGGYW	633	RASQGISNNLN	969	EASSVAS	1093	CQQSYTSTPLNSF	1273
014S-G04	Fzd8	FTFSSYGMS	144	SAISGSGGSTYYA	507	CARDLTPFTQQQLVLGLL	677	RASQSVSGYLA	1010	GASTRAA	1110	CQQYNYWPPAF	1315
014S-H04	Fzd8	FTFTSSAVQ	164	GRIVPAIGFTQYA	449	CARSGYNRRGYFDYW	816	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-A05	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GGIIPIFGTANYA	408	CARVTLGASVDAFDIW	846	RASQGISNNLN	969	DASSLES	1085	CLQHNSLPFTF	1172
014S-B05	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GWVSPNTGNTVYA	494	CTTDRRYSTYFDLW	918	RASQSVSSNLA	1014	GVSNRAT	1117	CQQYNIWPRTF	1310
014S-C05	Fzd8	YTFASYGMH	283	GWINAGNGNTTYA	465	CARLSVWKWEQVTNWFDPW	787	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-D05	Fzd8	GTFTSYAIS	216	GWINAGNGNTKYS	464	CTTGLFPYYRYNWNNDAFDIW	919	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-F05	Fzd9	FTFTGSAVQ	160	GGILPIYGTTKYA	418	CARGARLYGCDYW	718	RASQZVSRZZA	1025	GASTRAT	1111	CQQRSNWPITF	1226

[0266]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
014S-G05	Fzd9	FTFSSSWMH	140	SAIGTGGGTYYA	502	CARKVKGYCSGGSCYGYW	781	RVSQGISSALA	1049	AASSLQS	1071	CQQTFSVPWTF	1276
014S-H05	Fzd9	FTFSNYAMT	130	STISGSGVSTFYA	555	CARHGRIAADIW	773	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-A06	Fzd9	FTFZZSZVQ	167	GGILPIYGTTKYA	418	CARGARLYGFDYW	719	RASQSVSRNLA	1012	GASTRAT	1111	CQQRSNWPITF	1226
014S-B06	Fzd9	FTFSSYSMN	146	SYIENDGSITTYA	562	CARAPYYYGSGSLFRLDYW	645	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-C06	Fzd10	FTFTGSAVQ	160	GGILPIYGTTKYA	418	CARGARLYGFDYW	719	RASQSVSRNLA	1012	GASTRAT	1111	CQQRSNWPITF	1226
014S-D06	Fzd10	FTFSRYAMH	133	SGIGVGGGTYYA	512	CARDAYNWFDPR	660	RASQSISRYLN	993	AASSLQS	1071	CQQRYSTPLTF	1231
014S-F06	Fzd10	YIFTDYYMH	278	GVIFPVYPTPDYA	458	CARGGSTGYYGMDVW	736	RASQSVGRWMA	1005	AASSLQS	1071	CQQANTFPFTF	1213
014S-G06	Fzd10	FTFSSYAMH	141	SAIGAGGGTYYA	500	CARDAYNWFDPW	661	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-H06	Fzd10	FTFSSYDMN	142	SAIGTGGGTYYA	502	CARDAYNWFDPW	661	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-A07	Fzd10	FTFSNAQMS	124	SAIGTGGGTYYA	502	CAREGSYYDWYFDLW	706	RASQNIGSRLA	978	GASNRAS	1102	CQQYNHWPPLFTF	1309
017S-E08	Fzd8	IIFSPNDMG	223	ALISSGGSTSYA	359	CHFGVASVGLNYW	877						
017S-H08	Fzd8	RTFSSFVMG	256	AAVSASGGYTWYA	341	CNLAQRGETYW	895						
017S-A09	Fzd8	LAFNGYTMG	227	AAISWSDNTYYA	323	CAAGFPTVFVVDGEYDYW	577						
017S-B09	Fzd8	FTLDYYAIS	168	ADITSGGSTNYA	346	CNAVTYNGYTIW	891						
017S-C09	Fzd8	LTFSDYTVG	229	ASSTGGGVFENYA	373	CNAVTYNGYTIW	891						
018S-D06	Fzd4	RIFSSYAQA	240	PRIPSDSTTFYA	497	CEVHNFGATYW	876						
018S-E06	Fzd4	RTFSNYVMG	254	AVISRSGGNTYYT	381	CNAVSTDWTTDYW	889						
018S-F06	Fzd4	RTFSTYGMG	259	AAISWSDNTYYA	323	CNSFPLRLHDW	899						
018S-G06	Fzd5	LAIDDYYMV	228	SYISTSDGSTYYA	571	CNAVTYNGYSIW	890						

[0267]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
018S-H06	Fzd5	LAFNGYTMG	227	AQISWTGGSTDYA	369	CNADYGTWYGIGW	882						
018S-A07	Fzd5	LAFNGYTMG	227	AAISWMSNTYYA	321	CNMGLGYSEYRPLGYW	896						
018S-B07	Fzd5	SAFSNYAMG	265	AAITWSGARTYYA	335	CNAVWKFGTTHW	892						
018S-C07	Fzd7	LTIDDYYVV	233	SYISAGDGFTYYA	564	CNAVTYNGYTIW	891						
017S-F09	Fzd4	GSFSGYYWS	189	GEINHSGSTNYN	398	CARDLRFYSSSWRRVGMDVW	675	RSSRSLLHTSGYNYLD	1045	LGSNRAS	1131	CMQGTRWPTF	1183
017S-G09	Fzd4	YTITTYAIH	305	GWINADTGDTAYS	462	CARGWTTISSLGVW	769	RSSRSLLHTNGYNYLD	1044	LGSNRAS	1131	CMQALQTPLTF	1175
017S-H09	Fzd5	NIFRIYAIA	236	AALTGQRTTNYA	336	CNTVTYNAGCYKKYW	901						
017S-A10	Fzd5	LAFNGYTMG	227	ASITWNGRYTYYA	371	CNARLDAVYGHSRYDSW	885						
017S-B10	Fzd5	NFFSNYPLG	235	GAISRTGSGTFYA	393	CAAGVTGSWRYW	581						
017S-C10	Fzd8	RSFSNYRVA	245	AVSWSVGMTYYA	388	CNAVTYNGYTIW	891						
017S-D10	Fzd8	GTFGSYAVG	200	GLISRNAGNTLYA	427	CNAVNGRLNYW	888						
017S-E10	Fzd8	RTFSSYSLA	258	AAVSASGANTYYA	340	CAAPQSPNMYIRTDQLWWYKYW	584						
018S-D07	Fzd1	RSFSTYPMG	246	TVISGSGGSTYYA	573	CAAGPTLPFRYW	580						
018S-E07	Fzd1	RAFSNYAMG	238	AAINWSGDSAYYA	315	CNARLSFAGGMGYW	886						
018S-F07	Fzd1	IKSMFDMNFMG	224	AFITRGGTTRYG	347	CNAVSTDWTRDYW	889						
018S-G07	Fzd1	LTIDDYYMV	232	SYIGTSDGTTYYA	563	CNAVTYNGYTIW	891						
018S-H07	Fzd4	RVFSSYAQA	264	AGIASDSTTFYA	348	CKVHNFGATYW	880						
018S-A08	Fzd4	RIFSSYAQA	240	ASIPSDGTTFYA	370	CKVHNFEATYW	879						
018S-B08	Fzd4	LTFSTYGMG	231	AAINWSGRSTVYA	316	CNSFPLRLHDW	899						

[0268]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
018S-C08	Fzd4	RTLSSYVVG	261	ALISLSGASTYYA	358	CNAVSTDWTTDYW	889						
018S-D08	Fzd5	IKSMFDMNFMG	224	AFITRGGTTRYG	347	CNAVSTDWTRDYW	889						
018S-E08	Fzd5	RTDGMQAMG	248	GAITWSLGSAFYA	395	CNVLAQNDGDYRTYG	904						
018S-F08	Fzd5	RTFSSFVMG	256	AAVSASGGYTWYA	341	CNAVWKFGTTHW	892						
018S-G08	Fzd5	RTFSSFVMG	256	AAVSASGGYTWYA	341	CNAVCKFGTTHW	887						
018S-H08	Fzd5	RTFSSFVMG	256	AAVTASGGYAWYA	343	CNAVWKFGTTHW	892						
018S-A09	Fzd8	ITFSFNSVG	226	AVFIAGYGAYYA	379	CNGVTYNGYTIW	894						
018S-B09	Fzd8	HDFSSTYGVG	221	ATISWGGTNIA	377	CAAQKPYYNGHFYADDKHYDHW	585						
018S-C09	Fzd8	ITFGFDSVG	225	AVFNAGYRAYYA	380	CNAVTYNGYTIW	891						
018S-D09	Fzd8	RTFSWYSMG	260	AAVSWSGVSTYYP	342	CNAVTYNGYTIW	891						
018S-E09	Fzd8	ITFSFNSVG	226	AVFIAGYGAYYA	379	CIGVTYNGYTIG	878						
018S-F09	Fzd8	RTDGMQAMG	248	GAITWSLGIAFYA	394	CNVLAQNDGDYRTYW	905						
018S-G09	Fzd8	HDFSSTYGVG	221	AAISWRGTNIA	322	CAAQKPYYNGHFYADDKHYDHW	585						
021S-A01	Fzd8	DSVSSNSAAWN	74	GRAYYKSRWYYDYA	433	CVRDLRPSGDLNFDYW	926	RASQSIGSSLH	985	YASQSVS	1154	CHQSGRVPVTF	1162
021S-C01	Fzd1	GSISSGGYSWS	195	GSIYHSGSTYYN	454	CARFYYDILNGYSYFDYW	714	RSSRSLLDTDDGNTYLD	1040	TLSHRAS	1153	CMQSIQLPWTF	1188
021S-D01	Fzd1	FTFSSYGMH	143	AVISYDGSNKYYA	384	CAKGSVFGLKAGGYADYW	618	RSSQSLVHSDGNTYLS	1038	KISNRFS	1124	CMQATQFPHTF	1177
021S-E02	Fzd8	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CARDGTPFYSGSYYGSW	669	QGDSLRTYYAS	949	GKNNRPS	1113	CNSRDNSGKHKVF	1193
021S-G02	Fzd8	DSVSSNSGAWN	76	GRTYYRSKYYNGYA	452	PRLDYW	930	RSSQSLLDSDDGNTYLD	1031	MLSSRAP	1134	CMQRLEFPYTF	1187

[0269]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
021S-A03	Fzd8	DSVSSNSAAWN	74	GRTYYRSKWYNDYA	451	CARSQATGERFDYW	818	RSSQNIFQSLN	1029	SASSLQS	1148	CQQSYNSPITF	1240
022S-H06	Fzd4	FTFSSYAMS	141	SVISTSGGTVLYT	560	CADGSGTSHR	587	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
022S-A11	Fzd10	YIFTDYYMH	278	GGIFPIFGTANYA	402	CAKGSYYYDNSGYYWDAFDIW	619	RASQGISNNIN	968	AASNLET	1062	CQQTYSIPFTF	1283
027S-H02	Fzd5	FTFSSYAMS	141	SAISGSGGSTYYA	507	CAKGLWGPLLNW	615	RASQSVSSNYLS	1016	GASSRAP	1106	CQQRTNWPPRVTF	1228
027S-B03	Fzd8	DSVSSNSATWN	75	GRTYYRSKWYSDYA	451	CTRGNWNVGLANW	911	SGTSSNIGAGYDVH	1053	GNNNRPS	1113	CSAWDDNLNGVVF	1324
027S-E01	Fzd5	RSFSIYNTA	244	AAISWSGGSTYYA	327	CNVITIVRGMGPRAYW	903						
004S-D05	Fzd5	LTFSIYAMH	230	SAISGDGALTYYA	504	CARGVYPYSSKHKPSYYYYGMDVW	767	QASQDISNYLN	943	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLFTF	1263
004S-D04	Fzd5	YDFTTYGIH	277	GGVIPAFGATDYS	420	CARGYYYGMDVW	771	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-B05	Fzd5	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CASGLGYFDYW	854	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-G03	Fzd5	YTFTNNFMH	292	GGIIPIFGTPHYA	411	CARTLTTPPYYYGMDVW	826	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-F03	Fzd5	FTFSNSDMN	128	SAIGTGGDTYYA	501	CTRDLYGGYRDYW	910	KSSQSLLHSDGYTYLY	933	LGSNRAS	1131	CMQGLQTPWTF	1180
004S-C04	Fzd5	YIFTGYYMH	279	GRINPNSGGTNYA	446	CARGGEYSSGWTYYYYGMDVW	724	RATQTISTYLN	1027	AASRLQS	1067	CQQYYSYPWTS	1319
004S-B06	Fzd5	YTFTYRYLH	303	GMINPIGGSINYA	431	CARDVMDVW	700	RASQGISNNLN	969	AASALQS	1061	CQHLNNFPLTF	1196
004S-F06	Fzd5	FSVGSNYMT	100	SSISSGNSYIYYA	541	CARGPKTMWEDRPDYW	748	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-A04	Fzd5	FTFSTYSMI	158	GFIRSKDYGGTTEYA	400	CARLTGGAVAGTHRDYW	789	RASQGISNNLN	969	GASSLQS	1105	CQQSHSSPRTF	1237
004S-A05	Fzd5	FTFSSYVMS	150	SAIGTGGGTYYA	502	CARGSSGYYVAW	759	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264

[0270]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
004S-F05	Fzd5	FTFSNHYMS	126	AGVSIDANKKYYA	356	CARDQNDSWYRSDYW	682	RSSQSLLHSDGYTYLY	1033	LGSHRAS	1129	CMQGLQTPHTF	1179
003S-C01	Fzd1	GTFSSYAIS	207	GRINPNSGGTNYA	446	CARGSGYDFFDYGMDVW	758	RASQSISNNLN	990	AASSLQS	1071	CQQSYNTPFTF	1241
003S-H01	Fzd1	DTFSNYVLS	78	GLVDPEDGETIYA	429	CAKASTPMVQGAPDYW	594	RASQSIGSNLD	983	AASTLQS	1075	CQQNYATPRTF	1224
003S-H02	Fzd1	GTFNRYAIT	201	GGIIPIFGTANYA	408	CATTQGVYSSSWYGGGRAFDIW	873	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-H04	Fzd1	YTFTYRYLH	303	GRINPNSGGTNYA	446	CWGGSYYGDYW	927	RASQGISNNLN	969	AASSLQS	1071	CQQANSFPITF	1208
003S-A05	Fzd2	FTFSSYAMH	141	SSISWNSGRVDYA	545	CARGSGIAASGSYW	757	TSSQSLLHSDGKTYLY	1058	LGSNRAS	1131	CMQGTHWPYTF	1182
003S-B05	Fzd2	FTFSNAWMS	125	STIAGSGGRTYYS	550	CAKDSIGRRGRGAPQPYYYYGMDVW	606	KSSQSLLHSDGKTYLY	932	LGSNRAS	1131	CMQSLQSPLTF	1189
003S-F05	Fzd2	FSFSTYTMS	98	SRINGDGSSTRYA	531	CARAIVGATGLNRFKAFDIW	640	KSSQSLLHSDGKTYLY	932	LGSNRAS	1131	CMQNTHWPLTR	1186
003S-G05	Fzd2	STFTNAWMS	273	SAIGTGGGTYYA	502	CARDRVTLRGGYSYGTDAFDIW	693	RSSRSLLHSNGNTYLR	1043	LASRRAS	1125	CIQNTHWPLTR	1164
003S-H05	Fzd2	FTLSTYNMN	170	SRINYDGSATTYA	533	CARDRDIVVVPAQRGEGGFDPW	683	KSSQSLLHSDGKTYLY	932	MGSYRAS	1133	CMQGTHWPLTF	1181
003S-A07	Fzd2	FTFSSYAMS	141	SAISGSGGSTYYA	507	CAKGGRDGYKGYFDYW	611	KSSQSLLHSDGKTYLY	932	LGSNRAS	1131	CMQNTHWPLTL	1185
003S-C07	Fzd2	FSFRSYSMS	92	SAIGTGGGTYYA	502	CTTTTVTTSW	923	RTSQSVSSNLA	1048	DASNRAS	1083	CQQYGSSPYNF	1304
003S-F07	Fzd2	FSFSSYGMS	97	SHISSGGATIDYA	526	CARDGGYW	665	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-G07	Fzd2	FTFSSYWMH	152	SYISGDSGYTNYA	566	CARDNGYCSGGSCYATYYGMDVR	680	RASQAISSYLA	957	KASTLDT	1122	CQQADTFPFTF	1206
003S-B08	Fzd2	FTFSSZZMH	153	AVISYDGSNRZYA	385	CARSYYDSSGYPRKDAFDIW	824	KSSQSLLHSDGKTYLY	932	LGSNRAS	1131	CMQTLKAPLTF	1192

[0271]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
003S-F08	Fzd2	ZSVSSNYMS	310	SRINSDGSTISYA	532	CARARLLGGYYTPDRMDVW	647	RSSQYLSSAYLA	1039	GASSRAT	1107	CQQYGSSPTF	1303
003S-H08	Fzd2	FTFNRHALS	111	ALISSNGDHKYYT	360	CARDLMVGRNKLDYW	674	QASQGISNNLN	946	AASSLQS	1071	CQQSYSTPAFTF	1259
003S-A09	Fzd2	FTFSSSNMN	139	SGISGSGSSTYYA	518	CARGRVWSSRDYW	756	RSSQSLLHSDGYTYLY	1033	LGSNRAS	1131	CMQGTHWPLTF	1181
003S-B09	Fzd2	FNIRRZNMZ	88	SAIGTGGGTYYA	502	CARGDSGSYRDYW	720	RSSESLLHSDGKTYLY	1028	LGSNRAS	1131	CTQTVQFPITF	1325
003S-C09	Fzd2	FTFSSSAMH	138	SGISGSGTTTYYR	519	CARRLIAVAGAEFDPW	809	RASQGISNNLN	969	SASNLQS	1146	CQQSYSTPWTF	1270
003S-F09	Fzd4	FTFSNSDMN	128	GRIKSKAYGGTTEYA	445	CARQYYFDYW	806	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-H09	Fzd4	FTFSSFGMH	135	SVISSGGSPYYA	558	CATASGDFDYW	865	RASQSIGSNLN	984	RASTLES	1142	CQQTYTTPRF	1290
003S-A10	Fzd4	FTFDDYAMH	105	AIVSYDGTYKYYS	357	CARQTRGGTTDGW	804	RASQGISNNLN	969	YASSLQS	1156	CQQSHSPPGTF	1236
003S-B10	Fzd4	FTFSSHSTH	136	SAISASGDSTFYA	503	CARPIVGATAFDIW	797	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-G10	Fzd4	FTZSSYSMN	177	SYSSGNSGYTNYA	572	CARGVVGSGAFDIW	765	RASQSIVSYLN	1002	DASNLQS	1082	CQQGYSAPWTF	1220
003S-B11	Fzd4	FTFSDYYMS	122	SAIDGAGRTYYT	498	CARAIPGDYDYW	639	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-C11	Fzd4	FTFTSYAMH	165	GGIIPIFGIANYA	405	CARTGRGYYGMDVW	825	RASQSIGSNLD	983	AASTLQS	1075	CQQSYSTPRTF	1265
003S-D11	Fzd4	FTFSSYSMS	147	SYISGDSGYTNYA	566	CARAGVATIAFDYW	638	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-F11	Fzd4	FTFDDYGMH	106	SAISGSGGSTYYA	507	CTTPNYYDSR	920	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
003S-E12	Fzd4	GTFSSYAIS	207	GWINAGNGNTTYA	465	CARHYYGSGSYPDW	777	ZPZQTZZSHLN	1060	PASSLQS	1136	CQQSYSTPLTF	1264
004S-A01	Fzd4	FTFSTYGMH	157	SYISSSSSAIYYA	569	CARGGLDGPIDYR	727	RASQGISNNLN	969	AASTLQS	1075	CQQGNNFPFTF	1218
004S-G01	Fzd4	FTVSSHSMG	173	SLVSFDGSKEHYA	528	CARLGSTPDYW	784	RASQGISNNLN	969	AASSLQS	1071	CQQYYTYPYTF	1320
004S-C02	Fzd4	FTFSSYGMH	143	AVISYDGSNKYYA	384	CASDPVTAATR	853	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264

[0272]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
004S-D02	Fzd4	FSFSSYGMS	97	SGISGSGRSTYYA	517	CAKDGYW	596	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-A03	Fzd4	FTFSSYAMH	141	SGINWNGGSTGYA	513	CARPAGSAQNWFDPW	796	RASQGISNNLN	969	DASNLET	1081	CHQSYSIPRTF	1163
004S-B03	Fzd4	FSFSRYGMS	94	SGVGGSGGSTZYA	524	CARDGSW	668	RASQDVDTWLA	963	DASTLET	1087	CQQGYNIPWTF	1219
004S-C03	Fzd4	YTFTSYAIS	297	GIINPSGGSTSYA	422	CARQIGWELMPDIW	803	QASQDISSYLN	944	AASTLQS	1075	CQQAISFPLTF	1207
004S-C05	Fzd5	ZZZTDYYZQ	312	GGMNZNRGNTGYA	419	CANGSYAQHLW	629	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-G05	Fzd5	FTFSSYWMH	152	STISPSGLYIYQA	556	CAKDKVPYSYGPNFDYW	600	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-E06	Fzd5	FFFSGYWMS	83	ANIKQDGSEKYYV	368	CARVFPLHDYW	831	QASQDISNYLN	943	KASSLES	1120	CQQANSFPYTF	1211
004S-C06	Fzd5	FPFSTFSMN	90	AGISWNSGTIDYA	355	CARSGPAAMVYYYYGMDVW	815	RSSQNVSSYLA	1030	GASTRAT	1111	CQHRANWPQTF	1198
004S-E07	Fzd6	FTLSSHHMN	169	SAIGTGGGTYYA	502	CAAPDYW	583	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-F07	Fzd6	FSFSKKYMT	93	SSIDGNGDHVFYA	536	CARPYYYDSSGYDPMGDYW	801	QASQDITNYLN	945	KASTLES	1123	CQQSYSAPYTF	1248
004S-C08	Fzd6	FTVSSNYMN	174	SAIGTGGGTYYA	502	CAQGTYW	632	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-F08	Fzd6	FTFDDYYMN	107	SAVSGNGGGTFYA	511	CARGGNYGSGDYW	730	RASQSISZWLA	1000	EASTLQS	1094	CQQTYTPPFTF	1289
004S-G09	Fzd6	GTLNNHTLS	219	GRIIPIFGTANYA	435	CARDRRGYGMDVW	692	RASQAISNSLA	955	DASNLET	1081	CQQAYSFPWTF	1216
004S-B10	Fzd6	FTFSDYYMS	122	SGINWNSAKIGYV	514	CARIGAGGAFDIW	778	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-H10	Fzd6	FIFSDYYMS	84	AVITSGGTFKYYA	386	CARNGIAAAEDYW	793	RASQSISTYLS	999	GASSLES	1104	CQQSYSPPFTF	1254
004S-B11	Fzd6	FTFSSSWMH	140	SGISWNSGSIGYA	522	CARYSSGGSLDYW	852	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-D11	Fzd6	YZFZZZYMH	309	GRINPNSGGTNYA	446	CARARSSGWTDAFDIW	648	RASQSVSSWLA	1018	AASTLQT	1076	CQQSYSTPTF	1268
004S-F11	Fzd6	FTFSSYAMS	141	SSISGGGRHTYYA	539	CARPYSSSRQGDYW	800	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-G11	Fzd6	YIFTDYYMH	278	GWINPNSGGTNYA	471	CARDRPGFDPW	687	RASQSVSSYLA	1019	GASSRAT	1107	CQQYAISYTF	1292

[0273]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
004S-B12	Fzd6	FTFSSYWIH	151	SYISGDSGYTNYA	566	CAKGIRWFDPW	613	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
004S-C12	Fzd6	YIFTDYYMH	278	GWMNPNSGNTGYA	490	CASSHYAPGMDVW	859	RASQGISSYLA	974	RTSTLES	1144	CQQSYSTPWTF	1270
004S-F12	Fzd7	FTVGNNYMS	171	SSITTTSTLYA	547	CARGKEGRYSNYEAAW	741	RASQSISSYLN	996	AASTLQT	1076	CQQSYSIPFTF	1250
005S-B01	Fzd7	FTFRSYGMH	116	SLISGSGDNTNYA	527	CARREPLYSSRRGAFDIW	807	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-C01	Fzd7	FTFSSYSMS	147	SAISGSGGSTYYA	507	CTRTIVGATPHYW	914	RASQGISNNLN	969	KASSLQS	1121	CQQSYSLPYTF	1252
005S-F01	Fzd7	FTVSSNYMS	175	SAISGSGATTTYA	505	CAKGAGYGSGSWQAAW	608	RASQSVSSSYLS	1017	GASSRAT	1107	CQQRYKSYTF	1229
005S-B02	Fzd8	YSFTNYAMH	280	GRIIPIFGTAZYA	436	CARGTFLEWLLTNYGMDVW	763	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-D02	Fzd8	GTFSSYVIS	209	GWIGPHNGNTNYA	461	CATGWPRYYYGMDVW	868	RASQSVSSNLA	1014	NTSNRAT	1135	CQHYNNWPFTF	1201
005S-G02	Fzd8	YTFTSYYMH	301	GGIIPIFGTAZYA	409	CARLPYYDFWSGYYGGRTGFDYW	786	RASQSVSTNLA	1020	DASNRAT	1084	CQQRSNWPPQITF	1227
005S-H02	Fzd8	YTFTYRYLH	303	GWINAGNGNTTYA	465	CARASLYYDYVWGSYRHYYFDYW	650	QASQDISHYLN	941	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-B03	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GIINPSGGRTTYA	421	CATSFGGGWIVVDTSLWYW	872	RASQSINSNLA	989	GASSRAT	1107	CQQYGSSPYTF	1305
005S-C03	Fzd8	GSFSGYAIS	187	GGIIPIFGTANYA	408	CRVDAFDIW	906	RASQSVSSSYLS	1017	DTSNRAT	1090	CQQYGSSPITF	1300
005S-E03	Fzd8	FTFTSSAVQ	164	GGIIPIFGTANYA	408	CARSSGWQNRFAFDIW	820	RTSQSISSYLN	1047	AASTSQS	1077	CQQSFSSWTF	1234
005S-F03	Fzd8	YTFTYRYLH	303	GWINAGNGNTKYS	464	CATDLPVRKGFTYYDILTGSYGMDVW	867	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-B04	Fzd8	YTFTNNFMH	292	GGIIPIFGTANHA	407	CARGLRYFDWPQGIYYYYGMDVW	745	QASHDINIALN	936	AASSLQS	1071	CQQSYSSPLTF	1257

[0274]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
005S-C04	Fzd8	YTFTSYYMH	301	GRINPNSGGTNYA	446	CARGGLLFDYW	728	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-D04	Fzd8	FTFSTYSMS	159	STIGTGGGTYYA	552	CARVGWLRFLDYW	835	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-G04	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GWMSPSSGNAGYA	492	CARNNFLRAFDIW	794	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-A05	Fzd8	FAFSSYAMS	81	SRIDTDGSTTVYA	529	CARAPSYSSGWYVRW	644	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-C05	Fzd8	YTFTYYAMH	304	GIINPSGGSTSYA	422	CARELLPMTTVTSPFIW	709	RASQGISNNLN	969	RASSLQS	1141	CQQANSYPLTF	1212
005S-E05	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GGIIPIFGTANYA	408	CAIRAFDIW	591	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-C06	Fzd8	ZTFSZYDMH	311	SSISSSSHYKYYA	542	CARVRSKAVAGTLPKRLFDIW	844	RASQSVSSSYLS	1017	AASRRAT	1068	CQQYSNWPFTF	1316
005S-E06	Fzd8	YTFTSYYMH	301	GWMNPNSGNTGYA	490	CARGNPTSGHIVVVPAATFSDYW	747	QASQDISNRLN	942	SASRLQI	1147	CQQSYRTPRTF	1246
005S-G06	Fzd8	GTFSZZTIS	213	GWMNPDSGKTGYA	486	CARWAFPIPNAFDIW	847	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-H06	Fzd8	YTFTNNFMH	292	GGIFPIYGISTYA	403	CARDRPSSSWYAFDYW	688	RASQGISNNLN	969	DASTLQT	1089	CQQSFSAPITF	1233
005S-A08	Fzd9	GTFSZYAIS	212	GGIIPIFGTANYA	408	CARGGLLRFGDGWGMGMDVW	729	RASQSISSKSLA	995	GASTRAT	1111	CQQYGIAPTF	1299
005S-C08	Fzd9	YTFTDYHMH	285	GWINAGNGNTTYA	465	CARASSWYLHYYYGMDVW	652	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-E08	Fzd9	FIFSZYAMS	85	SSISAAGAYKYYA	538	CARRGYSSGWRDAFDIW	808	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-F08	Fzd9	YTFTSYYMH	301	GWINAGNGNTTYA	465	CAKDVNYW	607	QASQGISNYLN	947	AASSLQS	1071	CQQTYSTPTTF	1287
005S-H08	Fzd9	GTFSSYAIS	207	GRIIPILGTPNYA	440	CARDRLAFDYW	686	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-A09	Fzd9	FAFSSHWMH	80	SAISVSGGTTFYA	509	CARWGKRLRGSPYYFDYW	849	RASQSIGSNLD	983	RASTLQS	1143	CQQSYSTPSF	1267

[0275]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
005S-F09	Fzd9	FTFSIYGMH	123	SGISWNSGNIGYA	521	CARGPLPTKIGGHYMDVW	749	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-B10	Fzd9	FTFSTXWMS	154	AVMYSGGTTYYA	387	CARLSYYYDSSGPKGDAFDIW	788	RASQGISNNLN	969	AASSLQS	1071	CQQGNNFPLTF	1218
005S-C10	Fzd9	FSLSSYGMH	99	SSISSSSSYIYYA	543	CARSGMVKWLRSFDYW	814	RASQDIGSFLA	958	AASSLQS	1071	CQKYNRAPFTF	1203
005S-E10	Fzd9	FTFTSSAMQ	162	GVINPGSGGTSYN	459	CARGYGDYVWGENYFDYW	770	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-F10	Fzd9	YTLSNYGIS	306	GWISAYNGDTKYA	475	CARFDYFGGMDVW	713	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-G10	Fzd9	YTFTRYAVH	294	GGIIPFFNTVNYA	404	CAADRSPYYYDSSGYYPDAFDIW	576	RASQGISNNLN	969	QASSLDS	1138	CQQSYNVPYTF	1244
005S-A11	Fzd9	FTFSSYDMN	142	SGISWNSGYIGYA	522	CAKGSLLLGYYGMDVW	617	RASQSISNNLN	990	DASTLKR	1088	CQQSYNTPRTF	1242
005S-B12	Fzd10	FTZSSYDMH	176	SSISGLGGSTYZA	540	CAREAGTTGGWFDPW	702	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
005S-D12	Fzd10	FTFSDHYMD	118	STIGPAGDTYYP	551	CARASTSGDYSLW	653	RASQSVSTSYLA	1021	GASTRAT	1111	CQQYGASPWTF	1298
006S-B01	Fzd10	YTFTNYCTR	293	GLVCPSDGSTSYA	428	CARRTSASDIW	812	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
006S-C01	Fzd10	FTFTZSAVQ	166	GGFDPEDGETIYA	401	CTTDPLELPWYW	917	RASQGISSALA	973	SASNLQS	1146	CQQAISFPLTF	1207
006S-E01	Fzd10	YTFTGYYMH	288	GIINPSSGRTDYA	423	CARDLTYYYDSSGHSPLGAFDIW	678	RASQSVTSSLA	1022	GASTRAT	1111	CQQYNDWPPTF	1308
006S-G01	Fzd10	FTFSDFGMN	117	AGISGGGGSTDYA	352	CARDSDFWYYYGMDVW	694	KSSQSVLYSSNNKNYLA	934	STNTRSS	1151	CQHRNFF	1199
006S-B02	Fzd10	VSFSGYAMH	276	AYINSGSSEMNYA	391	CAREEWELFGMDVW	704	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
006S-G02	Fzd10	YTVTSYAMH	308	GGIIPIFGTAKYA	406	CAKGGQWLYGMDVW	610	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-A01	Fzd1	YTFTSYYMH	301	GWVSPSSGNTAYA	495	CARDEGAGYYYYMDVW	663	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264

[0276]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
014S-C01	Fzd2	FTFSNYAMT	130	SAIGTGGGTYYA	502	CATAYRRPGGLDVW	866	RSSQSLLHSDGKTYLY	1032	LGSNRAS	1131	CMQNTHWPLTR	1186
014S-F01	Fzd4	FTFSSYAMH	141	SVISTSGDTVLYT	559	CARGGSSDVR	735	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-H01	Fzd4	FTFSNYGMH	131	SYISSSSSTIYYA	570	CARAALGYCTGGVCPPVDYW	634	RASQGISNNLN	969	AASRLQS	1067	CQQSYSPPLTF	1255
014S-C03	Fzd7	YTFTNNFMH	292	GIIZPGGGRTIYA	426	CAKGDYGALDYW	609	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-D03	Fzd7	FNFSSYTMR	87	SVIYGGGNTNYA	561	CARGGSGGNLSYW	733	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-F03	Fzd8	YTFTNNFMH	292	GGIIPLFGTANYA	415	CARLVVRGGYGMDVW	790	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-A04	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GWISSFNGNTKYA	482	CARADDYYDSSGYYYGFDYW	635	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-C04	Fzd8	FTFSSYTMN	148	SRINGDGSNTNYA	530	CARGWAGFDYW	768	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-D04	Fzd8	HTFSGYHIH	222	GWINAGNGNTTYA	465	CARDLSPMVRGVISGMDVW	676	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-E05	Fzd8	YTFTNNFMH	292	GIISPGGGRTIYA	424	CAKGDYGALDYW	609	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPLTF	1264
014S-E06	Fzd10	FTFGNYDMN	109	SSLSWNSGTIVYA	548	CARDSSSGWYASYYGMDVW	695	RASQSISRYLN	993	AASSLQS	1071	CLQHHSYPFTF	1169
027S-C02	Fzd5	YTLTTWYMX	307	GWMNPNSGNTAYA	489	CARGALGMDVW	716	QASQDISNYLN	943	AASSLHT	1069	CQESYSSPYTF	1195
027S-E03	Fzd8	YTFTGHYMH	287	GWMNPNSGNTGYA	490	CARGTGGFDYW	764	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYSTPYTF	1271
027S-F03	Fzd8	YTFTGHYIH	286	GWMNPISGNTGYA	487	CARSTPFDPW	822	RASHDIGTFLA	954	AASTLQS	1075	CQQSYRTPYTF	1247
027S-G03	Fzd8	YTFTHSYIH	289	GWINAKSGGTFYA	466	CARGDYDFWSGYHEYYYGMDVW	721	QATQNIKKYLN	948	KASTLES	1123	CQQSYSTPLTF	1264
027S-H03	Fzd8	YTFTSYYMH	301	GWINPNSGGTNYA	471	CARAPLDGSGSYYVDW	643	RSSQSLLHSNGYNYLD	1036	LGSNRAS	1131	CMQALQTPQTF	1176
027S-A04	Fzd8	YTFTNHFMH	291	GWISPNRGGTNYA	478	CARDCSGGSCYSHFDYW	662	RASQSISRSLA	991	AASNLQS	1065	CQQAYSFPQTF	1215

[0277]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
027S-B04	Fzd8	FTVGSWYMS	172	SAIGTGGGTYYA	502	CAKDITPYGDYSILSHW	599	RASQAISNYLN	956	AASSLQS	1071	CQQTFSPPLTF	1275
027S-C04	Fzd8	YTFTSHWMH	295	GGIIPIFGTTNYA	412	CARDSSSWYSYYYYYMDVW	696	RASQGINNYLA	964	QASNLES	1137	CQQTYSSPLTF	1285
027S-D04	Fzd8	YTFTTYFMH	302	GWIYPNSGGTKYA	485	CTTDLRYDSSGPAAFDIW	916	QASQDIDNYLN	937	AASSLQS	1071	CQQSYSTPVTF	1269
027S-E04	Fzd8	FTFSDHYMS	119	SGISGSGGTTYYA	516	CATYGDFGYFDLW	875	RASQGIRNDLG	966	AASTLQS	1075	CQQAYSFPWTF	1216
027S-C05	Fzd8	GSFSTSVFG	191	GRIIPLFGTTNYA	441	CVKDRAWGFDYW	924	RASQGIRNDLA	965	AASSLQR	1070	CQQSYSKPTF	1251
027S-D05	Fzd8	YTFTSYYMH	301	GWINPKSGGTNYA	467	CARGGFVFDYW	725	QASQDISNYLN	943	ASSTLQT	1078	CQQSYSAPYTF	1248
027S-E05	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GMINPSGGSTTYA	432	CARQAGLHCSSTSCYLGNWFDPW	802	RASQGITKSLA	975	AASNLQL	1064	CQQYNTFPITF	1314
027S-F05	Fzd8	GTFNRYGIS	202	GGIIPRLGATDYA	417	CAKGNWAFDIW	616	RASQSISTYLA	998	GASTRAT	1111	CQQYGSSPTF	1303
027S-G05	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GWISPYNGNTKYA	479	CARGVWTTPMGGGGNWFDPW	766	RASQSISSYLN	996	YASSLQN	1155	CQQSYSTPFTF	1260
027S-H05	Fzd8	GTFGNYGIN	198	GWINPNSGGTNYA	471	CARETTDYYYGMDVW	711	RASQSIGTYLN	986	DASNLET	1081	CQQANSFPLTF	1209
027S-A06	Fzd8	GTFSSYAIN	206	GVIDPSTGGTNYA	457	CARVLPGDSSGWYRGYYYYYGMDVW	838	RASQGISNNLN	969	KASSLES	1120	CQQANSFPITF	1208
027S-C06	Fzd8	GTFTSYPIS	217	GWINTYNGNTIYA	473	CARDLDSGFDLW	673	RASQGVGDYLA	976	DASNLQS	1082	CQQHNAYPLTF	1221
027S-D06	Fzd8	GTFSSYAIS	207	GWISAYNGHTNYA	476	CARGGYSYGTVFDYW	739	RASQDISSWLA	961	KASTLES	1123	CQQSYGAPLTF	1239
027S-E06	Fzd8	YTFTKDYMH	290	GGIIPIFGTANYA	408	CARGLPPAAGGGGYFQHW	744	RASQNVNDWLA	980	SASNLQS	1146	CQQSYSTPFTF	1260
027S-F06	Fzd8	FTFSSYAMH	141	AVTWYDGSNKYYA	389	CAKDLVPYCSGGSCPPSGW	602	RASQSISSYLN	996	GASNLQS	1101	CQQSYSTPLTF	1264
027S-G06	Fzd5	YTFTDYYMH	285	GWMSPNSGNAGFA	491	CARGKSGSFDYW	743	RASQSVNNTYVA	1009	GTSTRAT	1116	CQQYDTSPPTF	1296

[0278]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
027S-H06	Fzd5	YTFTGHYIH	286	GIINPSGGSTSYA	422	CARGFCSGGSCLWYGMDVW	722	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSYTTPFTF	1274
027S-A07	Fzd5	GTFGSYAIT	199	GGIIPIFGTANYA	408	CAKDNGWYFDLW	603	RASQSISTNVN	997	AASSLQS	1071	CQQSYSTPYTF	1271
029S-B01	Fzd1	GTFSSYAIS	207	GRINPHNGNTNYA	1352	CARATRVSAAGTVHFQHW	1363	KSSQSVLHSSNNKNYLA	1389	STNTRSS	1151	CQQYYSTPFTF	1433
029S-D01	Fzd2	YTFTRYYIH	1344	GWMNPNSGNTGYA	490	CARVRFLEEMDVW	1385	RASQSLSSWLA	1403	DASTLQS	1412	CQQAISFPLTF	1207
029S-C02	Fzd2	GTFSSYGIS	1329	GIINPSGGSTSYA	1350	CARGDIVATMGMKKVDYYYYMDVW	1369	RASQDISNNLN	1391	GASHLQT	1414	CQQANSFPVTF	1210
029S-F02	Fzd2	YTFTRYYLH	1345	GWMNPNSGNTGYA	490	CARGIGYW	1372	RASQGISNYLA	971	AASRLQT	1407	CLQYNTYPWTF	1420
029S-H02	Fzd2	GTFSTYAIS	210	GDIIPIFGSANYA	1348	CARELGLGWFDPW	1367	RSSQSLLHSNGYNYLD	1036	LGSSRAS	1417	CMQALQTPLTF	1175
030S-A02	Fzd7	YTFTDYYMH	285	GWMNPNSGSTGYA	1358	CARGDINYGNFDYW	1368	RASQSISSYLN	996	KASTLHN	1415	CQQAISFPLTF	1207
030S-B02	Fzd3	YTFTDYYMH	285	GWMNPNSGNTGYA	490	CARQGGSYSMGLDPW	1379	RASQSITTYLN	1402	KTSSLQS	1416	CQQGDSFPYTF	1422
029S-E03	Fzd3	YTFTGYYMH	1342	GWINPNSGNTGYA	1354	CARSYYGVIDAFDIW	1383	RASQSISSYLN	996	AASSLQT	1408	CQQSFRLPLTF	1423
029S-G03	Fzd3	YTFTNYYMH	1343	GWMNPNSGNTGYA	490	CAREDDFWSGGGMDVW	1365	RASQSIISYLN	1400	AASSLQS	1071	CQQSWRFPYTF	1426
030S-E03	Fzd3	FTFSDYYMS	122	SAISGSGHSTYYA	1359	CAREGLRGWSIFDIW	1366	KSSQSVLYSSNNKNYLA	934	WASTRES	1418	CQQYYSTPPTF	1434
029S-D05	Fzd3	YTFTDHYFH	1338	GWANPSSGNTGTA	1353	CARSRLRWDWYFDLW	1382	RASQTISSYLN	1405	DASNLET	1081	CQQSYSIPLTF	1250
030S-H03	Fzd3	FSFSSHAMS	1327	SAIGTGGGTYYA	502	CANPKHYW	1361	RASQGVSTYLA	1396	AASSLQS	1071	CQQYYSSPQTF	1432
029S-B06	Fzd3	YTFSRHYIH	1337	GWMNPNSGNTGYA	490	CARGGHTGYSSGWYNHW	1370	RASQSVSSWLA	1404	AASSLQS	1071	CQQAFRFPPTF	1421
029S-E06	Fzd3	YWFTASYMH	1347	GWMKPDSGNTGYA	1356	CARRSSSWGWYFDLW	1380	RASQNINSWLA	1397	AASSLQS	1071	CQQYYSFPLTF	1431

[0279]

克隆 ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
029S-H06	Fzd3	YTFAKYYIH	1335	GWMNPNSGNTGYA	490	CARHKRHTPYAFDIW	1378	RASQSISSYLN	996	AASSLQS	1071	CQQSHSTPLTF	1424
029S-G07	Fzd3	YTFTDSYIH	1339	GWISAYNGNTNYA	477	CARGSGYFDLW	1377	RASQSISKWLA	1401	GASTLQS	1109	CQQAYSFPWTF	1216
029S-H08	Fzd3	YTFTGHYMH	1340	GWMNPNSGNTGYA	490	CARVGDYDRFNWYFDLW	1384	RASRTVYNFLA	1406	DASNLRT	1411	CQQSYSTPPTF	1427
029S-F09	Fzd3	GTFSSYAIT	1328	GWISAYNGNTNYA	477	CARANRGLRKNYYYGMDVW	1362	RASQSIARYLN	1398	GASSLQS	1105	CQQSYNTPWTF	1243
030S-F04	Fzd3	YTFTSSYIH	1346	GIINPSGGGAVYA	1349	CARWTTVVTGAAFDIW	1386	RASQGIRNDLN	1393	DASNLGT	1410	CQQSSRIPPTF	1425
029S-A10	Fzd3	YSFTGYYLH	1333	GWINPNSGGTNYA	471	CARDHGTMIAVAGTFDYYYYMDVW	1364	RASQGISKYLA	1394	AASSLQS	1071	CQQSYSTPWTF	1270
029S-B11	Fzd3	YTFNGYYMH	1336	GIVNPSGGGTNYA	1351	CARGGNYGRWLQPWYFDLW	1371	QASQDISNYLN	943	GASALRS	1413	CQQTKSFPLTF	1429
029S-D11	Fzd3	HTFTSHYMH	1331	GWMNPNSANAGYA	1357	CARGLGYFDLW	1374	RASQDISRGLG	1392	AASTLYR	1409	CQQAYSFPWTF	1216
030S-H05	Fzd7	YSFTNYYMH	1334	GWMNPNSGNTGYA	490	CARSPDFWSGEGYFDLW	1381	RASQSIGNYLN	1399	AASSLQS	1071	CQQANSFPLTF	1209
030S-A06	Fzd7	YMFTGHDMH	1332	GRIIPILGIANYA	438	CARGIHGDYGLDYYYMDVW	1373	RASQAIGRRLA	1390	AASSLQS	1071	CQQYDTYWTF	1430
029S-C12	Fzd7	YTFTGYYMH	1342	GWMNPNSGNTGYA	490	CARGMEYW	1375	RASQGISSYLA	974	AASTLQS	1075	CLQYNTYPWTF	1420
030S-C06	Fzd7	YTFTGYYIH	1341	GWMDPNSGYTGYA	1355	CARGPADFWSGYKNDYFDFW	1376	RASQGISSWLA	1395	DASSLQS	1086	CQQSYSTPYSF	1428
4A12	Fzd5	GYTFTNYDIN	1330	WIYPRDGSTKYNEKFKG	1360	CVRSAWGFAY	1387	KASQDVGTAVA	1388	WASTRHT	1419	QQYSTYPLT	1435

[0280] 表1B提供了说明性克隆的克隆ID、抗体重链片段和/或轻链片段(如果存在)的序列标识符编号。在某些实施例中,Fzd结合结构域是Fab或衍生自Fab,因此表1B的重链包含VH和CH1序列,但不包含CH2或CH3序列。在某些实施例中,Fzd结合结构域是VHH或sdAb ®或衍生自VHH或sdAb,因此表1B包含VHH结构域。表1B还提供了证明这些克隆与各种Fzd受体结合的数据。通过如上所述的BLI确定Kd值。空白条目表示与特定Fzd受体的结合尚未确定。条目“n.b.”指示未结合。如表1B所示,如通过Octet BLI中的结合亲和力所确定的,抗体片段的子集对单一Fzd表现出单特异性或对Fzd亚家族表现出特异性。

[0281] 表1B:克隆ID、重链(HC)和轻链(LC)Seq ID No以及结合特性。

[0282]

克隆 ID	HC SID NO	LC SID NO	确认的结合	Kd（nM）									
				Fz1	Fz2	Fz3	Fz4	Fz5	Fz6	Fz7	Fz8	Fz9	Fz10
001S-B01	1	38	Fzd1、Fzd2、Fzd7、Fzd9	**	**	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**	n.b.	*	n.b.
001S-E02	2	39	Fzd1、Fzd2、Fzd7	*	**	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	*	n.b.	n.b.	n.b.
001S-G02	3	40	Fzd1、Fzd2、Fzd7	**	**	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**	n.b.	n.b.	n.b.
001S-H02	4	41	Fzd1、Fzd2、Fzd7	**	**	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**	n.b.	n.b.	n.b.
001S-A03	5	42	Fzd1、Fzd2、Fzd7、Fzd9	*	**	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**	n.b.	**	n.b.
001S-B03	6	43	Fzd1、Fzd2、Fzd7	*	*	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	*	n.b.	n.b.	n.b.
004S-G06	7	44	Fzd5、Fzd8					*			*		
002S-B01	8		Fzd1	*									
002S-C02	9		Fzd1	*									
002S-E02	10		Fzd1	**									
002S-G02	11		Fzd1	**									
002S-F03	12		Fzd1	**									
002S-A04	13		Fzd1	*									
002S-B04	14		Fzd1	**									
002S-D04	15		Fzd1	**									
004S-H04	16	45	Fzd5					**					
001S-A04	17	46	Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8	*	*	n.b.	n.b.	*	n.b.	*	*	n.b.	n.b.
003S-E07	18	47	Fzd2		**								
003S-D10	19	48	Fzd4	n.b.	n.b.		*	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
004S-B08	20	49	Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**		n.b.	n.b.	n.b.
004S-D08	21	50	Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**		n.b.	n.b.	n.b.
004S-C09	22	51	Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**		n.b.	n.b.	n.b.
004S-F10	23	52	Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**		n.b.	n.b.	n.b.
004S-A11	24	53	Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**		n.b.	n.b.	n.b.
004S-A12	25	54	Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**		n.b.	n.b.	n.b.

[0283]

005S-B07	26	55	Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-D08	27	56	Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-E09	28	57	Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-H10	29	58	Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-B11	30	59	Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-D11	31	60	Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
014S-G02	32	61	Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	414		n.b.	n.b.	n.b.
014S-B04	33	62	Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		**	n.b.	n.b.
014S-B06	34	63	Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
014S-G06	35	64	Fzd10	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**
014S-A07	36	65	Fzd10	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**
017S-B09	37		Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		*	n.b.	n.b.
004S-D01	66	67	Fzd4				*						
004S-E09	68	69	Fzd6										
004S-F09			Fzd6						**				
004S-H09			Fzd6					n.b.	**		n.b.		n.b.
004S-B10			Fzd6						**				
004S-C10			Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**	n.b.	n.b.		n.b.
004S-F10			Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**		n.b.	n.b.	n.b.
004S-G10			Fzd6					n.b.	**		n.b.		n.b.
004S-A11			Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**		n.b.	n.b.	n.b.
004S-B11			n.b.						n.b.				
004S-D11			Fzd6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
004S-E11			n.b.					n.b.	n.b.		n.b.		n.b.
004S-F11			Fzd6						**				
004S-G11			Fzd6						*				
004S-A12			Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**		n.b.	n.b.	n.b.
004S-B12			Fzd6						**				
004S-C12			n.b.										
004S-D12			n.b.						n.b.				
004S-F12			n.b.										
004S-F12			n.b.	n.b.	n.b.					n.b.			
004S-G12			n.b.	n.b.	n.b.					n.b.			
005S-B02			n.b.					n.b.			n.s.		
005S-C02			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
005S-D02			Fzd5、Fzd8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	**	n.b.	n.b.	**	n.b.	n.b.
005S-E02			Fzd5、Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.		**	n.b.	n.b.
005S-H02			Fzd5、Fzd8					**			**		
005S-A03			Fzd5、Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.		**	n.b.	n.b.
005S-C03			n.s.								n.s.		
005S-E03			n.s.					n.s.			n.s.		
005S-F03			Fzd8								**		
005S-B04			Fzd5、Fzd8					**			n.s.		
005S-F04			n.b.				n.b.				n.b.		n.b.
005S-G04			Fzd5、Fzd8					**			**		
005S-H04			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
005S-E05			n.b.								n.b.		
005S-G05			Fzd5、Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.		**	n.b.	n.b.
005S-H05			Fzd5、Fzd8	n.b.	**		n.b.	*	n.b.		*	n.b.	n.b.

[0284]

005S-D06			Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		**	n.b.	n.b.
005S-F06			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
005S-G06			n.s.					n.s.			n.s.		
005S-A07			Fzd9、Fzd10	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	*	**
005S-B07			Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-A08			Fzd9									**	n.b.
005S-B08			Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-D08			Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-E08			Fzd9									**	n.b.
005S-F08			n.b.									n.b.	n.b.
005S-C09			Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-D09			Fzd9									**	
005S-E09			Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-F09			Fzd9									**	n.b.
005S-A10			Fzd9									**	n.b.
005S-B10			Fzd9									**	n.b.
005S-E10			Fzd9									**	n.b.
005S-H10			Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-B11			Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-D11			Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
005S-G11			n.b.									n.b.	
005S-H11			n.b.										n.b.
005S-E12			Fzd10	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**
006S-A01			Fzd10										**
006S-H01			n.b.										n.b.
006S-A02			Fzd10	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**
006S-D02			n.b.									n.b.	n.b.
006S-H02			Fzd10	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**
006S-A03			n.b.										n.b.
006S-B03			n.b.										n.b.
006S-C03			n.b.										
014S-A01			Fzd1、Fzd2、Fzd7	*	**					*			
014S-B02			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
014S-G02			Fzd6	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	350		n.b.	n.b.	n.b.
014S-B03			n.b.						n.b.				
014S-C03			Fzd1、Fzd2、Fzd7	**	**					**			
014S-A04			n.b.					n.b.			n.b.		
014S-B04			Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		**	n.b.	n.b.
014S-B05			Fzd5、Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.		**	n.b.	n.b.
014S-B06			Fzd9	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.
014S-F06			n.s.										
014S-G06			Fzd10	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**
014S-A07			Fzd10	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	**
017S-E08			Fzd8					n.b.			**		
017S-H08			n.b.					n.b.			n.b.		
017S-A09			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.

[0285]

017S-B09			Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		*	n.b.	n.b.
018S-F06			Fzd4	n.b.	n.b.		**	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
018S-H06			n.b.					n.b.			n.b.		
018S-B07			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
017S-A10			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
017S-B10			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
017S-D10			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
018S-H08			n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.	n.b.
018S-B09			Fzd5、Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.		**	n.b.	n.b.
021S-A01			n.b.	n.b.				n.b.			n.b.		n.b.
021S-E02			Fzd5、Fzd8	n.b.	n.b.		n.b.	**	n.b.		**	n.b.	n.b.
021S-G02			n.s.										
021S-A03			n.b.	n.b.				n.b.			n.b.		n.b.
029S-B01			n.b.	n.b.									
029S-D01			Fzd1、Fzd2、Fzd7	**	**					**			
029S-C02			Fzd1、Fzd2、Fzd7	**	**					**			
029S-H02			Fzd1	**	n.b.					n.b.			
030S-A02			Fzd7							**			
029S-E06			Fzd2、Fzd6、Fzd3			*							
030S-F04			Fzd3			**							
030S-H05			Fzd7							**			
030S-A06			Fzd1、Fzd2、Fzd5	*	*			**		*			
029S-C12			Fzd7							**			
030S-C06			Fzd1	**	**	**							
001S-A01			Fzd1、Fzd2、Fzd7	**	**					**			
001S-H01			Fzd1、Fzd2、Fzd7	**	**					*			

[0286] *指示<100nM;**指示100-2000nM

[0287] 实例2

[0288] 抗FZD抗体片段的丙氨酸扫描突变

[0289] 选择一种抗体片段(克隆001S-A04)用于CDR的丙氨酸扫描诱变,并且通过实例1中所描述的Octet BLI来确定各种突变体的相应Fzd1结合亲和力。如表2所示,大量的突变体以与野生型抗体片段类似的亲和力结合Fzd1表明Fzd1抗体和其抗原结合片段可以容许CDR内的氨基酸修饰。

[0290] 表2.001S-A04丙氨酸扫描突变CDR序列和通过Octet BLI确定的与生物素化Fzdd1 CRD的K_D(nM)(n.b.指示未观察到结合)。

[0291]

克隆 ID	Kd（nM）	CDR H1	SEQ ID No.	CDR H2	SEQ ID No.	CDR H3	SEQ ID No.	CDR L1	SEQ ID No.	CDR L2	SEQ ID No.	CDR L3	SEQ ID No.
WT	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWVF	1165
VLL1A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CALYLGRGIWVF	1444
VLL2A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLAYLGRGIWVF	1445
VLY3A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLALGRGIWVF	1446
VLL4A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYAGRGIWVF	1447
VLG5A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLARGIWVF	1448
VLR6A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGAGIWVF	1449
VLG7A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRAIWVF	1450

[0292]

克隆 ID	Kd（nM）	CDR H1	SEQ ID No.	CDR H2	SEQ ID No.	CDR H3	SEQ ID No.	CDR L1	SEQ ID No.	CDR L2	SEQ ID No.	CDR L3	SEQ ID No.
VLI8A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGAWVF	1451
VLW9A	**	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIAVF	1452
VLV10A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDVW	860	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWAF	1453
VHK2A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSAEKATYYYGMDVW	1436	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWVF	1165
VHK4A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEAATYYYGMDVW	1437	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWVF	1165
VHT6A	**	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKAAYYYGMDVW	1438	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWVF	1165
VHY7A	**	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATAYYGMDVW	1439	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWVF	1165
VHY8A	n.b.	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYAYGMDVW	1440	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWVF	1165

[0293]

克隆 ID	Kd（nM）	CDR H1	SEQ ID No.	CDR H2	SEQ ID No.	CDR H3	SEQ ID No.	CDR L1	SEQ ID No.	CDR L2	SEQ ID No.	CDR L3	SEQ ID No.
VHY9A	**	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYAGMDVW	1441	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWVF	1165
VHG10A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYAMDVW	1442	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWVF	1165
VHV13A	*	YTFTSYGIS	300	GWISAYNGNTNYA	477	CASSKEKATYYYGMDAW	1443	GLSSGSVSTNYYPS	931	YTNTRSS	1057	CLLYLGRGIWVF	1165

[0294] *指示≤100;**指示>100

[0295] 实例3

[0296] 与FZD细胞外结构域结合的抗FZD抗体片段的晶体结构

[0297] Fzd是其中细胞外富Cys结构域(CRD)通过接头区域与其7-跨膜螺旋结构域和细胞质尾区连接的一类GPCR。Fzd在其细胞外结构域内具有一个或两个预测的-NxS/T-糖基化基序。为了实现高分辨率结构,在第二预测的-NxS/T-糖基化基序之前将含有两个糖基化基序的Fzd细胞外结构域截短,从而产生名为CRD-Xtal的构建体。在其C端含有八-组氨酸基序的10个Fzd CRD-Xtal中的每个Fzd CRD-Xtal的序列如下:

[0298] hFzd1_Q9UP38_101-230

[0299] QYNGERGISVPDHGYCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSAELKFFLCSMYAPVCTVLEQALPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPDTLKCEKFPVHGAGELCVGQGSHHHHHHHH(SEQ ID NO:1454)

[0300] hFzd2_Q14332_24-153

[0301] QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQHHHHHHHH(SEQ ID NO:1455)

[0302] hFzd3_Q9NPG1_23-148

[0303] HSLFSCEPITLRMCQDLPYNTTFMPNLLNHYDQQTAALAMEPFHPMVNLDCSRDFRPFLCALYAPICMEYGRVTLPCRRLCQRAYSECSKLMEMFGVPWPEDMECSRFPDCDEPYPRLVDLNLAGEHHHHHHHH(SEQ ID NO:1456)

[0304] hFzd4_Q9ULV1_38-167

[0305] GDEEERRCDPIRISMCQNLGYNVTKMPNLVGHELQTDAELQLTTFTPLIQYGCSSQLQFFLCSVYVPMCTEKINIPIGPCGGMCLSVKRRCEPVLKEFGFAWPESLNCSKFPPQNDHNHMCMEGPGDEEVHHHHHHHH(SEQ ID NO:1457)

[0306] hFzd5_Q13467_27-152

[0307] ASKAPVCQEITVPMCRGIGYNLTHMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLRFFLCSMYTPICLPDYHKPLPPCRSVCERAKAGCSPLMRQYGFAWPERMSCDRLPVLGRDAEVLCMDYNRHHHHHHHH(SEQ ID NO:1458)

[0308] hFzd6_O60353_18-145

[0309] HSLFTCEPITVPRCMKMAYNMTFFPNLMGHYDQSIAAVEMEHFLPLANLECSPNIETFLCKAFVPTCIEQIHVVPPCRKLCEKVYSDCKKLIDTFGIRWPEELECDRLQYCDETVPVTFDPHTEFLGHHHHHHHH(SEQ ID NO:1459)

[0310] hFzd7_O75084_36-165

[0311] HGEKGISVPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTILPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSMYAPVCTVLDQAIPPCRSLCERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCENFPVHGAGEICVGQNTHHHHHHHH(SEQ ID NO:1460)

[0312] hFzd8_Q9H461_28-153

[0313] ASAKELACQEITVPLCKGIGYNYTYMPNQFNHDTQDEAGLEVHQFWPLVEIQCSPDLKFFLCSMYTPICLEDYKKPLPPCRSVCERAKAGCAPLMRQYGFAWPDRMRCDRLPEQGNPDTLCMDYNRHHHHHHHH(SEQ ID NO:1461)

[0314] hFzd9_O00144_23-159

[0315] LEIGRFDPERGRGAAPCQAVEIPMCRGIGYNLTRMPNLLGHTSQGEAAAELAEFAPLVQYGCHSHLRFFLCSLYAPMCTDQVSTPIPACRPMCEQARLRCAPIMEQFNFGWPDSLDCARLPTRNDPHALCMEAPENAHHHHHHHH(SEQ ID NO:1462)

[0316] hFzd10_Q9ULW2_21-154

[0317] SSMDMERPGDGKCQPIEIPMCKDIGYNMTRMPNLMGHENQREAAIQLHEFAPLVEYGCHGHLRFFLCSLYAPMCTEQVSTPIPACRVMCEQARLKCSPIMEQFNFKWPDSLDCRKLPNKNDPNYLCMEAPNNGHHHHHHHH(SEQ ID NO:1463)

[0318] 实例4

[0319] FZD CRD_XTAL构建体的表达和纯化

[0320] 使用慢病毒技术创建稳定表达所有Fzd CRD_Xtal蛋白构建体的FreeStyle™293-F细胞(赛默飞世尔(Thermofisher))。为了大规模表达,在10U/mL青霉素和10μg/mL链霉素(龙沙(Lonza))的存在下,将表达Fzd CRD_Xtal的冷冻小瓶FreeStyle™293-F细胞解冻到20mL的FreeStyle(赛默飞世尔)培养基中。隔天消耗细胞,直到在期望体积(通常为6L到10L)下,达到~3.0×10^6个细胞/mL的密度。在此阶段,使细胞连续生长到更高的密度,并且在~70%的活力下通过离心收获培养基。Fzd CRD_Xtal蛋白通过用在HBS(20mM HEPES,pH 7.4,150mM NaCl)中预平衡的Ni-NTA树脂(每L培养物1mL;凯杰(Qiagen))培育从培养基中纯化并且用HBS中的500mM咪唑来洗脱。将Ni-NTA洗脱液浓缩到5mL,并且在用HBS预平衡的HiLoad 16/600Superdex 200pg柱(通用电气生命科学(GE Life Sciences))上进一步精制。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进一步分析主峰附近的级分以确认含量。在还原和非还原条件下使用Tris-HCl 4-15%凝胶(加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐公司)执行SDS-PAGE。在Laemmli样品缓冲液中制备样品并且在100℃下加热所述样品5分钟。将含有Fzd CRD_Xtal的级分浓缩到~2 mg/mL并且在10%甘油的存在下冷冻,以在-80℃下储存

直至进一步使用。使用NanoDrop分光光度计(赛默科技)通过直接UV A280方法确定蛋白质浓度。基于Beer-Lamber方程A＝εl c,吸光度与蛋白质浓度的关系是线性的;A是吸光度值,ε是波长相关消光系数,l是以厘米为单位的路径长度,并且c是蛋白质浓度。所有产生的蛋白质的消光系数通过其氨基酸序列来估算。

[0321] 实例5

[0322] FAB结合物的表达和纯化

[0323] 遵循来自制造商(赛默飞世尔)的标准方案,将表达Fzd CRD_Xtal的Fab结合物的轻链和重链(在其C端具有六-组氨酸标签)的质粒共转染,以通常以1000mL的规模在Expi293细胞中进行共表达。在细胞连续生长4天后,通过离心收获培养基,并且将所述培养基与在PBS中预平衡的Complete-His树脂(每1L培养物2.5mL;罗氏)结合并使用PBS中的250mM咪唑在重力流下洗脱。将含有Fab结合物的洗脱物浓缩到～5mL,并且在用HBS预平衡的HiLoad 16/600 Superdex 200pg柱(通用电气生命科学)上进一步精制。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进一步分析主峰附近的级分以确认含量。在还原和非还原条件下使用Tris-HCl 4-15％凝胶(加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐公司)执行SDS-PAGE。在Laemmli样品缓冲液中制备样品并且在100℃下加热所述样品5分钟。将含有Fzd CRD_Xtal的级分浓缩到～3mg/mL并且在10％甘油的存在下冷冻,以在-80℃下储存直至进一步使用。使用NanoDrop分光光度计(赛默科技)通过直接UV A280方法确定蛋白质浓度。基于Beer-Lamber方程A＝ε l c,吸光度与蛋白质浓度的关系是线性的;A是吸光度值,ε是波长相关消光系数,l是以厘米为单位的路径长度,并且c是蛋白质浓度。所有产生的蛋白质的消光系数通过其氨基酸序列来估算。

[0324] 实例6

[0325] FZD:F_{AB}复合物形成、结晶和结构测定

[0326] 将纯化的Fzd CRD_Xtal和Fab结合物以1.1:1的摩尔比混合(相对于较小分子量蛋白质稍微过量),并且用羧肽酶A和B以100:1的w/w比在4℃下培育过夜。通过在HBS中预平衡的SuperdexS200 Increase(10/300GL)柱上观察到单个主峰确认了复合物形成。通过SDS-PAGE进一步检查含有复合物的级分,并且将所述级分浓缩到10mg/mL到55mg/mL的范围以用于结晶筛选。初始结晶筛选(使用可商购获得的MCSG1、MCSG2、MCSG3、MCSG4、PACT(分子尺寸))、PEG I和PEG II(凯杰)筛选以及通过网格筛选或微晶种基质筛选进行的优化[MMS;用于蛋白质结晶的优化的微晶种基质筛选:我们学到了什么?(Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization:what have we learned?)

[0327] D'Arcy,A.、Bergfors,T.、Cowan-Jacob S.W.和Marshd,M.《晶体学报(Acta Cryst.)》F70,1117-1126(2014)].使用Mosquito(TTP LabTech)液体处理机来执行,并且在EchoTherm培育器(Torrey Pines Scientific)内于18℃下平衡。通过DiscoveryV20立体显微镜(蔡司(Zeiss))定期人工监测96孔板晶体筛选实验,并且通过在各种冷冻保护剂(通常为15％到30％v/v的甘油或乙二醇)的存在下投入液氮中来冷冻晶体以收集数据。X射线衍射数据集是在加利福尼亚州伯克利的先进光源(ALS)的伯克利结构生物学中心(the Berkeley Center for Structural Biology at the Advanced Light Source(ALS),Berkeley CA)收集的,并且用XDS[Kabsch,W.XDS.《晶体学报》D66,125-132(2010)]和xdsme[Legrand,P.XDSME:XDS Made Easier(2017)GitHub库,https://github.com/legrandp/

xdsme DOI 10.5281/zenodo.837885].程序进行处理。Fzd:Fab复合物的结构通过分子置换方法使用Phaser来测定,其中相关Fab的恒定结构域和可变结构域是模板[Phaser晶体学软件.A.J.McCoy、R.W.Grosse-Kunstleve、P.D.Adams、M.D.Winn、L.C.Storoni和R.J.Read.《应用结晶学杂志(J Appl Crystallogr)》40,658-674(2007)],然后通过MolProbity进行完善和验证,如在Phenix中实施的[PHENIX:用于大分子结构解决方案的基于Python的综合系统(PHENIX:a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution).P.D.Adams、P.V.Afonine、G.Bunkoczi、V.B.Chen、I.W.Davis、N.Echols、J.J.Headd、L.W.Hung、G.J.Kapral、R.W.Grosse-Kunstleve、A.J.McCoy、N.W.Moriarty、R.Oeffner、R.J.Read、D.C.Richardson、J.S.Richardson、T.C.Terwilliger和P.H.Zwart.《晶体学报》D66,213-221(2010);MolProbity:用于大分子晶体学的全原子结构验证(MolProbity:all-atom structure validation for macromolecular).V.B.Chen、W.B.Arendall、J.J.Headd、D.A.Keedy、R.M.Immormino、G.J.Kapral、L.W.Murray、J.S.Richardson和D.C.Richardson.《晶体学报》D66,12-21(2010)].人工检查晶体学模型并且使用COOT[Coot的特征和发展(Features and development of Coot).P.Emsley、B.Lohkamp、W.G.Scott和K.Cowtan.《晶体学报》D66,486-501(2010)]建立所述晶体学模型。使用MOE(CCG)和PyMol(Schrodinger)执行精细晶体结构分析和图像创建。

[0328] 实例7

[0329] FZD1:1RC07复合物的结构:

[0330] 1RC07(001S-B03)Fab的序列:

[0331] 1RC07_轻链

[0332] SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS(SEQ ID NO:1464)

[0333] 1RC07_重链

[0334] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRQPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1465)

[0335] Fzd1:1RC07复合物(浓度=28mg/mL)的衍射质量晶体在含有0.1M氯化锂、0.1M HEPES:NaOH,pH 7.5和25%(w/v)PEG 6000的结晶条件下生长。使用20%甘油的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd1:1RC07复合物在$P2_12_12$空间群(a=65.79,b=192.21,c = 44.79 Å)中结晶,其中每个不对称单元具有一个复合物分子。Fzd1:1RC07复合物的结构在2.10 Å的分辨率下测定并且完善到R_{cryst}因子和R_{free}因子分别为19.9%和24.8%。在晶体结构中,由于无序的电子密度图而无法对Fzd1的残基的101-114、179-189、203-207和217-230延伸段建模。

[0336] Fzd1:1RC07复合物的整体结构在图3.1(A和B)中示出,其揭示了1RC07的重链CDR3与在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点的结合更紧密[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64]。

在建立晶体学模型期间,在抗原Fzd1和抗体1RC07的接合部处观察到在>10处的强mF_o-DF_c差异图电子密度。可以通过对锌离子进行建模来令人满意地解释这种强正差异密度图,这可以通过在3.5 Å分辨率下计算的在>15处的强异常差异图峰进一步确认(图3.1(C))。此Zn2+离子被来自1RC07的CDR H3环的His107(在2.04 Å下)和His109(在2.01 Å下)以及1RC07的CDR L2环的Glu49(在2.03 Å和2.76 Å下)以及在Fzd2、Fzd7、Fzd5、Fzd8和Fzd10的序列中保守的Fzd1的His151(在2.00 Å下)结合。

[0337] 复合物的结构允许鉴定Fzd1针对1RC07的表位,所述表位具有限定Fzd1上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å切断):

[0338] Pro122、Leu148、His151、Gln152、Try154、Pro155、Leu156、Lys158和Gln160。

[0339] 另外,Fzd1上的以下残基可以被鉴定为针对1RC07的立即相互作用位点(相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å):

[0340] Ser120、Ile121、Leu123、Cys124、Thr125、Asp126、Glu144、Gly147、Glu149、Val150、Phe153、Val157、Val159、Cys161、Cys198、Leu201和Met202。

[0341] Fzd1:1RC07复合物的结构还允许鉴定1RC07上的与Fzd1的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基:

[0342] 1RC07重链:

[0343] Tyr103、Trp105、Gly106、His107和His109。

[0344] 1RC07轻链:

[0345] Val27、Gly28、His29、Lys30、Tyr31、Ala32、Tyr48、Glu49、Asp50、Ser51、Gln52和Asn65。

[0346] 进一步地,Fzd1:1RC07复合物的结构揭示了1RC07上的以下残基是针对Fzd1的相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0347] 1RC07重链:

[0348] Gln100、Gly101和Tyr108。

[0349] 1RC07轻链:

[0350] Lsy26、Ser33、Ile47、Arg53、Val59、Ser62、Gly63、Ser64、Asn65、Ser66、Gly67、Thr69、Ala70、Trp90和Ser92。

[0351] 实例8

[0352] FZD1:R2M9复合体的结构:

[0353] R2M9(003S-E07)Fab的序列:

[0354] R2M9_轻链

[0355] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:1466)

[0356] R2M9_重链

[0357] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNNFMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTKYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGEVGATMLGIGVWYWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS

KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1467)

[0358] Fzd1:R2M9复合物(浓度＝32mg/mL)的衍射质量晶体在含有0.1M甲酸钠和11％(w/v)PEG 3350的结晶条件下生长。使用26％甘油的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd1:R2M9复合物在$P2_1$空间群(a＝50.57,b＝160.60,c = 88.97 Å并且β＝95.5°)中结晶,其中每个不对称单元具有两个复合物分子。Fzd1:R2M9复合物的结构在2.60 Å的分辨率下测定并且完善到R_{cryst}因子和R_{free}因子分别为23.1％和26.3％。

[0359] Fzd1:R2M9复合物的整体结构在图3.1(A和B)中示出,其揭示了R2M9从与Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点相反的方向识别Fzd1[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64]。复合物的结构允许鉴定Fzd1针对R2M9的表位,所述表位具有限定Fzd1上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å切断):

[0360] Tyr115、Ala128、Tyr129、Phe167、Val176、Thr178、Val179、Leu180、Glu181、Gln182、Leu184、Gly224、Leu226、Cys227和Val228。

[0361] 另外,Fzd1上的以下残基可以被鉴定为针对R2M9的立即相互作用位点(相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å):

[0362] Cys116、Ile127、Asn130、Gln131、Ser171、Cys177、Ala183、Pro185、Cys187、His221、Ala223、Glu225、Gly229和Gln230。

[0363] Fzd1:R2M9复合物的晶体结构揭示了在样品制备期间用作冷冻保护剂的与R2M9CDR H3环的Ser95相互作用的甘油分子与Fzd1的Leu180、Gln182、Leu184和Leu226的距离小于5 Å。与R2M9CDR H3环的Val108结合的另一个甘油分子与Fzd1的Val176、Cys177、Thr178和Val179的距离小于5 Å。可以将这些相互作用用于R2M9的结构导向工程化以优化其性质。

[0364] Fzd1:R2M9复合物的结构还允许鉴定R2M9上的与Fzd1的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基:

[0365] R2M9重链:

[0366] Asn31、Phe33、His35、Trp50、Asn52、Lys58、Ser95、Gly97、Glu98、Val99、Leu104、Gly105、Ile106、Val108和Tyr110。

[0367] R2M9轻链:

[0368] Ser91、Tyr92、Arg93、Thr94和Phe96。

[0369] 进一步地,Fzd1:R2M9复合物的结构揭示了R2M9上的以下残基是针对Fzd1的相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0370] R2M9重链:

[0371] Thr30、Asn32、Met34、Trp47、Ile51、Asn53、Ser54、Gly56、Thr57、Tyr59、Val96、Gly100、Ala101、Thr102、Met103、Gly107、Trp109、Trp111和Phe112。

[0372] R2M9轻链:

[0373] Try32、Gln89、Gln90和Pro95。

[0374] 实例9

[0375] FZD4:003S-D10复合物的结构：

[0376] 003S-D10 Fab的序列：

[0377] 003S-D10_轻链

[0378] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLLGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:1468)

[0379] 003S-D10_重链

[0380] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNFGIYSMTWVRQAPGKGLEWISYISGDSGYTNYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGPGGWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1469)

[0381] Fzd4:003S-D10的(浓度＝23mg/mL)衍射质量晶体通过MMS、在MCSG1筛中、在含有0.1M柠檬酸钠:HCl,pH 5.6、20％(v/v)PEG 4000、20％(v/v)异丙醇的H4条件来获得。使用20％甘油的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd4:3SD10在P3121空间群(a=b=149.4 Å并且c=91.9 Å)中结晶,其中每个不对称单元具有一个复合物分子。Fzd4:003S-D10复合物的结构在2.10 Å的分辨率下测定并且完善到R_{cryst}因子和R_{free}因子分别为18.5％和21.6％。

[0382] Fzd4:003S-D10复合物的整体结构在图4.1(A)中示出,其揭示了003S-D10的重链CDR3在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点(图4.1(B))处结合[PDB码:4FOA;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64]。复合物的结构允许鉴定Fzd4针对003S-D10的表位,所述表位具有限定如图4.1(C)中以深阴影所示的Fzd4上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å切断)：

[0383] Val67、Gly68、His69、Thr73、Asp74、Glu76、Leu77、Gln78、Thr80、Thr81、Phe82、Thr83、Pro84、Leu85、Gln87、Tyr88、Tyr102、Leu132、Phe135、Gly136、Phe137、Ala138和Ser142。

[0384] 另外,Fzd4上的以下残基可以被鉴定为立即相互作用位点(相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å);图4.1(C)中的浅绿色表面：

[0385] Ile50、Ser51、Met52、Pro64、Asn65、Leu66、Glu70、Leu71、Gln72、Ala75、Leu79、Ile86、Gly89、Leu94、Gln95、Leu98、Val101、Tyr102、Val131、Lys133、Glu134、Trp139、Pro140、Glu141、Leu143和Lys147。

[0386] Fzd4:003S-D10的结构还允许鉴定003S-D10上的与Fzd4的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基：

[0387] 003S-D10重链：

[0388] Gly30、Ile31、Tyr32、Ser33、Tyr50、Ser52、Gly53、Asp54、Tyr57、Asn59、Arg98、Val99、Gly100、Pro101、Gly102、Gly103、Trp104和Asp106。

[0389] 003S-D10轻链：

[0390] Ser30、Tyr32、Leu46、Try49、Asn53、Leu55、Gly56、Thr91、Tyr92、Ser93、Thr94和Trp96。

[0391] 进一步地,Fzd4:003S-D10复合物的结构揭示了003S-D10上的以下残基是针对Fzd4的相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0392] 003S-D10重链:

[0393] Val2、Phe27、Asn28、Phe29、Met34、Trp47、Ile51、Ser55、Gly56、Thr58、Tyr60、Arg72、Asp74、Phe105和Pro107。

[0394] 003S-D10轻链:

[0395] Ile2、Gln27、Gly28、Ile29、Ser31、Tyr36、Ile48、Ala50、Leu54、Ser67、Gln90、Pro95和Thr97。

[0396] 实例10

[0397] FZD5:R2M3复合物的结构

[0398] R2M3(001S-A04)Fab的序列:

[0399] >R2M3_轻链

[0400] QAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS(SEQ ID NO:1470)

[0401] >R2M3_重链

[0402] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1471)

[0403] Fzd5:R2M3复合物(浓度=28mg/mL)的衍射质量晶体在含有0.1M氯化锂、0.1M HEPES:NaOH,pH 7.5和25%(w/v)PEG 6000的结晶条件下生长。使用20%甘油的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd5:R2M3在$P2_12_12_1$空间群(a = 59.61 Å, b = 69.29 Å, c = 284.54 Å)中结晶,其中每个不对称单元具有两个复合物分子。Fzd5:R2M3复合物的结构在2.0 Å的分辨率下测定并且完善到R_{cryst}因子和R_{free}因子分别为21.9%和23.8%。

[0404] Fzd5:R2M3复合物的整体结构在图3.4(A和B)中示出,其揭示了R2M3与在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点的结合更紧密[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64]。R2M3以更广泛的特异性与Fzd的Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd5、Fzd8亚家族结合。

[0405] 复合物的结构允许鉴定Fzd5针对R2M3的表位,所述表位具有限定Fzd5上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å 切断):

[0406] Thr37、Val38、Pro39、Arg42、Asn56、His57、Asp58、Gln60、Asp61、Glu62、Gly64、Leu65、Glu66、His68、Gln69、Trp71、Pro72、Try123和Gly124。

[0407] 另外,Fzd5上的以下残基可以被鉴定为针对R2M3的立即相互作用位点(相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å):

[0408] Gln34、Glu35、Ile36、Met40、Cys41、Pro52、Asn53、Phe55、Thr59、Ala63、Val67、Phe70、Glu75、Tyr90、Met120、Arg121、Gln122、Phe125、Ala126、Pro128和Glu129。

[0409] Fzd5:R2M3复合物的结构还允许鉴定R2M3上的与Fzd5的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基:

[0410] R2M3重链:Ser31、Trp50、Tyr54、Asn55、Asn57、Lys102、Ile103、Thr104、Tyr105和Tyr106。

[0411] R2M3轻链:Thr31、Asn32、Tyr34、Tyr52、Asn54、Thr55、Tyr93、Gly95、Arg96、Gly97和Trp99。

[0412] 进一步地,Fzd5:R2M3复合物的结构揭示了R2M3上的以下残基是针对Fzd5的相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0413] R2M3重链:Phe29、Thr30、Tyr32、Gly33、Ile51、Ser52、Gly56、Thr58、Asn59、Glu101、Tyr107和Gly108。

[0414] R2M3轻链:Ser30、Tyr33、Pro35、Tyr51、Thr53、Gly66、Ser67、Ile68、Leu94和Ile98。

[0415] 实例11

[0416] FZD8:005S-H05复合物的结构

[0417] 005S-H05 Fab的序列:

[0418] >005S-H05_轻链

[0419] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSMPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:1472)

[0420] >005S-H05_重链

[0421] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARVPDFWSGYLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1473)

[0422] Fzd8:005S-H05复合物(浓度=38mg/mL)的衍射质量晶体在含有0.2M硫酸铵、0.1M HEPES:NaOH,pH 7.5和25%(w/v)PEG 3350的结晶条件下生长。使用26%甘油的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd8:005S-H05复合物在C2空间群(a=92.63 Å,b=60.38 Å,c=110.35 Å;β=97.5°)中结晶,其中每个不对称单元具有两个复合物分子。Fzd8:005S-H05复合物的结构在1.65 Å的分辨率下测定并且完善到R_{cryst}因子和R_{free}因子分别为16.8%和18.6%。

[0423] Fzd8:005S-H05复合物的整体结构在图3.5(A和B)中示出,其揭示了005S-H05的重链CDR3插入到在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点中[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64]。005S-H05以亚家族特异性结合Fzd5和Fzd8两者。

[0424] 复合物的结构允许鉴定Fzd8针对005S-H05的表位,所述表位具有限定Fzd8上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å切断):

[0425] Phe57、Asn58、Glu64、Leu67、Glu68、His70、Gln71、Phe72、Trp73、Pro74、Glu77、

Try92、Arg123、Gln124、Try125、Gly126、Phe127、Ala128、Trp129、Pro130、Arg132和Met133。

[0426] 另外,Fzd8上的以下残基可以被鉴定为针对005S-H05的立即相互作用位点(相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å):

[0427] Asn55、Gln56、His59、Asp60、Gly66、Val69、Leu75、Ile78、Leu88、Leu121、Met122、Asp131和Arg137。

[0428] Fzd8:005S-H05复合物的结构还允许鉴定005S-H05上的与Fzd8的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基:

[0429] 005S-H05重链:Gly26,Try27,Thr28,Ser31,Tyr32,Pro100,Asp101,Phe102,Trp103,Ser104,Gly105,Tyr106和Asp108。

[0430] 005S-H05轻链:Ile29,Ser30,Ser31,Ala32,Tyr49,Ala50,Ser52,Ser53,Leu54,Gln55,Ser56,Thr91,Tyr92和Ser93。

[0431] 进一步地,Fzd8:005S-H05复合物的结构揭示了R2M3上的以下残基是针对Fzd5的相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0432] 005S-H05重链:Gln1、Val2、Phe29、Thr30、Tyr33、Arg50、Asn52、Asn54、Arg98、Val99、Leu107和Tyr109。

[0433] 005S-H05轻链:Ile2、Gly28、Leu33、Ala34、Leu46、Ala51、Gly57、Gly66、Ser67、Gly68、Phe71、Gln90和Met94。

[0434] 实例12

[0435] FZD5:004S-E05复合物的结构

[0436] 004S-E05 Fab的序列:

[0437] >004S-E05_轻链

[0438] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPRTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:1474)

[0439] >004S-E05_Hchian

[0440] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYEMNWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARGQSEKWWSGLYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1475)

[0441] Fzd5:004S-E05复合物(浓度=30mg/mL)的衍射质量晶体在含有0.1M Bis-Tris pH5.7和24%(w/v)PEG 3350的结晶条件下生长。使用33%乙二醇的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd5:004S-E05复合物在$P2_12_12$空间群(a = 72.87 Å, b = 192.35 Å, c = 90.25 Å)中结晶,其中每个不对称单元具有两个复合物分子。Fzd5:004S-E05复合物的结构在1.70 Å的分辨率下测定并且完善到R_{cryst}因子和R_{free}因子分别为18.5%和20.7%。

[0442] Fzd5:004S-E05复合物的整体结构在图3.4(A和B)中示出,其揭示了004S-E05的CDR-H3在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点处结合[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64]。

004S-E050以偏向Fzd5的方式与Fzd5和Fzd8两者结合。用作冷冻保护剂的与Fzd5的Glu75结合的乙二醇与004S-E05的轻链的Ala50和Ala53相互作用。

[0443] 复合物的结构允许鉴定Fzd5针对004S-E05的表位,所述表位具有限定Fzd5上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å 切断):

[0444] Gln69、Phe70、Trp71、Pro72、Leu73、Glu75、Ile76、Gln77、Cys78、Gly115、Pro118、Leu119、Met120、Arg121、Gln122、Try123、Gly124和Phe125。

[0445] 另外,Fzd5上的以下残基可以被鉴定为针对004S-E05的立即相互作用位点(相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å):

[0446] Leu65、Glu66、Val67、His68、Val74、Ser79、Leu82、Cys116、Ser117、Ala126和Pro128。

[0447] Fzd5:004S-E05复合物的结构还允许鉴定004S-E05上的与Fzd5的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基:

[0448] 004S-E05重链:Arg57、His59、Ser101、Trp104、Tryp105、Ser106、Gly107、Leu108和Tyr109。

[0449] 004S-E05轻链:Ser30、Ser31、Ala32、Try49、Ala50、Ala53、Ser67、Thr91、Tyr92、Ser93、Thr94和Arg96。

[0450] 进一步地,Fzd5:004S-E05复合物的结构揭示了R2M3上的以下残基是针对Fzd5的相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0451] 004S-E05重链:Glu33、Ser52、Trp53、Ser56、His59、Gln100、Glu102、Lys103和Gly110。

[0452] 004S-E05轻链:Ile2、Gln27、Gly28、Ile29、Leu33、Tyr49、Ala51、Ser52、Leu54、Gly66、Gly68、Phe71、Gln89、Gln90、Pro95和Arg96。

[0453] 实例13

[0454] FZD5:4A12复合物的结构

[0455] 4A12 Fab的序列:

[0456] >4A12_轻链

[0457] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNVQSEDLADYFCQQYSTYPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:1476)

[0458] >4A12_重链

[0459] QVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVKQRPGQGLEWIGWIYPRDGSTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAYMELHSLTSEDSAVYFCVRSAWGFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1477)

[0460] 通过MMS获得的Fzd5:4A12复合物(浓度=10mg/mL)的衍射质量晶体在含有0.2M氯化钠、0.1M Na2HPO4:柠檬酸,pH 4.2和20%(w/v)PEG 8000的结晶条件下生长。使用25%乙二醇的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd5:4A12复合物在C2空间群(a=93.84

Å，b = 60.07 Å，c = 110.80 Å;β＝104.7°)中结晶,其中每个不对称单元具有两个复合物分子。Fzd5:4A12复合物的结构在1.75 Å的分辨率下测定并且完善到R_{cryst}因子和R_{free}因子分别为17.7％和21.6％。

[0461] Fzd5:4A12复合物的整体结构在图3.4(A和B)中示出,其揭示了4A12与在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点相对的方式进行结合[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64],并识别Fzd5的C端区域。电子密度图揭示了Fzd5:4A12复合物的接合部处与Fzd5的Arg111结合的氯离子还与Thr28的主链酰胺-氮和4A12的重链的Asn31的侧链酰胺基相互作用。

[0462] 复合物的结构允许鉴定Fzd5针对4A12的表位,所述表位具有限定Fzd5上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å切断):

[0463] Cys105、Arg106、Ser107、Glu110、Arg111、Cys133、Asp134、Val138、Leu139、Gly140、Arg141、Asp142、Ala143、Val145、Leu146、Cys147和Asp149。

[0464] 另外,Fzd5上的以下残基可以被鉴定为针对4A12的立即相互作用位点(相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å):

[0465] Asp81、Tyr98、Leu102、Pro103、Val108、Cys109、Ala112、Ala114、Ser132、Arg135、Leu136、Pro137、Glu144和Met148。

[0466] Fzd5:4A12复合物的结构还允许鉴定4A12上的与Fzd5的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基:

[0467] 4A12重链:Asn31、Tyr32、Asp33、Trp50、Tyr52、Arg54、Ser99、Ala100和Trp101。

[0468] 4A12轻链:Ala32、Trp50、Tyr91、Ser92和Tyr94。

[0469] 进一步地,Fzd5:4A12复合物的结构揭示了4A12上的以下残基是针对Fzd5的相互作用距离>5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0470] 4A12重链:Gly26、Tyr27、Thr28、Thr30、Ile34、Asp35、Trp47、Ile51、Pro53、Asp55、Ser57、Thr58、Lys59、Arg98、Gly102、Phe103、Ala104和Tyr105。

[0471] 4A12轻链:Val29、Thr31、Tyr49、Gln89、Gln90、Thr93和Leu96。

[0472] 实例14

[0473] FZD9:014S-B06复合物的结构:

[0474] 014S-B06 Fab的序列:

[0475] 014S-B06_轻链

[0476] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:1478)

[0477] 014S-B06_重链

[0478] EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYIENDGSITTYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARAPYYYGSGSLFRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1479)

[0479] Fzd9:014S-B06复合物(浓度＝31mg/mL)的衍射质量晶体在含有4％ PEG 3350、0.1M HEPES pH 7.5和0.2M氯化锂的结晶条件下生长。使用27％甘油的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd9:014S-B06在P212121空间群(a = 63.8 Å， b = 81.4 Å并且c = 160.5 Å)中结晶,其中每个不对称单元具有一个复合物分子。Fzd9:014S-B06复合物的结构在1.95 Å的分辨率下测定并且完善到Rcryst因子和Rfree因子分别为19.8％和22.6％。

[0480] Fzd9:014S-B06复合物的整体结构在图3.7(A和B)中示出,其揭示了014S-B06的重链CDR3远离在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点结合[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64],并识别更接近Fzd9的C端的区域。

[0481] 复合物的结构允许鉴定Fzd9针对014S-B06的表位,所述表位具有限定Fzd9上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å 切断):

[0482] Leu60、Leu61、Lue95、Thr106、Pro107、Pro109、Arg112、Arg119、Asp135、Ser136、Leu137、Asp138、Ala140、Arg141、Leu142、Pro143、Thr144、Asp147、Pro148、His149和Ala150。

[0483] 另外,Fzd9上的以下残基可以被鉴定为针对014S-B06的立即相互作用位点(相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å):

[0484] Asn59、Gly62、Phe91、Ser94、Pro98、Ser105、Ile108、Ala110、Trp133、Pro134、Asp138、Cys139、Arg145、Asn146、Leu151和Cys152。

[0485] Fzd9:014S-B06复合物的结构还允许鉴定3SD10上的与Fzd4的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基:

[0486] 014S-B06重链:

[0487] Thr28、Ser30、Ser31、Tyr32、Asn53、Tyr101、Tyr102、Try103、Gly104、Ser105、Leu108和Arg110。

[0488] 014S-B06轻链:

[0489] Ser31、Try32、Try49、Ala50、Ser53和Ser91。

[0490] 进一步地,Fzd9:014S-B06复合物的结构揭示了014S-B06上的以下残基是针对Fzd9的相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0491] 014S-B06重链:

[0492] Phe27、Phe29、Asp54、Arg72、Asp74、Asn77、Arg98、Ala99、Pro100、Gly106、Ser107、Phe109和Asp112。

[0493] 014S-B06轻链:

[0494] Ile29、Ser30、Leu33、Asn34、Ala51、Ser52和Tyr92。

[0495] 实例15

[0496] FZD10:005S-A07复合物的结构

[0497] 005S-A07 Fab的序列:

[0498] 005S-A07_轻链

[0499] EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:1480)

[0500] 005S-A07_重链

[0501] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTGSAVQWVRQAPGQGLEWVGGILPIYGTTKYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGARLYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1481)

[0502] Fzd10:005S-A07复合物(浓度＝37mg/mL)的衍射质量晶体在含有0.2M硫酸铵、0.1M柠檬酸钠:HCl pH 5.6和25％(w/v)PEG 4000的结晶条件下生长。使用20％甘油的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd10:005S-A07复合物在H32空间群(a＝b＝138.2 Å并且c＝190.6 Å)中结晶,其中每个不对称单元具有一个复合物分子。Fzd10:005S-A07复合物的结构在2.40 Å的分辨率下测定并且完善到Rcryst因子和Rfree因子分别为20.6％和25.0％。

[0503] Fzd10:005S-A07复合物的整体结构(图3.8(A和B))揭示了005S-A07在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点处与Fzd10结合[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64]。有趣的是,Fzd10:005S-A07的晶体结构在抗原-Fab接合部处示出了针对两个硫酸根离子(SO42-)的潜在结合位点,这可能有助于005S-A07的进一步结构导向工程化以优化其性质。复合物的结构允许鉴定Fzd10针对005S-A07的表位,所述表位具有限定Fzd10上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å切断):

[0504] Pro40、Met41、Ile66、Gln67、His69、Glu70、Phe71、Ala72、Pro73、Val75、Glu76、Tyr77、Arg84、Met121、Glu122、Gln123、Phe124、Asn125、Phe126、Lys127、Pro129和Asp130。

[0505] 另外,Fzd10上的以下残基可以被鉴定为针对005S-A07的立即相互作用位点(相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å):

[0506] Ile39、Cys42、Lys43、Arg62、Glu63、Ala65、Ile66、Leu68、Leu74、Gly78、Cys88、Tyr91、Ser118、Pro119、Ile120、Trp128、Ser131和Leu132。

[0507] Fzd10:005S-A07复合物的结构还允许鉴定005S-A07上的与Fzd4的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基:

[0508] 005S-A07重链:

[0509] Thr28、Thr30、Gly31、Ser32、Leu52、Ile54、Tyr55、Thr57、Lys59、Arg98、Ala100、Arg101、Leu102、Tyr103、Gly104和Asp106。

[0510] 005S-A07轻链:

[0511] Arg33、Asn34、Leu48、Tyr51、Gly52、Ala57、Thr58和Trp96。

[0512] 进一步地,Fzd10:005S-A07复合物的结构揭示了005S-A07上的以下残基是针对Fzd9的相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0513] 005S-A07重链:

[0514] Phe27、Phe29、Ala33、Gln35、Pro53、Gly56、Thr58、Gly99、Phe105和Tyr107。

[0515] 005S-A07轻链:

[0516] Val31、Ser32、Leu35、Leu49、Ile50、Ala53、Thr55、Arg56、Gly59、Ile60、Arg93、Ser94、Asn95和Ile98。

[0517] 实例16

[0518] FZD10:005S-E12复合体的结构：

[0519] 005S-E12 Fab的序列：

[0520] 005S-E12_轻链

[0521] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVGRWMAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANTFPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:1482)

[0522] 005S-E12_重链

[0523] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGVIFPVYPTPDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSTGYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1483)

[0524] Fzd10:005S-E12复合物(浓度＝34mg/mL)的衍射质量晶体在含有0.1M Bis-Tris丙烷:HCl,pH 7和2.5M硫酸铵的结晶条件下通过MSS获得。使用1.7M丙二酸钠的孔溶液pH 7.0对晶体进行冷冻保护。Fzd10:005S-E12复合物在P312空间群($a = b = 90.4$ Å并且$c = 185.1$ Å)中结晶,其中每个不对称单元具有一个复合物分子。Fzd10:005S-E12复合物的结构在2.50 Å的分辨率下测定并且完善到Rcryst因子和Rfree因子分别为20.1％和24.4％。

[0525] Fzd10:005S-E12复合物的整体结构(图3.9(A和B)中)揭示了005S-E12邻近在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点与Fzd10结合[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64],并识别Fzd10的N端区域处的尾区和螺旋。复合物的结构允许鉴定Fzd10针对005S-E12的表位,所述表位具有限定Fzd10上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å切断)：

[0526] Ile37、Glu38、Ile39、Pro40、Met41、Cys42、Lys43、Asp44、Ile45、Gly46、Asn48、Gln61、Arg62、Glu63、Ala65、Ile66、Leu68、His69、Ala72、Pro73、Val75、Glu76和Arg84。

[0527] 另外,Fzd10上的以下残基可以被鉴定为针对005S-E12的立即相互作用位点(相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å)：

[0528] Glu35、Pro36、Tyr47、Asn60、Gln61、Ala64、Gln67、Glu70、Phe71、Leu74、Tyr77和Phe124。

[0529] Fzd10:005S-E12复合物的结构还允许鉴定005S-E12上的与Fzd4的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基：

[0530] 005S-E12重链：

[0531] Tyr33、Phe52、Pro53、Val54、Tyr55、Thr57、Asp59、Gly100、Ser101、Thr102、Gly103、Tyr104和Tyr105。

[0532] 005S-E12轻链：

[0533] Ile2、Gln27、Ser28、Val29、Gly30、Arg31、Trp32、Ala50、Ala91、Asn92、Thr93、Phe94和Phe96。

[0534] 进一步地,Fzd10:005S-E12复合物的结构揭示了005S-E12上的以下残基是针对Fzd9的相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0535] 005S-E12重链:

[0536] Thr30、Asp31、Tyr32、His35、Trp47、Val50、Ile51、Pro56、Pro58、Tyr60、Gln62、Arg72、Gly99和Gly106。

[0537] 005S-E12轻链:

[0538] Asp1、Ala25、Ser26、Met33、Tyr49、Ala51、Ser52、Ser53、Ser67、Gly68、Thr69、Gln90和Pro95。

[0539] 实例17

[0540] FZD3:029S-E03复合物的结构

[0541] 029S-E03 Fab的序列:

[0542] >029S-E03_轻链

[0543] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFRLPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:1484)

[0544] >029S-E03_重链

[0545] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSYYGVIDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH(SEQ ID NO:1485)

[0546] Fzd3:029S-E03复合物(浓度=25mg/mL)的衍射质量晶体在含有0.2M三甲胺N-氧化物、0.1M Tris:HCl,pH 8.5和20%(w/v)PEG 2000MME的结晶条件下生长。使用20%甘油的孔溶液对晶体进行冷冻保护。Fzd3:029S-E03在$P2_1$空间群(a = 69.60 Å, b = 145.50 Å并且c = 104.31 Å;β=101.8°)中结晶,其中每个不对称单元具有一个复合物分子。Fzd3:029S-E03复合物的结构在2.40 Å的分辨率下测定并且进行完善,其中R_{cryst}因子和R_{free}因子分别为24.4%和31.8%。

[0547] 029S-E03是Fzd3的单特异性结合物,并且未示出与其它Fzd的可检测结合。Fzd3:029S-E03复合物的整体结构在图11(A和B)中示出,其揭示了029S-E03的重链CDR3邻近在Fzd8:Wnt8a复合物的复合物中观察到的脂质结合位点结合[PDB码:4F0A;Janda,C.Y.、Waghray,D.、Levin,A.M.、Thomas,C.、Garcia,K.C.(2012)《科学》337:59-64],并识别更接近Fzd3的N端的区域。

[0548] 复合物的结构允许鉴定Fzd3针对029S-E03的表位,所述表位具有限定Fzd3上的核心相互作用位点的以下残基(5 Å切断):

[0549] Pro30、Ile31、Thr32、Leu33、Arg34、Gln37、Asp38、Leu39、Gln55、Gln66、Ala59、Leu60、Glu63、His66和Asn70。

[0550] 另外,Fzd3上的以下残基可以被鉴定为针对029S-E03的立即相互作用位点(相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å):

[0551] Gln29、Met35、Cys36、Pro40、Tyr41、Asn42、Thr43、Asp54、Thr57、Ala58、Ala61、Met62、Pro67、Val69、Leu71、Asp72和Arg78。

[0552] Fzd3:029S-E03复合物的结构还允许鉴定3SD10上的与Fzd3的任何原子相距小于或等于5.0 Å的以下残基:

[0553] 029S-E03重链:Tyr33、Trp50、Asn52、Ser55、Asn57、Gln62、Tyr101、Val103、Ile104和Asp105。

[0554] 029S-E03轻链:Ile2、Gln27、Ser28、Ser30、Tyr32、Ser91、Phe92、Arg93和Leu94。

[0555] 进一步地,Fzd3:029S-E03复合物的结构揭示了029S-E03上的以下残基是针对Fzd3的相互作用距离>=5.0 Å且<=8.0 Å的立即相互作用位点:

[0556] 029S-E03重链:Trp47、Ile51、Pro53、Asn54、Gly56、Thr58、Gly59、Tyr60、Gln65、Ser99、Tyr100、Gly102和Ala06。

[0557] 029S-E03轻链:Asp1、Ser26、Ile29、Ser31、Leu33、Asn34、Gly68、Gln90、Pro95和Leu96。

[0558] 表3.通过共晶体结构测定的抗原结合蛋白的结合特性汇总

[0559]

抗原结合蛋白	抗原	Fzd 上的相互作用位点（<5 埃）	Fzd 上的相互作用位点（5-8 埃）
1RC07（与 Fzd1、Fzd2 和 Fzd7 结合）	Fzd1	Pro122、Leu148、His151、Gln152、Tyr154、Pro155、Leu156、Lys158 和 Gln160。	Ser120、Ile121、Leu123、Cys124、Thr125、Asp126、Glu144、Gly147、Glu149、Val150、Phe153、Val157、Val159、Cys161、Cys198、Leu201 和 Met202。
	Fzd2/Fzd7	P45/P55、L71/L81、H74/84、Y77/87、P78/88、L79/89、K81/91 和 Q83/93。	S43/S53、I44/I54、L46/56、C47/57、T48/58、D49/59、E67/77、G70/80、E72/82、V73/83、F76/86、V80/90、V82/92、C84/94、C121/131、L124/134 和 M125/135。
R2M9（与 Fzd1、Fzd2 和 Fzd7 结合）	Fzd1	Tyr115、Ala128、Tyr129、Phe167、Val176、Thr178、Val179、Leu180、Glu181、Gln182、Leu184、Gly224、Leu226、Cys227 和 Val228。	Cys116、Ile127、Asn130、Gln131、Ser171、Cys177、Ala183、Pro185、Cys187、His221、Ala223、Glu225、Gly229 和 Gln230。

[0560]

	Fzd2/Fzd7	F38/48、A51/61、Y52/62、F90/100、V99/109、T101/111、V102/112、L103/113、E104/D114、Q105/115、I107/117、E147/G157、I149/159、C150/160 和 V151/161。	C39/49、I50/60、N53/63、Q54/64、C100/110、A106/116、P108/118、C110/120、H144/154、A146/156、Q148/E158、G152/G162 和 Q153/163。
003S-D10（仅与 Fzd4、单 4 结合）	Fzd4	Val67、Gly68、His69、Thr73、Asp74、Glu76、Leu77、Gln78、Thr80、Thr81、Phe82、Thr83、Pro84、Leu85、Gln87、Tyr88、Tyr102、Leu132、Phe135、Gly136、Phe137、Ala138 和 Ser142。	Ile50、Ser51、Met52、Pro64、Asn65、Leu66、Glu70、Leu71、Gln72、Ala75、Leu79、Ile86、Gly89、Leu94、Gln95、Leu98、Val101、Tyr102、Val131、Lys133、Glu134、Trp139、Pro140、Glu141、Leu143 和 Lys147。
R2M3（与 Fzd1、Fzd2、Fzd7、Fzd5 和 Fzd8 结合）	Fzd5	Thr37、Val38、Pro39、Arg42、Asn56、His57、Asp58、Gln60、Asp61、Glu62、Gly64、Leu65、Glu66、His68、Gln69、Trp71、Pro72、Tyr123 和 Gly124。	Gln34、Glu35、Ile36、Met40、Cys41、Pro52、Asn53、Phe55、Thr59、Ala63、Val67、Phe70、Glu75、Tyr90、Met120、Arg121、Gln122、Phe125、Ala126、Pro128 和 Glu129。
	Fzd8/Fzd1/Fzd2/Fzd7	T39/S120/43/53、V40/I121/44/54、P41/122/45/55、K44/T125/49,59、N58/G139/62/72、H59/140/63/73、D60/T141/64/74、Q62/143/66/76、D63/E144/67/77、E64/D145/68/78/、G66/147/70/80、L67/148/71/81、E68/149/72/82、H70/151/74/84、Q71/152/75/85、W73/Y154/77/87、P74/155/78/88、Y125/F205/128/138 和 G126/206/129/139。	Q36/117/40/50、E37/P118/41/51、I38/119/42/52、L42/123/46/56、C43/124/47/57、P54/136/58/68、N55/136/59/69、F57/L137/60/70、T61/N142/65/75、A65/146/69/79、V69/150/73/83、F72/153/76/86、E77/K158/81/91、Y92/173/96/106、M122/202/125/135、R123/N203/126/136、Q124/K204/127/137、F127/207/130/140、A128/Q208/131/141、P130/210/133/143 和 D131/211/E134/144。

[0561]

005S-H05（以偏好的方式与 Fzd5 和 Fzd8 结合；也与 Fzd1、Fzd2 和 Fzd7 结合）	Fzd8	Phe57、Asn58、Glu64、Leu67、Glu68、His70、Gln71、Phe72、Trp73、Pro74、Glu77、Tyr92、Arg123、Gln124、Tyr125、Gly126、Phe127、Ala128、Trp129、Pro130、Arg132 和 Met133。	Asn55、Gln56、His59、Asp60、Gly66、Val69、Leu75、Ile78、Leu88、Leu121、Met122、Asp131 和 Arg137。
	Fzd5/Fzd1/Fzd2/Fzd7	F55/L138/61/71、N56/G139/62/72、E62/D145/68/78/、E66/149/72/82、H68/151/74/84、Q69/152/75/85、F70/153/76/86、W71/Y154/77/87、P72/155/78/88、E75/K158/81/91、Y90/173/96/106、R121/N203/126/136、Q122/K204/127/137、Y123/F205/128/138、G124/206/129/139、F125/207/130/140、A126/Q208/131/141、W127/209/132/142、P128/210/133/143、R130/T211/R135/145 和 M131/L212/136/146。	N53/136/59/69、Q54/L137/60/70、H57/140/63/73、D58/T141/64/74、G64/147/70/80、V67/150/73/83、L73/156/79/89、I76/V159/82/92、L86/169/92/102、L119/201/124/134、M120/202/125/135、E129/D211/E134/144 和 R135/K217/H140/N150。
004S-E05（优先与 Fzd5 结合）	Fzd5	Gln69、Phe70、Trp71、Pro72、Leu73、Glu75、Ile76、Gln77、Cys78、Gly115、Pro118、Leu119、Met120、Arg121、Gln122、Tyr123、Gly124 和 Phe125。	Leu65、Glu66、Val67、His68、Val74、Ser79、Leu82、Cys116、Ser117、Ala126 和 Pro128。
	Fzd8	Q71、F72、W73、P74、L75、E77、I78、G117、P120、L121、M122、R123、Q124、Y125、G126 和 F127。	L67、E68、V69、H70、V76、S81、L84、C118、A119、A128 和 P130。

[0562]

4A12（仅与Fzd5、单5结合）	Fzd5	Cys105、Arg106、Ser107、Glu110、Arg111、Cys133、Asp134、Val138、Leu139、Gly140、Arg141、Asp142、Ala143、Val145、Leu146、Cys147和Asp149。	Asp81、Tyr98、Leu102、Pro103、Val108、Cys109、Ala112、Ala114、Ser132、Arg135、Leu136、Pro137、Glu144和Met148。
014S-B06（仅与Fzd9、单9结合）	Fzd9	Leu60、Leu61、Lue95、Thr106、Pro107、Pro109、Arg112、Arg119、Asp135、Ser136、Leu137、Asp138、Ala140、Arg141、Leu142、Pro143、Thr144、Asp147、Pro148、His149和Ala150。	Asn59、Gly62、Phe91、Ser94、Pro98、Ser105、Ile108、Ala110、Trp133、Pro134、Asp138、Cys139、Arg145、Asn146、Leu151和Cys152。
005S-A07（与Fzd9和Fzd10两者结合）	Fzd10	Pro40、Met41、Ile66、Gln67、His69、Glu70、Phe71、Ala72、Pro73、Val75、Glu76、Tyr77、Arg84、Met121、Glu122、Gln123、Phe124、Asn125、Phe126、Lys127、Pro129和Asp130。	Ile39、Cys42、Lys43、Arg62、Glu63、Ala65、Leu68、Leu74、Gly78、Cys88、Tyr91、Ser118、Pro119、Ile120、Trp128、Ser131和Leu132。
	Fzd9	P45、M46、A71、E72、A74、E75、F76、A77、P78、V80、M126、E127、Q128、F129、N130、F131、G132、P134和D135。	I44、C47、R48、G67、E68、A70、L73、L79、G83、C93、Y96、A123、P124、I125、W133、S136和L138。
005S-E12（仅与Fzd10、单10结合）	Fzd10	Ile37、Glu38、Ile39、Pro40、Met41、Cys42、Lys43、Asp44、Ile45、Gly46、Asn48、Gln61、Arg62、Glu63、Ala65、Ile66、Leu68、His69、Ala72、Pro73、Val75、Glu76和Arg84。	Glu35、Pro36、Tyr47、Asn60、Gln61、Ala64、Gln67、Glu70、Phe71、Leu74、Tyr77和Phe124。
029S-E03（仅与Fzd3、单3结合）	Fzd3	Pro30、Ile31、Thr32、Leu33、Arg34、Gln37、Asp38、Leu39、Gln55、Gln66、Ala59、Leu60、Glu63、His66和Asn70。	Gln29、Met35、Cys36、Pro40、Tyr41、Asn42、Thr43、Asp54、Thr57、Ala58、Ala61、Met62、Pro67、Val69、Leu71、Asp72和Arg78。

[0563] 可以将以上所描述的各个实施例进行组合以提供另外的实施例。在本说明书中引用的和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物以全文引用的方式并入本文中。如果需要，则可以修改实施例的方面以采用各个专利、申请和出版物的概念来提供又另外的实施例。

[0564] 鉴于以上详细描述，可以对实施例进行这些以和其它改变。总之，在以下权利要求书中，所使用的术语不应当被解释为将权利要求书限制于本说明书和权利要求书中所公开

的特定实施例,而是应当被解释为包含所有可能的实施例连同此类权利要求有权获得的等效物的整个范围。因此,权利要求书并不受本公开的限制。

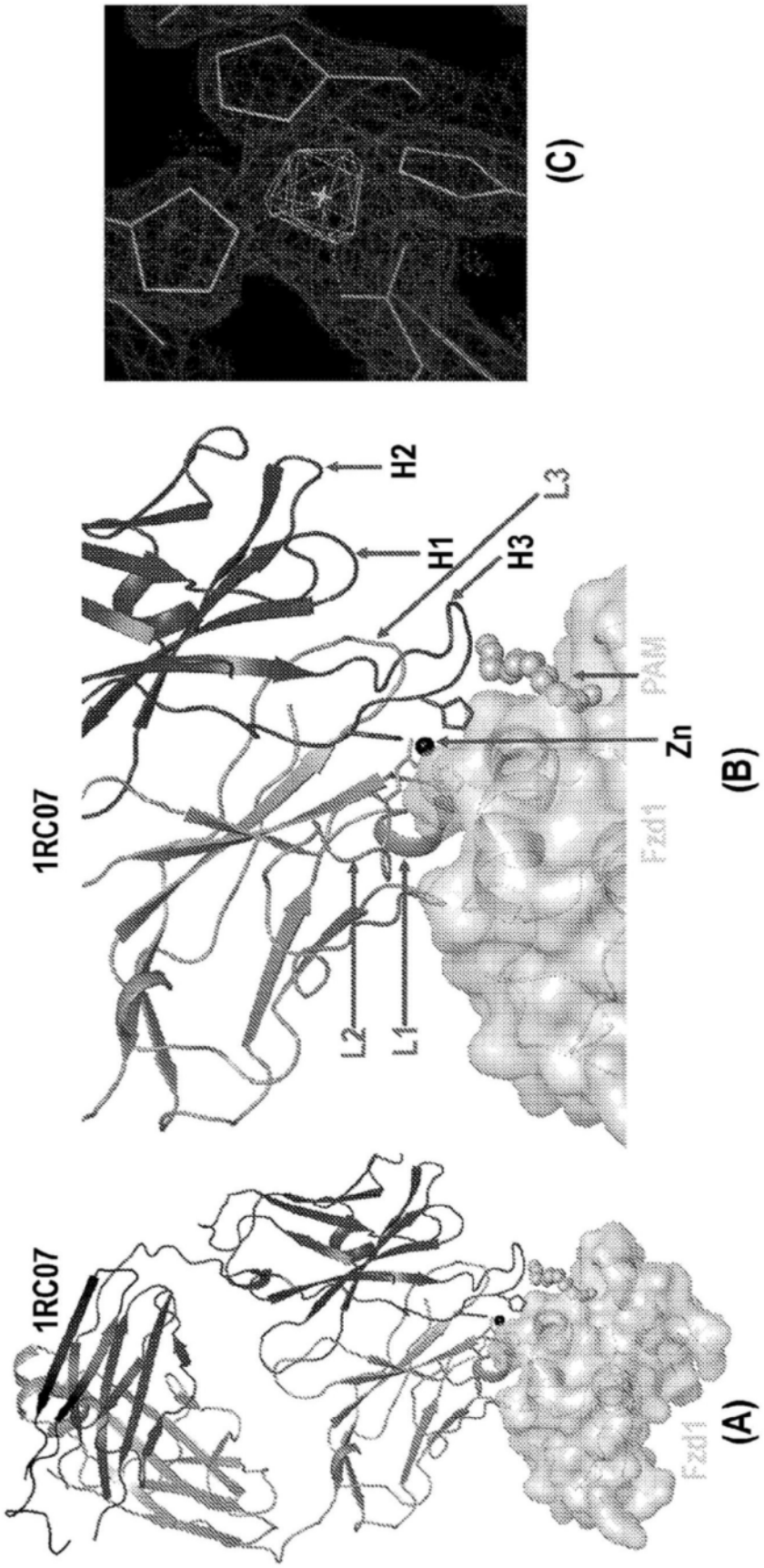


图1

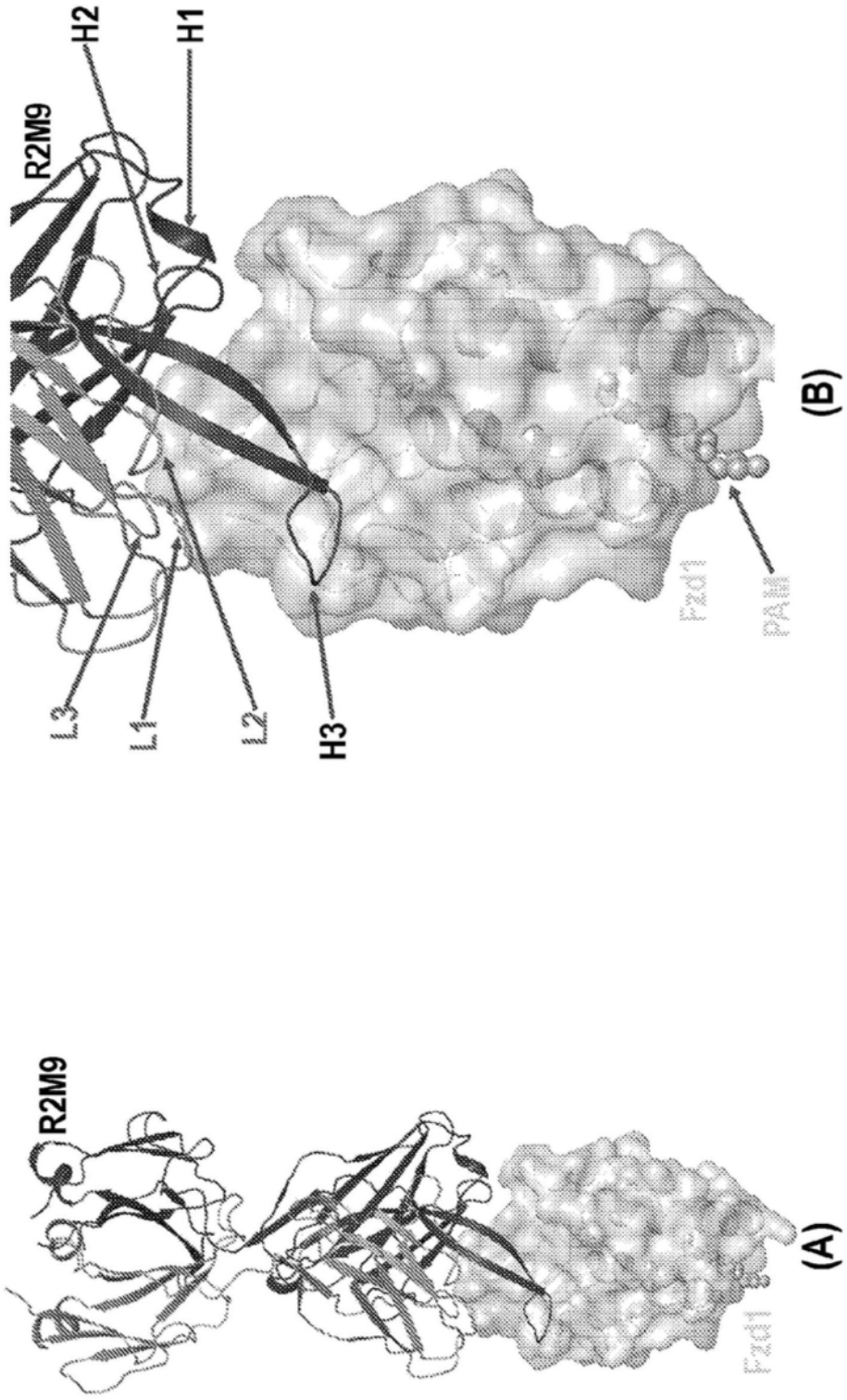


图2

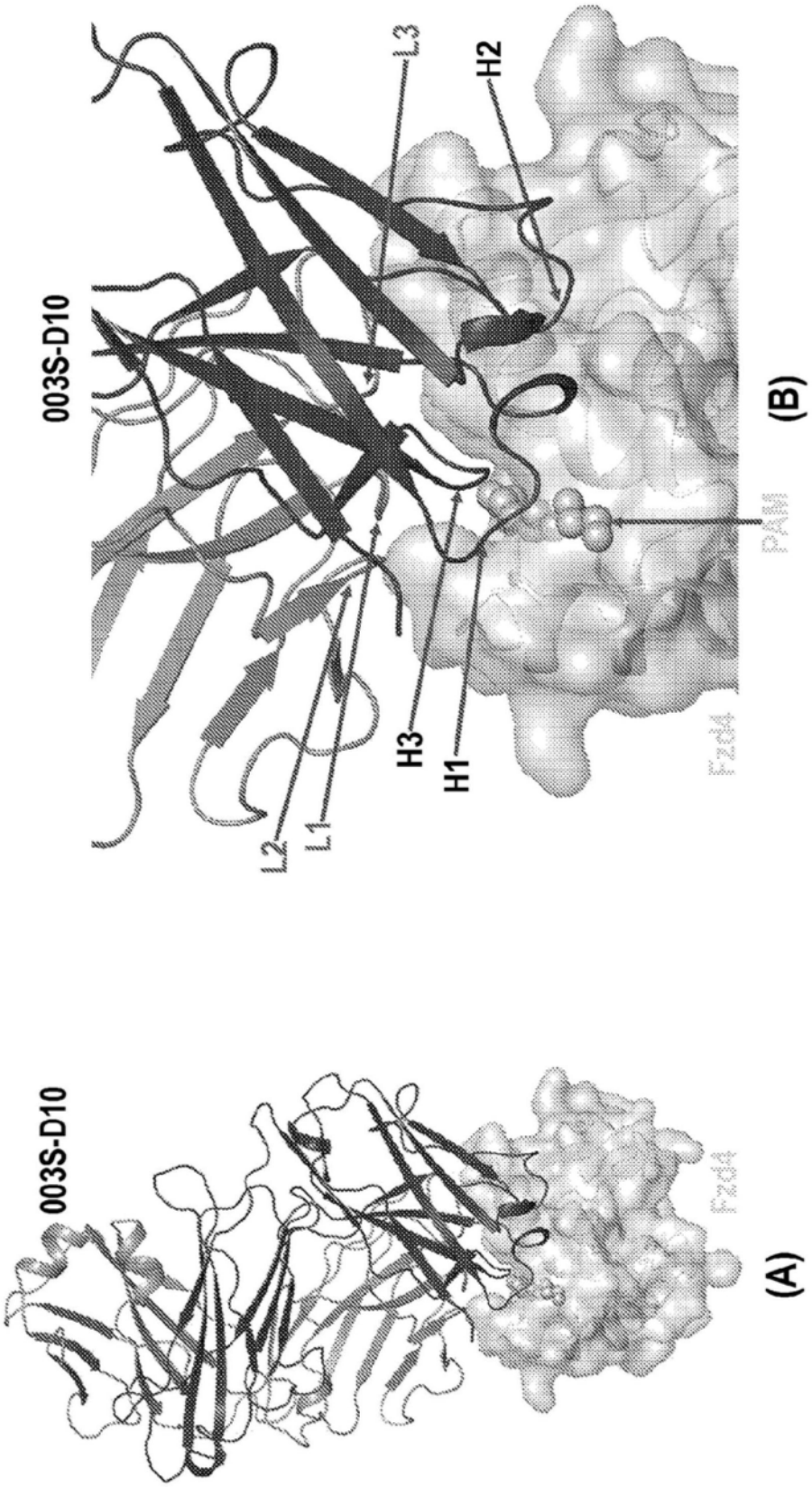


图3

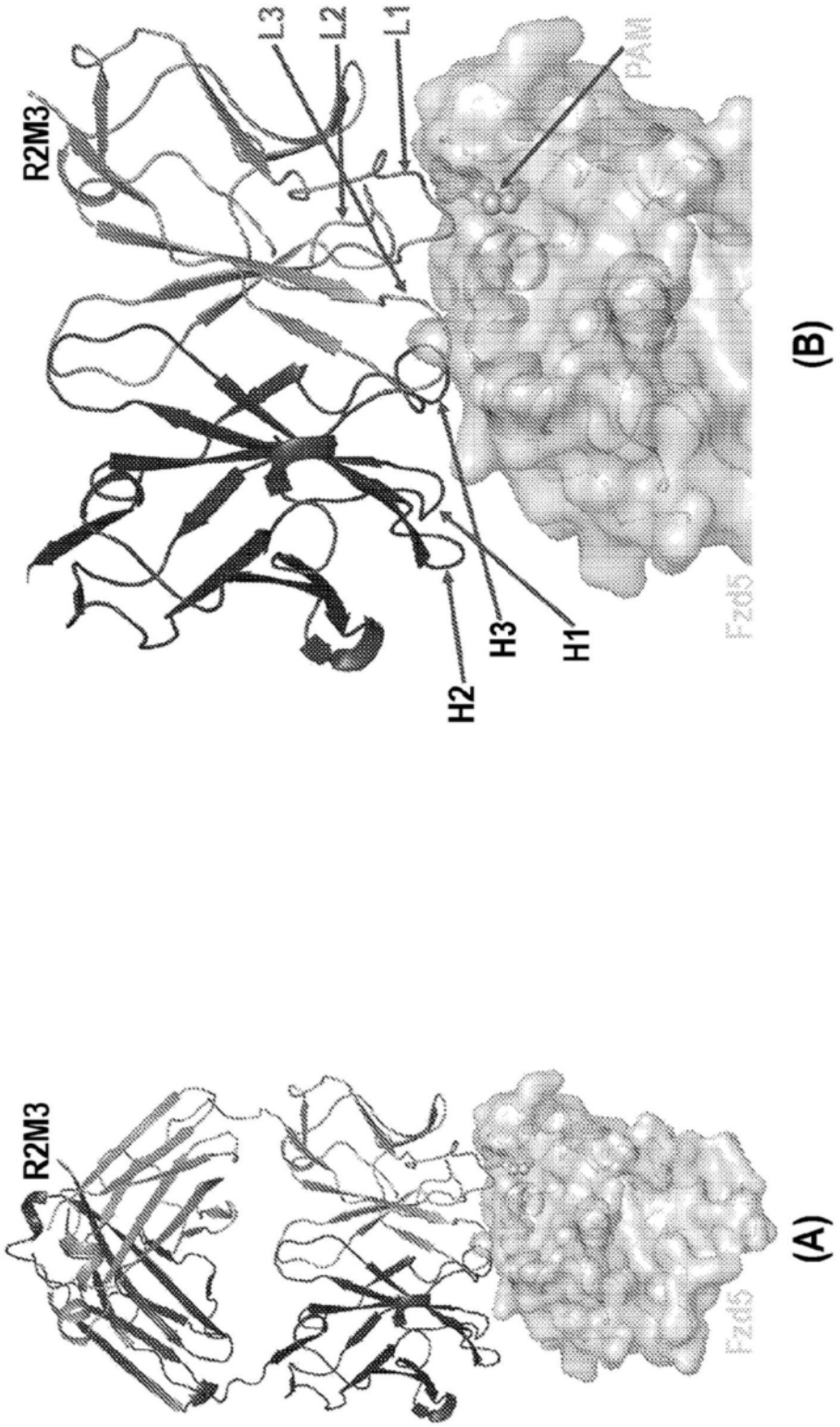


图4

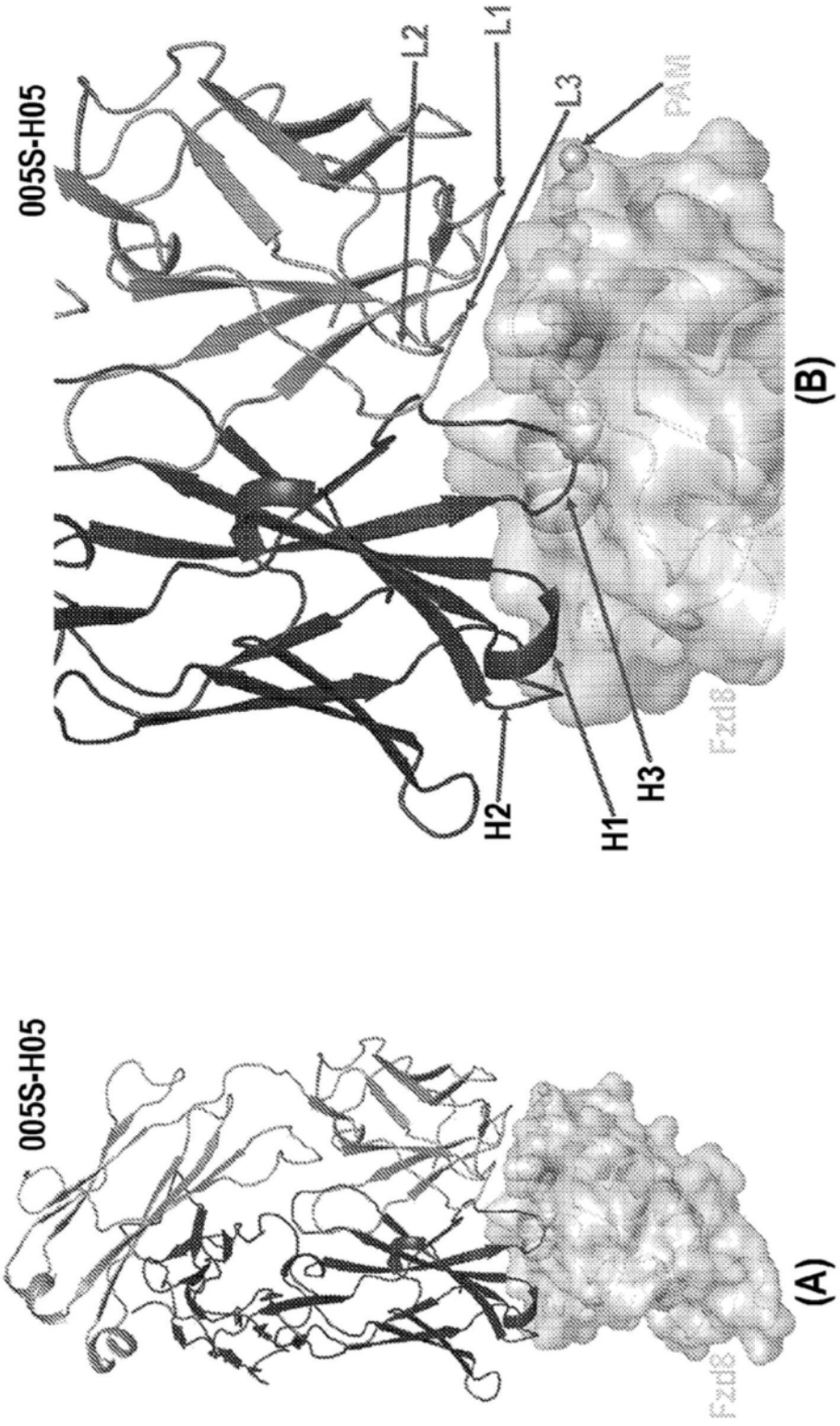


图5

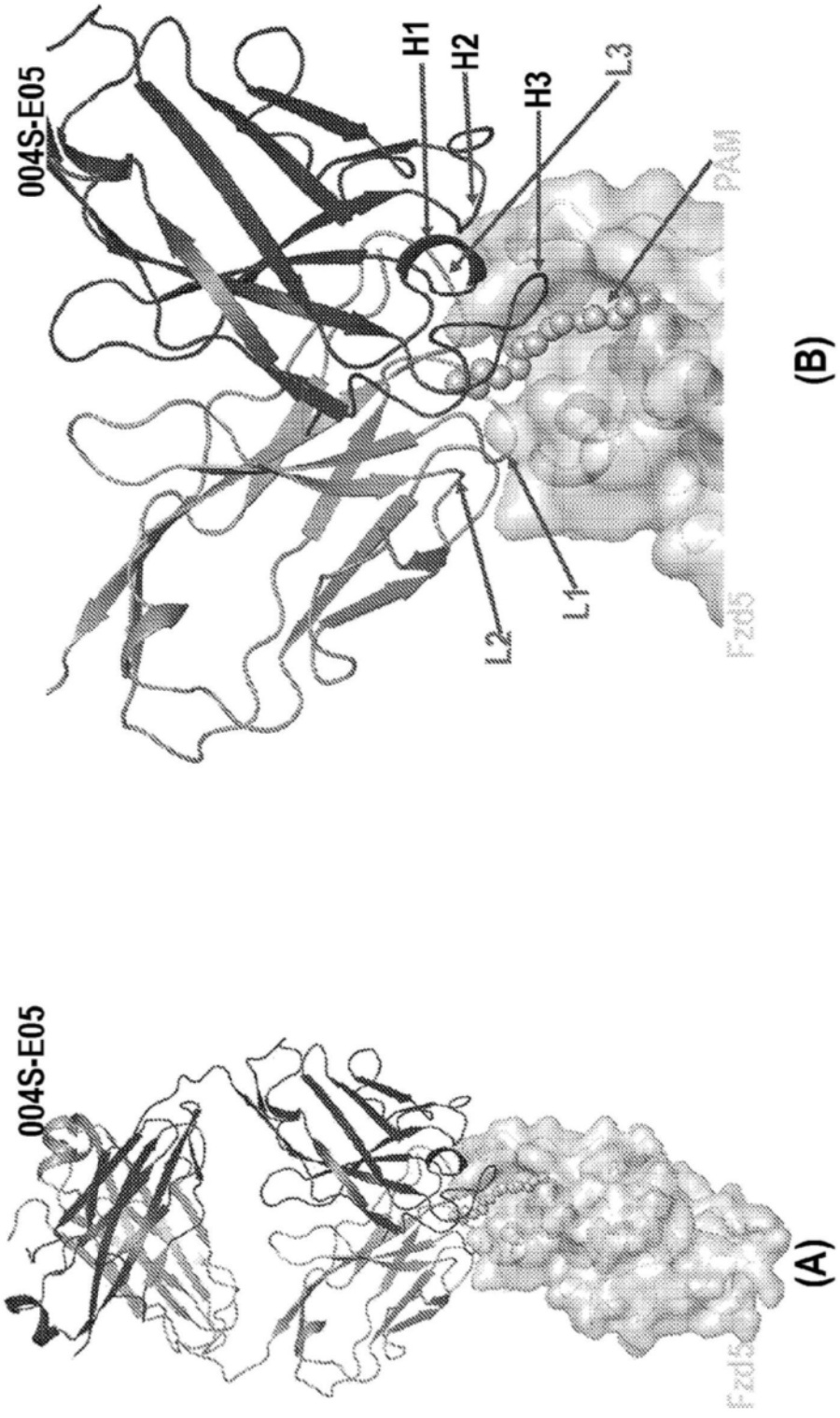


图6

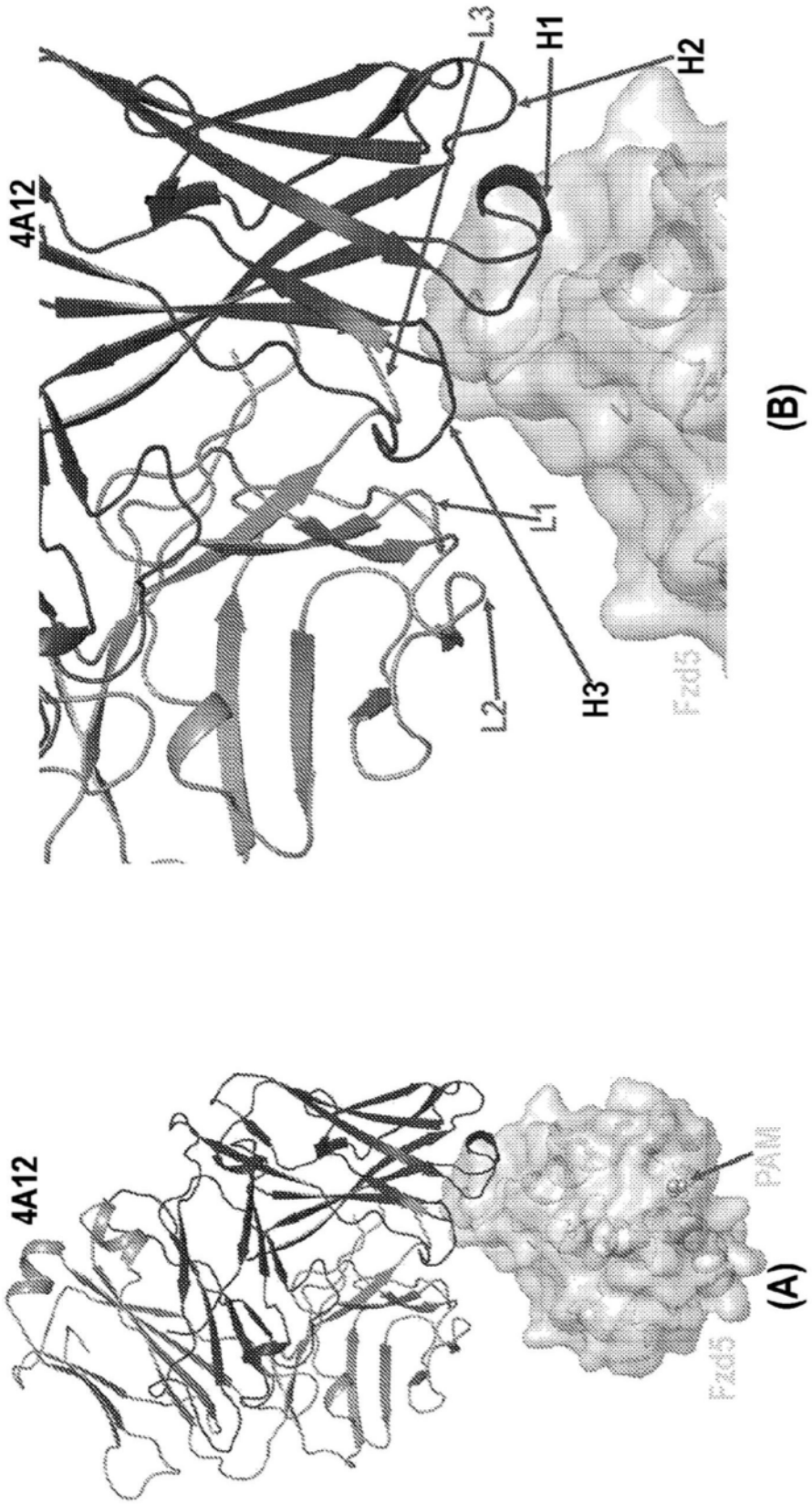


图7

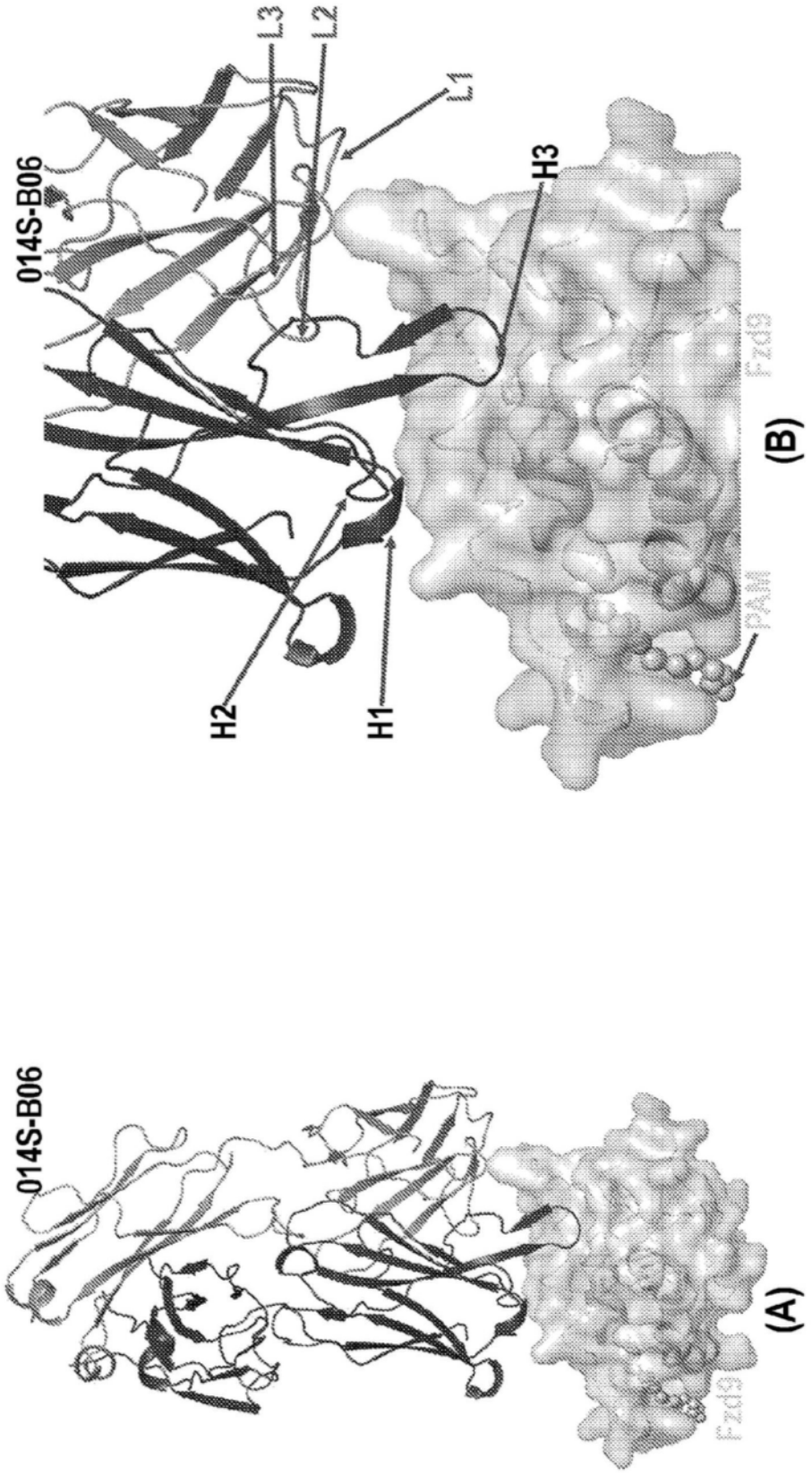


图8

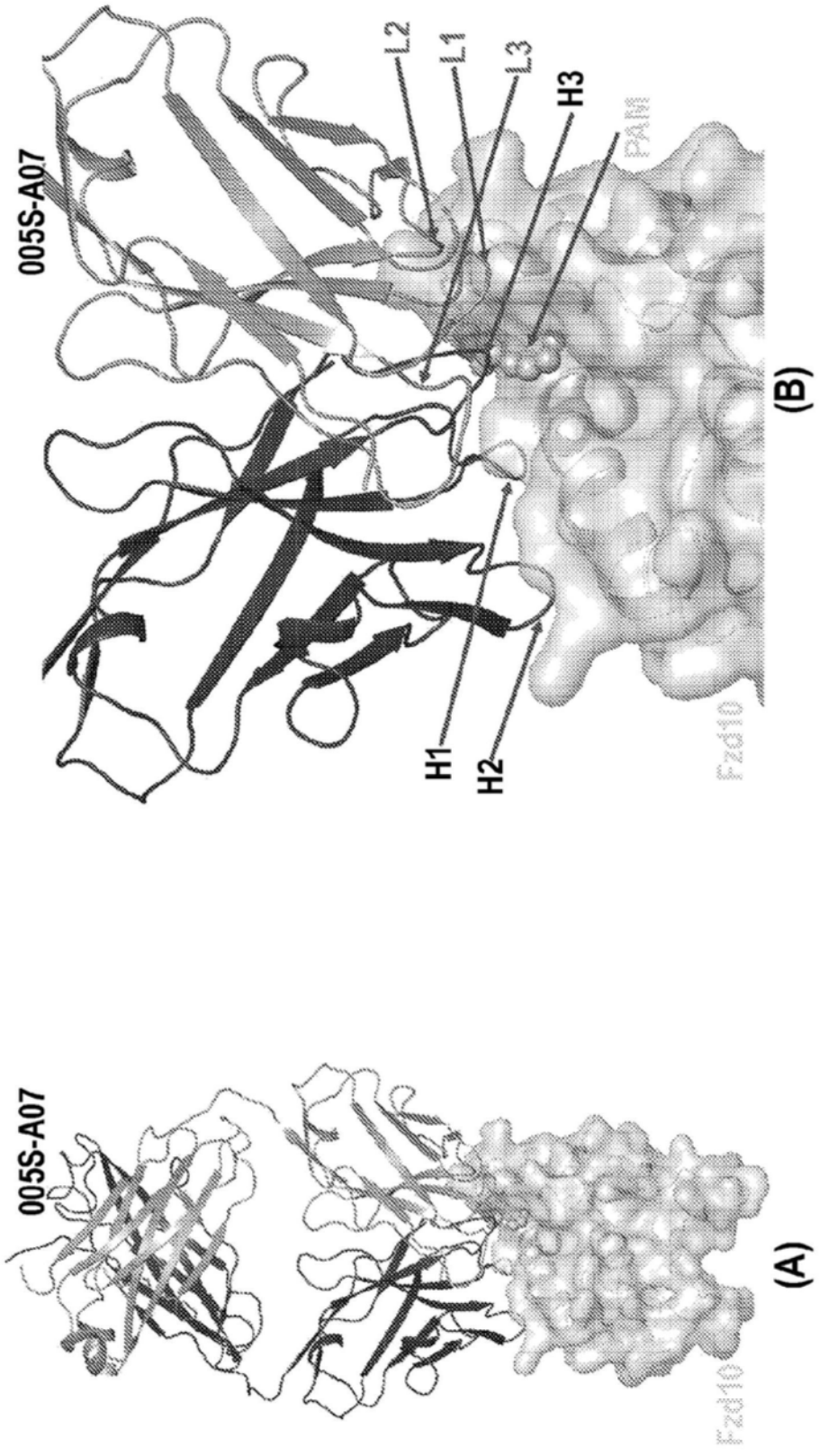


图9

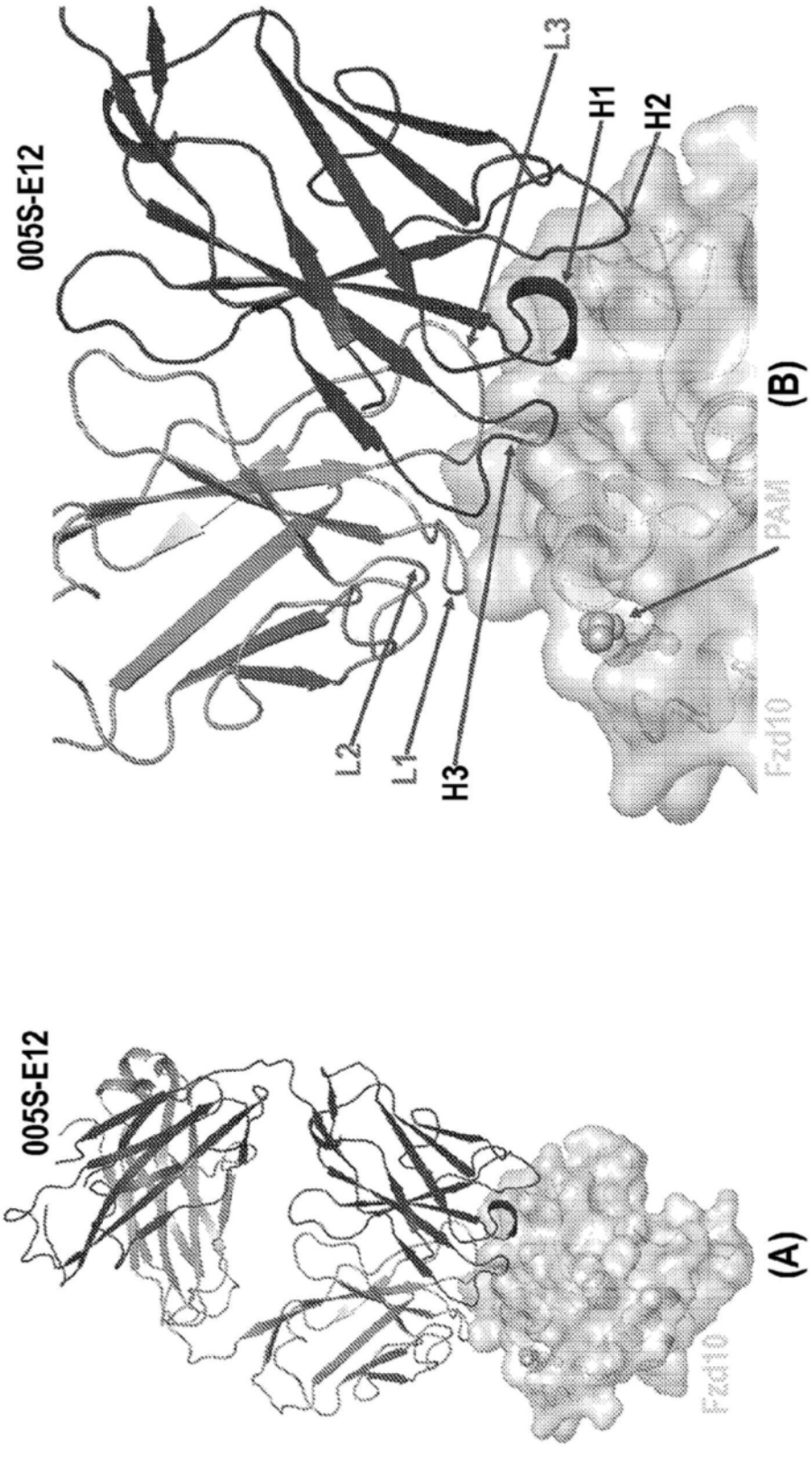


图10

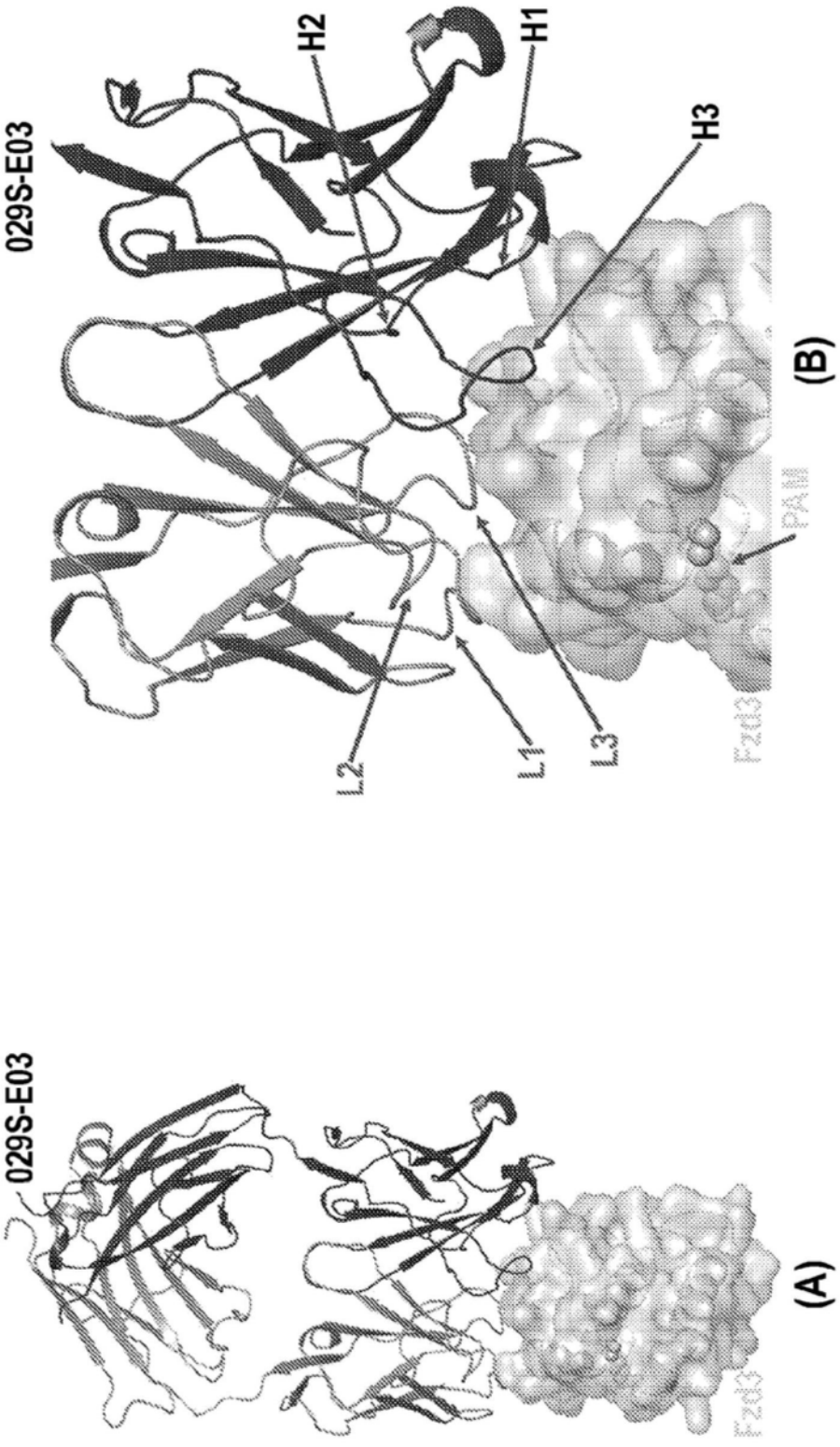


图11