



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I389919B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：099108743

(22)申請日：中華民國 95 (2006) 年 09 月 06 日

(51)Int. Cl. : C07K16/40 (2006.01)

(30)優先權：2005/09/07 美國 60/715,292

(71)申請人：艾默根佛蒙特有限公司(美國) AMGEN FREMONT INC. (US)

美國

輝瑞大藥廠(美國) PFIZER INC. (US)

美國

(72)發明人：諾夫 麥可 艾登 NORTH, MICHAEL AIDAN (GB)；阿穆德森 凱倫 克里斯汀娜 AMUNDSON, KARIN KRISTINA (US)；比迪恩 非 BEDIAN, VAHE (US)；比羅斯基 雪利 西姆斯 BELOUSKI, SHELLEY SIMS (US)；胡 洛 唐那 丹 HU-LOWE, DANA DAN (US)；蔣欣 JIANG, XIN (CN)；卡利克 雪能 瑪莉 KARLICEK, SHANNON MARIE (US)；凱勒曼 西瑞德 艾米 (DE)；湯瑪士 詹姆士 亞瑟 THOMSON, JAMES ARTHUR (CA)；王建英 WANG, JIANYING (US)；威克曼 葛蘭特 雷蒙 WICKMAN, GRANT RAYMOND (CA)；張京川 ZHANG, JINGCHUAN (CN)

(74)代理人：陳長文

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所 BCRC940504 2006 年 11 月 23 日

食品工業發展研究所 BCRC940505 2006 年 11 月 23 日

食品工業發展研究所 BCRC960281 2006 年 11 月 23 日

(56)參考文獻：

Abdalla SA et al, Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2, Hum Mol Genet. , vol.9, no.8, p.1227-1237. , 2000/05

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：21 共 0 頁

(54)名稱

針對類活化素受體激酶-1 之人類單株抗體

HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES TO ACTIVIN RECEPTOR-LIKE KINASE-1

(57)摘要

本發明係關於包括人類抗體及其抗原結合部分之抗體，該等人類抗體及其抗原結合部分與類活化素受體激酶-1(ALK-1)之胞外域(ECD)結合，且對 ALK-1/TGF- β -1/Smad1 信號傳輸路徑具消除作用。本發明亦係關於衍生自人類抗 ALK-1 抗體之重鏈及輕鏈免疫球蛋白，及編碼該等免疫球蛋白之核酸分子。本發明亦係關於製造人類抗 ALK-1 抗體之方法、包含該等抗體之組合物及使用該等抗體及組合物之方法。本發明亦係關於包含本發明之核酸分子之轉殖基因動物或植物。

The present invention relates to antibodies including human antibodies and antigen-binding portions thereof that bind to the extracellular domain (ECD) of activin receptor-like kinase-1 (ALK-1) and that function to abrogate the ALK-1/TGF-beta-1/Smad1 signaling pathway. The invention also relates to heavy and light chain immunoglobulins derived from human anti-ALK-1 antibodies and nucleic acid molecules encoding such immunoglobulins. The present invention also relates to methods of making human anti-ALK-1 antibodies, compositions comprising these antibodies and methods of using the antibodies and compositions. The invention also relates to transgenic animals or plants comprising nucleic acid molecules of the present invention.

(無元件符號說明)

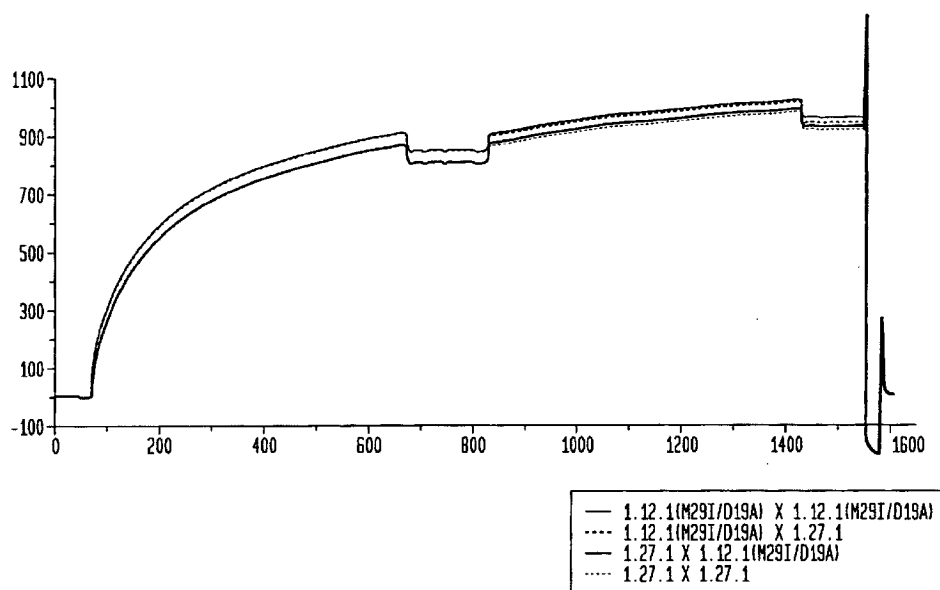


圖 1

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於結合至類活化素受體激酶-1(ALK-1)之胞外域(ECD)之人類單株抗體及其抗原結合部分。本發明亦係關於編碼該等抗體及抗原結合部分之核酸分子，製造人類抗ALK-1抗體及抗原結合部分之方法，包含該等抗體及抗原結合部分之組合物及使用該等抗體、抗原結合部分及組合物之方法。

【先前技術】

ALK-1為I型轉化生長因子 β 受體(TGF- β -1)之I型細胞表面受體。人類ALK-1為503胺基酸多肽，其包括信號序列(胺基酸：1-21)；N末端細胞外TGF- β -1配位體結合結構域或ECD(胺基酸：22-118)；單一跨膜結構域(胺基酸：119-141)；調節性甘胺酸/絲胺酸富集(GS)結構域(胺基酸：142-202)，及C末端絲胺酸-蘇胺酸激酶結構域(202-492)。於Attisano等人之*Cell*, 1993，第75卷，第671-680頁中揭示之人類ALK-1的胺基酸序列包括位置172之Ser(Genbank記錄L17075)，而美國專利第6,316,217號主張在位置172處具有Thr之人類ALK-1的胺基酸序列(Genbank記錄NM_000020)。編碼Attisano等人揭示之全長人類ALK-1之ACVRL1基因可自Invitrogen Inc.以Clone ID IOH21048購得。儘管ALK-1與其他I型受體(ALK-2至ALK-7)共有總計60-80%之同源性，但ALK-1之ECD與其他ALK家族成員之ECD顯著不同。例如，在人類中，僅ALK-2之ECD與ALK-

1之ECD顯著相關(共有大約25%之胺基酸一致性)。美國專利第6,316,217號，ten Dijke等人之*Oncogene*, 1993，第8卷，第2879-2887頁；Attisano等人之*Cell*, 1993，第75卷，第671-680頁。

一般而言，TGF- β 總配位體經由結合至兩種類型(I及II)之絲胺酸/蘇胺酸激酶之異源性受體錯合物來發揮其生物活性。II型受體為經配位體結合使I型受體磷酸化之原構性活性激酶。相反，活化I型激酶使包括易位至核且導致轉錄反應之各種Smad的下游信號傳輸分子磷酸化。Heldin等人*Nature*, 1997，第390卷，第465-471頁。在ALK-1之情況下，已展示Smad1經特別磷酸化且易位至核，且其於核中直接調節Smad1應答基因Id1及EphB2之表現。

ALK-1於內皮細胞及諸如胎盤或腦之其他高血管生成組織中係經高度且選擇性表現。藉由Affymetrix分佈及實時RT-PCR，已展示ALK-1於內皮細胞中之表現遠遠超過其輔助受體II型活化素及內皮因子，其配位體TGF- β -1或ALK-5之表現。ALK-1中之突變與遺傳性出血性毛細血管擴張症(HHT)相關，此表明ALK-1在控制血管發育或修復中之重要作用。Abdalla等人*J. Med. Genet.*, 2003，第40卷，第494-502頁；Sadick等人*Hematologica/The Hematology J.*, 2005，第90卷，第818-828頁。此外，ALK-1基因剔除小鼠之兩項獨立研究為ALK-1在血管生成過程中之作用提供了重要的活體內證明。Oh等人*Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000，第97卷，第2626-2631頁；Urness等人*Nature*

Genetics, 2000, 第26卷, 第328-331頁。

血管生成係包括由先前存在之血管形成新血管及/或使內皮幹細胞循環之生理過程。此係生長及發育中, 以及瘡傷癒合中之正常過程。然而, 此亦為腫瘤自潛伏狀態轉變為惡性狀態之基本步驟。Hanahan及Folkman, "Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis," *Cell*, 86(3):353-364, 1996; Carmeliet, "Angiogenesis in Health and Disease," *Nature Medicine*, 9(6):653-660, 2003; Bergers and Benjamin, "Tumorigenesis and the Angiogenic Switch," *Nature Reviews*, 3:401-410, 2003。在如癌症之疾病中, 身體喪失了維持平衡血管生成之能力。新血管引入患病組織, 破壞正常組織, 且在某些癌症之情況下, 新血管可容許腫瘤細胞逃逸至循環中且滯留於其他器官中(腫瘤轉移)。包括單株抗體(mAbs)之血管生成抑制劑係以此異常過程為靶向以阻斷或減緩腫瘤生長之一類極有前景的藥物。

除在實體腫瘤生長及轉移中之作用以外, 具有血管生成組份之其他顯著病況例如為關節炎、牛皮癬、年齡相關之新生血管黃斑退化及糖尿病性視網膜病變。Bonnet等人 "Osteoarthritis, Angiogenesis and Inflammation," *Rheumatology*, 2005, 第44卷, 第7-16頁; Creamer等人 "Angiogenesis in psoriasis," *Angiogenesis*, 2002, 第5卷, 第231-236頁; Clavel等人 "Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis," *Joint Bone Spine*, 2003, 第70卷, 第

321-326 頁 ; Anandarajah 等人 "Pathogenesis of psoriatic arthritis," *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2004 , 第 16 卷 , 第 338-343 頁 ; Ng 等人 "Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration," *Can. J. Ophthalmol.*, 2005 , 第 40 卷 , 第 352-368 頁 ; Witmer 等人 "Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease," *Progress in Retinal & Eye Research*, 2003 , 第 22 卷 , 第 1-29 頁 ; Adamis 等人 "Angiogenesis and ophthalmic disease," *Angiogenesis*, 1999 , 第 3 卷 , 第 9-14 頁。

預期抗血管生成療法本身為慢性的。因此，具有高選擇性內皮功能之標靶，諸如 ALK-1 較佳用以減少因副作用產生之損耗。此外，假定來自其他 ALK 家族成員 ECD 之 ALK-1 ECD 顯著不同，則預期所產生之對抗人類 ALK-1 ECD 之 mAb 選擇性地靶向 ALK-1。基於該等考慮，極為需要可抑制與 II 型受體之二聚化作用且因此阻斷 Smad1 磷酸化及下游轉錄反應之對抗 ALK-1 胞外域的單株抗體。

R&D Systems, Inc. 製造並出售由小鼠骨髓瘤與 B 細胞融合產生之融合瘤所產生之單株抗人類 ALK-1 抗體 (目錄號 MAB370)，該等 B 細胞係由以純化 NS0 衍生之重組人類 ALK-1 胞外域免疫之小鼠而獲得。已展示該抗體既不中和 ALK-1 與 TGF- β -1 之間之相互作用，亦不消除 Smad1 之磷酸化作用。已產生兔抗血清，其對抗對應於偶合至栓孔青貝血藍蛋白 (KLH) 之 ALK-1 之細胞內近膜區一部分 (胺基酸殘

基 145-166) 的合成肽(美國專利第 6,692,925 號), 且對抗除前導序列以外之整個 ALK-1 胞外域(Lux 等人, *J. Biol. Chem.*, 1999, 第 274 卷, 第 9984-9992 頁)。Abdalla 等人(*Human Mol. Gen.*, 2000, 第 9 卷, 第 1227-1237 頁)報導使用重組牛痘病毒構造產生 ALK-1 之多株抗體。R&D Systems, Inc. 製造並出售由純化、NS0 衍生之重組人類 ALK-1 胞外域免疫之山羊中產生之多株抗人類 ALK-1 抗體(目錄號 AF370)。

迄今尚未報導過 ALK-1 之 ECD 的完全人類單株抗體, 且尚無人證明 ALK-1 之 ECD 的任何單株抗體在消除 ALK-1/TGF- β -1/Smad1 信號傳輸路徑中之功效。

【發明內容】

本發明係關於結合至靈長類動物 ALK-1, 較佳為靈長類動物 ALK-1 之 ECD, 更佳為人類 ALK-1 之 ECD 的經分離中和抗 ALK-1 單株抗體或其抗原結合部分。在一較佳實施例中, 中和抗體為完全人類單株抗體或其抗原結合部分。

在另一態樣中, 本發明係抗 ALK-1 抗體或其抗原結合部分, 該抗體或其抗原結合部分消除 ALK-1/TGF- β -1/Smad1 信號傳輸路徑。在一較佳實施例中, 該等抗體為完全人類單株抗體或其抗原結合部分。

在另一態樣中, 本發明係抗 ALK-1 抗體或其抗原結合部分, 該抗體或其抗原結合部分為 TGF- β -1 刺激型血管生成之拮抗劑。在一較佳實施例中, 該等抗體為完全人類單株抗體或其抗原結合部分。

在另一態樣中，本發明係完全人類抗ALK-1抗體或其抗原結合部分，該抗體或其抗原結合部分為TGF- β -1刺激型腫瘤血管生成之拮抗劑。

在另一態樣中，本發明係耐受良好、可注射之完全人類抗ALK-1抗體或其抗原結合部分，該抗體或其抗原結合部分為TGF- β -1刺激型血管生成之拮抗劑。

在另一態樣中，本發明係抗ALK-1抗體或其抗原結合部分，該抗體或其抗原結合部分抑制ALK-1之特異性下游靶基因Id1之上調。在一較佳實施例中，該等抗體為完全人類單株抗體或其抗原結合部分。

在另一態樣中，本發明係抗ALK-1單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或其抗原結合部分係根據如下文所述若干功能特性中之至少一種來描述。

例如，在一實施例中，該抗體或其抗原結合部分以如由表面電漿共振所量測之1 μ M或更小之親和力值結合至靈長類動物ALK-1之胞外域。在另一實施例中，抗體或部分以如由表面電漿共振所量測之小於100 nM、小於5 nM、小於1 nM、小於500 pM、小於100 pM、小於50 pM、小於20 pM、小於10 pM或小於1 pM之親和力值結合至靈長類動物ALK-1之胞外域。在特定實施例中，親和力值係0.1 pM至1 μ M。在其他實施例中，親和力值係1 pM至100 nM。在其他實施例中，親和力值係1 pM至5 nM。在其他實施例中，親和力值係1 pM至500 pM。在其他實施例中，親和力值係1 pM至100 pM。在其他實施例中，親和力係1 pM至10

pM。

在另一實施例中，該抗體或其抗原結合部分以如由表面電漿共振所量測之100 nM或更小之親和力值結合至人類ALK-1之胞外域。在另一實施例中，抗體或部分以如由表面電漿共振所量測之小於10 nM、小於5 nM、小於1 nM、小於500 pM、小於100 pM、小於50 pM、小於20 pM、小於10 pM或小於1 pM之親和力值結合至人類ALK-1之胞外域。在特定實施例中，親和力值係1 pM至100 nM。在其他實施例中，親和力值係1 pM至5 nM。在其他實施例中，親和力值係1 pM至500 pM。在其他實施例中，親和力值係1 pM至100 pM。在其他實施例中，親和力係1 pM至10 pM。

在另一實施例中，如由表面電漿共振所量測，抗體或其部分具有 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 或更小之人類ALK-1解離速率(k_{off})。例如，在特定實施例中，抗體或部分具有小於 10^{-3} s^{-1} 、小於 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、小於 10^{-4} s^{-1} 、小於 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、小於 10^{-5} s^{-1} 或小於 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 之人類ALK-1的 k_{off} 。在其他實施例中， k_{off} 係 10^{-6} s^{-1} 至 10^{-4} s^{-1} 。在其他實施例中， k_{off} 係 10^{-6} s^{-1} 至 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 。

在另一實施例中，抗體或其部分以1000 nM或更小之 K_D 結合至靈長類動物ALK-1。在另一實施例中，抗體或部分以如由表面電漿共振所量測之小於500 nM、小於100 nM、小於50 nM、小於20 nM、小於10 nM或小於1 nM之 K_D 結合至人類ALK-1。在特定實施例中， K_D 係1 μM 至100 nM。在其他實施例中， K_D 係100 nM至10 nM。在其他實施例中，

K_D 係50 nM至0.1 nM。該等 K_D 值可藉由熟習此項技術者已知之任何技術來量測，諸如藉由ELISA、RIA、流式細胞儀或表面電漿共振，諸如BIACORE™。

在另一實施例中，抗體或其部分對於靈長類動物ALK-1($K_D(P)$)比對齧齒動物ALK-1($K_D(R)$)具有更高之結合親和力。在一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合部分具有大於或等於1.5之 $K_D(R)/K_D(P)$ 。在另一實施例中，本發明之抗體或其抗原結合部分具有大於或等於2、大於或等於3、大於或等於5、大於或等於10、大於或等於20、大於或等於50、大於或等於100、大於或等於200、大於或等於500或大於或等於1000之 $K_D(R)/K_D(P)$ 。靈長類動物ALK-1與齧齒動物ALK-1兩者之該等 K_D 值可藉由熟習此項技術者已知之任何技術來量測，諸如藉由流式細胞儀、ELISA、RIA或表面電漿共振，諸如BIACORE™。

在另一實施例中，如由其抑制ALK-1之特異性下游靶基因Id1上調之能力所量測，抗ALK-1抗體或其部分具有500 nM或更小之 IC_{50} 。在另一實施例中，該 IC_{50} 小於300 nM、小於200 nM、小於150 nM、小於100 nM、小於50 nM、小於20 nM、小於10 nM或小於1 nM。在特定實施例中， IC_{50} 係1 nM至500 nM。在其他實施例中， IC_{50} 係5 nM至250 nM。在其他實施例中， IC_{50} 係10 nM至100 nM。

在另一實施例中，如由其抑制藉由使用Odyssey紅外成像系統之西方墨點法所判定之Smad1磷酸化作用的能力所量測，抗ALK-1抗體或其部分具有250 nM或更小之 IC_{50} 。

在另一實施例中，該 IC_{50} 小於200 nM、小於150 nM、小於100 nM、小於50 nM、小於20 nM、小於10 nM或小於1 nM。在特定實施例中， IC_{50} 係1 nM至250 nM。在其他實施例中， IC_{50} 係5 nM至200 nM。在其他實施例中， IC_{50} 係10 nM至100 nM。

在另一實施例中，如由人類CD-31信號檢定之IHC分析判定，抗ALK-1抗體或其部分與對照樣本相比，在以人類包皮組織移植之SCID小鼠中，抑制至少40%之人類血管生成，其中人類黑素瘤M24met腫瘤細胞係經皮內植入以人類包皮組織移植之SCID小鼠中。在另一實施例中，抗ALK-1抗體或其部分與對照樣本相比，在以人類包皮組織移植之SCID小鼠中，抑制至少30%、至少40%、至少50%或至少60%之人類血管生成，其中人類黑素瘤M24met腫瘤細胞係經皮內植入以人類包皮組織移植之SCID小鼠中。

在另一實施例中，如由其在以人類包皮組織移植之SCID小鼠中抑制人類血管生成之能力所量測，抗ALK-1抗體或其部分具有500 nM或更小之 EC_{50} ，其中人類黑素瘤M24met腫瘤細胞係經皮內植入以人類包皮組織移植之SCID小鼠中。在另一實施例中，該 EC_{50} 係小於400 nM、小於300 nM、小於200 nM、小於150 nM、小於100 nM、小於50 nM、小於25 nM或小於5 nM。在特定實施例中， EC_{50} 係5 nM至500 nM。在其他實施例中， IC_{50} 係25 nM至300 nM。在其他實施例中， IC_{50} 係50 nM至150 nM。

在另一實施例中，如由人類CD-31信號檢定之IHC分析

判定，抗ALK-1抗體或其部分與對照樣本相比，在以人類包皮組織移植之SCID小鼠中，抑制至少25%之人類血管生成，其中膠原蛋白加人類大血管內皮細胞之混合物係經皮內植入以人類包皮組織移植之SCID小鼠中。在另一實施例中，抗ALK-1抗體或其部分與對照樣本相比，在以人類包皮組織移植之SCID小鼠中，抑制至少50%之人類血管生成，其中膠原蛋白係經皮內植入以人類包皮組織移植之SCID小鼠中。在另一實施例中，與對照物相比，抗ALK-1抗體或其部分抑制至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。

在另一實施例中，抗ALK-1抗體或其部分與選自由以下各抗體組成之群之抗體競爭結合至ALK-1：1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1。

在另一實施例中，抗ALK-1抗體或其部分與選自由以下各抗體組成之群之抗體交叉競爭結合至ALK-1：1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1。



在另一實施例中，抗ALK-1抗體或其部分結合至與選自由以下各抗體組成之群之抗體相同之ALK-1抗原決定基：1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1。

在另一實施例中，抗ALK-1抗體或其部分結合至與選自由以下各抗體組成之群之抗體具有大體上相同 K_D 之ALK-1：1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1。

在另一實施例中，抗ALK-1抗體或其部分結合至與選自由以下各物組成之群之抗體具有大體上相同 k_{off} 的ALK-1：1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1。

本發明之另一態樣為具有先前所述功能特性之至少一種之抗體或其抗原結合部分，且包含在胺基酸序列中與SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、

50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中任一者至少90%相同之V_H結構域。在一實施例中，該V_H結構域在胺基酸序列中與SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中任一者至少91%、至少93%、至少95%、至少97%、至少99%或100%相同。

在另一實施例中，抗體或其部分具有先前所述功能特性之至少一種，且包含一V_H結構域，其為SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中之任一者或與SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中之任一者相差至少一個保守胺基酸取代。例如，V_H結構域可與SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中之任一者相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個保守胺基酸取代。在另一實施例中，該等保守胺基酸取代中之任一者均可發生於CDR1、CDR2及/或CDR3區中。

本發明之另一態樣為具有先前所述功能特性之至少一種之抗體或其抗原結合部分，且包含在胺基酸序列中與SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中任一者至少90%相同之V_L結構域。在一實施例中，該V_L結

構域在胺基酸序列中與SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中任一者至少91%、至少93%、至少95%、至少97%、至少99%或100%相同。

在另一實施例中，抗體或其部分具有先前所述功能特性之至少一種，且包含一V_L結構域，其為SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中之任一者或與SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中之任一者相差至少一個保守胺基酸取代。例如，V_L結構域可與SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中之任一者相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個保守胺基酸取代。在另一實施例中，該等保守胺基酸取代中之任一者均可發生於CDR1、CDR2及/或CDR3區中。

本發明之另一態樣為具有先前所述功能特性之至少一種之抗體或其抗原結合部分，其中該等V_L及V_H結構域在胺基酸序列中各自分別與單株抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、

5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1中任一者之 V_L 及 V_H 結構域至少90%相同。例如， V_L 及 V_H 結構域在胺基酸序列中各自分別與單株抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1中任一者之 V_L 及 V_H 結構域至少91%、93%、95%、97%、99%或100%相同。

本發明之另一態樣為選自由以下各物組成之群之單株抗體或其抗原結合部分：a)包含SEQ ID NO：6中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO：8中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；b)包含SEQ ID NO:10中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO:12中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；c)包含SEQ ID NO:14中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO:16中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；d)包含SEQ ID NO:18中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO:20中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；e)包含SEQ ID NO:22中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO:24中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；f)包含SEQ ID NO:26中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO:28中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；g)包含SEQ ID NO:30中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO:32中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；h)包含SEQ ID NO:34中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO:36中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；i)包含SEQ ID NO:38中列出

之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:40 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；j) 包含 SEQ ID NO:42 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:44 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；k) 包含 SEQ ID NO:46 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:48 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；l) 包含 SEQ ID NO:50 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:52 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；m) 包含 SEQ ID NO:54 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:56 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；n) 包含 SEQ ID NO:58 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:60 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；o) 包含 SEQ ID NO:62 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:64 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；p) 包含 SEQ ID NO:66 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:68 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；q) 包含 SEQ ID NO:70 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:72 中列出之 V_L 結構域的抗體或其抗原結合部分；r) 包含 SEQ ID NO:74 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:76 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；s) 包含 SEQ ID NO:78 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:80 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；t) 包含 SEQ ID NO:82 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:84 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；u) 包含 SEQ ID NO:86 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:88 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；v) 包含 SEQ ID NO:90 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:92 中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；w) 包含 SEQ ID NO:104 中列出之 V_H 結構域及 SEQ ID NO:127 中列出之 V_L 結構域的抗體或其

部分；x)包含SEQ ID NO:6中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO:127中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分；及y)包含SEQ ID NO:104中列出之 V_H 結構域及SEQ ID NO:8中列出之 V_L 結構域的抗體或其部分。

在另一實施例中，對於上述組a)至v)中之任何抗體或其部分而言， V_H 及/或 V_L 結構域可與其中所列舉之特定SEQ ID NO相差至少一個保守胺基酸取代。例如， V_H 及/或 V_L 結構域可與所列舉之SEQ ID NO相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個保守胺基酸取代。在另一實施例中，任何該等保守胺基酸取代均可發生於CDR1、CDR2及/或CDR3區中。

在另一實施例中，本發明提供具有先前所述功能特性之至少一種之單株抗體或其抗原結合部分，其中該 V_H 結構域係獨立選自SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中之任一者，或與SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中之任一者相差至少一個保守胺基酸取代之序列；且該 V_L 結構域係獨立選自SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中之任一者，或與SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中之任一者相差至少一個

保守胺基酸取代之序列。例如，該等 V_H 及 V_L 結構域可各自分別與SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104及8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個保守胺基酸取代。

在另一實施例中，本發明提供具有先前所述功能特性之至少一種之單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或部分包含分別獨立選自重鏈CDR1、CDR2或CDR3序列中之 V_H CDR1、CDR2及CDR3序列，該等序列係發現於SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中之任一者中，或與SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中之任一者相差至少一個保守胺基酸取代之序列中。例如， V_H CDR1、CDR2及CDR3可分別與SEQ ID NO：6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中任一者之CDR1、CDR2及CDR3相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個保守胺基酸取代。

在另一實施例中，本發明提供具有先前所述功能特性之至少一種之單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或部

分包含分別獨立選自輕鏈CDR1、CDR2或CDR3序列中之V_L CDR1、CDR2及CDR3序列，該等序列係發現於SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中之任一者中，或與SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中之任一者相差至少一個保守胺基酸取代之序列中。例如，V_L CDR1、CDR2及CDR3可分別與SEQ ID NO：8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中任一者之CDR1、CDR2及CDR3相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個保守胺基酸取代。

本發明進一步提供具有先前所述功能特性之至少一種之單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或抗原結合部分包含如在以下單株抗體之任一者中發現之V_H及V_L CDR1，V_H及V_L CDR2及V_H及V_L CDR3：1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1。

本發明進一步提供具有先前所述功能特性之至少一種之單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或抗原結合部分

包含利用人類 V_H 4-31、 V_H 3-11、 V_H 3-15、 V_H 3-33、 V_H 4-61或 V_H 4-59基因之重鏈。在某些實施例中，重鏈利用人類 V_H 3-33基因、人類 D 6-19基因及人類 J_H 3B基因；人類 V_H 4-31基因、人類 D 6-19基因及人類 J_H 4B基因；人類 V_H 4-61基因、人類 D 6-19基因及人類 J_H 4B基因；人類 V_H 4-31基因、人類 D 3-3基因及人類 J_H 3B基因；人類 V_H 4-31基因及人類 J_H 3B基因；人類 V_H 4-59基因、人類 D 6-19基因及人類 J_H 4B基因；人類 V_H 3-11基因、人類 D 3-22基因及人類 J_H 6B基因；人類 V_H 3-15基因、人類 D 3-22基因及人類 J_H 4B基因；人類 V_H 4-31基因、人類 D 5-12基因及人類 J_H 6B基因；人類 V_H 4-31基因、人類 D 4-23基因及人類 J_H 4B基因；人類 V_H 4-31基因、人類 D 2-2基因及人類 J_H 5B基因；人類 V_H 4-31基因及人類 J_H 6B基因；人類 V_H 3-15基因、人類 D 1-1基因及人類 J_H 4B基因；人類 V_H 3-11基因、人類 D 6-19基因及人類 J_H 6B基因；人類 V_H 3-11基因、人類 D 3-10基因及人類 J_H 6B基因；或人類 V_H 3-11基因、人類 D 6-6基因及人類 J_H 6B基因。

本發明進一步提供具有先前所述功能特性之至少一種之單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或抗原結合部分包含利用人類 V_K A27、 V_K A2、 V_K A1、 V_K A3、 V_K B3、 V_K B2、 V_K L1或 V_K L2基因之輕鏈。在某些實施例中，輕鏈利用人類 V_K L1基因及人類 J_K 4基因；人類 V_K A27基因及人類 J_K 5基因或人類 J_K 4基因；人類 V_K B3基因及人類 J_K 1基因；人類 V_K L2基因及人類 J_K 3基因；人類 V_K A2基因及人類 J_K 1

基因；人類 V_{κ} A3 基因及人類 J_{κ} 4 基因；人類 V_{κ} A1 基因及人類 J_{κ} 1 基因；人類 V_{κ} B2 基因及人類 J_{κ} 4 基因；或人類 V_{κ} A2 基因及人類 J_{κ} 1 基因。

本發明進一步提供具有先前所述功能特性之至少一種之單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或抗原結合部分包含如在以下單株抗體之任一者中發現之一或多種重鏈及/或輕鏈 FR1、FR2、FR3 或 FR4 胺基酸序列：1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1 及 5.59.1。

本發明進一步提供包含以下中列出之胺基酸序列之單株抗體：a) SEQ ID NO:2 及 SEQ ID NO:4；b) SEQ ID NO:2 及 SEQ ID NO:102；c) SEQ ID NO:100 及 SEQ ID NO:4；及 d) SEQ ID NO:100 及 SEQ ID NO:102。

本發明之另一實施例為任何先前所述抗體，即 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子，或由該等分子衍生。例如，該抗體可為 IgG₁ 或 IgG₂。

另一實施例提供任何上述抗體或抗原結合部分，其為 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、F_v 片段、單鏈 F_v 片段、單鏈 V_H 片段、單鏈 V_L 片段、人化抗體、嵌合抗體或雙特異性抗體。

另一實施例為包含如先前所述之任何抗體或其部分及至少一個額外分子實體的衍生抗體或抗原結合部分。例如，



該至少一個額外分子實體可為可調節該抗體或抗體部分與另一分子(諸如抗生蛋白鏈菌素核心區或多聚組胺酸標記)之結合的另一抗體(例如，雙特異性抗體或雙功能抗體)、偵測劑、標籤、細胞毒性劑、醫藥劑及/或蛋白質或肽。例如，本發明之抗體或抗原結合部分可以其衍生之適用偵測劑包括螢光化合物，其包括螢光素、螢光素異硫氰酸酯、若丹明(rhodamine)、5-二甲基胺-1-萘磺醯氯、藻紅素、鐳系磷光體及其類似物。抗體亦可由適用於偵測之酶來標記，諸如辣根過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶、葡萄糖氧化酶及其類似物。在另一實施例中，本發明之抗體或其部分亦可由生物素或由藉由二次報導體辨識之預定多肽抗原決定基(例如，白胺酸拉鏈對序列、二次抗體之結合位點、金屬結合結構域、抗原決定基標記)來標記。在本發明之又一實施例中，任何抗體或其部分亦可由諸如聚乙二醇(PEG)、甲基或乙基或碳水化合物基團之化學基團來衍生。

在某些實施例中，將本文揭示之抗ALK-1抗體或抗原結合部分黏附至固體支撐體。

在某些實施例中，裂解本發明之任何抗ALK-1抗體重鏈的C末端離胺酸。在本發明之不同實施例中，抗ALK-1抗體之重鏈及輕鏈視情況可包括信號序列。

本發明亦提供包含上述任何抗體或其抗原結合部分及醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物。

在另一實施例中，本發明係關於包含編碼如本文所述之

任何抗體或其抗原結合部分之核苷酸序列的經分離核酸分子。在一特定實施例中，經分離核酸分子包含SEQ ID NO：1中列出之核苷酸序列，此序列編碼重鏈。在另一特定實施例中，經分離核酸分子包含SEQ ID NO：3中列出之核苷酸序列，此序列編碼輕鏈。

在另一特定實施例中，經分離核酸分子包含聚核苷酸，該聚核苷酸包含以ATCC寄存編號PTA-6864(以財團法人食品工業發展研究所寄存編號BCRC 940504)寄存之純系cDNA序列之開放閱讀框架。在另一特定實施例中，經分離核酸分子包含聚核苷酸，該聚核苷酸包含以ATCC寄存編號PTA-6865(以財團法人食品工業發展研究所寄存編號BCRC 940505)寄存之純系cDNA序列之開放閱讀框架。

在另一特定實施例中，經分離核酸分子包含SEQ ID NO：95或128中列出之核苷酸序列，其各序列編碼重鏈。在另一特定實施例中，經分離核酸分子包含SEQ ID NO：101中列出之核苷酸序列，此序列編碼輕鏈。

本發明進一步係關於包含本文所述之任何核酸分子之載體，其中該載體視情況包含可操作性地連接至核酸分子之表現控制序列。

另一實施例提供包含本文所述之任何載體或包含本文所述之任何核酸分子之宿主細胞。本發明亦提供產生本文如所述之任何抗體或抗原結合部分或產生任何該等抗體或該等抗原結合部分之重鏈或輕鏈的經分離細胞株。

在另一實施例中，本發明係關於一種產生抗ALK-1抗體或其抗原結合部分之方法，其包含於合適條件下培養本文所述



之任何宿主細胞或細胞株且使該抗體或抗原結合部分再生。

本發明亦係關於包含本文所述之任何核酸之非人類轉殖基因動物或轉殖基因植物，其中該非人類轉殖基因動物或轉殖基因植物表現該核酸。

本發明進一步提供一種用於使結合至ALK-1之抗體或其抗原結合部分分離之方法，其包含將抗體自如本文所述之非人類轉殖基因動物或轉殖基因植物分離之步驟。

在另一實施例中，本發明係關於以ATCC寄存編號PTA-6808(以財團法人食品工業發展研究所寄存編號BCRC 960281)寄存之融合瘤。

本發明亦提供一種用於判定物質是否抑制ALK-1之特異性下游靶基因Id1之上調的方法，該方法包含使表現Id1之細胞之第一樣本與該物質相接觸且判定Id1表現是否受到抑制，其中與細胞之對照樣本相比，在與該物質接觸之細胞的第一樣本中降低之Id1表現水平表明該物質抑制Id1之表現。本發明進一步提供該方法，其中該物質為結合至ALK-1胞外域之抗體。

本發明亦提供一種用於在有此需要之哺乳動物中治療異常細胞生長之方法，其包含向該哺乳動物投與如本文所述之任何抗體或其抗原結合部分或任何醫藥組合物之步驟。本發明進一步提供一種在有此需要之哺乳動物中以結合至ALK-1之抗體或其抗原結合部分治療異常細胞生長之方法，其包含在允許表現該等核酸分子之合適條件下，向該哺乳動物投與有效量之本文所述之任何核酸分子。在另一實施例中，用於治療異常細胞生長之方法進一步包含投與

一定量之選自抗腫瘤劑、抗血管生成劑、信號轉導抑制劑及抗增生劑之一或多種物質，該等量一起可有效用於治療該異常細胞生長。在特定實施例中，該異常細胞生長為癌性的。

本發明亦提供一種具有SEQ ID NO：93之胺基酸序列之經分離食蟹猴ALK-1蛋白質。本發明進一步提供一種編碼具有SEQ ID NO：93胺基酸序列之蛋白質的經分離核酸分子。本發明進一步提供一種SEQ ID NO:94之經分離核酸分子。

【實施方式】

定義及通用技術

除非另外定義，結合本發明使用之科學及技術術語應具有熟習此項技術者通常理解之涵義。此外，除非上下文需要，否則單數術語應包括複數且複數術語應包括單數。通常結合本文所述之細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳及蛋白質及核酸化學及雜交使用之術語及其技術為彼等於此項技術中所熟知及通用者。

除非另外指出，否則本發明之方法及技術通常係根據此項技術中所熟知且如在本說明書通篇中所引用且討論之各種通用及更具體參考中所述之習知方法來進行。參見例如 Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第3版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel 等人，*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods*



from *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow及Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998);及 Coligan 等人, *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003), 其以引用的方式併入本文。如通常於此項技術中完成或如本文所述, 根據製造者說明書來進行酶促反應及純化技術。結合本文所述之分析化學、合成有機化學及藥用及醫藥化學使用之術語及其實驗室程序及技術為彼等於此項技術中所熟知及通用者。

除非另外指出, 否則應將以下術語理解為具有以下涵義:

如本文所使用之術語"ALK-1"係指哺乳動物類活化素受體激酶-1。術語ALK-1意欲包括可藉由標準重組表現方法製備之重組ALK-1及重組嵌合形式之ALK-1。

如本文所使用之首字母縮寫詞"mAb"係指單株抗體。

如本文所使用, 以數字稱謂之抗體為自相同數目之融合瘤獲得之單株抗體(mAb)。例如, 單株抗體1.12.1係自融合瘤1.12.1獲得。

1.12.1係指自融合瘤分離之mAb 1.12.1變異體。

1.12.1(rWT)係指mAb 1.12.1變異體, 即經表現之重組mAb。

1.12.1(M29I/D19A)係指mAb 1.12.1變異體, 即含有兩個特定胺基酸突變(以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺

酸，及以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(M29I)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有特定單一胺基酸突變(其中以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(D19A)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有特定單一胺基酸突變(其中以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

除非另外指出，如本文所使用之"異常細胞生長"係指與正常調節機制(例如，接觸抑制損耗)無關之細胞生長。

如本文所使用之術語"相鄰"係用以係指彼此直接連接而不具有插入核苷酸之核苷酸序列。舉例而言，當因此連接之兩者為5'-AAAAATTT-3'或5'-TTTAAAAA-3'時，五核苷酸5'-AAAAA-3'與三核苷酸5'-TTT-3'相鄰，而當因此連接之兩者為5'-AAAAACTTT-3'時，五核苷酸5'-AAAAA-3'與三核苷酸5'-TTT-3'不相鄰。

本文所使用之術語"藥劑"代表化合物、化合物之混合物、生物大分子或由生物材料製造之萃取物。

如本文所使用之"緩解"疾病、病症或病況意謂降低疾病、病症或病況之症狀嚴重性。其包括(但不限於)與在該治療方法之前或不存在時患者之腫瘤尺寸、生長及/或質量，轉移範圍或進程及其類似者相比，影響該患者之該等參數。

如本文所使用之首字母縮寫詞"Id1"係指 ALK-1之特定下

游靶基因，Id1基因，其對於血管生成具有重要意義。已報導在特定癌症中，Id1基因藉由停止產生蛋白質、凝血栓蛋白-1(TSP-1)、天然產生之血管生成抑制劑來控制血管生成路徑。例如，已報導在黑素瘤、乳癌、頭頸部癌、腦癌、子宮頸癌、前列腺癌、胰腺癌及睪丸癌中高度表現之Id1基因導致TSP-1之表現降低且腫瘤血管之形成增加。Volpert, Olga V.等人 "Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1," *Cancer Cell*, 2002年12月，第2卷，第473-483頁。

如本文所使用之術語"Smad"係指於自線蟲類至人類之物種範圍內發現之Smad結構域蛋白質。該等高度保守蛋白質含有N末端MH1結構域，其接觸DNA且由短連接區自C末端MH2結構域分離，後者展示與雙頭(FHA)結構域之顯著相似性。FHA與Smad(MH2)結構域共有由具有希臘鑰匙拓撲結構之兩折疊中之十一個 β 鏈的夾層組成之通用結構。Smad蛋白質藉由來自受體Ser/Thr蛋白質激酶之TGF- β /活化素/BMP-2/4細胞激素介導於細胞表面至核之信號傳輸。Smad蛋白質分為三種功能類別：受體調節之Smad(R-Smad)，包括Smad1、-2、-3、-5及-8，其各自包括於配位體特異性信號傳輸路徑中；共介體Smad(共Smad)，包括Smad4，其與R-Smad相互作用以參與信號傳輸；及抑制性Smad(I-Smad)，包括Smad-6及-7，其阻斷R-Smad與共Smad之活化，藉此負性調節信號傳輸路徑。

如本文所使用之術語"TGF- β "係指轉化生長因子 β ，其組

成調節細胞生長及分化之多功能性細胞激素(TGF- β 1-5)之家族。轉化生長因子(TGF)為本身存在之諸多特徵化生長因子之一。其在患有嚴重組合免疫缺陷症之"SCID"小鼠中具有關鍵作用。許多細胞合成TGF- β 且基本上均具有該肽之特異性受體。TGF- β 調節許多其他肽生長因子之作用且判定其效應之正性或負性方向。TGF- β 為在上皮細胞中具有生長抑制效應之腫瘤抑制細胞激素。藉由引發上皮細胞至間葉細胞之轉移，TGF- β 亦可充當腫瘤啟動子。TGF- β 使包括於細胞週期進程中之若干蛋白質失活且藉此藉由導致上皮細胞在細胞週期之G1階段停止來發揮其對上皮細胞之生長抑制效應。蛋白質用作二硫化物連接之均二聚物。其序列之特徵在於存在若干種C末端半胱氨酸殘基，該等殘基形成排列於類結點拓撲結構中之聯鎖二硫化物連接。儘管精確拓撲結構不同，但已於某些結合至電壓閘Ca²⁺通道之酶抑制劑及神經毒素結構中注意到類似之"胱氨酸結點"排列。TGF- β 基因係經不同表現，表明不同TGF- β 物種於活體內可具有各自不同之生理作用。

如本文使用之術語"TGF- β 1"係指1型轉化生長因子 β 受體，其為藉由蛋白水解分裂由前驅體蛋白質C末端衍生之112胺基酸殘基之肽。對於成熟鼠組織中TGF- β 1 mRNA含量之實驗說明主要於脾、肺及胎盤中表現。咸信TGF- β 1在病理學方法中具有重要作用。

如本文所使用之術語"SCID"係指具有嚴重組合免疫缺陷症之小鼠。

如本文所使用之術語"HUVEC"係指人臍靜脈內皮細胞。

如下表說明，如本文所使用之"胺基酸"係以其全名、以其對應之三個字母代碼，或以與其對應之一個字母代碼來表示：

全名	三字母代碼	一字母代碼
天冬胺酸	Asp	D
麩胺酸	Glu	E
離胺酸	Lys	K
精胺酸	Arg	R
組胺酸	His	H
酪胺酸	Tyr	Y
半胱胺酸	Cys	C
天冬醯胺酸	Asn	N
麩醯胺酸	Gln	Q
絲胺酸	Ser	S
蘇胺酸	Thr	T
甘胺酸	Gly	G
丙胺酸	Ala	A
纈胺酸	Val	V
白胺酸	Leu	L
異白胺酸	Ile	I
甲硫胺酸	Met	M
脯胺酸	Pro	P
苯丙胺酸	Phe	F
色胺酸	Trp	W

如本文所使用之二十個習知胺基酸及其縮寫均遵循習知用法。參見*Immunology--A Synthesis*(第2版，E. S. Golub及D. R. Gren編，Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))，其係以引用的方式併入本文。

"保守胺基酸取代"為一種其中胺基酸殘基係以具有類似化學特性(例如帶電性或疏水性)之側鏈R基的另一胺基酸

殘基取代者。一般而言，保守胺基酸取代大體上不改變蛋白質之功能特性。在兩個或兩個以上之胺基酸序列因保守取代而彼此不同之情況下，可向上調節序列一致性百分比或類似度以校正取代之保守特性。進行此調節之方法為熟習此項技術者所熟知。參見例如 Pearson, *Methods Mol. Biol.* **243**:307-31 (1994)。

具有類似化學特性之側鏈之胺基酸基團的實例包括 1) 脂族側鏈：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸；2) 脂族羥基側鏈：絲胺酸及蘇胺酸；3) 含有醯胺之側鏈：天冬醯胺酸及麩醯胺酸；4) 芳族側鏈：苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸；5) 鹼性側鏈：離胺酸、精胺酸及組胺酸；6) 酸性側鏈：天冬胺酸及麩胺酸；及 7) 含硫側鏈：半胱胺酸及甲硫胺酸。較佳之保守胺基酸取代基為：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸、苯丙胺酸-酪胺酸、離胺酸-精胺酸、丙胺酸-纈胺酸、麩胺酸-天冬胺酸及天冬醯胺酸-麩醯胺酸。

或者，保守置換為在以引用的方式併入本文之 Gonnet 等人之 *Science* **256**:1443-45 (1992) 中揭示之 PAM250 對數似然矩陣中具有正值之任何變化。"中度保守"置換為在 PAM250 對數似然矩陣中具有非負值之任何變化。

在特定實施例中，抗 ALK-1 抗體或其抗原結合部分之胺基酸取代為彼等：(1) 降低對蛋白質水解之敏感性；(2) 降低對氧化作用之敏感性；(3) 改變對形成蛋白質錯合物之結合親和力；且 (4) 賦予或改變該等類似物之其他物理化學或功能特性，但仍保持特異性結合至 ALK-1 者。類似物可包



括對正常產生之肽序列之各種取代。例如，在正常產生之序列中，例如在結構域外形成分子間接觸之多肽部分中可進行單一或多種胺基酸取代，較佳為保守胺基酸取代。亦可在形成可改良多肽活性之分子間接觸之結構域中進行胺基酸取代。保守胺基酸取代應大體上不改變母序列之結構特徵，例如置換胺基酸應不改變組成在母序列中發生之免疫球蛋白結合結構域的抗平行 β 折疊，或破壞作為母序列特徵之其他類型二級結構。一般而言，甘胺酸及脯胺酸不用於抗平行 β 折疊中。技術辨識之多肽二級及三級結構之實例係描述於以引用的方式併入本文之 **Proteins, Structures and Molecular Principles**(Creighton編，W. H. Freeman and Company, New York (1984))；**Introduction to Protein Structure**(C. Branden 及 J. Tooze 編，Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))及 Thornton 等人之 *Nature* 354:105 (1991)中。

亦稱作序列一致性之多肽序列類似性一般使用序列分析軟體來量測。蛋白質分析軟體使用不同取代、缺失及其他修飾(包括保守胺基酸取代)指定之類似性量測而與類似序列相匹配。例如，GCG含有諸如"Gap"及"Bestfit"之程式，其可以預設參數使用來判定緊密相關多肽(諸如來自不同生物體物種之同源多肽)之間或野生型蛋白質與其突變蛋白質之間的序列同源性或序列一致性。參見例如GCG 6.1版。亦可使用FASTA來比較多肽序列，該FASTA使用預設或推薦參數，其為GCG 6.1版中之程式。FASTA(例如

FASTA2及FASTA3)為查詢與搜尋序列之間的最佳重疊區提供對準及序列一致性百分比(Pearson, *Methods Enzymol.* **183**:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* **132**:185-219 (2000))。當將本發明之序列與含有大量來自不同生物體之序列的資料庫比較時，另一種較佳演算法為使用預設參數之電腦程式BLAST，尤其為blastp或tblastn。參見例如以引用的方式併入本文之Altschul等人，*J. Mol. Biol.* **215**:403-410 (1990)；Altschul等人，*Nucleic Acids Res* **25**:3389-402 (1997)。

與同源物相比，多肽序列之長度通常至少為約16個胺基酸殘基，通常至少為約20個殘基，更通常至少為約24個殘基，一般至少為約28個殘基且較佳大於約35個殘基。當搜尋含有來自大量不同生物體之序列的資料庫時，較佳為比較胺基酸序列。如本文所使用之"類似物"係指包含至少25個胺基酸之區段的多肽，該區段與推論之天然產生之胺基酸序列部分具有大體一致性且其具有天然產生之多肽之特性中的至少一種。多肽類似物一般包含關於天然產生之序列的保守胺基酸取代(或添加或缺失)。類似物一般為至少20個胺基酸長，較佳為至少50個胺基酸長或更長且通常可與全長天然產生之多肽一樣長。

如具有類似於彼等模板肽之特性之非肽藥物，肽類似物通常用於醫藥工業中。將該等類型之非肽化合物命名為"肽模擬物"。Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* **15**:29 (1986)；Veber and Freidinger *TINS* 第392頁(1985)；及Evans等人

J. Med. Chem. 30:1229 (1987)，其以引用的方式併入本文。通常借助於電腦化分子模型化來研發該等化合物。

結構上類似於治療上有用之肽的肽模擬物可用以產生等效治療或預防效應。一般而言，肽模擬物結構上類似於範例多肽(意即，具有生化特性或藥理活性之多肽)，諸如人類抗體，但具有視情況藉由此項技術中所熟知之方法以選自由以下各物組成之群之鍵置換的一或多個肽鍵：
 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (順及反)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 及 $\text{CH}_2\text{SO}-$ 。以相同類型之D胺基酸系統性取代一致序列之一或多種胺基酸(例如，以D離胺酸取代L離胺酸)可用以產生更穩定之肽。此外，包含一致序列或大體上相同之一致序列變化之限制性肽可藉由此項技術中已知之方法而產生(Rizo及Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)，其以引用的方式併入本文)；例如藉由添加可形成環化肽之分子內二硫化物橋之內部半胱胺酸殘基。

完整"抗體"或"免疫球蛋白"(Ig)包含以雙硫鍵互連之至少兩個重(H)鏈(約50-70 kDa)及兩個輕(L)鏈(約25 kDa)。僅存在兩種類型之輕鏈： λ 及 κ 。在人類中，其為類似的，但在每一抗體僅存在一種類型。重鏈分為 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，且其將抗體之同型分別定義為IgM、IgD、IgG、IgA及IgE。通常參見 **Fundamental Immunology** 第7章(Paul, W. 編，第2版Raven Press, N.Y. (1989))(其全文為所有目的以引用的方式併入)。在一較佳實施例中，抗體為IgG及

IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型。在一更佳實施例中，抗ALK-1抗體為IgG2亞類。

每一重鏈包含重鏈可變結構域(V_H)及重鏈恆定區(C_H)。重鏈恆定區包含三個結構域， $CH1$ 、 $CH2$ 及 $CH3$ 。每一輕鏈包含輕鏈可變結構域(V_L)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個結構域 C_L 。在輕鏈及重鏈中，可變及恆定區由約12個或更多個胺基酸之"J"區接合，其中重鏈亦包括約3個或更多個胺基酸之"D"區。 V_H 及 V_L 區可進一步再分為稱為"互補判定區"(CDR)之超可變區，其中散佈有稱為"構架區"(FR)之更保守區。每一 V_H 及 V_L 均包含以以下順序自胺基末端至羧基末端排列之三個CDR及四個FR： $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$ 。胺基酸在各結構域中之分配係根據Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987及1991))或Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* **196**:901-917 (1987)；Chothia等人，*Nature* **342**:878-883 (1989)中之定義。

每一重/輕鏈對(V_H 及 V_L)之可變結構域形成與抗原相互作用之抗體結合位點。因此，例如完整IgG抗體具有兩個結合位點。除在雙功能或雙特異性抗體中之外，該兩個結合位點為相同的。抗體恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，該等宿主組織或因子包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典互補系統之第一組份($C1q$)。

抗體必須具有足夠之抗原結合多樣性以辨識每一可能之



病原體(多個V區)，而同時保持其C區(少數C區)之生物有效性。將來自基因區段之Ig基因隨機接合在一起，此使得多個V區與數個C區一起使用。發現編碼Ig H、 κ 及 λ 鏈之基因區段位於三種不同之染色體上。在B細胞發育期間，重組酶將內含子及某些外顯子自DNA移除且將區段接合為功能Ig基因中。

將哺乳動物之Ig基因區段排列為以下各組："可變"(V)、"多樣性"(D)、"接合"(J)及"恆定"(C)外顯子。V κ 區段各自編碼 κ 鏈V區之前兩個CDR及三個FR加CDR3之數個殘基。J κ 區段各自編碼CDR3之剩餘物及第四FR。C κ 編碼 κ 輕鏈之整個C區。編碼人類 κ 鏈之DNA包括大約40個功能性V κ 區段、五個J κ 區段及一個C κ 基因區段，以及含有終止密碼子之某些基因區段("假基因")。人類 λ 鏈DNA含有大約30個功能V λ 區段及J λ 與C λ 區段之四個功能組。與均與相同C κ 配對之J κ 不同，特定J λ 總是與其對應C λ 配對。人類H鏈之DNA包括大約50個功能V_H區段、30個D_H區段及六個J_H區段。重鏈可變結構域之前兩個CDR及三個FR由V_H來編碼。CDR3由V_H、所有D_H及部分J_H之數個核苷酸來編碼，而FR4係由J_H基因區段之剩餘物來編碼。在每一同型之每一重鏈結構域及膜區之DNA中，亦存在個別基因區段，其係以其由B細胞表現之順序排列。

術語"多肽"涵蓋蛋白質序列之原生或人造蛋白質、蛋白質片段及多肽類似物。多肽可為單體或聚合體。

術語"經分離蛋白質"、"經分離多肽"或"經分離抗體"根

據其來源或衍生源為(1)與以其原生態伴隨其之天然相關組份無關，(2)不含來自相同物種之其他蛋白質，(3)由來自不同物種之細胞表現，或(4)本身不產生之蛋白質、多肽或抗體。因此，經化學合成或在與天然產生細胞之細胞不同之細胞系統中合成的多肽將自其天然相關組份"分離"。使用此項技術中所熟知之蛋白質純化技術，亦可藉由分離使蛋白質大體上不含天然相關組份。

經分離抗體之實例包括(但不限於)使用 ALK-1 親和性純化之抗 ALK-1 抗體及藉由細胞株於活體外合成之抗 ALK-1 抗體。

當至少約 60 至 75% 之樣本展現單一物種之多肽時，蛋白質或多肽為"大體上純的"、"大體上均質的"或"大體上經純化的"。多肽或蛋白質可為單體或多聚體。大體上純的多肽或蛋白質一般可包含約 50%、60%、70%、80% 或 90% w/w 之蛋白質樣本，更通常約 95% 且較佳可高於 99% 純。蛋白質純度或均質性可藉由此項技術中所熟知之多種方式來說明，諸如對蛋白質樣本進行聚丙稀醯胺凝膠電泳，繼而基於以此項技術中所熟知之染色劑將該凝膠染色來目測單一多肽帶。對於特定目的而言，可藉由使用 HPLC 或純化技術中所熟知之其他方式來提供更高之離析率。

如本文所使用之術語"多肽片段"係指具有胺基末端及/或羧基末端缺失之多肽，但其中剩餘胺基酸序列與天然產生之序列中之對應位置一致。在某些實施例中，片段至少為 5、6、8 或 10 個胺基酸長。在其他實施例中，片段為至少



14、至少 20、至少 50 或至少 70、80、90、100、150 或 200 個胺基酸長。

如本文所使用之術語"類似物"或"多肽類似物"係指包含與某些參考胺基酸序列具有大體一致性且與參考胺基酸序列具有大體相同功能或活性之區段的多肽。多肽類似物一般包含關於參考序列之保守胺基酸取代(或插入或缺失)。類似物可為至少 20 或 25 個胺基酸長，或可為至少 50、60、70、80、90、100、150 或 200 個胺基酸長或更長，且通常可與全長多肽一樣長。本發明之某些實施例包括來自生殖系胺基酸序列之具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 個取代之多肽片段或多肽類似物抗體。根據本說明書之教示，彼等一般熟習此項技術者可易於製備抗體或免疫球蛋白分子之片段或類似物。

如本文所使用之術語抗體之"抗原結合部分"(或簡言之"抗體部分")係指保持特異性結合至抗原(例如 ALK-1 或 ALK-1 之 ECD)之能力之抗體之一或多個片段。已展示抗體之抗原結合功能可藉由全長抗體片段來進行。術語抗體之"抗原結合部分"所涵蓋之結合片段的實例包括(i)Fab 片段，由 V_L 、 V_H 、 C_L 及 C_{H1} 結構域組成之單價片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，於鉸鏈區包含兩個由雙硫橋連接之 Fab 片段的二價片段；(iii)由 V_H 及 C_{H1} 結構域組成之 Fd 片段；(iv)由抗體單臂之 V_L 及 V_H 結構域組成之 Fv 片段；(v)dAb 片段(Ward 等人，(1989). Nature 341:544-546)，其由 V_H 結構域組成；及(vi)經分離互補判定區(CDR)。此外，儘管 Fv 片

段之兩個結構域 V_L 及 V_H 係以分離基因編碼，但可使用重組方法藉由合成連接子將其接合，該合成連接子可使 V_L 及 V_H 製造成單一蛋白質鏈， V_L 及 V_H 區於其中配對以形成單價分子（稱為單鏈 Fv(scFv)）；參見例如 Bird 等人 *Science* 242:423-426 (1988) 及 Huston 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之"抗原結合部分"中。亦涵蓋其他形式之單鏈抗體，諸如雙功能抗體。雙功能抗體為二價、雙特異性抗體，其中 V_H 及 V_L 結構域係於單一多肽鏈上表現，但使用一連接子，其太短而不容許相同鏈上之兩個結構域之間配對，藉此迫使該等結構域與另一鏈之互補結構域配對且產生兩個抗原結合位點（參見例如 Holliger 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)；Poljak 等人 *Structure* 2:1121-1123 (1994)）。

此外，抗體或其抗原結合部分可為藉由將抗體或抗體部分與一或多種其他蛋白質或肽進行共價或非共價結合所形成之較大免疫黏附分子之部分。該等免疫黏附分子之實例包括使用抗生蛋白鏈菌素核心區以產生四聚體 scFv 分子 (Kipriyanov 等人 *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 (1995)) 及使用半胱胺酸殘基、標記肽及 C 末端多聚組胺酸標記以產生二價及生物素標記 scFv 分子 (Kipriyanov 等人 *Mol. Immunol.* 31:1047-1058 (1994))。其他實例包括其中將來自抗體之一或多個 CDR 經共價或非共價併入分子中，以使其成為特異性結合至諸如 ALK-1 或 ALK-1 之 ECD



之所關注抗原的免疫黏附素。在該等實施例中，CDR可作為較大多肽鏈之部分併入，可共價連接至另一多肽鏈或可非共價併入。

諸如Fab及F(ab')₂片段之抗體部分可使用習知技術由完全抗體來製備，諸如分別為完全抗體之木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化作用。此外，抗體、抗體部分及免疫黏附分子可使用如本文所述之標準重組DNA技術而獲得。

如本文所使用之術語"人類抗體"意謂其中可變及恆定結構域序列為人類序列之任何抗體。該術語涵蓋具有衍生自人類基因之序列的抗體，但該等抗體已經改變，例如以降低可能之免疫原性，增加親和力、消除可引起不良折疊之半胱胺酸等。該術語亦涵蓋在非人類細胞中重組產生之該等抗體，其可提供非人類細胞特徵之糖基化作用。該等抗體可由如下文所述之多種方式來製備。

如本文所使用之術語"中和抗體"、"抑制性抗體"或拮抗劑抗體意謂抑制ALK-1/TGF- β -1/Smad1信號傳輸路徑之抗體。在一較佳實施例中，該抗體抑制至少約20%、較佳40%、更佳60%、甚至更佳80%或甚至更佳85%之ALK-1/TGF- β -1/Smad1信號傳輸路徑。人類抗ALK-1抗體之中和或抑制潛力例如可藉由其抑制ALK-1之特異性下游靶基因Id1之上調(如實例12所呈現)，抑制藉由使用來自LI-COR Biosciences之Odyssey紅外成像系統以西方墨點法判定之Smad1磷酸化作用(如實例13所呈現)的能力來判定。

如本文所使用之術語"嵌合抗體"意謂包含來自兩個或兩

個以上不同抗體之區域的抗體。例如，嵌合抗體之一或多個CDR可衍生自人類抗ALK-1抗體。在另一實例中，所有CDR可衍生自人類抗ALK-1抗體。在另一實例中，來自一種以上人類抗ALK-1抗體之CDR可於嵌合抗體中組合。例如，嵌合抗體可包含來自第一人類抗ALK-1抗體輕鏈之CDR1，來自第二人類抗ALK-1抗體輕鏈之CDR2及來自第三人類抗ALK-1抗體輕鏈之CDR3，且來自重鏈之CDR可衍生自一或多種其他抗ALK-1抗體。此外，構架區可衍生自一或多個CDR自其獲得之抗ALK-1抗體中之一種或衍生自一或多種不同之人類抗體。此外，如本文先前所述，嵌合抗體包括包含衍生自一種以上物種之生殖系序列之部分的抗體。

在某些實施例中，本發明之嵌合抗體為人化抗ALK-1抗體。本發明之人化抗ALK-1抗體包含一或多個構架區之胺基酸序列及/或來自本發明之一或多種人類抗ALK-1抗體恆定區之至少一部分的胺基酸序列，且另外包含衍生自非人類抗ALK-1抗體之序列，例如CDR序列。

如本文所使用之術語"ELISA"係指酶聯結免疫吸附劑檢定法。該檢定法為熟習此項技術者所熟知。該檢定法之實例可於Vaughan, T.J.等人，*Nature Biotech.* 14:309-314 (1996)中，以及本申請案之實例2中發現。

如本文所使用之術語"表面電漿共振"係指使得可藉由例如使用BIACORE™系統偵測生物感應器矩陣中之蛋白質濃度改變對實時生物特異性相互作用進行分析之光學現象

(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)。對於進一步之描述，參見Jonsson等人，*Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 (1993)；Jonsson等人，*Biotechniques* 11:620-627 (1991)；Jonsson等人，*J. Mol. Recognit.* 8:125-131 (1995)；及Jonsson等人，*Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991)。

術語"親和力"係指對抗原與抗體之間之吸引力的量測。抗體對抗原之固有吸引力一般係以特定抗體-抗原相互作用之結合親和力平衡常數(K_D)來表現。當 $K_D \leq 1$ mM，較佳 ≤ 100 nM時，認為抗體特異性結合抗原。 K_D 結合親和力常數可藉由表面電漿共振來量測，例如使用如實例7及8中所述之BIAcore™系統。

術語" k_{off} "係指特定抗體-抗原相互作用之解離速率常數。 k_{off} 解離速率常數可藉由表面電漿共振來量測，例如使用如實例7及8中所述之BIAcore系統。

術語"親和力"係指基於抗體親和力及價數之抗體與其抗原之功能組合強度。如本文所使用之該術語描述由於免疫球蛋白上之多個抗原結合位點而發生之增加的親和力。

如本文所使用之術語"分子選擇性"係指抗體對特異性抗原之結合親和力大於對其他抗原之結合親和力。例如，本發明之抗體對ALK-1之選擇性優於對ALK-2至ALK-7之選擇性，意謂該抗體對ALK-1之結合親和力至少比對ALK-2至ALK-7之結合親和力大2倍，例如4倍或10倍或50倍或100倍或更大。該等結合親和力可使用熟習此項技術者已

知之標準技術來量測。

術語"抗原決定基"包括可特異性結合至免疫球蛋白或T細胞受體，或否則與分子相互作用之任何蛋白質決定子。抗原決定子通常由諸如胺基酸或碳水化合物或糖側鏈之分子的化學活性表面分組所組成，且通常具有特定三維結構特徵以及特定電荷特徵。抗原決定基可為"線性"或"構形"。在線性抗原決定基中，蛋白質與相互作用分子(諸如抗體)之間之所有相互作用點沿蛋白質之一級胺基酸序列線性產生。在構形抗原決定基中，相互作用點橫穿彼此分離之蛋白質之胺基酸殘基而產生。一旦判定抗原所要之抗原決定基，即可能例如使用本發明所述之技術產生彼抗原決定基之抗體。或者，在發現過程期間，抗體之產生及表徵可說明關於所要抗原決定基之資訊。隨後可能由該資訊競爭性地篩檢結合至相同抗原決定基之抗體。達成此目的之一種方法為進行交叉競爭研究以發現彼此競爭性結合之抗體，意即競爭結合至抗原之抗體。基於其交叉競爭之"重新分級"抗體之高產出方法係描述於國際專利申請案第WO 03/48731號中。

如本文所使用之術語"重新分級"係指一種基於抗體之抗原結合特徵將抗體分組之方法。視對於所有測試抗體而言所觀測之結合圖案的不同程度而定，組之分配在某種程度上而言係任意的。因此，組不總與藉由其他方法所判定之抗原決定基相關，且不應用以定義抗原決定基。

如本文關於抗體所使用之術語"競爭"意謂第一抗體或其

抗原結合部分與第二抗體或其抗原結合部分競爭結合至抗原，其中與第一抗體在不存在第二抗體時之結合相比，在第二抗體存在下，第一抗體與其同源抗原決定基之可偵測性結合降低。可發生在第一抗體存在下，第二抗體與其抗原決定基之可偵測性結合亦降低之替代情況，但此並非必需。即，第一抗體可抑制第二抗體結合至其抗原決定基，而第二抗體不抑制第一抗體結合至其個別抗原決定基。然而，當各抗體無論以相同、更大或更小之程度可偵測性地抑制其他抗體與其同源抗原決定基或配位體之結合時，均認為該等抗體彼此"交叉競爭"結合其個別之(多個)抗原決定基。本發明涵蓋競爭及交叉競爭抗體兩者。無論此競爭或交叉競爭發生之機制為何(例如位阻、構形改變或結合至共同抗原決定基或其部分及其類似者)，基於本文所提供之教示，熟習此項技術者均將瞭解涵蓋此競爭及/或交叉競爭抗體且其可適用於本文所揭示之方法。

如本文所提及之術語"聚核苷酸"意謂長度為至少10個鹼基之核苷酸的聚合形式，其為核糖核苷酸或脫氧核苷酸或任一類型核苷酸之修飾形式。該術語包括單鏈及雙鏈形式。

如本文所使用之術語"經分離聚核苷酸"意謂來自染色體、cDNA或合成來源之聚核苷酸或其組合，根據其來源，"經分離聚核苷酸"(1)並非與在自然界中發現之"經分離聚核苷酸"所具有之所有或部分聚核苷酸均相關(2)可操作性地連接至其本身未連接之聚核苷酸，或(3)本身並不作

為較大序列之部分出現。

如本文所使用之術語"天然產生之核苷酸"包括脫氧核糖核苷酸及核糖核苷酸。如本文所使用之術語"經修飾核苷酸"包括具有經修飾或取代糖基及其類似物之核苷酸。本文所提及之術語"寡核苷酸鍵"包括諸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、磷醯胺酸酯及其類似物之寡核苷酸鍵。參見例如 LaPlanche 等人, *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein 等人, *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon 等人, *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon 等人, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, 第 87-108 頁 (F. Eckstein 編, Oxford University Press, Oxford England (1991)); 美國專利第 5,151,510 號; Uhlmann 及 Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990), 其揭示內容均以引用的方式併入本文。若需要, 寡核苷酸可包括偵測標記。

"可操作性連接"序列包括與所關注之基因鄰近之表現控制序列, 及以反式或以一定距離作用以控制所關注基因之表現控制序列。

如本文所使用之術語"表現控制序列"意謂需要用以影響其所接合至之編碼序列之表現及加工的聚核苷酸序列。表現控制序列包括合適之轉錄起始、終止、啟動子及強化子序列; 有效 RNA 加工信號(諸如剪接及多聚腺嘌呤信號);

穩定細胞質 mRNA 之序列；增強轉譯效率之序列(意即，Kozak 一致序列)；增強蛋白質穩定性之序列；及當需要時，增強蛋白質分泌之序列。該等控制序列之性質視宿主生物體而不同；在原核生物中，該等控制序列通常包括啟動子、核糖體結合位點及轉錄終止序列；在真核生物中，該等控制序列通常包括啟動子及轉錄終止序列。術語"控制序列"意欲至少包括其存在為表現及加工所必需之所有組份，且亦可包括其存在為有利之額外組份，例如前導序列及融合搭配物序列。

如本文所使用之術語"載體"意謂一種核酸分子，其可轉運與其連接之另一種核酸。在某些實施例中，該載體為質體，意即額外 DNA 區段可於其中接合之 DNA 環狀雙鏈片段。在某些實施例中，該載體為病毒載體，其中額外 DNA 區段可接合至該病毒基因組中。在某些實施例中，該等載體可於引入其之宿主細胞中自主複製(例如，具有細菌複製來源之細菌載體及游離基因型哺乳動物載體)。在其他實施例中，該等載體(例如，非游離基因型哺乳動物載體)可於引入宿主細胞時整合為宿主細胞之基因組，且藉此與宿主基因組一起複製。此外，特定載體可引導表現其可操作性連接之基因。該等載體於本文中稱作"重組表現載體"(或簡稱為"表現載體")。

如本文所使用之術語"重組宿主細胞"(或簡稱為"宿主細胞")意謂其中已引入重組表現載體之細胞。應瞭解，"重組宿主細胞"及"宿主細胞"不僅意謂某些主體細胞，亦意謂

該細胞之子代。因為在後代中由於突變或環境影響可發生某些改質，所以事實上此子代可與母細胞不同，但仍包括於如本文所使用之術語"宿主細胞"的範疇內。

如本文所使用之術語"生殖系"係指當抗體基因及基因區段經由生殖細胞由雙親傳遞至後代時之其核苷酸序列及胺基酸序列。該生殖系序列與在成熟B細胞中編碼抗體之核苷酸序列不同，該等抗體已在B細胞成熟過程中藉由重組及超突變作用而改變。"利用"特定生殖系之抗體具有與彼生殖系核苷酸序列或與其所指定之胺基酸序列最密切對準之核苷酸或胺基酸序列。與生殖系序列相比，該等抗體常為經突變的。

在上下文中，術語核酸序列之"序列一致性百分比"意謂當以最大對應性對準時，兩序列中相同之殘基。序列一致性比較之長度可超過至少約九個核苷酸，通常至少約18個核苷酸，更通常至少約24個核苷酸，一般至少約28個核苷酸，更一般至少約32個核苷酸且較佳至少約36、48或更多個核苷酸之拉伸長度。此項技術中已知多種可用以量測核苷酸序列一致性之不同演算法。例如，可使用FASTA、Gap或Bestfit來比較聚核苷酸序列，FASTA、Gap或Bestfit為Genetics Computer Group(GCG)，Madison，Wisconsin之Wisconsin Package 10.0版本中之程式。包括例如程式FASTA2及FASTA3之FASTA為查詢與搜尋序列之間的最佳重疊區提供對準及序列一致性百分比(Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990)；Pearson, *Methods Mol. Biol.*

132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); 其以引用的方式併入本文)。除非另外指出，否則使用特定程式或演算法之預設參數。例如，如以引用的方式併入本文之GCG 6.1版本中所提供，可使用具有其預設參數(字長為6及計分矩陣之NOPAM因子)之FASTA或使用具有其預設參數之Gap來判定核酸序列之間的序列一致性百分比。

除非另外指出，否則核苷酸序列之參考涵蓋其互補序列。因此，應瞭解具有特定序列之核酸的參考涵蓋其互補鏈及其互補序列。

當提及核酸或其片段時，術語"大體類似性"或"大體序列類似性"意謂當合適核苷酸插入或缺失與另一核酸(或其互補鏈)最佳對準時，如諸如上述FASTA、BLAST或Gap之序列一致性的任何熟知演算法所量測，在至少約85%，較佳至少約90%，且更佳至少約95%、96%、97%、98%或99%之核苷酸鹼基中存在核苷酸序列一致性。

在上下文中，術語胺基酸序列之"序列一致性百分比"意謂當以最大對應性對準時，兩序列中相同之殘基。序列一致性比較之長度可超過至少約五個胺基酸，通常至少約20個胺基酸，更通常至少約30個胺基酸，一般至少約50個胺基酸，更一般至少約100個胺基酸且甚至更一般約150、200或更多個胺基酸之拉伸長度。此項技術中已知多種可用以量測胺基酸序列一致性之不同演算法。例如，可使用FASTA、Gap或Bestfit來比較胺基酸序列，FASTA、Gap或

Bestfit 為 Genetics Computer Group(GCG) , Madison , Wisconsin之 Wisconsin Package 10.0版本中之程式。

如應用於多肽之術語"大體一致性"或"大體類似性"意謂，當諸如藉由使用如由程式GAP或BESTFIT提供之預設間隙重量之該等程式得以最佳對準時，兩個胺基酸序列共有至少70%、75%或80%之序列一致性，較佳為至少90%或95%之序列一致性且更佳為至少97%、98%或99%之序列一致性。在特定實施例中，不一致之殘基位置因保守胺基酸取代而不同。

亦稱作信號肽、導肽之術語"信號序列"係指使蛋白質分泌(穿過細胞膜)之蛋白質N末端之約15至30個胺基酸的區段。信號序列隨著蛋白質之分泌而移除。

如本文所使用之術語"標記"或"經標記"係指於抗體中併入另一分子。在一實施例中，該標記為可偵測標記，例如併入經放射性標記之胺基酸或黏附至可由經標記抗生物素蛋白(例如，含有可由光學或比色法偵測之螢光標記或酶活性之抗生蛋白鏈菌素)偵測之生物素基部分之多肽。在另一實施例中，標記可為治療性的，例如藥物共軛物或毒素。此項技術中已知且可使用各種用於標記多肽及糖蛋白之方法。多肽標記之實例包括(但不限於)以下：放射性同位素或放射性核素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)；螢光標記(例如FITC、若丹明、鐳系螢光體)；酶標記(例如辣根過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶)；化學發光標記；生物素基組；由

二次報導體辨識之預定多肽抗原決定基(例如白胺酸拉鏈對序列、二次抗體之結合位點、金屬結合結構域、抗原決定基標記)；磁性劑，諸如釷螯合劑；毒素，諸如百日咳毒素；紫杉酚；細胞遲緩素B；短桿菌素D；溴化乙錠；吐根素；絲裂黴素；依託泊苷(etoposide)；特諾波賽(tenoposide)；長春新鹼(vincristine)；長春鹼(vinblastine)；秋水仙鹼(colchicine)；阿黴素；道諾黴素(daunorubicin)；二羥基炭疽菌素二酮；米托蒽醌(mitoxantrone)；光輝黴素(mithramycin)；放線黴素(actinomycin)D；1-去氫鞣酮；糖皮質激素；普魯卡因(procaine)；丁卡因(tetracaine)；利多卡因(lidocaine)；普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素(puromycin)及其類似物或同系物。在某些實施例中，可藉由不同長度之間隔臂來黏附標記以降低可能之位阻。

術語"靈長類動物"係指靈長目之哺乳動物，其包括類人猿及原猴類，其特徵為手足進一步進化、口鼻縮短及腦部較大。哺乳動物目之靈長類動物包括人類、猿類、猴類及原猴類或較低級之靈長類動物。

"治療有效量"係指所投與之將一定程度上減輕所治療病症之一或多種症狀之治療劑的量。關於癌症之治療，治療有效量係指具有以下效應之至少一種之量：減小腫瘤尺寸；抑制(即在一定程度上減緩，較佳為停止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制(即在一定程度上減緩，較佳為停止)腫瘤生長且在一定程度上緩解(或較佳為消除)與癌症相關聯

之一或多種症狀。

"治療"係指一種緩解或消除生物學病症及/或其伴隨症狀的方法。關於癌症，簡言之該術語意謂將增加感染癌症之個體的預期壽命或將降低該疾病之一或多種症狀。

"接觸"係指以抗體可影響 ALK-1 之生物活性的方式使本發明之抗體及其抗原結合部分與靶 ALK-1 或其抗原決定基聚集在一起。此"接觸"可於"活體外"完成，意即於試管、皮氏培養皿或其類似物中。在試管中，接觸可僅包括抗體或其抗原結合部分及 ALK-1 或其抗原決定基或其可包括完全細胞。亦可使細胞於細胞培養皿中保持或生長且於彼環境中與抗體或其抗原結合部分相接觸。在此情形下，特定抗體或其抗原結合部分影響 ALK-1 相關病症之能力，意即抗體之 IC_{50} 可於試圖在更複雜之活有機體活體內使用抗體之前判定。對於有機體外之細胞而言，存在多種使 ALK-1 與抗體或其抗原結合部分接觸之方法且其為熟習此項技術者所熟知。

首字母縮寫詞"FACS"係指螢光活化細胞分揀法。首字母縮寫詞FACS及流式細胞儀可互換使用。螢光標記使得可對細胞結構及功能進行研究。最廣泛使用之應用，免疫螢光法包括以與諸如螢光素及藻紅素之螢光染料共軛之抗體對細胞進行染色。該方法通常用以標記細胞表面上之分子，但抗體可指向細胞質中之標靶。在直接免疫螢光法中，分子之抗體與螢光染料直接共軛且細胞係於一個步驟內進行染色。在間接免疫螢光法中，不標記一級抗體且添



加對第一抗體具有特異性之第二螢光共軛抗體。

抗 ALK-1 抗體

本發明係關於結合至靈長類動物 ALK-1，較佳為靈長類動物 ALK-1 之 ECD，更佳為人類 ALK-1 之 ECD 的經分離中和抗 ALK-1 單株抗體或其抗原結合部分。在一較佳實施例中，本發明係關於經分離中和抗體，即完全人類單株抗體或其抗原結合部分。人類抗體較佳為對 ALK-1 比對 ALK-2 至 ALK-7 具有更高親和力之重組人類抗 ALK-1 抗體。在某些實施例中，人類抗 ALK-1 抗體係藉由對例如齧齒動物之非人類轉殖基因動物進行免疫而產生，該非人類轉殖基因動物之基因組包含人類免疫球蛋白基因，以使得轉殖基因動物可產生人類抗體。本發明之不同態樣係關於該等抗體及抗原結合部分，及其醫藥組合物，以及用於製造該等抗體及抗原結合部分之核酸、重組表現載體及宿主細胞。於活體外或活體內使用本發明之抗體及抗原結合部分以消除 ALK-1/TGF- β -1/Smad1 信號傳輸路徑或偵測 ALK-1 之方法亦涵蓋於本發明中。

本發明之抗 ALK-1 抗體可包含人類 κ 或人類 λ 輕鏈或自其衍生之胺基酸序列。在某些包含 κ 輕鏈之實施例中，輕鏈可變結構域 (V_L) 利用人類 A27、A2、A1、A3、B3、B2、L1 或 L2 V_κ 基因。在某些實施例中，輕鏈利用人類 V_κ L1 基因及人類 J_κ 4 基因；人類 V_κ A27 基因及人類 J_κ 5 基因或人類 J_κ 4 基因；人類 V_κ B3 基因及人類 J_κ 1 基因；人類 V_κ L2 基因及人類 J_κ 3 基因；人類 V_κ A2 基因及人類 J_κ 1 基因；人類 V_κ

A3基因及人類J_κ 4基因；人類V_κ A1基因及人類J_κ 1基因；人類V_κ B2基因及人類J_κ 4基因；或人類V_κ A2基因及人類J_κ 1基因。

在某些實施例中，抗ALK-1抗體之V_L包含與生殖系V_κ胺基酸序列相關之一或多種胺基酸取代、缺失或插入(添加)。在某些實施例中，抗ALK-1抗體之V_L包含與生殖系V_κ胺基酸序列相關之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個胺基酸取代。在某些實施例中，來自生殖系之一或多種取代係在輕鏈之CDR區中。在某些實施例中，如例如圖7所示，與生殖系相關之V_κ胺基酸取代係位於與本文所提供之抗體之任一或多個V_L中發現之生殖系相關之取代相同之一或多個位置處。在某些實施例中，胺基酸改變係位於一或多個相同位置處，但包括與參考抗體不同之取代。

在某些實施例中，與生殖系相關之胺基酸取代發生於與來自抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1之任何V_L中之生殖系的取代相同之一或多個位置處，但在相對於參考抗體中胺基酸之該(等)位置處，該等取代可代表保守胺基酸取代。例如，若該等抗體之一中之特定位置相對於生殖系改變，且為麩胺酸，則可於彼位置取代天冬胺酸。類似地，若例示性抗體中與生殖系相比之

胺基酸取代為絲胺酸，則可於彼位置以蘇胺酸保守性取代絲胺酸。保守性胺基酸取代係於上文中描述。

在某些實施例中，抗ALK-1抗體包含SEQ ID NO：4之輕鏈胺基酸序列。在其他實施例中，輕鏈包含抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1之輕鏈胺基酸序列。

在某些實施例中，人類抗ALK-1抗體之輕鏈包含以下抗體之V_L胺基酸序列：1.12.1(SEQ ID NO：8)、1.11.1(SEQ ID NO：12)、1.13.1(SEQ ID NO：16)、1.14.1(SEQ ID NO：20)、1.151.1(SEQ ID NO：24)、1.162.1(SEQ ID NO：28)、1.183.1(SEQ ID NO：32)、1.8.1(SEQ ID NO：36)、1.9.1(SEQ ID NO：40)、4.10.1(SEQ ID NO：44)、4.24.1(SEQ ID NO：48)、4.38.1(SEQ ID NO：52)、4.58.1(SEQ ID NO：56)、4.62.1(SEQ ID NO：60)、4.68.1(SEQ ID NO：64)、4.72.1(SEQ ID NO：68)、5.13.1(SEQ ID NO：72)、5.34.1(SEQ ID NO：76)、5.53.1(SEQ ID NO：80)、5.56.1(SEQ ID NO：84)、5.57.1(SEQ ID NO：88)或5.59.1(SEQ ID NO：92)；或該胺基酸序列具有高達1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個保守胺基酸取代及/或總計高達3個

非保守胺基酸取代。在其他實施例中，人類抗ALK-1抗體之輕鏈包含抗體1.27.1、1.29.1或1.31.1之V_L胺基酸序列。在某些實施例中，輕鏈包含自前述抗體中任一者之CDR1起點至CDR3終點之胺基酸序列。

在某些實施例中，輕鏈可包含分別獨立選自兩個或兩個以上單株抗體之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3區之CDR1、CDR2及CDR3區的胺基酸序列，該等單株抗體係選自1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1；或該等CDR區各自具有小於3或小於2個保守胺基酸取代及/或總計三個或更少之非保守胺基酸取代。

在特定實施例中，抗ALK-1抗體之輕鏈包含選自1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1之抗體之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3區的胺基酸序列，或該等CDR區各自具有小於3或小於2個保守胺基酸取代及/或總計三個或更少之非保守胺基酸取代。

關於重鏈，在某些實施例中，可變結構域(V_H)利用人類

V_H 4-31、V_H 3-11、V_H 3-15、V_H 3-33、V_H 4-61或V_H 4-59基因。在某些實施例中，抗ALK-1抗體之V_H序列含有與生殖系V_H胺基酸序列相關之一或多種胺基酸取代、缺失或插入(添加)，統稱為"突變"。在某些實施例中，重鏈之可變結構域包含生殖系V_H胺基酸序列之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11個突變。在某些實施例中，突變與生殖系胺基酸序列相比為非保守取代。在某些實施例中，突變係在重鏈之CDR區中。在某些實施例中，重鏈利用人類V_H 3-33基因、人類D 6-19基因及人類J_H 3B基因；人類V_H 4-31基因、人類D 6-19基因及人類J_H 4B基因；人類V_H 4-61基因、人類D 6-19基因及人類J_H 4B基因；人類V_H 4-31基因、人類D 3-3基因及人類J_H 3B基因；人類V_H 4-31基因及人類J_H 3B基因；人類V_H 4-59基因、人類D 6-19基因及人類J_H 4B基因；人類V_H 3-11基因、人類D 3-22基因及人類J_H 6B基因；人類V_H 3-15基因、人類D 3-22基因及人類J_H 4B基因；人類V_H 4-31基因、人類D 5-12基因及人類J_H 6B基因；人類V_H 4-31基因、人類D 4-23基因及人類J_H 4B基因；人類V_H 4-31基因、人類D 2-2基因及人類J_H 5B基因；人類V_H 4-31基因及人類J_H 6B基因；人類V_H 3-15基因、人類D 1-1基因及人類J_H 4B基因；人類V_H 3-11基因、人類D 6-19基因及人類J_H 6B基因；人類V_H 3-11基因、人類D 3-10基因及人類J_H 6B基因；或人類V_H 3-11基因、人類D 6-6基因及人類J_H 6B基因。

在某些實施例中，胺基酸取代係位於與抗體1.11.1、

1.12.1 、 1.12.1(rWT) 、 1.12.1(M29I/D19A) 、 1.12.1(M29I) 、 1.12.1(D19A) 、 1.13.1 、 1.14.1 、 1.151.1 、 1.162.1 、 1.183.1 、 1.27.1 、 1.29.1 、 1.31.1 、 1.8.1 、 1.9.1 、 4.10.1 、 4.24.1 、 4.38.1 、 4.58.1 、 4.62.1 、 4.68.1 、 4.72.1 、 5.13.1 、 5.34.1 、 5.53.1 、 5.56.1 、 5.57.1 或 5.59.1 之任一或多個V_H中生殖系之取代相同之一或多個位置處。在其他實施例中，胺基酸改變係位於一或多個相同位置處，但包括與參考抗體不同之取代。

在某些實施例中，重鏈包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列。在其他實施例中，重鏈包含抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1之重鏈胺基酸序列。在某些實施例中，重鏈包含抗體1.12.1(SEQ ID NO: 6)、1.11.1(SEQ ID NO: 10)、1.13.1(SEQ ID NO: 14)、1.14.1(SEQ ID NO: 18)、1.151.1(SEQ ID NO: 22)、1.162.1(SEQ ID NO: 26)、1.183.1(SEQ ID NO: 30)、1.8.1(SEQ ID NO: 34)、1.9.1(SEQ ID NO: 38)、4.10.1(SEQ ID NO: 42)、4.24.1(SEQ ID NO: 46)、4.38.1(SEQ ID NO: 50)、4.58.1(SEQ ID NO: 54)、4.62.1(SEQ ID NO: 58)、4.68.1(SEQ ID NO: 62)、4.72.1(SEQ ID NO: 66)、5.13.1(SEQ ID NO: 70)、

5.34.1(SEQ ID NO: 74)、5.53.1(SEQ ID NO: 78)、5.56.1(SEQ ID NO: 82)、5.57.1(SEQ ID NO: 86)或5.59.1(SEQ ID NO: 90)之V_H胺基酸序列；或該V_H胺基酸序列具有高達1、2、3、4、6、8、9、10或11個保守胺基酸取代及/或總計高達3個非保守胺基酸取代。在其他實施例中，重鏈包含抗體1.27.1、1.29.1或1.31.1之V_H胺基酸序列。在某些實施例中，重鏈包含自前述抗體中任一者之CDR1起點至CDR3終點之胺基酸序列。

在某些實施例中，重鏈包含抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1之重鏈CDR1、CDR2及CDR3區，或該等CDR區各自具有小於8、小於6、小於4或小於3個保守胺基酸取代及/或總計三個或更少之非保守胺基酸取代。

在某些實施例中，重鏈CDR區係獨立選自兩種或兩種以上抗體之CDR區，該等抗體係選自抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1。在另一實施例中，抗體

包含如上文所揭示之輕鏈及如上文所揭示之重鏈。在另一實施例中，輕鏈CDR及重鏈CDR均來自相同抗體。

在不同實施例中，抗ALK-1抗體具有(多個)全長重鏈及全長輕鏈胺基酸序列， V_H 及 V_L 胺基酸序列；重鏈CDR1、CDR2及CDR3及輕鏈CDR1、CDR2及CDR3胺基酸序列或本文所提供之抗ALK-1抗體之自CDR1起點至CDR3終點之重鏈胺基酸序列及自CDR1起點至CDR3終點之輕鏈胺基酸序列。

一種可進行之胺基酸取代類型為改變抗體中之一或多個半胱胺酸，其對諸如(但不限於)丙胺酸或絲胺酸之另一種殘基具有化學反應性。在一實施例中，存在非典型半胱胺酸之取代。取代可於抗體可變結構域之CDR或構架區中或於抗體恆定結構域中進行。在某些實施例中，半胱胺酸為典型的。

另一種可進行之胺基酸取代類型為移除抗體中可能之蛋白水解位點。該等位點可發生於抗體可變結構域之CDR或構架區中或抗體恆定結構域中。半胱胺酸殘基之取代及蛋白水解位點之移除可降低抗體產物中非均質性之風險且因此增加其均質性。另一種胺基酸取代類型為藉由改變一個或兩個該等殘基來消除形成可能之脫醯胺作用位點之天冬醯胺酸-甘胺酸對。

在某些實施例中，裂解本發明之抗ALK-1抗體重鏈的C末端離胺酸。在本發明之不同實施例中，抗ALK-1抗體之重鏈及輕鏈可視情況包括信號序列。

在一態樣中，本發明提供25種抑制性人類抗ALK-1單株抗體及產生其之融合瘤細胞株。在特定實施例中，本發明之抗體為命名為以下之IgG：1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1。在較佳實施例中，人類抗ALK-1抗體為抗體1.12.1、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.27.1、1.14.1、1.162.1、1.31.1、4.62.1或4.72.1。

抗體將抗原表面暴露之抗原決定基辨識為線性(一級)序列或結構(二級)序列區。使用BIAcore以定義功能性抗原決定基橫式影像且判定本發明例示之抗ALK-1抗體之抗原決定基排外性。

表1列出編碼1.12.1抗體變異體之全長重鏈及輕鏈及本發明抗ALK-1抗體之含可變結構域部分的核酸之序列識別符(SEQ ID NO)，及對應之推論胺基酸序列。

表 1

抗體	序列識別符(SEQ ID NO)							
	全長				含V結構域之部分			
	重		輕		重		輕	
	DNA	蛋白質	DNA	蛋白質	DNA	蛋白質	DNA	蛋白質
1.11.1					9	10	11	12
1.12.1(M29I/D19A)	1	2	3	4	5	6	7	8
1.12.1	95	100	101	102	103	104	126	127
1.12.1(rWT)	128	100	101	102	129	104	126	127
1.13.1					13	14	15	16
1.14.1					17	18	19	20
1.151.1					21	22	23	24
1.162.1					25	26	27	28
1.183.1					29	30	31	32
1.8.1					33	34	35	36
1.9.1					37	38	39	40
4.10.1					41	42	43	44
4.24.1					45	46	47	48
4.38.1					49	50	51	52
4.58.1					53	54	55	56
4.62.1					57	58	59	60
4.68.1					61	62	63	64
4.72.1					65	66	67	68
5.13.1					69	70	71	72
5.34.1					73	74	75	76
5.53.1					77	78	79	80
5.56.1					81	82	83	84
5.57.1					85	86	87	88
5.59.1					89	90	91	92

如實例 4 中所述，1.12.1(M29I/D19A)係指含有位置 29 之甲硫胺酸以異白胺酸置換之重鏈中的特異性單一胺基酸突變及位置 19 之天冬胺酸以丙胺酸置換之輕鏈中的特異性單一胺基酸突變之抗 ALK-1 抗體。

1.12.1 係指自融合瘤分離之 mAb 1.12.1 變異體。

1.12.1(rWT)係指表現為實例 3 中所述之重組 mAb 之 mAb 1.12.1 變異體。

本發明進一步提供上文列出之特定人類抗 ALK-1 抗體之

重鏈及/或輕鏈變異體，其包含一或多種胺基酸修飾。為命名該等變異體，第一個字母為天然產生之抗體鏈之胺基酸的單字母符號，數字係指胺基酸之位置(其中位置一為FR1之N末端胺基酸)且第二個字母為變異體胺基酸之單字母符號。

在又一實施例中，本發明包括包含與上文列出之任何人類抗ALK-1抗體之可變結構域胺基酸序列具有大於80%、大於85%、大於90%、大於95%、大於96%、大於97%、大於98%或大於99%之序列一致性的可變結構域胺基酸序列。

抗ALK-1抗體之種類及亞類

抗ALK-1抗體之種類及亞類可藉由於此項技術中已知之任何方法來判定。一般而言，抗體之種類及亞類可使用對抗體之特定種類及亞類具有特異性之抗體來判定。該等抗體為可購得者。可藉由ELISA、西方墨點法以及其他技術來判定該種類及亞類。或者，可藉由對抗體重鏈及/或輕鏈之所有或部分恆定結構域進行定序，對其胺基酸序列與不同種類及亞類免疫球蛋白之已知胺基酸序列進行比較且判定抗體之種類及亞類來判定該種類及亞類。

如上述獲得之抗ALK-1抗體之種類可相互轉換。在本發明之一態樣中，編碼 V_L 或 V_H 之核酸分子係使用此項技術中所熟知之方法而分離，以使其不包括編碼 C_L 或 C_H 之核酸序列。"Antibody Engineering"(Kontermann & Dubel編，Springer-Verlag, Berlin (2001))。接著將編碼 V_L 或 V_H 之核

酸分子分別可操作性地連接至編碼來自不同種類之免疫球蛋白分子之 C_L 或 C_H 的核酸序列。如上文所述，此可使用包含 C_L 或 C_H 鏈之載體或核酸分子來達成。例如，可將原本為IgM之抗ALK-1抗體之種類轉換為IgG。此外，種類轉換可用以將一種IgG亞類轉化為另一種，例如自IgG1至IgG2。用於產生包含所要同型之本發明抗體之較佳方法包含以下步驟：分離編碼抗ALK-1抗體重鏈之核酸分子與編碼抗ALK-1抗體輕鏈之核酸分子；獲得重鏈之可變結構域；將所要同型之重鏈可變結構域與重鏈恆定結構域接合，於細胞中表現輕鏈及經接合重鏈且收集具有所要同型之抗ALK-1抗體。

在某些實施例中，抗ALK-1抗體為單株抗體。抗ALK-1抗體可為IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子。在一較佳實施例中，抗ALK-1抗體為IgG及IgG1、IgG2、IgG3、IgG4亞類。在另一較佳實施例中，抗體為亞類IgG2。

識別由抗ALK-1抗體辨識之ALK-1抗原決定基

本發明提供結合至ALK-1且與如下抗體之相同抗原決定基競爭或交叉競爭及/或結合之人類抗ALK-1單株抗體：(a)選自以下之抗體：1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1；(b)包含具有SEQ ID NO: 6、10、14、

18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中任一者之 V_H 結構域之胺基酸序列的重鏈可變結構域之抗體；(c)包含具有SEQ ID NO: 8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127中任一者之 V_L 結構域之胺基酸序列的輕鏈可變結構域之抗體；(d)包含(b)中所定義之重鏈可變結構域及(c)中所定義之輕鏈可變結構域的抗體。

可藉由使用此項技術中已知之方法來判定抗體是否結合至相同抗原決定基或交叉競爭與抗ALK-1抗體結合。在一實施例中，容許本發明之抗ALK-1抗體於飽和條件下結合至ALK-1且隨後量測測試抗體結合至ALK-1之能力。若測試抗體可與參考抗ALK-1抗體同時結合至ALK-1，則與參考抗ALK-1抗體相比，測試抗體結合至不同之抗原決定基。然而，若測試抗體不可同時結合至ALK-1，則測試抗體結合至相同抗原決定基、重疊抗原決定基或與由本發明之抗ALK抗體結合之抗原決定基緊密近接之抗原決定基。可使用ELISA、RIA、BIAcore™或流式細胞儀來進行本實驗。為測試抗ALK-1抗體是否與另一抗ALK-1抗體交叉競爭，可以兩種方向使用上述競爭方法，意即判定已知抗體是否阻斷測試抗體及測試抗體是否阻斷已知抗體。在一較佳實施例中，使用BIAcore™進行實驗。

抗ALK-1抗體對ALK-1之結合親和力

可藉由此項技術中已知之方法來判定抗ALK-1抗體或其

抗原結合部分對ALK-1之結合親和力(K_D)及解離速率(k_{off})。可藉由ELISA、RIA、流式細胞儀或諸如BIAcore™之表面電漿共振來量測結合親和力。可藉由表面電漿共振來量測解離速率。較佳為藉由表面電漿共振來量測結合親和力及解離速率。更佳為使用BIAcore™來量測結合親和力及解離速率。藉由使用此項技術中已知之方法，可判定抗體是否具有與抗ALK-1抗體大體相同之 K_D 。在初始篩檢階段以及隨後之最佳化階段期間，可使用該等判定 K_D 及 k_{off} 之方法。

由抗ALK-1抗體抑制ALK-1活性

可使用多種檢定法來識別抑制ALK-1結合之抗ALK-1單株抗體。例如，如實例12中所述，中和抗ALK-1抗體可藉由其對ALK-1之特異性下游靶基因Id1之上調的抑制作用來識別。較佳抗ALK-1抗體具有不大於500 nM、300 nM、200 nM、150 nM、100 nM、50 nM、20 nM、10 nM或1 nM之 IC_{50} 。

如實例13中所述，亦可判定抗ALK-1抗體抑制藉由使用Odyssey紅外成像系統以西方墨點法判定之Smad1磷酸化作用的能力。在不同實施例中，抗ALK-1抗體在該檢定中具有不大於250 nM、200 nM、150 nM、100 nM、50 nM、20 nM、10 nM或1 nM之 IC_{50} 。

以抗ALK-1抗體抑制血管生成

在另一實施例中，如實例17中所述及表13中所示，如由人類CD-31信號檢定之IHC分析所判定，抗ALK-1抗體或其

部分與對照樣本相比，如於以人類包皮組織移植之SCID小鼠中所表現，抑制至少40%之人類血管生成，其中人類黑素瘤M24met腫瘤細胞係經皮內植入以人類包皮組織移植之SCID小鼠中。

在另一實施例中，如實例16中所述及表12中所示，如由人類CD-31信號檢定之IHC分析所判定，抗ALK-1抗體或其部分與對照樣本相比，如於以人類包皮組織移植之SCID小鼠中所表現，抑制至少50%之人類血管生成，其中膠原蛋白係經皮內植入以人類包皮組織移植之SCID小鼠中。

物種及分子選擇性

在本發明之另一態樣中，抗ALK-1抗體表現物種及分子選擇性兩者。根據本說明書之教示，可使用此項技術中所熟知之方法來判定抗ALK-1抗體之物種或分子選擇性。例如，可使用西方墨點法，表面電漿共振(例如BIAcore)、ELISA、免疫沉澱法或RIA來判定物種選擇性。

在某些實施例中，抗ALK-1抗體以小於其對齧齒動物ALK-1之 K_D 至少兩倍之 K_D 結合至靈長類動物ALK-1。在另一實施例中，如由流式細胞儀所量測，對靈長類動物ALK-1之 K_D 小於其對齧齒動物ALK-1之 K_D 的至少3倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少200倍、至少500倍或至少1000倍。

在其他實施例中，抗ALK-1抗體對ALK-1比對ALK-2至ALK-7具有更強之選擇性。在某些實施例中，抗ALK-1抗體對除ALK-1以外之任何其他蛋白質不展現任何明顯之特

異性結合。抗ALK-1抗體較佳結合至人類ALK-1之ECD。

產生抗體及抗體產生細胞株之方法

ALK-1免疫原

在某些實施例中，ALK-1免疫原或抗原為經分離及/或經純化之ALK-1。在某些實施例中，ALK-1免疫原為人類ALK-1。在較佳實施例中，ALK-1免疫原為人類ALK-1之ECD。人類ALK-1或其抗原性部分可根據熟習此項技術者所熟知之方法來製備，或可自銷售商處購得。人類ALK-1胺基酸及核苷酸序列為已知的(參見例如Genbank記錄寄存編號L17075)。編碼全長ALK-1之ACVRL1基因可以Clone ID IOH21048購自Invitrogen Inc.。例如，R&D Systems, Inc.出售藉由表現編碼ALK-1之ECD胺基酸殘基1-118之DNA序列而製備之重組人類ALK-1/Fc嵌合體(目錄號370-AL)，其中將該DNA序列經由編碼小鼠骨髓瘤細胞株中之多肽連接子之DNA序列融合至編碼人類IgG之Fc區的DNA序列。重組成熟人類ALK-1/Fc嵌合體為胺基末端處具有Asp 22之二硫化物連接之同源二聚蛋白質。此外，實例1描述已用於產生融合瘤之ALK-1 ECD His-Tag蛋白質之製備，該融合瘤產生根據本發明之抗ALK-1抗體。

在其他實施例中，ALK-1抗原為表現或過度表現ALK-1之細胞。在其他實施例中，ALK-1抗原為藉由重組技術自酵母、昆蟲細胞、諸如大腸桿菌(*E. coli*)之細菌或其他來源表現之重組蛋白質。

免疫作用

在某些實施例中，人類抗體係藉由對非人類、轉殖基因動物進行免疫而產生，該動物於其基因組中包含具有ALK-1抗原之某些或所有人類免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座。在一較佳實施例中，非人類動物為XENOMOUSE®動物。(Abgenix, Inc., Fremont, CA)。

XENOMOUSE®小鼠為包含大片段人類免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座且缺乏小鼠抗體產生之基因工程小鼠種類。參見例如Green等人，Nature Genetics 7:13-21 (1994)及美國專利第5,916,771號、第5,939,598號、第5,985,615號、第5,998,209號、第6,075,181號、第6,091,001號、第6,114,598號、第6,130,364號、第6,162,963號及第6,150,584號。亦參見WO 91/10741、WO 94/02602、WO 96/34096、WO 96/33735、WO 98/16654、WO 98/24893、WO 98/50433、WO 99/45031、WO 99/53049、WO 00/09560及WO 00/037504。

在另一態樣中，本發明提供一種藉由以ALK-1抗原對包含人類免疫球蛋白基因座之非人類轉殖基因動物進行免疫，以自非人類、非小鼠動物製造抗ALK-1抗體之方法。可使用上文所引用文獻中所述之方法產生該等動物。該等文獻中揭示之方法可如以引用的方式併入本文之美國專利第5,994,619號中所述進行修改。美國專利第5,994,619號描述用於產生衍生自豬及牛之新穎經培養內細胞團(CICM)細胞及細胞株及已插入異種DNA之轉殖基因CICM細胞的方法。CICM轉殖基因細胞可用於產生經選殖轉殖基因胚

胎、胎兒及後代。'619號專利亦描述產生可將異種DNA傳遞至其子代之轉殖基因動物的方法。在本發明之較佳實施例中，非人類動物為哺乳動物，尤其為大鼠、綿羊、豬、山羊、牛、馬或雞。

XENOMOUSE®小鼠產生完全人類抗體之類成人人類清單且產生抗原特異性人類抗體。在某些實施例中，經由在酵母人造染色體(YAC)中引入人類重鏈基因座及 κ 輕鏈基因座之兆基尺寸之生殖系組態片段，XENOMOUSE®小鼠含有大約80%之人類抗體V基因清單。在其他實施例中，XENOMOUSE®小鼠另外含有大約所有之人類 λ 輕鏈基因座。參見Mendez等人，*Nature Genetics* 15:146-156 (1997)，Green及Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998)及WO 98/24893，其揭示內容均以引用的方式併入本文。

在某些實施例中，包含人類免疫球蛋白基因之非人類動物為具有人類免疫球蛋白"微型基因座"之動物。在微型基因座之方法中，經由包括來自Ig基因座之個別基因來模擬外源性Ig基因座。因此，將一或多個 V_H 基因、一或多個 D_H 基因、一或多個 J_H 基因、 μ 恆定結構域及第二恆定結構域(較佳為 γ 恆定結構域)形成為一構築體以供插入動物中。該方法尤其描述於以引用的方式併入本文之美國專利第5,545,807號、第5,545,806號、第5,569,825號、第5,625,126號、第5,633,425號、第5,661,016號、第5,770,429號、第5,789,650號、第5,814,318號、第5,591,669號、第5,612,205號、第5,721,367號、第

5,789,215號及第5,643,763號中。

在另一態樣中，本發明提供一種製造人化抗ALK-1抗體之方法。在某些實施例中，在容許產生抗體之條件下，如下文所述以ALK-1抗原對非人類動物進行免疫。將抗體產生細胞自該等動物分離，且將編碼所關注抗ALK-1抗體之重鏈及輕鏈之核酸自經分離抗體產生細胞或自由該等細胞產生之永生化細胞株分離。隨後使用熟習此項技術者已知及如下文進一步描述之技術對該等核酸進行基因工程設計以降低非人類序列之量，意即人化該抗體以降低人類之免疫反應。

可藉由此項技術中已知之任何方法進行動物之免疫。參見例如Harlow及Lane, **Antibodies: A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990。此項技術中熟知對諸如小鼠、大鼠、綿羊、山羊、豬、牛及馬之非人類動物進行免疫之方法。參見例如前述之Harlow及Lane，及美國專利第5,994,619號。在一較佳實施例中，與佐劑一起投與ALK-1抗原以刺激免疫反應。例示性佐劑包括完全或不完全弗氏(Freund's)佐劑、RIBI(胞壁醯二肽)或ISCOM(免疫刺激複合物)。該等佐劑可藉由在局部沈積物中將多肽螯合而使其免於快速分散，或其可含有刺激宿主分泌對巨噬細胞及免疫系統之其他組份具有趨化性之因子的物質。較佳地，若投與多肽，則免疫進程將包括在若干週內散佈投與兩次或兩次以上多肽。實例2例示一種在XENOMOUSE®小鼠中產生抗ALK-1單株抗體之方法。

抗體及抗體產生細胞株之產生

在以 ALK-1 抗原對動物進行免疫之後，可由該動物獲得抗體及/或抗體產生細胞。在某些實施例中，藉由對動物放血或將其處死而由該動物獲得含有抗 ALK-1 抗體之血清。該血清可如其由動物所獲得之原樣使用，免疫球蛋白部分可自血清而獲得或抗 ALK-1 抗體可自血清純化。

在某些實施例中，抗體產生細胞株係由自經免疫動物分離之細胞來製備。免疫之後，將動物處死且以此項技術中已知之任何方式使淋巴結及/或脾 B 細胞永生。使細胞永生之方法包括(但不限於)以致癌基因對其進行轉染，以致癌病毒使其感染且於選擇用於永生細胞之條件下對其進行培養，使其經受致癌或突變化合物，將其與永生細胞(例如骨髓瘤細胞)融合且使腫瘤抑制基因失活。參見例如前述之 Harlow 及 Lane。若使用與骨髓瘤細胞之融合，則骨髓瘤細胞較佳不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌性細胞株)。使用 ALK-1 或其部分篩檢永生細胞。在一較佳實施例中，使用酶聯免疫檢定法(ELISA)或放射免疫檢定法進行初始篩檢。ELISA 篩檢之實例係於以引用的方式併入本文之 WO 00/37504 中提供。

如下文進一步所描述，選擇抗 ALK-1 抗體產生細胞(例如融合瘤)，對其進行選殖且進一步篩檢所要之特徵，包括穩固生長、高抗體產量及所要之抗體特徵。融合瘤可於同源動物；缺乏免疫系統之動物(例如裸小鼠)之活體內，或於活體外細胞培養中擴展。選擇、選殖及擴展融合瘤之方

法為一般熟習此項技術者所熟知。

在一較佳實施例中，經免疫動物為表現人類免疫球蛋白基因之非人類動物，且將脾B細胞融合至來自與非人類動物相同物種之骨髓瘤細胞株。在一更佳實施例中，經免疫動物為XENOMOUSE®小鼠，且骨髓瘤細胞株為非分泌性小鼠骨髓瘤。在一甚至更佳實施例中，骨髓瘤細胞株為P3-X63-Ag8.653(美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection))。參見例如實例2。

因此，在一實施例中，本發明提供用於產生細胞株的方法，該細胞株產生針對ALK-1之人類單株抗體或其片段，該等方法包含(a)以ALK-1、ALK-1之部分或表現ALK-1之細胞或組織對本文所述之非人類轉殖基因動物進行免疫；(b)使轉殖基因動物對ALK-1具有免疫反應；(c)將抗體產生細胞自轉殖基因動物分離；(d)使抗體產生細胞永生化；(e)產生永生化抗體產生細胞之個別單株群體；及(f)篩檢永生化抗體產生細胞以識別針對ALK-1之抗體。

在另一態樣中，本發明提供產生人類抗ALK-1抗體之細胞株。在某些實施例中，細胞株為融合瘤細胞株。在某些實施例中，如上文所述，融合瘤為小鼠融合瘤。在其他實施例中，融合瘤係於諸如大鼠、綿羊、豬、山羊、牛或馬之非人類非小鼠物種中產生。在另一實施例中，融合瘤為人類融合瘤。

在另一實施例中，以ALK-1抗原對轉殖基因動物進行免疫，將例如脾或外周血液B細胞之初級細胞自經免疫轉殖

基因動物分離，且識別產生對所要抗原具有特異性之抗體的個別細胞。分離來自每一個別細胞之多聚腺嘌呤 mRNA，且使用黏接至可變結構域序列之感應引物及黏接至恆定或接合區序列之抗感應引物進行反向轉錄聚合酶鏈反應(RT-RCR)，該等感應引物例如為辨識人類重及輕鏈可變結構域基因之大部分或所有FR1區的退化引物。隨後在任何合適之宿主細胞(例如骨髓瘤細胞)中選殖重鏈及輕鏈可變結構域之 cDNA，且將其表現為與相應免疫球蛋白恆定區(諸如重鏈及 κ 或 λ 恆定結構域)之嵌合抗體。參見以引用的方式併入本文之 Babcook, J.S. 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-48, 1996。隨後可如本文所述來識別且分離抗 ALK-1 抗體。

在另一實施例中，可使用噬菌體呈現技術來提供含有對 ALK-1 具有不同親和力之抗體清單庫。對於產生該等清單而言，無需將來自經免疫動物之 B 細胞永生化。相反，可將初級 B 細胞直接用作 DNA 來源。將自例如衍生自脾之 B 細胞所獲得之 cDNA 混合物用於製備表現庫，例如轉染至大腸桿菌中之噬菌體呈現庫。測試所得細胞對 ALK-1 之免疫反應性。識別來自該等庫之高親和力人類抗體之技術係由以參考的方式併入本文之 Griffiths 等人，*EMBO J.*, 13:3245-3260 (1994)；Nissim 等人，*ibid*，第 692-698 頁及 Griffiths 等人，*ibid*，12:725-734 來描述。最後，識別來自該庫之對抗原產生所要量值之結合親和力的純系，且回收對造成該結合之產物編碼的 DNA 且對其進行操控以供標準

重組表現。亦可使用先前操控之核苷酸序列建構且以類似方式篩檢噬菌體呈現庫。一般而言，編碼重鏈及輕鏈之cDNA係經獨立供應或連接以形成供在噬菌體庫中產生之Fv類似物。

隨後篩檢噬菌體庫中對ALK-1具有最高親和力之抗體及自適當純系回收之遺傳物質。另外之篩檢循環可增加經分離原始抗體之親和力。

核酸、載體、宿主細胞及製造抗體之重組方法

核酸

本發明亦涵蓋編碼抗ALK-1抗體或其抗原結合片段之核酸分子。在某些實施例中，不同核酸分子編碼抗ALK-1免疫球蛋白之重鏈及輕鏈。在其他實施例中，相同核酸分子編碼抗ALK-1免疫球蛋白之重鏈及輕鏈。

在某些實施例中，編碼輕鏈可變結構域(V_L)之核酸分子利用人類A27、A2、A1、A3、B3、B2、L1或L2 V_κ基因及人類J_κ5、J_κ1、J_κ3或J_κ4基因。在某些實施例中，核酸分子利用人類A27 V_κ基因及人類J_κ5基因。在其他實施例中，核酸分子利用人類A2基因及人類J_κ1基因。在某些實施例中，編碼輕鏈之核酸分子編碼包含來自(多個)生殖系胺基酸序列之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個取代的胺基酸序列。在某些實施例中，與生殖系V_κ及J_κ序列相比，核酸分子包含編碼包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個保守胺基酸取代及/或1、2或3個非保守取代之V_L胺基酸序列的

核苷酸序列。取代可位於CDR區、構架區或恆定結構域中。

在某些實施例中，與生殖系序列相比，核酸分子編碼包含一或多個突變之V_L胺基酸序列，該等突變與於抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1中任一者之V_L中發現之來自生殖系的突變相同。

在某些實施例中，與生殖系序列相比，核酸分子編碼至少三個胺基酸取代，該等取代與於抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1中任一者之V_L中發現之來自生殖系的突變相同。

在某些實施例中，核酸分子包含選自由以下序列組成之群之核苷酸序列：SEQ ID NO: 7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、51、55、59、63、67、71、75、79、83、87、91或126，該核苷酸序列編碼以下單株抗體之V_L胺基酸序列：1.12.1(M29I/D19A)、1.11.1、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、

1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1、5.59.1或1.12.1。

在某些實施例中，核酸分子包含編碼以下序列之一之胺基酸序列的核苷酸序列：SEQ ID NO: 8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127。在某些實施例中，核酸分子包含SEQ ID NO: 3之核苷酸序列或其部分。在某些實施例中，核酸編碼該抗體之一、二或所有三個CDR之輕鏈的胺基酸序列。在某些實施例中，該部分編碼抗ALK-1抗體輕鏈之連續區CDR1-CDR3。

在某些實施例中，核酸分子編碼與抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1中任一者之V_L胺基酸序列或SEQ ID NO: 4之V_L區之胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%一致性的V_L胺基酸序列。本發明之核酸分子包括諸如上述彼等之於高度嚴格條件下雜交，或與編碼SEQ ID NO: 8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或126之V_L區胺基酸序列之核酸或與包含SEQ ID NO: 4之V_L區核苷酸序列之

核酸具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%一致性的核酸。

在其他較佳實施例中，核酸分子編碼利用人類 V_H 4-31、V_H 3-11、V_H 3-15、V_H 3-33、V_H 4-61或V_H 4-59基因序列或自其衍生之序列之重鏈可變結構域(V_H)。在某些實施例中，核酸分子利用人類 V_H 4-31基因、DH6-19基因及人類 JH4B基因。

在某些實施例中，與人類 V、D或J基因之生殖系胺基酸序列相比，核酸分子編碼包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11個突變之胺基酸序列。在某些實施例中，該等突變位於V_H區。在某些實施例中，該等突變位於CDR區。

在某些實施例中，與生殖系 V_H序列相比，核酸分子編碼包含一或多個胺基酸突變之V_H序列，該等突變與於單株抗體 1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1中任一者之V_H中發現之胺基酸突變相同。在某些實施例中，與生殖系序列相比，核酸至少編碼三個胺基酸突變，該等胺基酸突變與以上列出之單株抗體之一中發現之至少三個胺基酸突變相同。

在某些實施例中，核酸分子包含選自由SEQ ID NO: 5、13、17、21、25、29、33、37、41、45、49、53、57、

61、65、69、73、77、81、85、89或103組成之群之核苷酸序列，其編碼單株抗體1.12.1(M29I/D19A)、1.11.1、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1、5.59.1或1.12.1之V_H胺基酸序列。

在某些實施例中，核酸分子包含編碼SEQ ID NO: 2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中之一之胺基酸序列的核苷酸序列。在各個較佳實施例中，核酸分子包含SEQ ID NO: 1或95之至少一部分核苷酸序列。在某些實施例中，該部分編碼V_H區、CDR3區、所有三個CDR區或包括CDR1-CDR3之連續區。

在某些實施例中，核酸分子編碼與SEQ ID NO: 2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90或104中任一者之V_H胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%一致性之V_H胺基酸序列。本發明之核酸分子包括諸如上述彼等之於高度嚴格條件下雜交，或與編碼SEQ ID NO: 2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74、78、82、86、90、100或104之胺基酸序列之核酸，或與其V_H區，或與包含SEQ ID NO: 1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、49、53、57、61、65、69、73、

77、81、85、89、95、103、128或129之核苷酸序列或編碼其V_H區之核苷酸序列的核酸具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%一致性的核酸。

在另一實施例中，核酸編碼選自由1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1組成之群之抗體的全長重鏈或包含SEQ ID NO: 2胺基酸序列之重鏈。此外，核酸可包含SEQ ID NO: 1或95之核苷酸序列。

編碼抗ALK-1抗體或其部分之重鏈或輕鏈之核酸分子可自產生該抗體之任何來源分離。在各個實施例中，將核酸分子自表現抗ALK-1抗體之B細胞分離，該抗ALK-1抗體係自以ALK-1免疫之動物或自衍生自該B細胞之永生化細胞而分離。分離編碼抗體之核酸的方法為此項技術所熟知。參見例如 Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)。可將mRNA分離且用以產生用於抗體基因之聚合酶鏈反應(PCR)或cDNA選殖中之cDNA。在一較佳實施例中，將核酸分子自融合瘤分離，該融合瘤具有來自非人類轉殖基因動物之細胞作為其融合搭配物之一，該細胞產生人類免疫球蛋白。在一甚至



更佳之實施例中，將產生人類免疫球蛋白之細胞自XENOMOUSE®動物分離。在另一實施例中，將產生人類免疫球蛋白之細胞自如上文所述之非人類、非小鼠轉殖基因動物分離。在另一實施例中，將核酸自非人類非轉殖基因動物分離。自非人類非轉殖基因動物分離之核酸分子例如可用於包含來自本發明之人類抗ALK-1抗體之一或多個胺基酸序列的人化抗體。

在某些實施例中，編碼本發明之抗ALK-1抗體重鏈之核酸可包含與編碼來自任何來源之重鏈恆定結構域之核苷酸序列同框接合之編碼本發明之 V_H 結構域的核苷酸序列。類似地，編碼本發明之抗ALK-1抗體輕鏈之核酸分子可包含與編碼來自任何來源之輕鏈恆定結構域之核苷酸序列同框接合之編碼本發明之 V_L 結構域的核苷酸序列。

在本發明之另一態樣中，將編碼重鏈(V_H)及/或輕鏈(V_L)可變結構域之核酸分子"轉化"為全長抗體基因。在一實施例中，將編碼 V_H 及 V_L 結構域之核酸分子藉由插入已分別編碼重鏈恆定(C_H)或輕鏈恆定(C_L)結構域之表現載體中而轉化為全長抗體基因，以使得 V_H 區段可操作性地連接至載體中之(多個) C_H 區段及/或使 V_L 區段可操作性地連接至載體中之 C_L 區段。在另一實施例中，將編碼 V_H 及/或 V_L 結構域之核酸分子藉由使用標準分子生物技術將編碼 V_H 及/或 V_L 結構域之核酸分子連接(例如接合)至編碼 C_H 及/或 C_L 結構域之核酸分子而轉化為全長抗體基因。人類重鏈及輕鏈免疫球蛋白恆定結構域基因之核酸序列為此項技術所已知。參見

例如 Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，NIH 公開案第 91-3242 號，1991。隨後可將編碼全長重及/或輕鏈之核酸分子自引入該等核酸分子之細胞表現且將抗 ALK-1 抗體分離。

核酸分子可用以重組性表現大量之抗-ALK-1 抗體。核酸分子亦可用以產生如下文進一步描述之嵌合抗體、雙特異性抗體、單鏈抗體、免疫黏附素、雙功能抗體、突變抗體及抗體衍生物。亦如下文所述，若該等核酸分子係衍生自非人類、非轉殖基因動物，則該等核酸分子可用於抗體人化。

在另一實施例中，本發明之核酸分子係用作特異性抗體序列之探針或 PCR 引物。例如，核酸可用作診斷方法中之探針或用作 PCR 引物以擴增尤其可用以分離編碼抗 ALK-1 抗體之可變結構域之額外核酸分子的 DNA 區。在某些實施例中，核酸分子為寡核苷酸。在某些實施例中，寡核苷酸係來自所關注抗體之重鏈及輕鏈的高度可變結構域。在某些實施例中，寡核苷酸編碼如本文所述之抗體 1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1 或 5.59.1 或其變異體之一或多個 CDR 的全部或部分。

載體



本發明提供包含編碼本發明之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分之重鏈之核酸分子的載體。本發明亦提供包含編碼該等抗體或其抗原結合部分之輕鏈之核酸分子的載體。本發明另外提供包含編碼融合蛋白質、經修飾抗體、抗體片段及其探針之核酸分子之載體。

在某些實施例中，藉由將如上文所述獲得之編碼部分或全長輕鏈及重鏈之DNA插入表現載體來表現本發明之抗ALK-1抗體及抗原結合部分，以使得該等基因可操作性地連接至諸如轉錄及轉譯控制序列之必需表現控制序列。表現載體包括質體、反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒(AAV)、植物病毒(諸如花椰菜嵌紋病毒、煙草嵌紋病毒)、黏質體、YAC、EBV衍生之離合染色小體及其類似物。將抗體基因接合於載體中以使得載體中之轉錄及轉譯控制序列發揮其調節抗體基因轉錄及轉譯之預期功能。選擇與所使用之表現宿主細胞相容之表現載體及表現控制序列。可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入分離載體中。在一較佳實施例中，將兩種基因插入相同之表現載體中。藉由標準方法(例如，接合抗體基因片段及載體上之互補限制位點，或若不存在限制位點，則進行鈍端接合)將抗體基因插入表現載體中。

如上文所述，適宜載體為編碼功能性完全人類 C_H 或 C_L 免疫球蛋白序列者，其中對適當限制位點進行基因工程設計以使得任何 V_H 或 V_L 序列可易於插入及表現。在該等載體中，剪接通常發生於經插入J區之剪接供體位點與人類C結

構域之前之剪接受體位點之間，且亦發生於人類C_H外顯子內發生之剪接區。多聚腺嘌呤及轉錄終止發生於編碼區之原生染色體位點下游。重組表現載體亦可編碼促進抗體鏈自宿主細胞分泌之信號肽。抗體鏈基因可經選殖至載體中，以使得信號肽同框連接至免疫球蛋白鏈之胺基末端。信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異種信號肽(意即，來自非免疫球蛋白之信號肽)。

除抗體鏈基因以外，本發明之重組表現載體載運控制抗體鏈基因在宿主細胞內之表現的調節序列。熟習此項技術者應瞭解，表現載體之設計，包括調節序列之選擇可取決於以下因素，諸如待轉型宿主細胞之選擇、所要蛋白質之表現水平等。對於哺乳動物宿主細胞表現而言較佳之調節序列包括在哺乳動物細胞中引導高水平蛋白質表現之病毒元素，諸如衍生自反轉錄病毒LTR之啟動子及/或強化子、巨細胞病毒(CMV)(諸如CMV啟動子/強化子)、猿病毒40(SV40)(諸如SV40啟動子/強化子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))、多瘤病毒及強哺乳動物啟動子，諸如原生免疫球蛋白及活化素啟動子。對於病毒調節元素及其序列之進一步描述，參見例如美國專利第5,168,062號、美國專利第4,510,245號及美國專利第4,968,615號。此項技術中已知於植物中表現抗體之方法，包括對於啟動子及載體以及植物轉型之描述。參見例如以引用的方式併入本文之美國專利第6,517,529號。此項技術中亦熟知在細菌細胞或真菌細胞(例如酵母細胞)中表現多

肽之方法。

除抗體鏈基因及調節序列以外，本發明之重組表現載體可載運額外序列，諸如用於調節載體於宿主細胞(例如複製來源)及可選擇性標記基因中複製之序列。可選擇性標記基因促進了其中引入載體之宿主細胞的選擇(參見例如美國專利第4,399,216號、第4,634,665號及第5,179,017號，其以引用的方式併入本文)。例如，可選擇性標記基因對其中引入載體之宿主細胞賦予對諸如G418、濕黴素或甲胺喋呤之藥物的抗性。例如，可選擇性標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於具有甲胺喋呤選擇/擴增之dhfr宿主細胞)；新基因(用於G418選擇)及麩胺酸合成酶基因。

非融合瘤宿主細胞及重組產生蛋白質之方法

編碼包含核酸分子之抗ALK-1抗體及載體之該等核酸分子可用於轉染合適之哺乳動物、植物、細菌或酵母宿主細胞。轉型可藉由用於將聚核苷酸引入宿主細胞之任何已知方法來進行。將異種聚核苷酸引入哺乳動物細胞之方法為此項技術所熟知且包括葡聚糖介導之轉染、磷酸鈣沉澱、聚凝胺介導之轉染、原生質體融合、電穿孔、脂質體中之(多種)聚核苷酸之封裝及將DNA直接顯微注射入核中。此外，核酸分子可藉由病毒載體而引入哺乳動物細胞中。此項技術中熟知轉型細胞之方法。參見例如以引用的方式併入本文之美國專利第4,399,216號、第4,912,040號、第4,740,461號及第4,959,455號。此項技術中熟知轉型植物細

胞之方法，其包括例如土壤桿菌(*Agrobacterium*)介導之轉型、基因槍轉型、直接注射、電穿孔及病毒轉型。此項技術中亦熟知轉型細菌及酵母細胞之方法。

此項技術中熟知可用作表現宿主之哺乳動物細胞株且其包括可購自美國典型培養物保藏中心(ATCC)之多種永生化細胞株。該等細胞株尤其包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、293游離型細胞(Invitrogen)、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、非洲綠猴腎細胞(COS)、人類肝細胞癌細胞(例如Hep G2)、A549細胞及多種其他細胞株。特別較佳之細胞株係經由判定哪些細胞株具有高表現水平而進行選擇。可使用之其他細胞株為昆蟲細胞株，諸如Sf9或Sf21細胞。當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞時，藉由培養宿主細胞歷時足以使抗體於宿主細胞中表現或更佳使抗體分泌至宿主細胞生長之培養基中之時間段而產生抗體。可使用標準蛋白質純化方法自培養基回收抗體。植物宿主細胞包括例如煙草、阿拉伯芥、浮萍、玉米、小麥、馬鈴薯等。細菌宿主細胞包括大腸桿菌及鏈黴素類。酵母宿主細胞包括粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及甲醇酵母(*Pichia pastoris*)。

此外，可使用多種已知技術來增強自生產細胞株表現本發明之抗體。例如，麩氨酰胺合成酶基因表現系統(GS系統)為於特定條件下增強表現之常用方法。GS系統係全部

或部分結合歐洲專利第0 216 846號、第0 256 055號、第0 323 997號及第0 338 841號描述。

由不同細胞株或於轉殖基因動物中表現之抗體可能將具有彼此不同之糖基化作用。然而，無論抗體之糖基化作用如何，由本文提供之核酸分子編碼或包含本文提供之胺基酸序列的所有抗體均為本發明之部分。

轉殖基因動物及植物

本發明之抗ALK-1抗體亦可經由產生對所關注之免疫球蛋白重及輕鏈序列而言具有轉殖基因性之哺乳動物或植物，且產生其可回收形式之抗體而轉殖基因性地產生。結合在哺乳動物中之轉殖基因產生，抗ALK-1抗體可於山羊、牛或其他哺乳動物之乳汁中產生或自其回收。參見例如以引用的方式併入本文之美國專利第5,827,690號、第5,756,687號、第5,750,172號及第5,741,957號。在某些實施例中，如上文所述，包含人類免疫球蛋白基因座之非人類轉殖基因動物係以ALK-1及其免疫原性部分進行免疫。例如於以參考的方式併入本文之美國專利第6,046,037號及第5,959,177號中描述於植物中製造抗體之方法。

在某些實施例中，藉由標準轉殖基因技術將編碼本發明之抗ALK-1抗體之一或多個核酸分子引入動物或植物中而產生非人類轉殖基因動物或植物。參見前述之Hogan及美國專利第6,417,429號。用於製造轉殖基因動物之轉殖基因細胞可為胚胎幹細胞或體細胞或受精卵。轉殖基因非人類生物體可為嵌合體、非嵌合雜合子及非嵌合純合子。參見

例如 Hogan 等人，**Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual** 第 2 版，Cold Spring Harbor Press (1999)；Jackson 等人，**Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach**, Oxford University Press (2000)；及 Pinkert, **Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook**, Academic Press (1999)，所有均以引用的方式併入本文。在某些實施例中，轉殖基因非人類動物具有藉由編碼所關注重鏈及/或輕鏈之靶向構築體標靶之破壞及取代。在一較佳實施例中，轉殖基因動物包含且表現編碼特異性結合至 ALK-1，較佳為人類 ALK-1 之重鏈及輕鏈之核酸分子。在某些實施例中，轉殖基因動物包含編碼諸如單鏈抗體、嵌合抗體或人化抗體之經修飾抗體的核酸分子。可於任何轉殖基因動物中製造抗 ALK-1 抗體。在一較佳實施例中，非人類動物為小鼠、大鼠、綿羊、豬、山羊、牛或馬。非人類轉殖基因動物於血液、乳汁、尿液、唾液、淚液及其他體液中表現該等經編碼多肽。

噬菌體呈現庫

本發明提供一種產生抗 ALK-1 抗體或其抗原結合部分之方法，其包含以下步驟：於噬菌體上合成人類抗體庫；以 ALK-1 或其抗體結合部分篩檢該庫；分離結合 ALK-1 之噬菌體且自該噬菌體獲得抗體。舉例而言，一種製備用於噬菌體呈現技術之抗體庫的方法包含以下步驟：以 ALK-1 或其抗原性部分對包含人類免疫球蛋白基因座之非人類動物進行免疫以產生免疫反應；自經免疫動物提取抗體產生細

胞；自經提取之細胞分離編碼本發明之抗體重鏈及輕鏈之RNA；逆轉錄RNA以產生cDNA；使用引物擴增cDNA且將cDNA插入噬菌體呈現載體中以使得於噬菌體上表現抗體。本發明之重組抗ALK-1抗體可以此方式獲得。

可藉由篩檢重組組合抗體庫來分離本發明之重組人類抗ALK-1抗體。該庫較佳為scFv噬菌體呈現庫，其係使用由自B細胞分離之mRNA製備之人類V_L及V_H cDNA而產生。此項技術中已知製備及篩檢該等庫之方法。產生噬菌體呈現庫之套組係可購得(例如，Pharmacia Recombinant Phage Antibody System，目錄號27-9400-01；及Stratagene SurfZAPTM噬菌體呈現套組，目錄號240612)。亦存在可用於產生及篩檢抗體呈現庫之其他方法及試劑(參見例如，美國專利第5,223,409號；PCT公開案號WO 92/18619、WO 91/17271、WO 92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047、WO 92/09690；Fuchs等人，*Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991)；Hay等人，*Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992)；Huse等人，*Science* 246:1275-1281 (1989)；McCafferty等人，*Nature* 348:552-554 (1990)；Griffiths等人，*EMBO J.* 12:725-734 (1993)；Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)；Clackson等人，*Nature* 352:624-628 (1991)；Gram等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992)；Garrad等人，*Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991)；Hoogenboom等人，*Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991)；及Barbas等人，*Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982 (1991)，其所有均以引用的方式併入本文)。

在一實施例中，為分離且產生具有所要特徵之人類抗ALK-1抗體，首先使用以引用的方式併入本文之PCT公開案號WO 93/06213中所述之抗原決定基壓印法，將如本文所述之人類抗ALK-1抗體用以選擇對ALK-1具有類似結合活性之人類重鏈及輕鏈序列。該方法中使用之抗體庫較佳為如以引用的方式併入本文之PCT公開案號WO 92/01047，McCafferty等人之*Nature* 348:552-554 (1990)及Griffiths等人之*EMBO J.* 12:725-734 (1993)中所述而製備且篩檢之scFv庫。較佳使用人類ALK-1作為抗原來篩檢scFv抗體庫。

一旦選擇初始人類 V_L 及 V_H 結構域，即進行"混合及匹配"實驗，其中篩檢不同對之初始選擇的 V_L 及 V_H 區段以供ALK-1結合以選擇較佳之 V_L/V_H 對組合。此外，為進一步改良抗體之品質，可以類似於在自然免疫反應期間造成抗體親和力成熟之活體內體細胞突變方法之方法，將較佳 V_L/V_H 對之 V_L 及 V_H 區段較佳在 V_H 及/或 V_L 之CDR3區內進行隨機突變。該活體外親和力成熟可藉由使用分別與 V_H CDR3或 V_L CDR3互補之PCR引物擴增 V_H 及 V_L 結構域而完成，其中以特定位置處之四種核苷酸鹼基的隨機混合物"強化"引物，以使得所得PCR產物編碼已將隨機突變引入 V_H 及/或 V_L CDR3區之 V_H 及 V_L 區段。該等隨機突變之 V_H 及 V_L 區段可經再此篩檢以供結合至ALK-1。



在自重組免疫球蛋白呈現庫篩檢及分離本發明之抗ALK-1抗體之後，可藉由標準重組DNA技術將編碼所選抗體之核酸自呈現封裝(例如自噬菌體基因組)回收且經次選殖至其他表現載體中。如下文所述，若需要，可進一步操控核酸以產生本發明之其他抗體形式。如上文所述，為表現藉由篩檢組合庫而分離之重組人類抗體，將編碼該抗體之DNA選殖至重組表現載體中且引入哺乳動物宿主細胞中。

去免疫抗體

在本發明之另一態樣中，可使用例如PCT公開案號WO 98/52976及WO 00/34317(以引用的方式併入本文)中所述之技術使抗體去免疫以降低其免疫原性。

突變抗體

在另一實施例中，核酸分子、載體及宿主細胞可用以製造突變抗ALK-1抗體。可於重鏈及/或輕鏈之可變結構域中使抗體突變，例如以改變抗體之結合特性。例如，可於一或多個CDR區中進行突變以增加或降低抗體對ALK-1之 K_D ，以增加或降低 k_{off} 或以改變抗體之結合特異性。此項技術中熟知定點突變技術。參見例如，前述之Sambrook等人及Ausubel等人。在另一實施例中，於胺基酸殘基處進行一或多種突變，已知該胺基酸殘基與單株抗體1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、

4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1中之生殖系相比係待改變者。可於可變結構域之CDR區或構架區，或恆定結構域中進行突變。在一較佳實施例中，可於可變結構域中進行突變。在某些實施例中，可於胺基酸殘基處進行一或多種突變，已知該胺基酸殘基與胺基酸序列SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92或127之可變結構域之CDR區或構架區中之生殖系相比係待改變者，或其核酸序列存在於SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、95、102或126中。

在另一實施例中，使構架區突變以使得所得構架區具有對應生殖系基因之胺基酸序列。可於構架區或恆定結構域中進行突變以增加抗ALK-1抗體之半衰期。參見例如以引用的方式併入本文之PCT公開案號WO 00/09560。亦可於構架區或恆定結構域中進行突變以改變抗體之免疫原性，以提供共價或非共價結合至另一分子之位點或以改變諸如互補固定、FcR結合及抗體依賴性細胞介導細胞毒性(ADCC)之特性。根據本發明，單一抗體可於可變結構域

之任何一或多個CDR或構架區中或於恆定結構域中具有突變。

在某些實施例中，與突變前之抗ALK-1抗體相比，經突變抗ALK-1抗體之 V_H 或 V_L 結構域中存在1至13個(包括其間之任意數目)胺基酸突變。在以上之任何狀況下，該等突變可發生於一或多個CDR區中。此外，任何突變均可為保守性胺基酸取代。在某些實施例中，恆定結構域中存在不多於5、4、3、2或1個胺基酸改變。

經修飾抗體

在另一實施例中，可產生包含連接至另一多肽之本發明之所有或部分抗ALK-1抗體的融合抗體或免疫黏附素。在一較佳實施例中，僅將抗ALK-1抗體之可變結構域連接至該多肽。在另一較佳實施例中，以使得 V_H 及 V_L 結構域彼此相互作用以形成抗原結合位點之方式，將抗ALK-1抗體之 V_H 結構域連接至第一多肽，而將抗ALK-1抗體之 V_L 結構域連接至與第一多肽相關聯之第二多肽。在另一較佳實施例中，藉由一連接子將 V_H 結構域自 V_L 結構域分離，以使得 V_H 及 V_L 結構域可彼此相互作用(參見下文之Single Chain Antibodies)。接著將 V_H -連接子- V_L 抗體連接至所關注之多肽。此外，可產生融合抗體，其中兩個(或兩個以上)單鏈抗體彼此連接。若希望於單一多肽鏈上產生二價或多價抗體，或若希望產生雙特異性抗體，則此為適用的。

為產生單鏈抗體，將編碼 V_H 及 V_L 之DNA片段(scFv)可操作性地連接至編碼彈性連接子(例如編碼胺基酸序列(Gly₄-

Ser₃))之另一片段，以使得V_H及V_L序列可表現為連續之單鏈蛋白質，其中V_L及V_H結構域係以彈性連接子接合。參見例如 Bird 等人，*Science* 242:423-426 (1988)；Huston 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)；McCafferty 等人，*Nature* 348:552-554 (1990)。若僅使用單一V_H及V_L，則單鏈抗體可為單價；若使用兩個V_H及V_L，則為二價；或若使用兩個以上之V_H及V_L，則為多價。可產生特異性結合至 ALK-1 或另一分子之雙特異性或多價抗體。

在其他實施例中，可使用編碼核酸分子之抗 ALK-1 抗體製備其他經修飾抗體。例如，可根據本說明書之教示，使用標準分子生物學技術製備"κ體"(Ill 等人，*Protein Eng.* 10: 949-57 (1997))；"微型體"(Martin 等人，*EMBO J.* 13: 5303-9 (1994))；"雙功能抗體"(Holliger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993))；或"Janusin"(Traunecker 等人，*EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) 及 Traunecker 等人，*Int. J. Cancer* (增刊) 7:51-52 (1992))。

可藉由各種方法產生雙特異性抗體或抗原結合片段，包括融合瘤之融合或 Fab' 片段之連接。參見例如 Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny 等人，*J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)。此外，雙特異性抗體可形成為"雙功能抗體"或"Janusin"。在某些實施例中，雙特異性抗體結合至 ALK-1 之兩個不同之抗原決定基。在某些實施例中，雙特異性抗體具有來自單株抗



體 1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1或5.59.1之第一重鏈及第一輕鏈及額外之抗體重鏈及輕鏈。在某些實施例中，該額外輕鏈及重鏈亦來自上文辨識之單株抗體之一，但不同於第一重鏈及輕鏈。

在某些實施例中，使用來自本文提供之人類抗ALK-1單株抗體之一或多個可變結構域或CDR區來製備上述經修飾之抗體。

衍生及標記抗體

本發明之抗ALK-1抗體或抗原結合部分可為衍生的或連接至另一分子(例如另一種肽或蛋白質)。一般而言，抗體或其部分為衍生的，以使得ALK-1結合不受衍生或標記之不利影響。因此，預期本發明之抗體或抗體部分包括本文所述之完整或經修飾形式之人類抗ALK-1抗體。例如，本發明之抗體或抗體部分可功能性地連接(藉由化學偶合、遺傳性融合、非共價締合或其他)至可介導抗體或抗體部分與另一分子(諸如抗生蛋白鏈菌素核心區或聚組胺酸標記)締合之一或多個其他分子實體，諸如另一抗體(例如，雙特異性抗體或雙功能抗體)；偵測劑；醫藥劑及/或蛋白質或肽。

藉由使兩種或兩種以上抗體(相同類型或不同類型，例

如以產生雙特異性抗體)交聯而產生一種類型之衍生抗體。合適交聯劑包括彼等為異雙功能性(具有由適當間隔劑(例如，間馬來醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯)分離之兩個不同反應基)或同雙功能性(例如二琥珀醯亞胺基辛二酸酯)者。該等連接子可購自Pierce Chemical Company, Rockford, IL。

另一類型之衍生抗體係經標記抗體。本發明之抗體或抗原結合部分可以其衍生之適用偵測劑包括螢光化合物，其包括螢光素、螢光素異硫氰酸酯、若丹明、5-二甲基胺-1-萘磺醯氯、藻紅素、銅系磷光體及其類似物。亦可由適用於偵測之酶來標記抗體，該等酶諸如辣根過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶、葡萄糖氧化酶及其類似物。當由可偵測酶來標記抗體時，其係藉由添加額外試劑來偵測，酶使用該等試劑以產生可辨別之反應產物。例如，當存在藥劑辣根過氧化物酶時，添加過氧化氫及二胺基聯苯胺導致可偵測之有色反應產物。亦可由生物素來標記抗體，且經由間接量測抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素結合來偵測。亦可由藉由二次報導體辨識之預定多肽抗原決定基(例如，白胺酸拉鏈對序列、二次抗體之結合位點、金屬結合結構域、抗原決定基標記)來標記抗體。在某些實施例中，可藉由不同長度之間隔臂來黏附標記以降低可能之位阻。

亦可以諸如聚乙二醇(PEG)、甲基或乙基或碳水化合物基團之化學基團來衍生抗ALK-1抗體。該等基團適用於改

良抗體之生物特徵，例如用於增加血清半衰期。

醫藥組合物及投藥

本發明亦係關於一種用於治療與哺乳動物(包括人類)中不合乎需要之血管生成增加相關聯之病況的醫藥組合物，其包含可有效治療該等病況之量的如本文所述之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分及醫藥學上可接受之載劑。

本發明之抗體及抗原結合部分可併入適用於對受檢者投藥之醫藥組合物中。該醫藥組合物一般包含本發明之抗體或抗原結合部分及醫藥學上可接受之載劑。如本文所使用之"醫藥學上可接受之載劑"意謂生理上相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗菌劑及抗真菌劑、等張及吸收延緩劑及其類似物。醫藥學上可接受之載劑之某些實例為水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似物，以及其組合。在諸多情況下，較佳為在組合物中包括等張劑，例如糖類、多元醇類(諸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化鈉。醫藥學上可接受之物質之額外實例為增強抗體存放期或有效性之濕潤劑或微量助劑物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑。

本發明之組合物可為例如液體、半固體或固體劑型之多種形式，諸如液體溶液(例如可注射及可注入溶液)，分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、散劑、脂質體及栓劑。較佳形式視預期之投藥模式及治療應用而定。典型較佳組合物為可注射或可注入溶液之形式，諸如類似於彼等用於人類被動免疫者之組合物。較佳投藥模式為非經腸(例如靜脈

內、皮下、腹膜內、肌肉內)。在較佳實施例中，藉由靜脈內輸注或注射投與抗體。在另一較佳實施例中，藉由肌肉內或皮下注射投與抗體。用於注射之調配物可以單位劑型存在於例如添加有或未添加防腐劑之安瓶或多劑量容器中。該等組合物於油性或水性媒劑中可呈現諸如懸浮液、溶液或乳液之形式，且可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑之調配劑。或者，活性成份於使用之前可為粉末形式，以與例如無菌無熱原質水之合適媒劑組合。

治療組合物在製造及儲存條件下一般必須為無菌且穩定的。可將該組合物調配為適合高藥物濃度之溶液、微乳液、分散液、脂質體或其他有序結構。可藉由視需要向含有以上列舉成份之一或其組合之適當溶劑中併入所需量之抗ALK-1抗體，繼而過濾殺菌來製備無菌可注射溶液。通常藉由向含有來自以上列舉彼等之鹼性分散介質及所需其他成份之無菌媒劑中併入活性化合物來製備分散液。在用於製備無菌可注射溶液之無菌散劑的情況下，較佳之製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥，其產生活性成份加來自其先前無菌過濾溶液之任何額外所要成份之散劑。例如，可藉由使用諸如卵磷脂之包衣，藉由在分散液之情況下保持所要之粒度且藉由使用界面活性劑來維持溶液之合適流動性。可藉由在組合物中包括延緩吸附之藥劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)而引起可注射組合物之吸收延長。

儘管對於許多治療應用而言，較佳之投藥途徑/模式為皮下、肌肉內或靜脈內輸注，但本發明之抗體或抗體部分



可藉由此項技術中已知之多種方法來投與。如熟習此項技術者應瞭解，投藥途徑及/或模式將視所要結果而變化。

在特定實施例中，可製備含有載劑之本發明之抗體組合物，該載劑可保護抗體免於快速釋放，諸如受控釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微封裝傳遞系統。可使用可生物降解之生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。熟習此項技術者通常已知多種製備該等調配物之方法。參見例如以引用的方式併入本文之 **Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems** J. R. Robinson編，Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

亦可將額外活性化合物併入組合物中。在特定實施例中，將本發明之抑制性抗ALK-1抗體與一或多種額外之治療劑共調配及/或共投藥。該等藥劑包括(但不限於)結合其他靶之抗體、抗腫瘤劑、抗血管生成劑、信號轉導抑制劑、抗增生劑、化學治療劑或抑制抗ALK-1之肽類似物。該等組合療法可能需要較低劑量之抑制性抗ALK-1抗體以及共投藥劑，因此避免與各種單一療法相關聯之可能毒性或併發症。

如上所述，除螯合劑以外，本發明之組合物可另外包含醫藥學上可接受之抗氧化劑。合適之抗氧化劑包括(但不限於)甲硫胺酸、硫代硫酸鈉、催化酶及鉑。

例如，該組合物可含有濃度介於1 mM至約100 mM之間，且詳言之為約27 mM之甲硫胺酸。例如，水性調配物

可為：10 mg/mL 抗 ALK-1 抗體、pH 為 5.5 之 20 mM 組胺酸、84 mg/mL 二水合海藻糖、0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 80、0.05 mg/mL 之 EDTA 二鈉、0.1 mg/mL 之 L-甲硫胺酸。

本發明之組合物可包括"治療有效量"或"預防有效量"之本發明之抗體或抗原結合部分。"治療有效量"係指以需要之劑量及時間段有效達成所要治療結果之量。抗體或抗原結合部分之治療有效量可根據諸如疾病狀態、年齡、性別及個體體重及抗體或抗體部分在個體中引發所要反應之能力的因素而變化。治療有效量亦為其中治療有益效應超過抗體或抗原結合部分之任何毒性或有害效應者。"預防有效量"係指以需要之劑量及時間段有效達成所要預防結果之量。由於預防劑量通常係於疾病之前或早期時對受檢者使用，因此預防有效量可小於治療有效量。

可調整給藥方案以提供所要之最佳反應(例如，治療或預防反應)。例如，可投與單次劑量，可隨時間投與若干分次劑量或可如緊急治療狀況所指示預防性減少或增加劑量。尤其有利的是調配單位劑型之非經腸組合物以供易於投藥及劑量之均一化。如本文所使用之單位劑型係指適用於作用於待治療哺乳動物受檢者之整體劑量的物理離散單位，每一單位均含有經計算以產生所要治療效應之預定量的活性化合物以及所要之醫藥載劑。對於本發明單位劑型之說明係由(a)抗 ALK-1 抗體或其部分之獨特特徵及欲達成之特定治療或預防效應及(b)在混配用於治療個體敏感性之該抗體之技術中固有的限制來指示及直接取決於此。



本發明抗體或抗體部分之治療或預防有效量之例示性非限制性範圍為 0.025 至 50 mg/kg，更佳為 0.1 至 50 mg/kg，更佳為 0.1-25、0.1 至 10 或 0.1 至 3 mg/kg。在某些實施例中，調配物於 pH 為 5.5 之 20 mM 檸檬酸鈉、140 mM NaCl 及 0.2 mg/mL 聚山梨醇酯 80 之緩衝液中含有 5 mg/mL 抗體。應注意，劑量值可隨待緩解病症之類型及嚴重性而變化。應進一步瞭解，對於任何特定受檢者而言，應根據個體需要及投與或監控該等組合物投藥者之專業判斷，隨時間調整具體給藥方案，且本文列出之劑量範圍僅為例示性的且不意欲限制所主張組合物之範疇或實踐。

本發明之另一態樣提供包含本發明之抗 ALK-1 抗體或抗原結合部分或包含此抗體或部分之組合物的套組。除抗體或組合物之外，套組可包括診斷或治療劑。套組亦可包括用於診斷或治療方法中之說明。在一較佳實施例中，套組包括可用於下述方法中之抗體或包含其之組合物及診斷劑。在另一較佳實施例中，套組包括可用於下述方法中之抗體或包含其之組合物及一或多種治療劑。

使用之診斷方法

抗 ALK-1 抗體或其抗原結合部分可用於診斷方法中以於活體外或活體內偵測生物樣本中之 ALK-1。例如，抗 ALK-1 抗體可用於習知免疫檢定法中，其包括（但不限於）ELISA、RIA、流式細胞儀、組織免疫組織化學法、西方墨點法或免疫沉澱法。本發明之抗 ALK-1 抗體可用於偵測來自人類之 ALK-1。抗 ALK-1 抗體亦可用於偵測來自其

他靈長類動物(例如，食蟹猴)之ALK-1。

本發明提供一種用於偵測生物樣本中之ALK-1之方法，其包含使生物樣本與本發明之抗ALK-1抗體接觸且偵測結合抗體。在一實施例中，抗ALK-1抗體係以可偵測標記直接標記。在另一實施例中，抗ALK-1抗體(第一抗體)未經標記，且可結合抗ALK-1抗體之第二抗體或其他分子經標記。如熟習此項技術者所熟知，選擇可特異性結合特定物種及種類之第一抗體的第二抗體。例如，若抗ALK-1抗體為人類IgG，則第二抗體可為抗人類IgG。可結合至抗體之其他分子包括(但不限於)蛋白質A及蛋白質G，二者均可購自例如Pierce Chemical Co.。

先前已描述抗體或二次抗體之合適標記，且其包括各種酶、輔基、螢光材料、發光材料及放射性材料。合適酶之實例包括辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；合適輔基複合物之實例包括抗生蛋白鏈菌素/生物素及抗生物素蛋白/生物素；合適螢光材料之實例包括傘酮、螢光素、螢光素異硫氰酸酯、若丹明、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯或藻紅素；發光材料之實例包括魯米諾(luminol)；且合適放射性材料之實例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

在其他實施例中，可藉由利用以可偵測物質標記之ALK-1標準物及未經標記之抗ALK-1抗體的競爭免疫檢定法檢定生物樣本中之ALK-1。在該檢定中，組合生物樣本、經標記ALK-1標準物及抗ALK-1抗體且判定結合至未

經標記抗體之經標記ALK-1標準物的量。生物樣本中ALK-1之量與結合至抗ALK-1抗體之經標記ALK-1標準物之量成反比。

可使用上文揭示之免疫檢定法用於多種目的。例如，抗ALK-1抗體可用於偵測培養細胞中之ALK-1。在一較佳實施例中，抗ALK-1抗體用於判定由以不同化合物處理之細胞產生之ALK-1的量。該方法可用於識別調節ALK-1蛋白質含量之化合物。根據此方法，以測試化合物處理細胞之一個樣本歷時一段時間且使另一樣本保持未經處理。若欲量測ALK-1之總含量，則將該等細胞溶解且使用上述免疫檢定法中之一種來量測ALK-1總含量。比較經處理細胞與未經處理細胞中之ALK-1總含量以判定測試化合物之效應。

用於量測ALK-1總含量之較佳免疫檢定法為流式細胞儀或免疫組織化學法。此項技術中熟知諸如ELISA、RIA、流式細胞儀、西方墨點法、免疫組織化學法、整體膜蛋白質之細胞表面標記法及免疫沉澱法之方法。參見例如前述之Harlow及Lane。此外，對於高通量篩檢而言，可成比例增加免疫檢定以測試大量化合物之ALK-1表現之活化作用或抑制作用。

本發明之抗ALK-1抗體亦可用於判定組織或自該組織衍生之細胞中之ALK-1含量。在某些實施例中，組織為患病組織。在該方法之某些實施例中，自患者切除組織或其活檢體。接著將該組織或活檢體用於免疫檢定中以藉由上文

論述之方法判定例如 ALK-1 總含量或 ALK-1 之定位。

本發明之抗體亦可用於活體內識別表現 ALK-1 之組織及器官。使用本發明之人類抗 ALK-1 抗體的一種有利之處在於，與非人類來源之抗體或人化或嵌合抗體不同，其可於活體內安全使用，而在投藥時不對抗體引發實質性免疫反應。

該方法包含以下步驟：向需要此診斷測試之患者投與可偵測性標記之抗 ALK-1 抗體或包含其之組合物，且使患者經受成像分析以判定 ALK-1 表現組織之位置。醫藥技術中熟知成像分析，且其包括(但不限於)x光分析、磁共振成像(MRI)或電腦斷層攝影術(CT)。可由適用於活體內成像之任何藥劑來標記抗體，該藥劑例如可用於x光分析之對比劑，諸如鋇；或可用於MRI或CT之磁性對比劑，諸如釷螯合劑。其他標記劑包括(但不限於)放射性同位素，諸如⁹⁹Tc。在另一實施例中，抗 ALK-1 抗體將未經標記且將藉由投與可偵測且可結合抗 ALK-1 抗體之第二抗體或其他分子而成像。在一實施例中，可自患者獲得活檢體來判定所關注組織是否表現 ALK-1。

使用之治療方法

在另一實施例中，本發明提供一種藉由向有此需要之患者投與抗 ALK-1 抗體來抑制 ALK-1 活性之方法。本文所述之任何抗體或其抗原結合部分均可治療性使用。在一較佳實施例中，抗 ALK-1 抗體為人類、嵌合或人化抗體。在另一較佳實施例中，抗 ALK-1 抗體為人類抗體且患者為人類



患者。或者，患者可為表現與抗ALK-1抗體交叉反應之ALK-1的哺乳動物。為獸醫學之目的或作為人類疾病之動物模型，可將抗體投與至表現與該抗體交叉反應之ALK-1之非人類哺乳動物(例如食蟹猴)。該等動物模型可適用於評估本發明抗體之治療功效。

在另一實施例中，可將抗ALK-1抗體或其抗體部分投與至表現不適當高含量ALK-1之患者。該抗體可投與一次，但更佳為投與多次。該抗體可以每日三次至每六個月或更久一次來投與。可以諸如每日三次、每日兩次、每日一次、每兩天一次、每三天一次、每週一次、每兩週一次、每月一次、每兩個月一次、每三個月一次及每六個月一次之進程進行投藥。抗體亦可經由一微型泵連續投與。抗體可經由黏膜、口腔、鼻內、吸入、靜脈內、皮下、肌肉內、非經腸或瘤內途徑來投與。該抗體可投與一次、至少兩次或歷經之時間段至少為直至病症得以治療、減輕或治癒。通常投與抗體歷時該病症存在之久。該抗體通常作為如前述醫藥組合物之部分而投與。抗體劑量通常在0.1至100 mg/kg之範圍內，更佳為0.5至50 mg/kg，更佳為1至20 mg/kg，且甚至更佳為1至10 mg/kg。可由此項技術中已知之任何方法來量測抗體之血清濃度。

在一實施例中，將抗體於調配物中作為無菌水溶液來投與，該無菌水溶液具有介於約5.0至約6.5之間之pH值且包含約1 mg/ml至200 mg/ml之抗體、約1毫莫耳至約100毫莫耳之組胺酸緩衝劑、約0.01 mg/ml至約10 mg/ml之聚山梨

醇酯 80、約 100 毫莫耳至約 400 毫莫耳之海藻糖及約 0.01 毫莫耳至約 1.0 毫莫耳之二水合 EDTA 二鈉。

本發明進一步涵蓋可將本文之任何組合物投與至易感或患有與血管生成增加相關聯之病症("血管生成症")的患者。

藉由本發明之組合物/方法可治療/預防之血管生成症之實例包括(但不限於)癌症(實體及血液科)、年齡相關之黃斑退化(AMD)、發育異常(器官形成)、糖尿病性失明、子宮內膜異位、眼新生血管生成、牛皮癬、類風濕性關節炎(RA)及皮膚失色(例如,血管瘤、鮮紅斑痣或單純性斑痣)。

例如,本發明係關於使用本文之任何組合物/方法治療或預防與眼新生血管生成相關聯之病症的方法。與眼新生血管生成相關聯之病症包括(但不限於)糖尿病性視網膜病變、年齡相關之黃斑退化("ARMD")、視網膜青光眼、間質性角膜炎、早產兒視網膜病、缺血性視網膜病(例如鐮狀細胞性)、病理性近視、眼組織漿菌症、翼狀贅肉、點狀內脈絡膜病變(punctate inner choroidopathy)及其類似病症。

異常細胞生長之治療

本發明亦係關於一種治療哺乳動物(包括人類)中異常細胞生長之方法,其包含向該哺乳動物投與對於治療異常細胞生長而言有效之治療有效量之如本文所述之抗 ALK-1 抗體或其抗原結合部分。



在該方法之一實施例中，異常細胞生長為癌症，其包括(但不限於)間皮瘤、肝膽癌(肝及膽管)、原發性或繼發性CNS腫瘤、原發性或繼發性腦瘤、肺癌(NSCLC及SCLC)、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚或眼內黑素瘤、卵巢癌、結腸癌、直腸癌、肛門區癌症、胃癌、腸胃癌(胃、結腸直腸及十二指腸)、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、陰門癌、霍奇金氏(Hodgkin's)病、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、睪丸癌、慢性或急性白血症、慢性骨髓白血症、淋巴細胞淋巴瘤、膀胱癌、腎癌或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、脊椎腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、腎上腺皮質癌、膽囊癌、多發性骨髓瘤、膽管癌、纖維肉瘤、神經母細胞瘤、視網膜母細胞瘤或一或多種前述癌症之組合。

在本發明之一較佳實施例中，癌症係選自肺癌(NSCLC及SCLC)、頭頸部癌、卵巢癌、結腸癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌、乳癌、腎癌及輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、脊椎腫瘤或一或多種前述癌症之組合。

在本發明之另一較佳實施例中，癌症係選自肺癌(NSCLC及SCLC)、卵巢癌、結腸癌、直腸癌、肛門區癌或一或多種前述癌症之組合。

在該方法之另一實施例中，該異常細胞生長為良性增生性疾病，其包括(但不限於)牛皮癬、良性前列腺肥大或再狹窄。

本發明亦係關於一種治療哺乳動物中異常細胞生長之方法，其包含向該哺乳動物投與對治療異常細胞生長有效量之如本文所述之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分與抗腫瘤劑之組合，該抗腫瘤劑係選自由以下藥劑組成之群：有絲分裂抑制劑、烷基化劑、抗代謝物、中間抗生素、生長因子抑制劑、細胞週期抑制劑、酶類、拓撲異構酶抑制劑、生物反應改質劑、抗體、細胞毒素、抗激素及抗雄激素。

本發明亦係關於一種用於治療哺乳動物(包括人類)中之異常細胞生長的醫藥組合物，其包含對治療異常細胞生長有效量之如本文所述之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分與醫藥學上可接受之載劑及抗腫瘤劑之組合，該抗腫瘤劑係選自由以下藥劑組成之群：有絲分裂抑制劑、烷基化劑、抗代謝物、中間抗生素、生長因子抑制劑、細胞週期抑制劑、酶類、拓撲異構酶抑制劑、生物反應改質劑、抗激素及抗雄激素。

本發明亦係關於一種治療哺乳動物中之過度增生性病徵之方法，其包含向該哺乳動物投與治療有效量之如本文所述之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分與抗腫瘤劑之組合，該抗腫瘤劑係選自由以下藥劑組成之群：抗增生劑、激酶抑制劑、血管生成抑制劑、生長因子抑制劑、cox-I抑制劑、cox-II抑制劑、有絲分裂抑制劑、烷基化劑、抗代謝



物、中間抗生素、生長因子抑制劑、輻射物、細胞週期抑制劑、酶類、拓撲異構酶抑制劑、生物反應改質劑、抗體、細胞毒素、抗激素、抑制素及抗雄激素。

在本發明之一實施例中，結合本文所述之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分及醫藥組合物使用之抗腫瘤劑為抗血管生成劑、激酶抑制劑、pan激酶抑制劑或生長因子抑制劑。較佳之pan激酶抑制劑包括美國專利第6,573,293號(Pfizer, Inc, NY, USA)中所述之舒尼替尼(Sutent)(Pfizer Inc., SU-11248)。

抗血管生成劑包括(但不限於)以下藥劑，諸如EGF抑制劑、EGFR抑制劑、VEGF抑制劑、VEGFR抑制劑、TIE2抑制劑、IGF1R抑制劑、COX-II(環氧合酶II)抑制劑、MMP-2(基質金屬蛋白酶2)抑制劑及MMP-9(基質金屬蛋白酶9)抑制劑。較佳VEGF抑制劑包括例如阿瓦斯丁(Avastin)(貝伐單抗(bevacizumab))，其為South San Francisco, California之Genentech, Inc.的抗VEGF單株抗體。

額外VEGF抑制劑包括CP-547,632(Pfizer Inc., NY, USA)、阿西替尼(Axitinib)(Pfizer Inc.; AG-013736)、ZD-6474(AstraZeneca)、AEE788(Novartis)、AZD-2171、VEGF Trap(Regeneron/Aventis)、凡塔藍尼(Vatalanib)(亦稱為PTK-787、ZK-222584: Novartis & Schering AG)、麥可淨(Macugen)(哌加他尼鈉(pegaptanib octasodium)、NX-1838、EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech)、IM862(Kirkland, Washington, USA之Cytran Inc.)；及安基核酶

(angiozyme)(其為來自Ribozyme(Boulder, Colorado)及Chiron(Emeryville, California)之一種合成核酶)及其組合。適用於實踐本發明之VEGF抑制劑係揭示於美國專利第6,534,524號及第6,235,764號中，二者全文為所有目的併入本文。尤其較佳之VEGF抑制劑包括CP-547,632、AG13736、凡塔藍尼、麥可淨及其組合。

額外VEGF抑制劑係描述於例如WO 99/24440(於1999年5月20日公開)、PCT國際申請案PCT/IB99/00797(於1999年5月3日申請)、WO 95/21613(於1995年8月17日公開)、WO 99/61422(於1999年12月2日公開)、美國專利第6,534,524號(揭示AG13736)、美國專利第5,834,504號(於1998年11月10日頒佈)、WO 98/50356(於1998年11月12日公開)、美國專利第5,883,113號(於1999年3月16日頒佈)、美國專利第5,886,020號(於1999年3月23日頒佈)、美國專利第5,792,783號(於1998年8月11日頒佈)、美國專利第US 6,653,308號(於2003年11月25日頒佈)、WO 99/10349(於1999年3月4日公開)、WO 97/32856(於1997年9月12日公開)、WO 97/22596(於1997年6月26日公開)、WO 98/54093(於1998年12月3日公開)、WO 98/02438(於1998年1月22日公開)、WO 99/16755(於1999年4月8日公開)及WO 98/02437(於1998年1月22日公開)中，其所有之全文均以引用的方式併入本文。

可與本發明之抗體或其抗原結合部分一起使用之其他抗增生劑包括法呢基蛋白質轉移酶抑制劑及受體酪胺酸激酶



PDGFr抑制劑，其包括於以下美國專利申請案中揭示及主張之化合物：09/221946(於1998年12月28日申請)、09/454058(於1999年12月2日申請)、09/501163(於2000年2月9日申請)、09/539930(於2000年3月31日申請)、09/202796(於1997年5月22日申請)、09/384339(於1999年8月26日申請)及09/383755(於1999年8月26日申請)；及於以下美國臨時專利申請案中揭示及主張之化合物：60/168207(於1999年11月30日申請)、60/170119(於1999年12月10日申請)、60/177718(於2000年1月21日申請)、60/168217(於1999年11月30日申請)及60/200834(於2000年5月1日申請)。各前述專利申請案及臨時專利申請案之全文係以引用的方式併入本文。

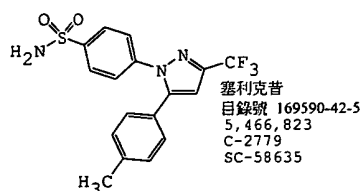
對於額外PDGRr抑制劑而言，參見於2001年7月7日公開之WO 01/40217及於2004年3月11日公開之WO 2004/020431，其內容之全文為所有目的而併入。較佳之PDGFr抑制劑包括Pfizer之CP-868,596及其醫藥學上可接受之鹽。

較佳GARF抑制劑包括Pfizer之AG-2037(派利卻佐(pelitrexol)及其醫藥學上可接受之鹽)。適用於實踐本發明之GARF抑制劑係揭示於其全文為所有目的而併入之美國專利第5,608,082號中。

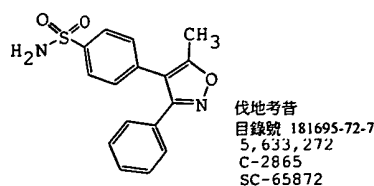
可結合如本文所述之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分及本文所述之醫藥組合物而使用之適用COX-II抑制劑之實例包括CELEBREXTM(塞利克西(celecoxib))、帕瑞考昔

(parecoxib)、德拉昔布(deracoxib)、ABT-963、MK-663(依託昔布(etoricoxib))、COX-189(盧米羅可(Lumiracoxib))、BMS 347070、RS 57067、NS-398、Bextra(伐地考昔(valdecoxib))、帕雷考昔(paracoxib)、Vioxx(羅非考昔(rofecoxib))、SD-8381、4-甲基-2-(3,4-二甲基苯基)-1-(4-胺磺醯基-苯基)-1H-吡咯、2-(4-乙氧基苯基)-4-甲基-1-(4-胺磺醯基苯基)-1H-吡咯、T-614、JTE-522、S-2474、SVT-2016、CT-3、SC-58125及Arcoxia(依託昔布)。對於額外之COX-II抑制劑而言，參見其內容之全文為所有目的而併入之美國專利申請案第10/801,446號及第10/801,429號。

在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為塞利克西，參見其內容之全文為所有目的而以引用的方式併入之美國專利第5,466,823號。塞利克西之結構展示如下：

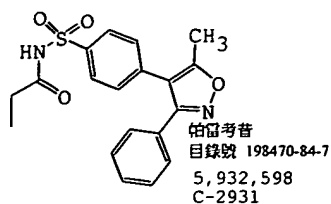


在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為伐地考昔(valecoxib)，參見其內容之全文為所有目的而以引用的方式併入之美國專利第5,633,272號。伐地考昔之結構展示如下：

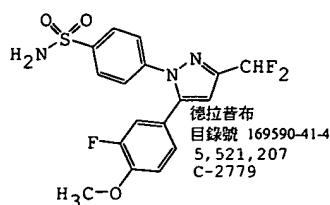


在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為帕瑞考昔，參見其內容之全文為所有目的而以引用的方式併入之美國專利第

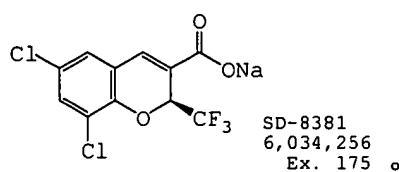
5,932,598號。帕雷考昔之結構展示如下：



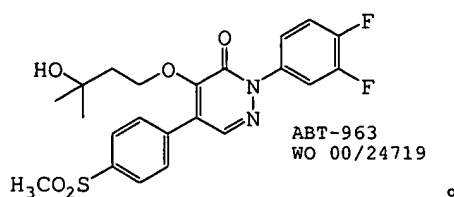
在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為德拉昔布，參見其內容之全文為所有目的而以引用的方式併入之美國專利第5,521,207號。德拉昔布之結構展示如下：



在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為SD-8381，參見其內容之全文為所有目的而以引用的方式併入之美國專利第6,034,256號。SD-8381之結構展示如下：



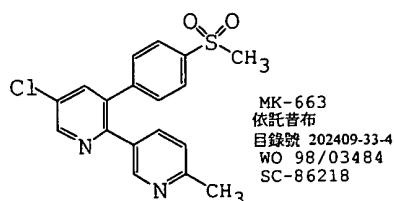
在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為ABT-963，參見其內容之全文為所有目的而以引用的方式併入之國際公開案號WO 2002/24719。ABT-963之結構展示如下：



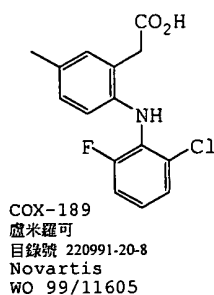
在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為如下展示之羅非考昔：



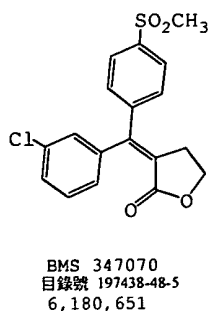
在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為MK-663(依託昔布)，參見其內容之全文為所有目的而以引用的方式併入之國際公開案號WO 1998/03484。依託昔布之結構展示如下：



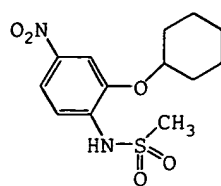
在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為COX-189(盧米羅可)，參見其內容之全文為所有目的而以引用的方式併入之國際公開案號WO 1999/11605。盧米羅可之結構展示如下：



在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為BMS-347070，參見其內容之全文為所有目的而以引用的方式併入之美國專利第6,180,651號。BMS-347070之結構展示如下：

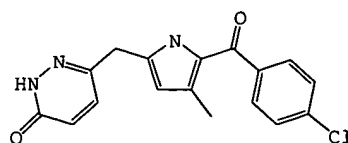


在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為NS-398(目錄號123653-11-2)。NS-398(目錄號123653-11-2)之結構展示如下：



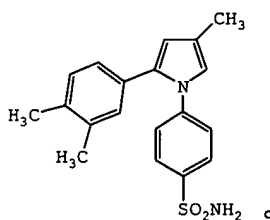
NS-398
目錄號 123653-11-2

在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為RS 57067(目錄號17932-91-3)。RS 57067(目錄號17932-91-3)之結構展示如下：

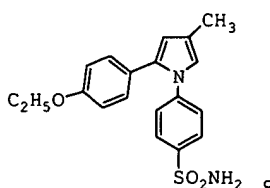


RS 57067
目錄號 17932-91-3

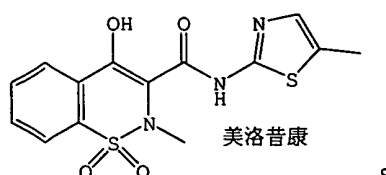
在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為4-甲基-2-(3,4-二甲基苯基)-1-(4-胺磺醯基-苯基)-1H-吡咯。4-甲基-2-(3,4-二甲基苯基)-1-(4-胺磺醯基-苯基)-1H-吡咯之結構展示如下：



在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為2-(4-乙氧基苯基)-4-甲基-1-(4-胺磺醯基苯基)-1H-吡咯。2-(4-乙氧基苯基)-4-甲基-1-(4-胺磺醯基苯基)-1H-吡咯之結構展示如下：



在一較佳實施例中，抗腫瘤劑為美洛昔康(meloxicam)。
美洛昔康之結構展示如下：



適用作結合本發明之抗體及本文所述之醫藥組合物使用之抗腫瘤藥劑的其他抑制劑包括阿斯匹靈(aspirin)且抑制產生前列腺素而導致前列腺素含量較低之酶(環氧合酶I及II)之非類固醇消炎藥(NSAID)，其包括(但不限於)以下：雙水楊酸酯(Amigesic)、二氟尼柳(Diflunisal)(Dolobid)、布洛芬(Ibuprofen)(Motrin)、酮洛芬(Ketoprofen)(Orudis)、萘丁美酮(Nabumetone)(Relafen)、吡羅昔康(Piroxicam)(Feldene)、萘普生(Naproxen)(Aleve, Naprosyn)、雙氯芬酸(Diclofenac)(Voltaren)、吲哚美辛(Indomethacin)(Indocin)、舒林酸(Sulindac)(Clinoril)、托美汀(Tolmetin)(Tolectin)、依託度酸(Etodolac)(Lodine)、酮絡酸(Ketorolac)(Toradol)、奧沙普嗪(Oxaprozin)(Daypro)及其組合。較佳之COX-I抑制劑包括布洛芬(Motrin)、努普林(nuprin)、萘普生(Aleve)、吲哚美辛(Indocin)、萘丁美酮(Relafen)及其組合。

結合如本文所述之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分及如本文所述之其醫藥組合物使用之標靶劑包括EGFr抑制劑，諸如Iressa(吉非替尼(gefitinib)，AstraZeneca)、它賽瓦(Tarceva)(埃羅替尼(erlotinib)或OSI-774，OSI Pharmaceuticals



Inc.)、Erbix(西妥昔單抗(cetuximab)，Imclone Pharmaceuticals、Inc.)、EMD-7200(Merck AG)、ABX-EGF(Amgen Inc.及Abgenix Inc.)、HR3(Cuban Government)、IgA 抗體 (University of Erlangen-Nuremberg)、TP-38 (IVAX)、EGFR融合蛋白質、EGF-疫苗、抗-EGFr免疫微脂囊(Hermes Biosciences Inc.)及其組合。

較佳之EGFr抑制劑包括易瑞沙、艾比特思、它賽瓦及其組合。

本發明亦係關於選自 pan erb受體抑制劑或ErbB2受體抑制劑之抗腫瘤劑，諸如CP-724,714(Pfizer, Inc.)、CI-1033(可尼替布(canertinib)，Pfizer, Inc.)、赫賽汀(Herceptin)(曲妥珠單抗(trastuzumab)，Genentech Inc.)、Omitarg(2C4，帕妥珠單抗(pertuzumab)，Genentech Inc.)、TAK-165(Takeda)、GW-572016(羅那伐布(lonafarnib)，GlaxoSmithKline)、GW-282974(GlaxoSmithKline)、EKB-569(Wyeth)、PKI-166(Novartis)、dHER2(HER2疫苗，Corixa及GlaxoSmithKline)、APC8024(HER2疫苗，Dendreon)、抗-HER2/neu雙特異性抗體(Decof Cancer Center)、B7.her2.IgG3(Agensys)、AS HER2(Research Institute for Rad Biology & Medicine)、三功能性雙特異性抗體(University of Munich)及mAB AR-209(Aronex Pharmaceuticals Inc)及mAB 2B-1(Chiron)及其組合。較佳之erb選擇性抗腫瘤劑包括赫賽汀、TAK-165、CP-724,714、ABX-EGF、HER3及其組合。較佳之 pan erbb受體抑制劑包括

GW572016、CI-1033、EKB-569及Omitarg及其組合。

額外之erbB2抑制劑包括WO 98/02434(於1998年1月22日公開)、WO 99/35146(於1999年7月15日公開)、WO 99/35132(於1999年7月15日公開)、WO 98/02437(於1998年1月22日公開)、WO 97/13760(於1997年4月17日公開)、WO 95/19970(於1995年7月27日公開)、美國專利第5,587,458號(於1996年12月24日頒佈)及美國專利第5,877,305號(於1999年3月2號頒佈)(其各自之全文以引用的方式併入本文)中之彼等。對於適用於本發明之額外ErbB2受體抑制劑而言，參見美國專利第6,465,449號及第6,284,764號，及國際申請案號WO 2001/98277，其各自之全文係以引用的方式併入本文。

此外，其他抗腫瘤劑可選自以下藥劑：索拉非尼(Sorafenib)(Onyx Pharmaceuticals Inc.; BAY-43-9006)、根納三思(Genasense)(augmerosen, Genta)、帕尼單抗(Panitumumab)(Abgenix/Amgen)、澤娃靈(Zevalin)(Schering)、Bexxar(Corixa/GlaxoSmithKline)、阿巴瑞克(Abarelix)、力比泰(Alimta)、EPO 906(Novartis)、迪斯德莫來(discodermolide)(XAA-296)、ABT-510(Abbott)、鯊癌靈(Neovastat)(Aeterna)、安佐斯汀(enzastaurin)(Eli Lilly)、康姆伯勒斯汀(Combrestatin)A4P(Oxigene)、ZD-6126(AstraZeneca)、黃酮吡醇(flavopiridol)(Aventis)、CYC-202(Cyclacel)、AVE-8062(Aventis)、DMXAA(Roche/Antisoma)、諾拉曲特(Thymitaq)(Eximias)、特莫達(Temodar)(替莫



唑 胺 (temozolomide) , Schering Plough) 及 Revilimd (Celegene)及其組合。

其他抗腫瘤劑可選自以下藥劑：CyPat(乙酸環丙孕酮)、組胺瑞林(Histerelin)(乙酸組胺瑞林)、Plenaixis(阿巴瑞克(abarelix)儲槽)、阿曲生坦(Atrasentan)(ABT-627)、賽特鉑(Satraplatin)(JM-216)、thalomid(沙立度胺(Thalidomide))、賽拉托撲(Theratope)、泰米立芬(Temilifene)(DPPE)、ABI-007(紫杉醇(paclitaxel))、愛微斯塔(Evista)(雷洛昔芬raloxifene)、阿他美坦(Atamestane)(Biomed-777)、Xyotax(聚麩胺酸紫杉醇)、Targetin(貝卡洛汀(bexarotene))及其組合。

此外，其他抗腫瘤劑可選自以下藥劑：替紫酮(Trizaone)(替拉紫明(tirapazamine))、艾波新(Aposyn)(艾昔舒林(exisulind))、奈瓦斯塔(Nevastat)(AE-941)、塞普林(Ceplene)(二鹽酸組胺酸)、奧拉塞新(Orathecin)(盧比西康(rubitecan))、維如利金(Virulizin)、抗胃泌素疫苗(Gastrimmune)(G17DT)、DX-8951f(甲磺酸依喜替康(exatecan mesylate))、昂科內斯(Onconase(萊吡內斯(ranpirnase))、BEC2(咪托莫得(mitumoab))、Xcytrin(莫特沙芬釐(motexafin gadolinium))及其組合。

其他抗腫瘤劑可選自以下藥劑：CeaVac(CEA)、三甲曲沙(NeuTrexin)(三甲葡糖醛酸酯(trimetresate glucuronate))及其組合。額外抗腫瘤劑可選自以下藥劑：OvaRex(奧萊沃單抗(oregovomab))、奧昔單姆(Osidem)(IDM-1)及其組

合。額外抗腫瘤劑可選自以下藥劑：艾得新(Advexin)(ING 201)、替紫酮(替拉紫明)及其組合。額外抗腫瘤劑可選自以下藥劑：RSR13(乙丙昔羅(efaproxiral))、Cotara(131I chTNT 1/b)、NBI-3001(IL-4)及其組合。額外抗腫瘤劑可選自以下藥劑：康瓦新(Canvaxin)、GMK疫苗、PEG應特龍(Interon)A、他索瑞新(Taxoprexin)(DHA/太平洋紫杉醇)及其組合。其他較佳抗腫瘤劑包括Pfizer之MEK1/2抑制劑PD325901、Array Biopharm之MEK抑制劑ARRY-142886、Bristol Myers之CDK2抑制劑BMS-387,032、Pfizer之CDK抑制劑PD0332991及AstraZeneca之AXD-5438及其組合。此外，亦可利用mTOR抑制劑，諸如CCI-779(Wyeth)及雷帕黴素(rapamycin)衍生物RAD001(Novartis)及AP-23573(Ariad)、HDAC抑制劑SAHA(Merck Inc./Aton Pharmaceuticals)及其組合。額外抗腫瘤劑包括歐若拉(aurora)2抑制劑VX-680(Vertex)、Chk1/2抑制劑XL844(Exilixis)。

可結合如本文所述之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分及如本文所述之其醫藥組合物來使用以下細胞毒性劑，該等細胞毒性劑例如為選自由以下各物組成之群之一或多者：表柔比星(epirubicin)(Ellence)、歐洲紫杉醇(docetaxel)(Taxotere)、太平洋紫杉醇、Zinecard(地拉佐生(dexrazoxane))、利妥單抗(rituximab)(Rituxan)、甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)(Gleevec)及其組合。

本發明亦涵蓋本發明之抗體及其抗原結合部分連同激素



療法之用途，該激素療法包括(但不限於)依西美坦(exemestane)(阿諾新(Aromasin)，Pfizer Inc.)、亮丙瑞林(leuporelin)(Lupron或Leuplin, TAP/Abbott/Takeda)、阿納托唑(anastrozole)(Arimidex，Astrazeneca)、戈舍瑞林(goserelin)(Zoladex，AstraZeneca)、多西骨化醇(doxercalciferol)、法屈唑(fadrozole)、福美斯坦(formestane)、檸檬酸他莫昔芬(tamoxifen citrate)(他莫昔芬，Nolvadex，AstraZeneca)、康士得(Casodex) (AstraZeneca)、阿巴瑞克(Abarelix)(Praecis)、Trelstar及其組合。

本發明亦係關於激素治療劑，諸如抗雌激素，其包括(但不限於)氟維司群(fulvestrant)、托瑞米芬(toremifene)、雷諾昔芬、拉索昔芬(lasofexifene)、來曲唑(Femara，Novartis)；抗雄激素，諸如比卡魯胺(bicalutamide)、氟他胺(flutamide)、米非司酮(mifepristone)、尼魯米特(nilutamide)、Casodex®(4'-氟基-3-(4-氟苯基磺醯基)-2-羥基-2-甲基-3'-(三氟甲基)丙醯苯胺，比卡魯胺)及其組合。

此外，本發明提供單獨或與一或多種輔助性護理產品組合之本發明之抗體，該等輔助性護理產品例如為選自由以下各物組成之群之產品：非格司亭(Filgrastim) (Neupogen)、恩丹西酮(ondansetron)(Zofran)、法安明(Fragmin)、普羅克裏特(Procrit)、阿羅昔(Aloxi)、艾曼得(Emend)或其組合。

尤其較佳之細胞毒性劑包括 Camptosar、Erbitux、Iressa、Gleevec、Taxotere及其組合。

以下拓撲異構酶I抑制劑可用作抗腫瘤劑：喜樹鹼 (camptothecin)、HCl 伊利替康 (Camptosar)、伊朵卡新 (edotecarin)、奧拉塞新 (orathecin)(Supergen)、伊喜替康 (Daiichi)、BN-80915(Roche)及其組合。尤其較佳之拓撲異構酶II抑制劑包括表柔比星(Ellence)。

本發明之抗體可與以下藥劑一起使用：抗腫瘤劑、烷基化劑、抗代謝物、抗生素、植物衍生之抗腫瘤劑、喜樹鹼衍生物、酪胺酸激酶抑制劑、其他抗體、干擾素及/或生物反應改質劑。

烷基化劑包括(但不限於)氮芥N-氧化物、環磷醯胺、異環磷醯胺、美法侖(melphalan)、白消胺(busulfan)、二溴甘露醇、卡巴醌(carboquone)、塞替派(thiotepa)、雷莫司汀(ranimustine)、尼莫司汀(nimustine)、替莫唑胺、AMD-473、六甲蜜胺(altretamine)、AP-5280、阿帕瑞醌(apaziquone)、波羅他新(brostallicin)、苯達莫司汀(bendamustine)、卡莫司汀(carmustine)、雌莫司汀(estramustine)、福莫司汀(fotemustine)、麩磷醯胺(glufosfamide)、異環磷醯胺、KW-2170、馬磷醯胺(mafosfamide)及二溴衛矛醇(mitolactol)；鉑配位之烷基化化合物包括(但不限於)順鉑、伯爾定(Paraplatin)(卡鉑(carboplatin))、依鉑(eptaplatin)、洛鉑(lobaplatin)、奈達鉑(nedaplatin)、樂沙定(Eloxatin)(奧沙利鉑(oxaliplatin), Sanofi)或沙曲鉑(satrplatin)及其組合。尤其較佳之烷基化劑包括樂沙定(奧沙利鉑)。



抗代謝物包括(但不限於)甲胺喋呤(methotrexate)、6-巰基嘌呤核苷、巰基嘌呤、單獨或與甲醯四氫葉酸組合之5-氟脲嘧啶(5-FU)、替加氟(tegafur)、UFT、氟鐵龍(doxifluridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、阿糖胞苷歐福斯佛(cytarabine ocfosfate)、依諾他濱(enocitabine)、S-1、Alimta(瑞美曲沙二鈉, LY231514, MTA)、Gemzar(吉西他汀(gemcitabine), Eli Lilly)、氟達他濱(fludarabin)、5-阿紫胞苷(azacitidine)、卡培他濱(capecitabine)、克拉屈濱(cladribine)、克羅拉濱(clofarabine)、地西他濱(decitabine)、依氟鳥胺酸(eflornithine)、乙炔基胞嘧啶核苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、羥基脲、TS-1、美法倫、奈拉濱(nelarabine)、諾拉曲特(nolatrexed)、ocfosfate、瑞美曲沙二鈉、噴司他丁(pentostatin)、pelitrexol、雷替曲塞(raltitrexed)、三阿平(triapine)、三甲曲沙(trimetrexate)、阿糖腺苷(vidarabine)、長春新鹼(vincristine)、長春瑞賓(vinorelbine)或例如於歐洲專利申請案第239362號中揭示之較佳抗代謝物中之一種, 諸如N-(5-[N-(3,4-二氫-2-甲基-4-氧代喹唑啉-6-基甲基)-N-甲基氨基]-2-噻吩甲醯基)-L-麩胺酸及其組合。

抗生素包括中間抗生素, 但不限於: 阿柔比星(aclarubicin)、放線菌素(actinomycin D)、胺柔比星(amrubicin)、阿那黴素(annamycin)、亞德裏亞黴素(adriamycin)、博萊黴素(bleomycin)、道諾黴素

(daunorubicin)、阿黴素(doxorubicin)、依沙蘆星(elsamitrucin)、表柔比星、格萊比星(galarubicin)、伊達比星(idarubicin)、絲裂黴素C、奈莫柔比星(nemorubicin)、新抑癌菌素(neocarzinostatin)、培洛黴素(peplomycin)、吡柔比星(pirarubicin)、蝴蝶黴素(rebeccamycin)、斯酯(stimalamer)、鏈脲菌素(streptozocin)、戊柔比星(valrubicin)、淨司他汀(zinostatin)及其組合。

植物衍生之抗腫瘤物質包括例如選自有絲分裂抑制劑之彼等，例如長春鹼、歐洲紫杉醇(Taxotere)、太平洋紫杉醇及其組合。

細胞毒性拓撲異構酶抑制劑包括選自由以下各物組成之群之一或多種藥劑：阿柔比星、胺萘非特(amonafide)、百樂替康(belotecan)、喜樹鹼、10-羥基喜樹鹼、9-胺基喜樹鹼、氟替康(diflomotecan)、鹽酸伊利替康(irinotecan HCl)(Camptosar)、伊朵卡新、表柔比星(Ellence)、依託泊苷、伊喜替康、基馬替康(gimatecan)、勒托替康(lurtotecan)、米托蒽醌(mitoxantrone)、吡柔比星(pirarubicin)、吡仙蒽醌(pixantrone)、盧比替康(rubitecan)、索布佐生(sobuzoxane)、SN-38、泰氟泊苷(tafluposide)、托泊替康(topotecan)及其組合。

較佳之細胞毒性拓撲異構酶抑制劑包括選自由以下各物組成之群之一或多種藥劑：喜樹鹼、10-羥基喜樹鹼、9-胺基喜樹鹼、HCl伊利替康(Camptosar)、伊朵卡新、表柔比



星(Ellence)、依託泊苷、SN-38、托泊替康及其組合。

免疫物包括干擾素及多種其他免疫增強劑。干擾素包括干擾素 α 、干擾素 α -2a、干擾素 α -2b、干擾素 β 、干擾素 γ -1a、干擾素 γ -1b(Actimmune)或干擾素 γ -n1及其組合。其他藥劑包括非格司亭、香菇多糖(lentinan)、裂皺菌素(sizofiran)、TheraCys、烏苯美司(ubenimex)、WF-10、阿地白介素(aldesleukin)、阿倫單抗(alemtuzumab)、BAM-002、達卡巴嗪(dacarbazine)、達克珠單抗(daclizumab)、地尼白介素(denileukin)、吉妥珠單抗奧唑米星(gemtuzumab ozogamicin)、伊莫單抗(ibritumomab)、咪喹莫特(imiquimod)、來諾拉提(lenograstim)、香菇多糖、黑素瘤疫苗(melanoma vaccine)(Corixa)、莫拉司亭(molgramostim)、OncoVAX-CL、沙莫司亭(sargramostim)、他索納明(tasonermin)、泰克白介素(tecleukin)、胸腺法新(thymalasin)、托西莫單抗(tositumomab)、維魯利秦(Virulizin)、Z-100、依帕珠單抗(epratuzumab)、米妥莫單抗(mitumomab)、奧萊沃單抗(oregovomab)、派土莫單抗(pemtumomab)(Y-muHMFG1)、Provence(Dendreon)及其組合。

生物反應改質劑為改質活有機體之防禦機制或諸如組織細胞存活、生長或分化之生物反應以使其具有抗腫瘤活性之藥劑。該等藥劑包括雲芝多糖(krestin)、香菇多糖、西佐喃(sizofiran)、溶血性鏈球菌製劑(picibanil)、烏苯美司(ubenimex)及其組合。

其他抗癌劑包括阿利維 A 酸 (alitretinoin)、阿普林津 (ampligen)、阿曲生坦 (atrasentan)、貝沙羅汀 (bexarotene)、波替單抗 (bortezomib)、波生坦 (Bosentan)、鈣三醇 (calcitriol)、依昔舒林 (exisulind)、非那雄胺 (finasteride)、福莫司汀、伊班膦酸 (ibandronic acid)、米替福新 (miltefosine)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、l-天冬醯胺酶、丙卡巴肼 (procarbazine)、達卡巴嗪 (dacarbazine)、羥基脲 (hydroxycarbamide)、培加帕加司 (pegaspargase)、噴司他丁 (pentostatin)、泰紫洛尼 (tazarotne)、Telcyta (TLK-286, Telik Inc.)、萬珂得 (Velcade)(博特麻布 (bortemazib), Millenium)、維甲酸 (tretinoin) 及其組合。

其他抗血管生成化合物包括阿昔曲丁 (acitretin)、芬維 A 胺 (fenretinide)、沙立度胺 (thalidomide)、唑來膦酸 (zoledronic acid)、血管阻止素 (angiostatin)、阿吡利丁 (aplidine)、西蘭苷 (cilengtide)、康布瑞塔卡汀 (combretastatin) A-4、內抑素 (endostatin)、溴氯哌嗪酮 (halofuginone)、萊比馬泰 (rebimastat)、萊莫凡布 (removab)、萊利米得 (Revlimid)、角鯊胺 (squalamine)、烏克蘭林 (ukrain)、維他新 (Vitaxin) 及其組合。

鉑配位之化合物包括(但不限於)順鉑、卡鉑、奈達鉑、奧沙利鉑及其組合。

喜樹鹼衍生物包括(但不限於)喜樹鹼、10-羥基喜樹鹼、9-胺基喜樹鹼、伊利替康 (irinotecan)、SN-38、伊朵卡新、拓泊替康及其組合。



其他抗腫瘤劑包括米托蒽醌(mitoxantrone)、l-天冬醯胺酶、丙卡巴肼(procarbazine)、達卡巴嗪(dacarbazine)、羥基脲、噴司他丁、維甲酸及其組合。

亦可利用可增強抗腫瘤免疫反應之抗腫瘤劑(諸如CTLA-4(細胞毒性淋巴細胞抗原4)抗體)及可阻斷CTLA-4之其他藥劑，諸如於美國專利第6,682,736號中揭示之MDX-010(Medarex)及CTLA-4化合物，及抗增生藥劑，諸如其他法呢基蛋白質轉移酶抑制劑，例如法呢基蛋白質轉移酶抑制劑。此外，可用於本發明之特異性CTLA-4抗體參見美國臨時申請案60/113,647(於1998年12月23日申請)、美國專利第6,682,736號，二者全文均以引用的方式併入本文。例如，可根據本發明使用之另一種抗CTLA-4抗體為泰希利幕單抗(ticilimumab)，其具有美國專利第6,682,736號中之單株抗體11.2.1之序列。

對於可用於本發明之特異性IGF1R抗體而言，參見國際專利申請案第WO 2002/053596號，其全文以引用的方式併入本文。

對於可用於本發明之特異性CD40抗體而言，參見國際專利申請案第WO 2003/040170號，其全文以引用的方式併入本文。

亦可採用基因治療劑作為抗腫瘤劑，諸如表現回應放射線療法之TNF α 之TNFerade(GeneVec)。

在本發明之一實施例中，可結合如本文所述之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分及其醫藥組合物使用抑制素。抑制

素(HMG-CoA還原酶抑制劑)可選自由以下各物組成之群：
 阿托伐他汀(Atorvastatin)(Lipitor, Pfizer Inc.)、普伐他汀
 (Provastatin)(Pravachol, Bristol-Myers Squibb)、洛伐他汀
 (Lovastatin)(Mevacor, Merck Inc.)、辛伐他汀(Simvastatin)
 (Zocor, Merck Inc.)、氟伐他汀(Fluvastatin)(Lescol,
 Novartis)、西立伐他汀(Cerivastatin)(Baycol, Bayer)、羅
 蘇伐他汀(Rosuvastatin)(Crestor, AstraZeneca)、洛佛他汀
 (Lovostatin)及煙酸(Advicor, Kos Pharmaceuticals)、其衍
 生物及其組合。

在一較佳實施例中，抑制素係選自由阿托伐他汀及洛伐
 他汀、其衍生物及組合組成之群。

適用作抗腫瘤劑之其他藥劑包括Caduet。

對於如本文所述使用抗ALK-1抗體或抗原結合部分與至
 少一種額外治療劑之組合來治療過度增生性病變或異常細
 胞生長之方法而言，抗ALK-1抗體可與額外之治療劑共軛
 或以其衍生。該至少一種額外治療劑亦可獨立投與，或以
 非衍生或非共軛之方式投與。當該至少一種額外治療劑未
 衍生為抗體，或未與抗體共軛時，其可於與該抗體相同之
 醫藥調配物中來投與，或其可以獨立調配物投與。

治療視力衰退

本發明之化合物及含有其之醫藥組合物適用於治療來自
 年齡相關之黃斑退化及影響眼後段之其他疾病的嚴重視力
 衰退，該等疾病諸如脈絡膜新生血管、糖尿病性視網膜病
 變、青光眼、色素性視網膜炎及其類似疾病。



例如，本發明之組合物可用以於眼後形成藥物儲槽，且除如本文所述之一或多種非活性賦形劑之外可包括一或多種醫藥活性劑。適用於本發明之組合物之醫藥活性劑的實例包括抗感染劑，包括(但不限於)抗生素、抗病毒劑及抗真菌劑；抗過敏劑及肥大細胞穩定劑；類固醇及非類固醇消炎劑(諸如奈帕芬胺(nepafenac))；環氧合酶抑制劑，包括(但不限於)Cox I及Cox II抑制劑；抗感染劑及消炎劑之組合；解充血藥；抗青光眼劑，包括(但不限於)腎上腺素、 β -腎上腺素阻斷劑、 α -腎上腺素促效劑、擬副交感神經劑、膽鹼酯酶抑制劑、碳酸酐酶抑制劑及前列腺素；抗青光眼劑之組合；抗氧化劑；營養補充劑；用於治療黃斑囊樣水腫之藥物，包括(但不限於)非類固醇消炎劑；用於治療年齡相關之黃斑退化(AMD)(包括非滲出性(乾燥)及滲出性(潮濕)AMD)之藥物，包括(但不限於)血管生成抑制劑(其包括抑制蛋白質激酶受體之血管生成抑制劑，該蛋白質激酶受體包括為VEGF受體之蛋白質激酶受體)；及營養補充物；用於治療疱疹性感染及CMV眼部感染之藥物；用於治療增生性玻璃體視網膜病變之藥物，包括(但不限於)抗代謝物及纖溶物；創口調節劑，包括(但不限於)生長因子；抗代謝物；神經保護性藥物，包括(但不限於)依利羅地(eliprofil)；及用於治療後段26之疾病或病症之血管造血類固醇，該等疾病或病症包括(但不限於)年齡相關之黃斑退化(AMD)(包括非滲出性(乾燥)及滲出性(潮濕)AMD)、脈絡膜新生血管、視網膜病變、視網膜炎、葡

萄膜炎、黃斑水腫及青光眼。對於關於該等血管造血類固醇之額外資訊，參見美國專利第5,679,666號及第5,770,592號。一種用於治療黃斑囊樣水腫之非類固醇消炎藥為奈帕芬胺。

為對眼投藥，將本發明之化合物於醫藥學上可接受之眼用媒劑中傳遞，以使得維持該化合物與眼睛表面接觸歷時足夠長之時間以使該化合物穿過眼角膜及/或鞏膜及內部區，該等內部區包括例如前房、後房、玻璃體、房水、玻璃體液、角膜、虹膜/睫狀體、晶狀體、脈絡膜/視網膜及鞏膜。醫藥學上可接受之眼用媒劑可為油膏、植物油或封裝材料。亦可將本發明之化合物直接注入玻璃體液或房水中。

此外，亦可藉由諸如結膜間質下及/或結膜下注射之熟知可接受方法來投與化合物。如眼科技術中所熟知，黃斑主要由視網膜錐體組成且為視網膜中視覺敏感度最大之區。眼球囊(Tenon's capsule)或結膜薄膜(Tenon's membrane)位於鞏膜上。結膜覆蓋眼後球體至邊緣之較小區域(眼球結膜)且向上(上端 cul-de-sac)或向下(下端 cul-de-sac)折疊以分別覆蓋上眼瞼及下眼瞼之內部區。結膜位於眼球囊之頂部。鞏膜及眼球囊界定眼球之外表面。為治療眼科疾病，諸如年齡相關之黃斑退化(AMD)(包括非滲出性(乾燥)及滲出性(潮濕)AMD)；脈絡膜新生血管、視網膜病變(諸如糖尿病性視網膜病變、早產兒視網膜病)、糖尿病性黃斑水腫、視網膜炎、葡萄膜炎、黃斑囊樣水腫(CME)、青

光眼及眼後段之其他疾病或病況，較佳將特定量之眼科可接受之醫藥活性劑儲槽直接安置於鞏膜之外表面上及眼球囊下。此外，在年齡相關之黃斑退化(AMD)(包括非滲出性(乾燥)及滲出性(潮濕)AMD)及CME之情況下，最佳將該儲槽直接安置於鞏膜之外表面上、眼球囊下且通常安置於黃斑之上。

可將該等化合物調配為儲槽製劑。可藉由植入(例如皮下或肌網內)、肌肉內注射或藉由上文提及之結膜間質下或玻璃體內注射來投與該等長效調配物。或者，該活性成份可為散劑形式，以供在使用之前與例如無菌無熱原質水之合適媒劑組合。

在本發明之尤其較佳實施例中，可製備該等化合物以供於生理食鹽水(與通常用於眼用製劑中之任何防腐劑及抗生物劑組合)中進行局部投藥，且以滴眼液之形式投與。可將該溶液或懸浮液以其純形式製備且每日投與若干次。或者，如上文所述製備之本組合物亦可直接投與至角膜。

在較佳實施例中，以結合至角膜之黏膜黏附性聚合物來製備該組合物。因此，例如可將該等化合物與合適之聚合或疏水性材料(例如可接受油中之乳液)或離子交換樹脂一起調配，或調配為微溶性衍生物，例如微溶性鹽。

疏水性化合物之醫藥載劑為包含苜醇、非極性界面活性劑、水可混溶有機聚合物及含水相之共溶劑系統。該共溶劑系統可為VPD共溶劑系統。VPD為3% w/v之苜醇，8% w/v之非極性界面活性劑聚山梨醇酯80及65% w/v之聚乙二

醇300於無水乙醇中達成所需容積之溶液。該VPD共溶劑系統(VPD: 5W)含有以水溶液中5%之右旋糖稀釋為1:1之VPD。該共溶劑系統將疏水性化合物良好溶解，且其自身在經全身投藥時產生較低毒性。自然地，共溶劑系統之比例可適度變化，而不破壞其溶解度及毒性特徵。此外，共溶劑組份之特性可變化：例如可使用其他低毒性非極性界面活性劑代替聚山梨醇酯80；聚乙二醇部分之尺寸可變化；可以例如聚乙烯吡咯酮之其他生物相容性聚合物置換聚乙二醇；且可以其他糖類或多醣類取代右旋糖。

或者，可採用其他疏水性醫藥化合物之傳遞系統。脂質體及乳液為疏水性藥物之傳遞媒劑或載劑之已知實例。儘管通常以較高毒性為代價，但仍可採用某些有機溶劑，諸如二甲亞碸。此外，可使用持續釋放系統來傳遞化合物，諸如含有治療劑之固體疏水性聚合物的半透性基質。已確定多種持續釋放材料且其為熟習此項技術者所已知。持續釋放膠囊可視其化學性質而釋放化合物歷時數週直至100天以上。視治療試劑之化學性質及生物穩定性而定，可採用額外策略來穩定蛋白質。

醫藥組合物亦可包含合適之固相或凝膠相載劑或賦形劑。該等載劑或賦形劑之實例包括碳酸鈣、磷酸鈣、糖類、澱粉、纖維素衍生物、明膠及諸如聚乙二醇之聚合物。

可調配任何組合物以供對個體投藥。本發明之個體較佳為哺乳動物，或更佳為人類。

本文之醫藥調配物可另外包括選自由以下藥劑組成之群之治療劑：抗贅生劑、消炎劑、抗菌劑、抗病毒劑、血管生成劑及抗血管生成劑。該等藥劑之實例係於本文中揭示。

例如，抗贅生劑可選自由以下各物組成之群：鹽酸阿考達唑 (Acodazole)、阿克羅寧 (Acronine)、阿多來新 (Adozelesin)、阿地白介素、六甲蜜胺、安波黴素 (Ambomycin)、乙酸阿美蔥醌 (Ametantrone Acetate)、胺魯米特 (Aminogluthethimide)、胺吡啶 (Amsacrine)、阿納托唑 (Anastrozole)、安麴黴素 (Anthramycin)、天冬醯胺酶 (Asparaginase)、曲林菌素 (Asperlin)、阿紫胞苷、阿紫替派 (Azetepa)、阿佐黴素 (Azotomycin)、巴馬司他 (Batimastat)、苯佐替派 (Benzodepa)、比卡魯胺、鹽酸比生群 (Bisantrene Hydrochloride)、二甲磺酸雙奈法德 (Bisnafide Dimesylate)、比折來新 (Bizelesin)、硫酸博萊黴素、布喹那鈉 (Brequinar Sodium)、溴匹立明 (Bropirimine)、白消胺、放線菌素 C (Cactinomycin)、卡普畢酮 (Calusterone)、卡醋胺 (Caracemide)、卡貝替姆 (Carbetimer)、卡鉑、卡莫司汀、鹽酸卡柔比星 (Carubicin Hydrochloride)、卡折來新 (Carzelesin)、西地芬戈 (Cedefingol)、苯丁酸氮芥 (Chlorambucil)、西羅黴素 (Cirolemycin)、順鉑、克拉屈濱、甲磺酸克裏斯奈通 (Crisnatol Mesylate)、環磷醯胺、阿糖胞苷、達卡巴嗪、放線菌素 D (Dactinomycin)、鹽酸道諾黴素、地西他濱、右

奧馬鉑(Dexormaplatin)、地紫胍寧(Dezaguanine)、甲磺酸
 地紫胍寧、地吡醌(Diaziquone)、歐洲紫衫醇
 (Docetaxel)、阿黴素、鹽酸阿黴素、屈洛昔芬
 (Droloxifene)、檸檬酸屈洛昔芬、丙酸屈他雄酮
 (Dromostanolone Propionate)、達佐黴素(Duazomycin)、依
 達曲沙(Edatrexate)、鹽酸依氟烏胺酸、依沙蘆星、恩洛鉑
 (Enloplatin)、恩普胺酯(Enpromate)、依匹哌啉
 (Epipropidine)、鹽酸表柔比星、厄布洛唑(Erbulazole)、
 鹽酸依索比星(Esorubicin Hydrochloride)、雌莫司汀、雌
 莫司汀磷酸鈉、依他硝唑(Etanidazole)、乙碘油I 131、依
 託泊苷(Etoposide)、磷酸依託泊苷、依託平(Etoprine)、鹽
 酸法屈唑(Fadrozole Hydrochloride)、法紫拉濱
 (Fazarabine)、芬維A胺、氟尿苷(Floxuridine)、磷酸氟達
 拉賓、氟脲嘧啶、氟西他濱(Fluorocitabine)、磷喹酮
 (Fosquidone)、福司曲星鈉(Fostriecin Sodium)、吉西他
 汀、鹽酸吉西他汀、金Au 198、羥基脲、鹽酸伊達比星、
 異環磷醯胺、伊莫氟星(Imofosine)、干擾素 α -2a、干擾素
 α -2b、干擾素 α -n1、干擾素 α -n3、干擾素 β -1a、干擾素 γ -
 1b、異丙鉑(Iproplatin)、鹽酸伊利替康、乙酸蘭瑞肽
 (Lanreotide Acetate)、來曲唑(Letrozole)、乙酸亮丙立得
 (Leuprolide Acetate)、鹽酸利阿唑(Liarazole
 Hydrochloride)、洛美曲索鈉(Lometrexol Sodium)、洛莫司
 汀(Lomustine)、鹽酸洛索蔥醌(Losoxantrone
 Hydrochloride)、馬索羅酚(Masoprocil)、美登素

(Maytansine)、鹽酸氮芥(Mechlorethamine Hydrochloride)、
 乙酸甲地孕酮(Megestrol Acetate)、乙酸美侖孕酮
 (Melengestrol Acetate)、美法侖、美諾立爾(Menogaril)、
 巯基嘌呤、甲胺嘌呤、甲胺碟呤鈉、美妥平(Metoprime)、
 美妥替哌(Meturedopa)、米丁度胺(Mitindomide)、米托卡
 星(Mitocarcin)、米托考明(Mitocromin)、米托潔林
 (Mitogillin)、米托馬星(Mitomalcin)、絲裂黴素、米托司
 培(Mitosper)、米托坦(Mitotane)、鹽酸米托蒽醌、黴酚酸
 (Mycophenolic Acid)、諾考達唑(Nocodazole)、諾加黴素
 (Nogalamycin)、奧馬鉑(Ormaplatin)、奧昔舒侖
 (Oxisuran)、太平洋紫杉醇、培加帕加司、培利黴素
 (Peliomycin)、奈莫司汀(Pentamustine)、硫酸培洛黴素、
 培磷醯胺(Perfosfamide)、哌泊溴烷(Pipobroman)、哌泊舒
 凡(Piposulfan)、鹽酸吡羅蒽醌(Piroxantrone
 Hydrochloride)、普卡黴素(Plicamycin)、普洛美坦
 (Plomestane)、卟吩姆鈉(Porfimer Sodium)、泊非黴素
 (Porfiromycin)、潑尼莫司汀(Prednimustine)、鹽酸丙卡巴
 肼、嘌呤黴素(Puromycin)、鹽酸嘌呤黴素、吡唑呋喃菌素
 (Pyrazofurin)、利波腺苷(Riboprime)、羅穀亞胺
 (Rogletimide)、沙芬戈(Safingol)、鹽酸沙芬戈、司莫司汀
 (Semustine)、辛曲嗪(Simtrazene)、斯帕氟蒂鈉(Sparfosate
 Sodium)、斯帕索黴素(Sparsomycinl)、鹽酸鍺螺胺
 (Spirogermanium Hydrochloride)、螺莫司汀(Spiromustine)、
 螺鉑(Spiroplatin)、鏈黑菌素(Streptonigrin)、鏈脲佐菌

素、氯化鋇 Sr 89、磺氯苯脲 (Sulofenur)、他利黴素 (Talisomycin)、紫杉烷 (Taxane)、紫杉醇 (Taxoid)、特可加蘭 (Tecogalan) 鈉、替加氟、鹽酸替洛萸醌 (Teloxantrone Hydrochloride)、替莫唑芬 (Temoporfin)、替尼泊苷 (Teniposide)、替羅昔隆 (Teroxirone)、睾內醌 (Testolactone)、替米平 (Thiamiprine)、硫鳥嘌呤 (Thioguanine)、塞替派、噻唑呋啉 (Tiazofurin)、替拉紫明 (Tirapazamine)、鹽酸拓泊替康、檸檬酸托瑞米芬 (Toremifene Citrate)、乙酸曲托龍 (Trestolone Acetate)、磷酸曲西立濱 (Triciribine Phosphate)、三甲曲沙、葡糖醛酸三甲曲沙、曲普瑞林 (Triptorelin)、鹽酸妥布氯唑 (Tubulazole Hydrochloride)、烏拉莫司汀 (Uracil Mustard)、烏瑞替派 (Uredepa)、伐普肽 (Vapreotide)、維替泊芬 (Verteporfin)、硫酸長春鹼、硫酸長春新鹼、長春地辛 (Vindesine)、硫酸長春地辛、硫酸長春匹定 (Vinepidine Sulfate)、硫酸長春甘酯 (Vinglycinate Sulfate)、硫酸長春羅新 (Vinleurosine Sulfate)、酒石酸長春瑞賓、硫酸長春羅定 (Vinrosidine Sulfate)、硫酸長春利定 (Vinzolidine Sulfate)、伏氯唑 (Vorozole)、折尼鉑 (Zeniplatein)、淨司他汀、鹽酸佐柔比星 (Zorubicin Hydrochloride)。

不管本文是否揭示，或此項技術中是否已知，抗血管生成劑為抑制血管生成之任何藥劑。在較佳實施例中，抗血管生成劑為抗 VEGF 劑，諸如 Macugen™ (Eyeteck, New York, NY) 或抗 VEGF 抗體。



可藉由標準技術，使用一或多種合適之載劑、賦形劑及稀釋劑來調配醫藥組合物。參見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences(第 19 版，Williams & Wilkins, 1995)(其為所有目的以引用的方式併入本文)。

適合非經腸投藥之調配物包括與所要受體之血液等張之含水及不含水調配物；及可包括經設計以將該化合物靶向血液組份或一或多個器官之懸浮系統的含水及不含水無菌懸浮液。該等調配物可存在於例如安瓶或小瓶之單位劑量或多劑量密封容器中。對於眼內調配物而言，單位劑量因調配物中無防腐劑而為較佳。對於其他非經腸調配物而言，可使用防腐劑，其允許使用多劑量容器。

例如，可由無菌散劑製備臨時注射溶液及懸浮液。非經腸及靜脈內形式亦可包括礦物質及其他材料，以使其與所選之注射或傳遞系統類型相容。

本發明涵蓋之特定非經腸投藥包括對眼之眼內及玻璃體內投藥。用於眼內及玻璃體內投藥之醫藥調配物包括具有或不具有諸如甘露糖醇或山梨糖醇之賦形劑作為蛋白質穩定劑之磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)及平衡等張鹽溶液(BSS)。

一般而言，水、合適之油、生理食鹽水、含水右旋糖(葡萄糖)或相關糖溶液及諸如丙二醇或聚乙二醇之二醇類為用於非經腸溶液之合適載劑。用於非經腸投藥之溶液較佳含有活性成份之水可溶性鹽，合適之穩定劑及(若需要)緩衝物質。諸如單獨或組合之亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉或抗

壞血酸之抗氧化劑為合適之穩定劑。亦使用其檸檬酸鹽或EDTA鈉。此外，非經腸溶液可含有防腐劑，諸如氯化苯甲烴銨、對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯或氯丁醇。合適之醫藥載劑係描述於前文引用之Remington中。

在本文之任何實施例中，可將本文之組合物或醫藥調配物凍乾。

在本文之任何實施例中，醫藥調配物較佳為每毫克治療劑具有小於約10，更佳小於約5，更佳小於約3或更佳小於約1個內毒素單元。

在某些實施例中，本文揭示之治療方法另外包括向患有血管生成症之個體投與選自由以下藥劑組成之群之一或多種治療劑：抗贅生劑、抗病毒劑、消炎劑、抗菌劑、抗血管生成劑或抗血管生成劑。

該等組合治療可藉由向個體投與本文之組合物與(多種)額外治療劑之共調配物或藉由以兩種分離之醫藥調配物投與本文之組合物及(多種)治療劑而達成。在向個體投與一種以上之組合物/治療劑之實施例中，由於兩種活性成份之協同效應，因此可利用較低劑量之組合物及/或(多種)治療劑。

可向個體投與之抗贅生劑包括(但不限於)阿柔比星、鹽酸阿考達唑、阿克羅甯、阿多來新、阿地白介素、六甲蜜胺、安波黴素、乙酸阿美萸醌、胺魯米特、胺吡啶、阿納托唑、安麴黴素、天冬醯胺酶、曲林菌素、阿紫胞苷、阿紫替派、阿佐黴素、巴馬司他、苯佐替派、比卡魯胺、鹽



酸比生群、二甲磺酸雙奈法德、比折來新、硫酸博萊黴素、布喹那鈉、溴匹立明、白消胺、放線菌素C、卡普甾酮、卡醋酸、卡貝替姆、卡鉑、卡莫司汀、鹽酸卡柔比星、卡折來新、西地芬戈、苯丁酸氮芥、西羅黴素、順鉑、克拉屈濱、甲磺酸克裏斯奈通、環磷醯胺、阿糖胞苷、達卡巴嗪、放線菌素D、鹽酸道諾黴素、地西他濱、右奧馬鉑、地紮胍寧、甲磺酸地紮胍寧、地吖醌、歐洲紫衫醇、阿黴素、鹽酸阿黴素、屈洛昔芬、檸檬酸屈洛昔芬、丙酸屈他雄酮、達佐黴素、依達曲沙、鹽酸依氟鳥胺酸、依沙蘆星、恩洛鉑、恩普胺酯、依匹哌啶、鹽酸表柔比星、厄布洛唑、鹽酸依索比星、雌莫司汀、雌莫司汀磷酸鈉、依他硝唑、乙碘油I 131、依託泊苷、磷酸依託泊苷、依託平、鹽酸法屈唑、法紮拉濱、芬維A胺、氟尿苷、磷酸氟達拉賓、氟脲嘧啶、氟西他濱、磷嗪酮、福司曲星鈉、吉西他汀、鹽酸吉西他汀、金Au 198、羥基脲、鹽酸伊達比星、異環磷醯胺、伊莫氟星、干擾素 α -2a、干擾素 α -2b、干擾素 α -n1、干擾素 α -n3、干擾素 β -1a、干擾素 γ -1b、異丙鉑、鹽酸伊利替康、乙酸蘭瑞肽、來曲唑、乙酸亮丙立得、鹽酸利阿唑、洛美曲索鈉、洛莫司汀、鹽酸洛索蔥醌、馬索羅酚、美登素、鹽酸氮芥、乙酸甲地孕酮、醋酸美侖孕酮、美法侖、美諾立爾、巰基嘌呤、甲胺喋呤、甲胺喋呤鈉、美妥平、美妥替哌、米丁度胺、米托卡星、米托考明、米托潔林、米托馬星、絲裂黴素、米托司培、米托坦、鹽酸米托蔥醌、黴酚酸、諾考達唑、諾加

黴素、奧馬鉑、奧昔舒倫、太平洋紫杉醇、培加帕加司、培利黴素、奈莫司汀、硫酸培洛黴素、培磷醯胺、哌泊溴烷、哌泊舒凡、鹽酸吡羅蔥醌、普卡黴素、普洛美坦、吡吩姆鈉、泊非黴素、潑尼莫司汀、鹽酸丙卡巴肼、嘌吟黴素、鹽酸嘌吟黴素、吡唑呋喃菌素、利波腺苷、羅穀亞胺、沙芬戈、鹽酸沙芬戈、司莫司汀、辛曲嗪、斯帕氟蒂鈉、斯帕索黴素、鹽酸鎳螺胺、螺莫司汀、螺鉑、鏈黑菌素、鏈脲佐菌素、氯化鋇Sr 89、磺氯苯脲、他利黴素、紫杉烷、紫杉醇、特可加蘭鈉、替加氟、鹽酸替洛蔥醌、替莫吡酚、替尼泊苷、替羅昔隆、鞏內酪、替米平、硫鳥嘌呤、塞替派、噻唑呋啉、替拉紫明、鹽酸拓撲替康、檸檬酸托瑞米芬、醋酸曲托龍、磷酸曲西立濱、三甲曲沙、葡糖醛酸三甲曲沙、曲普瑞林、鹽酸妥布氯唑、烏拉莫司汀、烏瑞替派、伐普肽、維替泊芬、硫酸長春鹼、硫酸長春新鹼、長春地辛、硫酸長春地辛、硫酸長春匹定、硫酸長春甘酯、硫酸長春羅新、酒石酸長春瑞賓、硫酸長春羅定、硫酸長春利定、伏氯唑、折尼鉑、淨司他汀、鹽酸佐柔比星。

可向個體投與之抗菌劑包括(但不限於)盤尼西林(penicillin)、胺基糖苷、大環內酯、單環內醯胺、利福黴素、四環素、氯黴素、克林黴素、林可黴素、亞胺硫黴素、梭鏈孢酸、新生黴素、磷黴素、梭鏈孢酸鈉、新黴素、多黏黴素、卷麩黴素、多黏菌素E甲磺酸、黏菌素、短桿菌素、米諾環素(minocycline)、強力黴素、萬古黴



素、亞枯草菌素、卡那黴素、慶大黴素、紅黴素及頭孢菌素。

可向個體投與之消炎劑包括(但不限於)NSAIDS(例如阿斯匹靈(水楊酸鹽胺)、水楊酸鹽胺鈉、吲哚洛酚(indoprofen)、吲哚美辛、三水合吲哚美辛鈉、Bayer™、Bufferin™、Celebrex™、雙氯芬酸、Ecotrin™、二氟尼柳、非諾洛芬(fenoprofen)、萘普生、舒林酸、Vioxx™); 皮質類固醇或促皮質素(ACTH); 秋水仙鹼及乙酸阿奈可他(anecortave acetate)。

可向個體投與之抗病毒劑包括(但不限於) α -甲基-P-金剛烷甲基胺、1,-D-呋喃核糖基-1,2,4-三唑-3-甲鹽胺、9-[2-羥基-乙氧基]甲基鳥嘌呤、金剛烷胺、5-碘基-2'-脫氧尿苷、三氟胸苷、干擾素、腺嘌呤阿拉伯糖、CD4、3'-疊氮基-3'-脫氧胸苷(AZT)、9-(2-羥基乙氧基甲基)-鳥嘌呤(阿昔洛韋(acyclovir))、磷甲酸、1-金剛烷胺、肽T及2',3'二脫氧胞嘧啶核苷。

於活體內對靶細胞投與本發明之組合物可使用熟習此項技術者所熟知之多種技術中之任一種來完成。

例如，可藉由此項技術中已知之任何方式(例如經口、經眼、血管內(i.v.)、皮內、肌肉內、經皮、經黏膜、經腸、非經腸、藉由吸入噴霧、經直腸或局部)，以單位劑量調配物且含有習知醫藥學上可接受之載劑、佐劑及媒劑之形式，全身性或局部性投與本發明之組合物。

如本文所使用之術語眼內包括玻璃體內、視網膜下及其

類似者。

如本文所使用之術語非經腸包括皮下、靜脈內、肌肉內、胸骨內、輸注技術或腹膜內。可藉由將藥物與諸如可可脂及聚乙二醇之合適非刺激性賦形劑混合來製備用於藥物直腸投藥之栓劑，其在常溫下為固體而在直腸溫度下為液體且因此將於直腸中熔融且釋放藥物。

以本發明之組合物治療病症或疾病之給藥方案係基於多種因素，包括疾病類型、患者之年齡、體重、性別、醫病況、病況之嚴重性、投藥途徑及所採用之特定化合物。因此，給藥方案可廣泛變化，但可使用標準方法來進行常規判定。

對於全身投藥而言，本發明之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分及/或一或多種額外治療劑較佳以每kg體重至少0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10、20、30、40、50、75、100或150 mg之劑量投與。在其他實施例中，本文之多肽(較佳為二聚體或均質二聚體)及/或小分子係以0.1-100 mg/kg，更佳0.5-50 mg/kg，更佳1-30 mg/kg體重或更佳5-20 mg/kg之劑量全身投藥。

對於局部投藥而言，本發明之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分及/或一或多種額外治療劑較佳以至少50 μ g、100 μ g、150 μ g、200 μ g、250 μ g、300 μ g、350 μ g、400 μ g、450 μ g、500 μ g、550 μ g、600 μ g、650 μ g或700 μ g之劑量投與。在其他實施例中，本文之多肽(較佳為二聚體



或均質二聚體)及/或小分子係以每個位點50-1000 μg ，更佳100-800 μg ，更佳200-500 μg 或更佳300-400 μg 之劑量局部投藥。

例如，對於真皮投藥而言，本發明之抗ALK-1抗體或其抗原結合部分及/或肽模擬物及/或一或多種額外治療劑係以50-1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，更佳100-800 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，或更佳200-500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之劑量投與。在另一實例中，對於眼部投藥而言，本發明之多肽及/或肽模擬物及/或小分子係以50-1000 $\mu\text{g}/\text{眼}$ ，更佳100-800 $\mu\text{g}/\text{眼}$ ，或更佳200-500 $\mu\text{g}/\text{眼}$ 之劑量投與。

醫藥組合物較佳包括有效量，意即有效達成治療或預防效益之量之活性成份(例如抗ALK-1抗體)。對於特定應用有效之實際量將視治療之病況及投藥途徑而定。尤其就本文之揭示內容而言，有效量之判定恰在熟習此項技術者之能力範圍內。

例如抗ALK-1抗體之活性成份之有效量較佳為每公斤患者體重約0.0001 mg至約500 mg活性劑，更佳為每公斤患者體重約0.001至約250 mg活性劑，又更佳為每公斤患者體重約0.01 mg至約100 mg活性劑，又更佳為每公斤患者體重約0.5 mg至約50 mg活性劑且最佳為每公斤患者體重約1 mg至約15 mg活性劑。

就體重百分比而言，本發明之調配物較佳包含約0.0001至約10 wt.%，更佳約0.001至約1 wt.%，更佳約0.05至約1 wt.%，或更佳約0.1 wt.%至約0.5 wt.%之量之活性劑，例

如抗ALK-1抗體。

基因療法

可經由基因療法向有此需要之患者投與編碼本發明之抗體及抗體部分之核酸分子。該療法可在活體內或活體外。在較佳實施例中，向患者投與編碼重鏈及輕鏈兩者之核酸分子。在更佳實施例中，因為該等細胞對於產生抗體而言具有特異性，所以投與核酸分子以使得其穩定整合為B細胞之染色體。在一較佳實施例中，將前驅體B細胞於活體外轉染或感染且再移植至有此需要之患者中。在另一實施例中，使用已知用於感染所關注細胞類型之病毒，於活體內感染前驅體B細胞或其他細胞。用於基因療法之典型載體包括脂質體、質體及病毒載體。例示性病毒載體為反轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒。於活體內或活體外感染之後，可藉由自經治療患者獲取樣本且使用此項技術中已知或本文所述之任何免疫檢定法來監控抗體表現水平。

在一較佳實施例中，基因療法包含以下步驟：投與編碼抗ALK-1抗體之重鏈或其抗原結合部分之經分離核酸分子且表現該核酸分子。在另一實施例中，基因療法包含以下步驟：投與編碼抗ALK-1抗體之輕鏈或其抗原結合部分之經分離核酸分子且表現該核酸分子。在一更佳方法中，基因療法包含以下步驟：投與編碼本發明之抗ALK-1抗體之重鏈或其抗原結合部分之經分離核酸分子及編碼輕鏈或其抗原結合部分之經分離核酸分子，且表現該等核酸分子。基因療法亦可包含以下步驟：投與另一種治療劑，諸如先

前結合組合療法所論述之任何藥劑。

篩檢ALK-1拮抗劑或促效劑之方法

在一實施例中，本發明提供一種判定一種物質是否抑制ALK-1之特異性下游靶基因Id1之上調的方法，諸如實例12中所述之對於Id1之Taqman檢定。該方法包含使表現Id1之細胞樣本與該物質相接觸，且判定Id1表現是否受到抑制，其中與對照細胞樣本相比，與該物質接觸之細胞樣本中之Id1表現水平降低說明該物質抑制Id1之表現。在一特定實施例中，該物質為結合至ALK-1胞外域之抗體。在另一實施例中，該物質為小分子。根據本發明，該等細胞本質上可表現ALK-1及Id1，諸如實例12中所述之HUVEC，或已經編碼該等中之一或兩者之DNA轉型或轉染者。例如，可經由使用實例12中所述之對於Id1之Taqman檢定來判定Id1之表現。

相反，根據相同類型之程序亦可測試或利用活化劑或促效劑。

為可更好理解本發明，列出以下實例。該等實例僅為說明之目的且不欲解釋為以任何形式限制本發明之範疇。

實例

在以下實例及製備中，"MW"意謂分子量；"His-標記"意謂用於以鎳螯合樹脂快速純化且以抗His(C末端)抗體偵測之C末端聚組胺酸(6xHis)標記；"BSA"意謂牛血清白蛋白；"EDTA"意謂乙二胺四乙酸；"DMSO"意謂二甲亞砜；"MOPS"意謂3-(N-嗎啉基)丙磺酸；"MES"意謂2-(N-嗎啉基)

乙磺酸；"PBS"意謂磷酸鹽緩衝生理食鹽水；"dPBS"意謂杜貝科氏(Dulbecco's)磷酸鹽緩衝生理食鹽水；"HEMA"意謂2-羥基-甲基丙烯酸乙酯；"DMEM"意謂杜貝科氏改質鷹氏培養基；"FBS"意謂胎牛血清；"NEAA"意謂非必需胺基酸；"HEPES"意謂N-2-羥基乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸；且"DMF"意謂二甲基甲醯胺。

實例1 ALK-1免疫原製備

使用正向 5'-ACGGCCCAGCCGGCCGACCCTGTGAAGCCGTCT (SEQ ID NO: 96) 及反向 5'-ACTAAGCTTTTAATGATGATGATGATGCTGGCCATCTGTTCCCG (SEQ ID NO: 97) 引物，藉由PCR自全長人類 ALK-1 ORF純系 (Invitrogen, Clone ID IOH21048) 選殖 ALK-1 之ECD。將PCR產物純化，經 SfiI 及 HindIII 限制酶處理且選殖至哺乳動物表現載體 pSecTag2/Hygro (Invitrogen Inc., 目錄號 V910-20) 之 SfiI/HindIII 位點中。根據製造者說明，將該純系用以藉由 Eugene 6 轉染試劑 (Roche Applied Science, 目錄號 1814443) 瞬時轉染 293T 細胞。於轉染後 72 小時自含有分泌之靶蛋白質之細胞培養物收集上清液且使其於 4°C 下結合至 Ni-NTA 樹脂 (QIAGEN, 目錄號 30430) 隔夜。接著將該樹脂以含有 pH 值為 8.0 之 20 mM Tris、25 mM 咪唑及 300 mM 氯化鈉之緩衝液洗滌。使用含有 pH 值為 8.0 之 20 mM Tris、300 mM 咪唑及 300 mM 氯化鈉之緩衝液將 His-標記蛋白質自該樹脂溶離出。使用 CM 瓊脂糖陽離子交換樹脂於 20 mM 磷酸鈉 (pH 7.0) 中進一步純化蛋白質且收集含有該靶蛋白質之未



結合溶離份。將該蛋白質藉由透析緩衝交換為PBS或pH值為7.4之10 mM HEPES加150 mM氯化鈉且濃縮至0.2-1 mg/mL，其中藉由以庫馬斯(Coomassie)藍染色之SDS PAGE凝膠判斷之最終純度>90%。將ALK-1 ECD His-標記蛋白質以與蛋白質之11 KDa理論MW相比為26 KDa之表觀MW高度糖基化。如實例2中所述，已將ALK-1 ECD His-標記蛋白質(SEQ ID NO:98)用於繁殖產生抗ALK-1抗體之融合瘤。

人類ALK-1 ECD His-標記蛋白質：

基因序列(小寫字母部分為分泌信號)：

```
atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactg
gtgacgcggcccagccggccGACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGC
CCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCCACATTGCAA
GGGGCCTACCTGCCGGGGGGGCCTGGTGCACAGTAGTGC
TGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGG
GGCTGCGGGAACTTGACAGGGAGCTCTGCAGGGGGGCG
CCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCGACAGCCA
CCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCAC
CCAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGC
ATCATCATCATCATCAT(SEQ ID NO: 99)
```

蛋白質序列：

```
DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGR
HPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVS
LVLEATQPPSEQPGTDGQH HHHHHH(SEQ ID NO: 98)
```

實例2繁殖產生抗ALK-1抗體之融合瘤

將八至十週大之XENOMOUSE®小鼠於其後腳掌以10 µg/小鼠之重組人類ALK-1/Fc嵌合體(R&D Systems, Inc., 目錄號370-AL)或以實例1中所述之ALK-1 ECD His-標記蛋白質進行免疫。於三至五週之時期內重複該劑量五至七次。在融合前三或四天，對小鼠最後注射PBS中之免疫原。經由電子細胞融合(ATCC目錄號CRL 1580)使來自免疫小鼠之淋巴結淋巴細胞與非分泌性骨髓瘤P3-X63-Ag8.653細胞株融合，且使該等融合細胞經受先前所述之HA-DMEM分泌(DMEM/15% FBS/1% 200 mM L-麩醯胺酸/1% 100X非必需胺基酸/1% 100X Pen/Strep/10 U/ml IL-6/1小瓶/公升 OPI 培養基補充物加 0.5x HA(Azaserine-Hypoxanthine, Sigma, 目錄號A9666))。回收所有分泌ALK-1特異性人類IgG2抗體之融合瘤板。

使用ELISA檢定來偵測抗體結合。於4°C下將免疫原以4 µg/mL塗覆於50 mM碳酸氫鈉緩衝液中之96孔Immulon微量滴定盤上(NUNC-Immuno™盤MaxiSorp™表面, Nalge Nunc International, 目錄號439454)隔夜。將盤洗滌，且接著以添加0.1%吐溫(Tween)-20及0.5%牛血清白蛋白之PBS阻斷。將抗體添加至阻斷ELISA盤中，培育1小時且以含有吐溫-20之PBS洗滌。藉由抗人類IgG-辣根過氧化物酶(Pierce, 目錄號31420)，繼而添加ABTS(Pierce, 目錄號37615)來偵測該結合。在微量滴定盤讀取器(SpectraMax Plus 384, Molecular Devices)中於405 nm下進行比色量

測。

選擇25個融合瘤用於進一步研究。該等為藉由限制稀釋而選殖之單細胞且將其命名為1.11.1、1.12.1、1.12.1(rWT)、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.13.1、1.14.1、1.151.1、1.162.1、1.183.1、1.27.1、1.29.1、1.31.1、1.8.1、1.9.1、4.10.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、5.34.1、5.53.1、5.56.1、5.57.1及5.59.1。

將小鼠融合瘤細胞株LN 15916(融合瘤1.12.1)寄存於根據美國典型培養物保藏中心(ATCC)，10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209於2005年6月21日之布達佩斯條約(Budapest Treaty)之條目下。對融合瘤1.12.1指定以下寄存編號：PTA-6808。融合瘤1.12.1亦於2006年11月23日寄存於財團法人食品工業發展研究所(FIRDI，新竹市食品路331號)，並投予寄存編號：BCRC 960281。

實例3抗ALK-1抗體之序列

為分析根據本發明產生之抗體的結構，選殖編碼來自產生抗ALK-1單株抗體之融合瘤之重鏈及輕鏈片段的核酸。藉由標準方式來完成選殖及定序。

使用Fast-TrackTM套組(Invitrogen)，自每一ALK-1抗體之約 2×10^5 個融合瘤細胞分離Poly(A)⁺ mRNA。藉由使用隨機引物由mRNA合成cDNA。藉由PCR，使用人類V_H或人類V_K家族特異性可變結構域引物結合對人類C_γ2恆定區或C_κ恆定區具有特異性之引物擴增隨機引物cDNA，以擴增包括所有構架區(FR)及互補判定區(CDR)之抗體可變區。藉由直接定序PCR產物之兩條鏈，由產生抗ALK-1之融合瘤

獲得編碼人類重及 κ 輕鏈轉錄物之核酸序列。使用 Abgenix 專屬軟體及人類 V_H 及 V_K 基因之公開可獲得之序列資訊 ("V BASE sequence directory", Tomlinson 等人, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) 來分析序列。可由一般熟習使用 MacVector 及 Geneworks 軟體程式者使用公開可獲得之序列對準軟體來獲得識別結果。

詳言之，將全長 ALK-1 抗體 1.12.1 如下選殖至表現載體中：使用 Rneasy 微型套組 (Qiagen) 分離 Poly(A)⁺ mRNA，且藉由使用寡(dT)引物之 Advantage RT-for-PCR 套組 (BD Biosciences) 由 mRNA 合成 cDNA。使用表 2 中列出之引物擴增用於純系 1.12.1 之寡(dT)引物 cDNA。使用 *Pfu* Ultra 聚合酶 (Stratagene) 及 PTC-200 DNA Engine (MJ Research) 以如下之循環達成擴增：於 95°C 下 3 分鐘；25×(於 95°C 下 20 秒鐘，於 52°C 下 30 秒鐘，於 72°C 下 1 分 20 秒)；於 72°C 下 10 分鐘。使用 Grills 第 16 BDTv3.1/dGTP 化學法 (Applied Biosystems Inc) 及 3730xl DNA 分析器 (Applied Biosystems Inc) 驗證純系之序列。在選殖 1.12.1 V_H 之過程中，將沉默突變引入第 8 密碼子，將 "GGC" 轉化為 "GGT"。藉由與 'V BASE 序列目錄' 之對準來分析所有序列 (Tomlinson 等人, *J. Mol. Biol.*, 227, 776-798 (1992); *Hum. Mol. Genet.*, 3, 853-860 (1994); *EMBO J.*, 14, 4628-4638 (1995))。



表 2

用於選殖全長 1.12.1 之重鏈及輕鏈擴增引物

引物名稱	引物序列	SEQ ID NO
4-61	5' tcttcaagcttgatatctctagaagccgccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCC 3'	105
G1/2_FL_R	5' ttctctgatcagaattcctaCTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC 3'	106
A11	5' tcttcaagcttccgggagccgccaccATGGAAACCCAGCGCAGCTT 3'	107
K_FL_R	5' ttctttgatcagaattctcaCTAACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG 3'	108

以小寫字母顯示非雜交鹼基

實例 4 基因選擇分析及 CDR 分析

自抗體之核酸序列及預測胺基酸序列識別各抗體鏈之基因選擇。表 3 列出根據本發明之所選抗體融合瘤純系的基因選擇。

表 3

重鏈及輕鏈基因選擇

純系	重鏈生殖系				κ輕鏈生殖系		
	SEQ ID NO:	V _H	D _H	J _H	SEQ ID NO:	V _κ	J _κ
1.11.1	9	3-33	6-19	JH3B	11	L1	JK4
1.12.1	103	4-31	6-19	JH4B	126	A27	JK5
1.13.1	13	4-61	6-19	JH4B	15	A27	JK5
1.14.1	17	4-61	6-19	JH4B	19	A27	JK5
1.151.1	21	4-31	3-3	JH3B	23	B3	JK1
1.162.1	25	4-31		JH3B	27	A27	JK5
1.183.1	29	4-59	6-19	JH4B	31	L2	JK3
1.31.1		4-31	6-19	JH4B		A27	JK5
1.8.1	33	4-31	3-3	JH3B	35	B3	JK1
1.9.1	37	3-11	3-22	JH6B	39	A2	JK1
4.10.1	41	3-15	3-22	JH4B	43	A3	JK4
4.24.1	45	4-31	5-12	JH6B	47	A27	JK5
4.38.1	49	4-31	4-23	JH4B	51	B3	JK1
4.58.1	53	4-31	4-23	JH4B	55	A27	JK5
4.62.1	57	4-31	5-12	JH6B	59	A27	JK5
4.68.1	61	4-31	2-2	JH5B	63	A27	JK5
4.72.1	65	4-31	5-12	JH6B	67	A27	JK5
5.13.1	69	4-31		JH3B	71	A27	JK4
5.34.1	73	4-31		JH6B	75	A1	JK1

純系	重鏈生殖系				κ輕鏈生殖系		
	SEQ ID NO:	V _H	D _H	J _H	SEQ ID NO:	V _κ	J _κ
5.53.1	77	3-15	1-1	JH4B	79	B2	JK4
5.56.1	81	3-11	6-19	JH6B	83	A2	JK1
5.57.1	85	3-11	3-10	JH6B	87	A2	JK1
5.59.1	89	3-11	6-6	JH6B	91	A2	JK1

根據製造者說明，以表4所列之引物及 QuickChange 套組 (Stratagene) 於純系 1.12.1 之 V_H(M29I) 及 V_κ(D19A) 區中引導突變。藉由標準程序驗證突變變異體之序列且將其選殖至表現載體中。

表 4

誘突變性寡核苷酸(序列 5' 至 3')：

引物	正義	反義
1.12.1(D19A)	CTCCAGGGGAAAGAG <u>C</u> ACCCT CTCCTGTAGG (SEQ ID NO:109)	CCTACAGGAGAGGGTGG <u>C</u> TCTT TCCCCTGGAG (SEQ ID NO:110)
1.12.1(M29I)	GGTGGCTCCAT <u>C</u> AGCAGTGGTG AATACTAC (SEQ ID NO:111)	GTAGTATTCACCACTGCTG <u>A</u> TGG AGCCACC (SEQ ID NO:112)

突變係以粗體及下劃線表示。

將編碼 1.12.1(M29I/D19A) 抗體之重鏈可變結構域 (SEQ ID NO:5) 及輕鏈可變結構域 (SEQ ID:7) 之核酸分子寄存於根據美國典型培養物保藏中心 (ATCC)，10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 於 2005 年 7 月 14 日之布達佩斯條約之條目下。對該等寄存物指定以下寄存編號：含有質體 pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_H(M29I):UC 25502 之大腸桿菌 DH5α 為 ATCC No. PTA-6864，且含有質體 pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_κ(D19A):UC 25503 之大腸桿菌 DH5α 為 ATCC No. PTA-6865。含有質體 pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_H(M29I):UC 25502 之大腸桿菌 DH5α 亦於 2006 年 11 月 23 日寄存於財團法人食品工業發展研究所 (FIRDI，新竹市食品路 331 號)，並



投予寄存編號：BCRC 940504，且含有質體pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_κ(D19A):UC 25503之大腸桿菌DH5α亦於2006年11月23日寄存於財團法人食品工業發展研究所(FIRDI，新竹市食品路331號)，並投予寄存編號：BCRC 940505。

許多抗 ALK-1 特異性人類抗體於重鏈可變結構域之 CDR1 中展現共同圖案。該等主導分子利用 4-31 或 4-61 重鏈 V 基因區段。於表 4A 中展示與生殖系序列對準之對應於該等抗體重鏈之 FR1 及 CDR1 序列。對準中之短劃線(-)表示與生殖系相同之殘基。在所有情況下，CDR1 末端之 GYYWS (SEQ ID NO:136) 圖案經受體細胞突變以產生新序列圖案，藉此使 12 個實例中之 9 個中之 G 殘基變為酸性殘基 (D 或 E) 且將最後之 S 殘基變為 N。其他 V_H 區之序列多樣性說明該等可能為於 V_H 之 CDR1 末端產生相同序列圖案之獨立體細胞突變事件。

表 4A

ALK-1 抗體重鏈序列圖案

純系	V-基因	D-基因	J-基因	FR1	CDR1
		生殖系		QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVS (SEQ ID NO: 122)	GGSISSGGYYWS (SEQ ID NO: 123)
5.34.1	VH4-31	- NA -	JH6B	-----	-----D---N
4.58.1	VH4-31	D4-23	JH4B	-----	-----D---N
4.38.1	VH4-31	D4-23	JH4B	-----	-----D---
5.13.1	VH4-31	- NA -	JH3B	-----	-----D---N
1.162.1	VH4-31	- NA -	JH3B	-----J-----	-----E---
4.72.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	-----E---
4.24.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	-----ND---N
4.62.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	-----D---N
1.31.1	VH4-31	D6-19	JH4B	-----	-----D---N
1.12.1	VH4-31	D6-19	JH4B	-----	---M---E---N
				QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVS (SEQ ID NO: 124)	GGSVSSGGYYWS (SEQ ID NO: 125)
生殖系				Q	
1.13.1	VH4-61	D6-19	JH4B	--H-----	-----D---N
1.14.1	VH4-61	D6-19	JH4B	-----	-----D---N

實例 5 1.12.1 Fab分子之製備

藉由使用木瓜蛋白酶消化 1.12.1(M29I/D19A)IgG1 製備 1.12.1(M29I/D19A)之 Fab 片段。於 37°C 下，在含有 30 mM 磷酸鈉 (pH 7.0)，2 mM EDTA 及 2 mM 半胱胺酸之緩衝液中以 1:50 (木瓜蛋白酶:蛋白質) 之比率由木瓜蛋白酶 (VWR) 來培育經蛋白質 A 純化之全長 1.12.1(M29I/D19A)IgG1 歷時 2-3 小時。接著將消化混合物塗覆於蛋白質 A 微管柱上以移除未消化之全長蛋白質及 Fc 片段。於流通中收集未結合之 Fab。接著使用尺寸排阻管柱 (Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) 進一步純化 Fab 蛋白質且將緩衝液交換為 PBS。之後藉由經由 Detoxi 凝膠 (PIERCE) 與 Vivapure Mini Q 離子交換管柱 (VivaScience) 塗覆蛋白質溶液而移除內毒素。將蛋白質以 0.2 μ m 針筒過濾器過濾且以 LAL 熱原質套組 (Cambrex) 測試內毒素含量。最終純化之蛋白質濃度為 2-3 mg/mL，內毒素含量 < 0.1 EU/mg 且純度 > 95%。如由電子噴霧質譜法所示，1.12.1(M29I/D19A)Fab 片段於非還原條件下具有 47,347 之分子量。Edman N 末端定序分析分別證實 EIVLTQSPG 之輕鏈 N-末端序列 (SEQ ID NO:113) 及 QVQLQESG 之重鏈序列 (SEQ ID NO:114)。

實例 6 藉由表面電漿共振 (SPR) 使用 BIACORE™ 判定完全人類抗 ALK-1 單株抗體之親和力值

藉由表面電漿共振使用 BIACORE™ 3000 儀器量測純化抗 ALK-1 抗體之親和力係如下使用製造者之實驗程序來進行。



為進行動力學分析，使用常規胺偶合將重組人類 ALK-1/Fc 融合蛋白質 (hALK-1/Fc) 及食蟹猴 ALK-1/Fc 融合蛋白質 (cALK-1/Fc) 固定於 CM5 BIAcore 感應晶片之獨立流槽中。使用 pH 5.0 之 10 mM 乙酸鹽緩衝液作為固定緩衝液來製備表面，且對於 hALK-1/Fc 及 cALK-1/Fc 融合蛋白質而言，分別達成 300 及 150 RU 之蛋白質密度。使用 pH 8.5 之 1 M 鹽酸乙醇胺進行未反應 N-羥基琥珀醯亞胺酯之失活反應。製備濃度介於 0.125 至 2 nM 之間之電泳緩衝液中之抗體樣本 (包括僅包含電泳緩衝液之 0 nM 溶液作為零參考)。使用 HBS-EP (pH 7.4 之 10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% 界面活性劑 P20) 作為電泳緩衝液，將樣本隨機化且歷時 10 分鐘注入雙份，其各自橫穿所有 4 個流槽。觀測到啟動速率與 1 至 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 之流動速率無關，此說明無質量傳輸限制。使用 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ 之流動速率判定親和力之值。監控抗體之解離歷時 10 分鐘，藉由 12 次第二注射 100 mM H_3PO_4 (25 $\mu\text{L}/\text{min}$) 使表面再生。使用 Scrubber (©BioLogic Software) 軟體套件處理原始數據且使用 CLAMP (©BioLogic Software) 軟體套件進行分析。將來自單一表面之多個數據組以每次六個數據組同時全程擬合為利用常見可變 R_{max} 值之簡單 1:1 蘭牟 (Langmuir) 結合模型。表 5 列出本發明之代表性抗 ALK-1 抗體之親和力值。代表性數據說明根據本發明製備之抗體對人類 ALK-1 具有高親和力及強結合常數。

表 5

藉由表面電漿共振(BIAcore)判定親和力值

純系	hALK-1/Fc親和力(pM)	hALK-1/Fc k_{off} (1/s)	cALK-1/Fc親和力(pM)
1.12.1(M29I/D19A)	<6.8	$<5.0 \times 10^{-6}$	27
1.14.2	76	5.6×10^{-5}	280
1.27.3	2.9	1.9×10^{-5}	60
1.31.1	<13	$<5.0 \times 10^{-6}$	150
1.162.1	18	1.1×10^{-5}	62
1.183.2	220	3.1×10^{-5}	1800
4.24.2	70	4.4×10^{-5}	430
4.38.1	100	4.0×10^{-5}	150
4.58.2	40	1.6×10^{-5}	130
4.62.1	9.6	7.6×10^{-6}	19
4.68.2	86	3.8×10^{-5}	320
4.72.2	73	3.4×10^{-5}	280
5.13.3	91	6.3×10^{-5}	190

1.12.1(M29I/D19A)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有兩個特異性胺基酸突變(以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸，及以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

實例7藉由表面電漿共振(SPR)使用 BIACORE™判定完全人類抗ALK-1單株抗體1.12.1之變異體的親和力常數(K_D)

藉由表面電漿共振使用 BIACORE™ 3000儀器量測純化抗ALK-1抗體之親和力係如下使用製造者之實驗程序來進行。

為進行動力學分析，使用胺偶合將完全人類抗ALK-1單株抗體1.12.1之變異體固定於CM5生物感應晶片之葡聚糖層上。使用pH 5.0之10 mM乙酸鹽緩衝液作為固定緩衝液來製備表面，且達成3500-4800 RU之蛋白質密度。使用pH 8.5之1 M鹽酸乙醇胺進行未反應N-羥基琥珀醯亞胺酯之失



活反應。製備濃度介於2.63至640 nM之間之電泳緩衝液中
之單體ALK-ECD樣本(包括僅包含電泳緩衝液之0 nM溶液
作為零參考)。使用HBS-EP(pH 7.4之10 mM HEPES、150
mM NaCl、3 mM EDTA、0.005%界面活性劑P20)作為電泳
緩衝液，將樣本隨機化且歷時2分鐘注入，其各自橫穿所
有4個流槽。使用25 μ L/min之流動速率判定親和力常數。
監控單體ALK-ECD之解離歷時10分鐘，藉由12次第二注射
100 mM H_3PO_4 (25 μ L/min)使表面再生。使用
Scrubber(©BioLogic Software)軟體套件處理原始數據且使
用CLAMP(©BioLogic Software)軟體套件進行分析。將該
數據全程擬合為簡單1:1蘭牟結合模型。表6列出本發明之
人類抗ALK-1單株抗體1.12.1之變異體的親和力量測。

表 6
藉由表面電漿共振(BIAcore)判定 mAb 1.12.1變異體親和力

常數 K_D			
抗體	啟動速率($M^{-1} s^{-1}$)	解離速率(s^{-1})	K_D (nM)
1.12.1	1.9×10^3	7.4×10^{-5}	39
1.12.1 (rWT)	2.2×10^3	5.8×10^{-5}	26
1.12.1 (D19A)	2.6×10^3	4.4×10^{-5}	17
1.12.1 (M29I)	2.4×10^3	9.1×10^{-5}	38
1.12.1 (M29I/D19A)(1)*	2.2×10^3	9.5×10^{-5}	43
1.12.1 (M29I/D19A)(2)*	2.3×10^3	8.4×10^{-5}	37

*使用兩個獨立表面獲得1.12.1(M29I/D19A)(1)及(2)之兩個
親和力常數。

1.12.1係指自融合瘤分離之mAb 1.12.1變異體。
1.12.1(rWT)係指 mAb 1.12.1變異體，即經表現重組
mAb。

1.12.1(M29I)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(D19A)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(M29I/D19A)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有兩個特異性胺基酸突變(以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸，且以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

實例8藉由表面電漿共振(SPR)使用 **BIACORE™**判定代表性完全人類抗ALK-1單株抗體之親和力常數(K_D)

藉由表面電漿共振使用 **BIACORE™** 3000儀器量測純化抗ALK-1抗體之親和力(K_D 及 k_{off})係如下使用製造者之實驗程序來進行。

為進行動力學分析，使用胺偶合將親和力純化mAb固定於CM5生物感應晶片之葡聚糖層上。使用pH 5.0之10 mM乙酸鹽緩衝液作為固定緩衝液來製備表面，且達成200-400 RU之蛋白質密度。使用pH 8.5之1 M鹽酸乙醇胺進行未反應之N-羥基琥珀醯亞胺酯之失活反應。製備濃度介於3.125-400 nM之間之電泳緩衝液中之單體ALK-ECD樣本(包括僅包含電泳緩衝液之0 nM溶液作為零參考)。使用HBS-EP(pH 7.4之10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005%界面活性劑P20)作為電泳緩衝液，將樣本



隨機化且歷時2分鐘注入雙份，其各自橫穿所有4個流槽。觀測到啟動速率與1至100 μL/min之流動速率無關，此說明無質量傳輸限制。使用25 μL/min之流動速率判定親和力常數。監控單體ALK-ECD之解離歷時10分鐘，藉由12次第二注射100 mM H₃PO₄(25 μL/min)使表面再生。使用Scrubber(©BioLogic Software)軟體套件處理原始數據且使用CLAMP(©BioLogic Software)軟體套件進行分析。將該數據全程擬合為簡單1:1蘭牟結合模型。表7列出本發明之代表性抗ALK-1抗體之親和力量測。

表 7

藉由表面電漿共振(BIAcore)判定代表性單株抗體之親和力常數K_D

mAb	啟動速率(M ⁻¹ s ⁻¹)	解離速率(s ⁻¹)	K _D (nM)
1.12.1(M29I/D19A)	3.3 x 10 ⁴	8.2 x 10 ⁻⁴	25
1.31.1	3.2 x 10 ⁴	1.9 x 10 ⁻⁴	6.0
4.72.1	3.2 x 10 ⁴	2.5 x 10 ⁻⁵	0.8
Fab 1.12.1(M29I/D19A)	3.8 x 10 ⁴	8.2 x 10 ⁻⁴	22

用以產生實例8之數據之單體ALK-ECD與用以產生實例7之數據者相比為不同之製劑。

1.12.1(M29I/D19A)係指mAb 1.12.1變異體，即含有上文提及之兩個特異性胺基酸突變(以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸，且以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸)之經表現重組mAb。

Fab 1.12.1(M29I/D19A)係指藉由使用木瓜蛋白酶消化1.12.1(M29I/D19A) IgG1製備之mAb 1.12.1(M29I/D19A)之Fab片段。

實例9抗ALK-1抗體之抗原決定基選擇性之識別

根據製造者之實驗程序，使用BIACORE™ 3000儀器(Biacore International AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J)進行交叉競爭實驗。

使用胺偶合將重組人類ALK-1/FC嵌合體固定於CM5生物感應晶片之葡聚糖層上。使用pH 5.0之10 mM乙酸鹽緩衝液作為固定緩衝液來製備晶片，且達成940 RU之蛋白質密度。使用pH 8.5之1 M鹽酸乙醇胺進行未反應N-羥基琥珀醯亞胺酯之失活反應。

將純化mAb於HBS-EP電泳緩衝液(pH 7.4之0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005%聚山梨醇酯20)中稀釋至50 nM之濃度。選擇一級抗體且接著將其以10 μ L/min之速率注入橫穿流槽歷時600秒鐘。注入完成之後，選擇二級抗體且將其以10 μ L/min之速率注入橫穿相同流槽歷時600秒鐘。藉由12次第二注射100 mM H_3PO_4 (25 μ L/min)使感應表面再生。

再生之後，再次將一級抗體以10 μ L/min之速率注入橫穿流槽歷時600秒鐘。注入完成之後，選擇不同之二級抗體且將其以10 μ L/min之速率注入橫穿相同流槽歷時600秒鐘。一旦已使用整板之14個抗體作為二級抗體，則選擇新穎一級抗體且以該新穎一級抗體重複該程序。進行該等程



序直至將一級抗體與二級抗體之所有可能組合均注入而橫穿該流槽。若在注入兩種抗體後觀測之總反應超過觀測之兩種可能之臨限值，則認為已發生二級抗體之結合。藉由使用與一級抗體及二級抗體二者相同之抗體來判定臨限值。於表 8 中展示，基於是否觀測到結合，建立反應矩陣：-表示無二級抗體之結合；x表示觀測到結合(反應大於個別抗體之臨限值)。對展示相同反應性圖案之純系進行分組，產生兩種不同之抗原決定基組，其中 1.11.1 在一組中且所有其他抗體在另一組中。

圖 8 BIAcore 抗原決定基分組反應矩陣

一級mAb	二級mAb													
	1.9.1	1.11.1	1.12.1 (M29I/D19A)	1.27.3	1.31.1	1.162.1	1.183.2	4.24.2	4.38.1	4.58.2	4.62.1	4.68.2	4.72	5.13
1.9.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.11.1	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1.12.1(M29I/D19A)	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.27.3	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.31.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.162.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.183.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.24.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.38.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.58.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.62.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.68.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.72	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.13	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

實例 10 食蟹猴 ALK-1 基因之分離

食蟹猴 ("Cyno") ALK-1 基因係自食蟹猴肺組織中提取。基於所公開之人類 ALK-1 基因序列 (Genebank 記錄 L17075)，設計引物以 PCR 擴增全長食蟹猴 ALK-1。根據製造者說明，使用 mRNA 純化套組 (Ambion，目錄號 1915)，

由冷凍切除之食蟹猴肺組織(約1 g)製備 mRNA。於 61°C 之黏接溫度下，利用基因特異性寡聚物：5'-AGCGGGCCCAGAGGGACCAATG(SEQ ID NO:115)(正向)及 5'-CAGAAAGGAATCAGGTGCTCCTGGGCTA(SEQ ID NO:116)(反向)將 200 ng 之 mRNA 反向轉錄且使用 OneStep RT-PCR 套組 (Qiagen，目錄號 210210) 進行 PCR 擴增。電泳之後，將適當尺寸(約 1.5 Kb)之 RT-PCR 產物切除且自 0.9% 瓊脂糖凝膠純化，接著將 TOPO-TA 選殖至 pCR4-TOPO 載體 (Invitrogen，目錄號 K4575-01) 中。將插入物定序以獲得食蟹猴 ALK-1 之 ORF 核苷酸序列。將核苷酸及預測轉譯胺基酸序列分別展示於 SEQ ID NO: 93 及 94 中。儘管基因之細胞質部分編碼食蟹猴與人類之間之相同蛋白質序列，但在胞外域 (ECD，其包括位置 22-118) 仍存在 5 個不同之胺基酸，且在蛋白質之跨膜區仍存在 1 個不同之胺基酸。人類與食蟹猴之間之 ECD 序列一致性為 94.8%。人類與靈長類 ECD 之對準展示於圖 2 中。

使用一對引物(正向：5'-GATTATGGCCTTGGGCTCCCC CAGGAAA(SEQ ID NO:117)及反向：5'-GGGCTATTGAAT CACTTTAGGCTTCTCTGGACTGTTG(SEQ ID NO:118))來 PCR 擴增全長食蟹猴 ALK-1 基因。

實例 11 藉由流式細胞儀 (FACS) 判定細胞表面結合特徵及靈長類交叉雜交

為產生可用以使用流式細胞儀 (FACS) 測試抗 ALK-1 結合親和力之 ALK-1 過度表現細胞株，將全長人類、食蟹猴及



大鼠 ALK-1 基因分別選殖至 Invitrogen(目錄號 K6510-20)之 pcDNA5/FRT/To TOPO 載體中，且轉染至 293 Flp-In T-Rex 宿主細胞 (Invitrogen 目錄號 R780-07) 中。使用濕黴素進行選擇以獲得最終穩定之細胞株。藉由於 37°C /5% CO₂ 下引入四環素 (2 µg/mL) 歷時 24 小時而達成個別全長 ALK-1 蛋白質之過度表現。

使用 FACS 檢定，採用過度表現 ALK-1 蛋白質之 293 個穩定細胞來測試抗 ALK-1 mAb 對細胞表面 ALK-1 之結合親和力。將該等細胞使用胰蛋白酶-EDTA 分離且以冷 PBS-SA 洗滌。在等分至 96 孔培養盤中之後，於 4°C 下將該等細胞以血清阻斷且以不同濃度之特異性 mAb 培育歷時 1 小時。隨後，將該等細胞洗滌且以與 R-PE 螢光團共軛之抗人類 κ 二級抗體培育，之後使用 FACSCalibur 流式細胞儀 (BD Biosciences) 進行分析。在不施加任何閘控之情況下，為每一樣本收集 10,000 個事件。於表 9 中展示，將每一樣本直方圖之幾何平均值作為 mAb 濃度之函數進行繪圖且於擬合至雙態平衡模型後計算每一 mAb 之 K_D。等效人類及靈長類 FACS 實驗之實例係展示於圖 3 中。

表 9

藉由 FACS 量測之抗 ALK-1 單株抗體對細胞表面人類或食蟹猴 ALK-1 之平均結合親和力 (K_D) 結果

抗體	K_D (nM)	
	人類	食蟹猴
1.12.1	6.7	2.0
1.27.1	3.7	2.2
1.162.1	5.6	3.0
4.38.1	9.3	3.4
4.58.1	14.0	6.7
4.72.1	6.4	3.8
5.13.1	3.2	1.6
1.31.1	3.2	1.7
4.24.1	7.6	3.1
4.62.1	2.3	0.78
4.68.1	8.4	9.0

此外，鑒於大鼠/人類及小鼠/人類 ALK-1 之間分別具有 74% 及 68% 之 ECD 序列一致性，因此藉由 FACS 檢定展示 1.12.1 對大鼠具有極有限之交叉 ($K_D > 100$ nM) 且預測其對小鼠具有極低之交叉。

FACS 檢定亦用以判定重組 1.12.1 mAb 變異體之 K_D 。於表 10 中展示之結果說明來自重組抗體之類似結合親和力。

表 10

藉由 FACS 量測之 1.12.1(M29I/D19A) 變異體對細胞表面人類或食蟹猴 ALK-1 之平均結合親和力 (K_D) 結果

抗體	K_D (nM)	
	人類	食蟹猴
1.12.1	6.7	2.0
1.12.1(rWT)	5.9	6.0
1.12.1(M29I)	6.0	3.3
1.12.1(D19A)	5.7	3.8
1.12.1(M29I/D19A)	7.2	3.4
Fab 1.12.1(M29I/D19A)	0.77	ND

1.12.1係指自融合瘤分離之mAb 1.12.1變異體。

1.12.1(rWT)係指 mAb 1.12.1 變異體，即經表現重組 mAb。

1.12.1(M29I)係指 mAb 1.12.1 變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(D19A)係指 mAb 1.12.1 變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(M29I/D19A)係指 mAb 1.12.1 變異體，即含有兩個特異性胺基酸突變(以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸，且以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

Fab 1.12.1(M29I/D19A)係指藉由使用木瓜蛋白酶消化 1.12.1(M29I/D19A) IgG1而製備之mAb 1.12.1(M29I/D19A)之Fab片段。

實例 12 Id1之Taqman檢定

將HUVEC(Biowhittaker，目錄號CC-2519)以12000個細胞/孔接種於24孔培養盤上之600 μ L完全HUVEC培養基(EGM-2 Bullet套組，Biowhittaker，目錄號CC-3162)中，且使其生長隔夜。第二天，該等細胞一般長滿50%。移除完全培養基且添加200 μ L饑餓培養基(僅具有0.2% FBS之EBM-2)。培育細胞歷時2小時。接著以40 μ L抗體於PBS中之溶液處理該等細胞。將經凍乾之Ab以無菌PBS復水。最

後，根據製造者之實驗程序，以1%之FBS/Basal培養基(最終濃度)處理該等細胞歷時30分鐘，移除該培養基且將該等細胞於400 µL之RTL緩衝液(Rneasy 96套組，Qiagen，目錄號74182)中溶解。隨後，使用RNeasy套組(根據製造者說明)製備RNA。將RNA溶離且以RiboGreen® RNA定量套組(Molecular probes，目錄號R-11490)定量。對於實時PCR分析使用等量之RNA總量以偵測Id1 RNA表現(ABI 7900儀器)。使用Taqman One Step PCR Master混合套組(ABI，目錄號4309169)及下文列出之ID1引物/探針序列進行PCR。使用40個循環之以下黏接及擴增條件進行PCR: 95°C，15秒鐘；60°C，1min。

TaqMan探針：CPG共軛之5'-6-FAM及3'-TAMRA。

名稱：ID1-探針

序列：5' CCAGCACGTCATCGACTACATCAGGGA 3'

(SEQ ID NO:119)

Taqman PCR引物：

名稱：ID1-F

序列：5' AAGGTGAGCAAGGTGGAGATTC 3'(SEQ ID NO:120)

名稱：ID1-R

序列：5' TTCCGAGTTCAGCTCCAACTG 3'(SEQ ID NO:121)

圖4及5中展示1.12.1(M29I/D19A)前導分子(包括1.12.1序列變異體)及Fab衍生物之Id1滴定實例。

該檢定之平均 IC_{50} 值之概述展示於表11中。重複進行所有 IC_{50} 判定三次。

實例 13 藉由 LI-COR Biosciences 之 Odyssey 紅外成像系統偵測 Smad1 磷酸化作用 (24 孔培養盤)

將 HUVEC (Biowhittaker, 目錄號 CC-2519) 以 18000 個細胞 / 孔接種於 24 孔培養盤上之 600 μ L 完全 HUVEC 培養基 (EGM-2 Bullet 套組, Biowhittaker, 目錄號 CC-3162) 中, 且使其生長隔夜。第二天, 該等細胞一般長滿 50%。移除完全培養基且添加 200 μ L 饑餓培養基 (饑餓培養基: 僅具有 0.2% FBS 之 EBM-2)。培育細胞歷時 2 小時。接著以 40 μ L 抗體於 PBS 中之溶液處理該等細胞歷時 3 小時。最後, 以 0.3X 之完全培養基 (最終濃度) 處理該等細胞歷時 35 分鐘。移除該培養基且將該等細胞於 80 μ L 之 1.1X 樣本緩衝液 (Invitrogen, 目錄號 NP0007) 中溶解。藉由西方墨點法, 使用 X 細胞 Surelock Mini-Cell & Blot Module (Invitrogen, 目錄號 EI0002) 判定磷酸化 Smad1。使用兔抗磷光體 Smad1 抗體 (Cell Signaling, 抗體 9511) 偵測磷酸化 Smad1, 接著藉由 IRDye™ 800 共軛之抗 RABBIT IgG (Rockland Immunochemicals, 目錄號 611-732-127) 來偵測。使用 Odyssey 紅外影像器 (Li-Cor) 定量磷酸化 Smad1 之量。將肌動蛋白 (Santa Cruz, # sc-8432) 用於標準化 (抗小鼠 Alex 680, Molecular Probe, 目錄號 A-21058)。該檢定之平均 IC_{50} 值之概述展示於表11中。重複進行所有 IC_{50} 判定三次。

表 11

純系	ID1 Taqman IC ₅₀ nM	pSmad1 西方 IC ₅₀ nM
1.11.1	nd	nd
1.12.1(M29I/D19A)	16	18
1.13.1	100	87
1.27.1	82	70
1.29.1	94	82
1.31.1	24	21
1.162.1	75	15
1.183.1	58	17
4.24.1	100	82
4.38.1	87	52
4.58.1	14	15
4.62.1	24	34
4.68.1	141	110
4.72.1	21	35
5.13.1	30	68

實例 14 抗 ALK-1 單株抗體之內化特徵

使用 FACS 來監控剩餘細胞表面受體 ALK-1 以及中和抗體之時程。藉由可結合細胞表面 ALK-1 且可識別來自中和抗體之不同抗原決定基之標記抗體來監控剩餘之細胞表面 ALK-1。識別小鼠抗人類 ALK-1 ECD mAb(R&D 系統，目錄號 AF310) 且將其作為標記抗體用於研究中。

使用內皮細胞株 HUVEC 及 HUAEC 研究內化作用之時程。使細胞於 37°C，5% 之 CO₂ 下於每孔含有 200 μ L 完全培養基之 24 孔培養盤中生長。在 48 小時過程期間 11 個時間點之每一處，向一個孔中添加 2 μ L 之 1 mg/mL 抗體溶液且混合(中和抗體之最終濃度為 10 μ g/mL)。接著將該培養盤放回 37°C 恆溫箱中直至當將該培養盤置於冰上以終止內化處

理之0小時時間點。於此點向該等孔中添加標記抗體(10 $\mu\text{g/mL}$ 之最終濃度)且於冰上培育1小時。接著將該等細胞以PBS洗滌，藉由胰蛋白酶作用分離且轉移至96孔培養盤中。接著將細胞洗滌、阻斷及以帶有不同螢光團之二級抗體處理以監控中和抗體及細胞表面上剩餘之受體ALK-1。將該等樣本於FACSCalibur流式細胞儀上檢定，計數3,000-5,000個事件/樣本。計算特定螢光通道中每一樣本之幾何平均值且作為時間之函數進行繪圖。將數據擬合為經修正放射衰變方程式以獲得內化作用之半衰期($t_{1/2}$)以及當內化作用達到穩態時中和抗體或細胞表面剩餘之受體ALK-1之百分比。如圖6所示，mAb 1.12.1(M29I/D19A)與細胞表面受體ALK-1以相同之速率內化且內化至相同之程度。1.12.1(M29I/D19A)內化作用之半衰期為約2小時。當50%之抗體內化時，達到平衡。購自R&D系統之多株抗體(目錄號AF370)以1小時之 $t_{1/2}$ 內化且達到約70%之受體得以內化之穩態(圖6)。以本發明之其他人類抗ALK-1 mAb(未圖示)觀測到類似之內化特徵。

實例15確立人類包皮-SCID嵌合小鼠

對H-C Yan等人之"Human/Severe Combined Immunodeficient Mouse Chimeras, An Experimental In Vivo Model System to Study the Regulation of Human Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecules", *J. Clin. Invest.* 91:986, 1993 ; J. Varner之"Regulation of Angiogenesis in Vivo by Ligation of Integrin $\alpha 5\beta 1$ with the Central Cell-Binding Domain of

Fibronectin" *Amer. J. Path.* 156 (4):1345, 2000 ; K. Tahtis 等人之 "Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model" *Mol. Cancer. Ther.* 2(8):729, 2003 中先前公開之程序進行外科程序之顯著修正。根據 National Disease Research Institute 及 Cooperative Human Tissue Network 所達成，修整人類包皮片之不健康區且將其轉移至以盤尼西林及鏈黴素 (Gibco/Life Tech，目錄號 15070-063) 補充之 RPMI 培養基 (Cellgro/Mediatech，目錄號 MT-15-040-CV) 中 (向 500 mL 之 RPMI 中添加 5 mL 之 pen/strep 儲備溶液)。使用解剖刀且於無菌皮氏培養皿中切割，將皮膚修整為大約 8×13 mm 之橢圓形，清除任何粗糙端及結締組織且於手術前儲存於濕冰上。將適當體積 (4 μ L/公克動物) 之 100 mg/mL 氯胺酮 (Ketaset^{TR}, Fort Dodge Animal Health)/1 mg/mL 美托咪定 (medetomidine) (Pfizer Animal Health-Dormitor) 溶液經腹膜內注射入 SCID 小鼠之腹部 (意即以 45° 角，於皮下但不向內過深)。一旦麻醉，即對小鼠施以眼潤滑劑，經皮下注射酮洛芬 (10 mg/kg, Fort Dodge Animal Health) 且剃去手術部位之毛髮。使用 Clorahexiderm (Butler, Chclo-Scrub 40，目錄號 WAB20109) 且接著使用乙醇，以自手術部位中心開始向外且避免自不清潔區返回清潔區之圓形方式移動將手術區進行外科擦洗三次。將小鼠轉移至預備之手術罩且置放於維持在 37°C 之熱水墊 (Gaymar Industries，目錄號

TP500 T/Pump)上。接著將小鼠置於異氟麻醉下以供持續手術。以剪切為暴露手術部位之手術簾覆蓋小鼠之背側。以鑷子夾起小鼠皮膚且以彎曲剪刀一次性切割橢圓形之皮膚組織。將適當尺寸之人類包皮置於小鼠上。使用Ethilon縫合術(Ethicon目錄號697H.)，自橢圓頂部起始，接著底部，接著最右側且接著最左側，將人類與小鼠皮膚縫合在一起。其間進行多次縫合以將該等組織進一步縫合在一起。在皮膚周圍等距縫合大約8針。在手術過程中，當皮膚/小鼠手術創口變得乾燥時使用無菌生理食鹽水針筒以對其進行沖洗。於創口上置放急救帶。接著使用透明敷條(3M Tegaderm™)鬆散包覆於繃帶周圍。將敷條切割成覆蓋比急救帶稍寬區域之尺寸。接著給予小鼠阿替美唑(Atipamezole)(50-100 μ L, Pfizer Animal Health-Antisedan)且使小鼠於5-10 min內在加熱籠中恢復。於7-10天內移除敷條及繃帶且於第15天之前大部分皮膚呈現結疤。於21-28天之間發生完全癒合，此後預備使皮膚以腫瘤細胞進行接種。圖8展示手術後部分經植入皮膚之之組織學(H&E染色)分析的實例。經植入皮膚組織學近似模擬植入小鼠之人類皮膚的特徵，該特徵係由Tahtis等人之"Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model" *Mol. Cancer. Ther.* 2(8):729, 2003來描述。h.e.：人類表皮層；h.d.：人類真皮層。

實例16人類包皮-SCID嵌合小鼠之膠原蛋白模型

以 0.02 N 乙酸將膠原蛋白 I 儲備溶液 (目錄號 354236, Becten-Dickinson) 稀釋至 4 mg/mL 且於植入之前將其保持於冰上。將酸性膠原蛋白溶液 (8 份) 與 10X M199 (Sigma, 目錄號 M9163) (1 份) 及人類血漿纖維結合蛋白 (Fn) (目錄號 354008, Becten-Dickinson) 混合以達到 90 μ L/mL 之最終 Fn 濃度; 添加 NaOH (1.0 N) 以將 pH 調節至約 7.2。將膠原蛋白 / Fn 混合物保持於冰上直至使用。使用以上膠原蛋白 / Fn 混合物加所關注之血管生成抑制劑來製備具有或不具有人類巨血管內皮細胞 (HMVEC) (Cascade Biologics, 目錄號 C-010-5C) 之植入混合物。將 HMVEC 以 PBS 中 6×10^6 個細胞 / mL 製備。將 50-100 μ L 植入混合物經皮內注射至 SCID 嵌合小鼠之包皮中。7-14 天之後, 收穫膠原蛋白塞, 將其嵌入 OCT 化合物 (目錄號 4583, Sajura Finetek, CA) 中且急速冷凍以供進行免疫組織化學分析。以 Trichrome 套組 (目錄號 KC1641, Mater Tech, CA) 將包皮中之膠原蛋白塞識別為如圖 9(A) 所示之藍色染色。藉由使用抗人類 CD-31 抗體 (純系 13.3, Vector Laboratories) 對人類 P-CAM 染色來識別人類血管 (圖 9(B))。表 12 概述在包皮-SCID 嵌合小鼠之膠原蛋白模型中之人類血管染色及定量。

表 12 膠原蛋白模型結果之概述

基質	基質中之HMVEC	處理(Rx)	Rx之天數	研究終點	人類血管計分(1×10^3)	對照%(人類血管)
1.6 mg/ml 膠原蛋白	無	無處理	4	人類CD-31染色	0.036 ± 0.001	40
1.6 mg/ml 膠原蛋白	7×10^3	無處理	4		0.071 ± 0.022	78
1.6 mg/ml 膠原蛋白	1.4×10^4	無處理	4		0.063 ± 0.016	69
2.4 mg/ml 膠原蛋白	無	無處理	4		0.091 ± 0.056	100
2.4 mg/ml 膠原蛋白	7×10^3	無處理	4		0.067 ± 0.049	74
2.4 mg/ml 膠原蛋白	1.4×10^4	無處理	4		0.062 ± 0.047	68
3.0 mg/ml 膠原蛋白	8.8×10^3	無處理	4	人類CD-31染色	54 ± 9	100
3.0 mg/ml 膠原蛋白	8.8×10^3	混合於凝膠中之同型對照抗體 100 $\mu\text{g/ml}$	4		52 ± 13	96
3.0 mg/ml 膠原蛋白	8.8×10^3	混合於凝膠中之1.12.1(M29I/D19A)抗體 100 $\mu\text{g/ml}$	4		15 ± 3	28
3.0 mg/ml 膠原蛋白	無	無處理	4	人類CD-31染色	0.112 ± 0.026	100
5.0 mg/ml 膠原蛋白	無	無處理	4		0.031 ± 0.012	28
3.0 mg/ml 膠原蛋白	無	同型對照抗體100 $\mu\text{g/ml}$ ，皮內注射	4	人類CD-31染色	75 ± 15	100
3.0 mg/ml 膠原蛋白	無	1.12.1(M29I/D19A)抗體，100 $\mu\text{g/ml}$ ，皮內注射	4		39 ± 11	52
3.0 mg/ml 膠原蛋白	無	1.14.1抗體，100 $\mu\text{g/ml}$ ，皮內注射	4		44 ± 28	59

實例 17 人類包皮-SCID 嵌合小鼠中之 M24met 腫瘤模型

在該等研究中一般使用手術後 5-10 週之間之移植期。

M24met 細胞株係由 Mueller 及其合作者於 "Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling

thrombin receptor on malignant melanoma cells", *Cancer Research*, 55(8):1629-32, 1995中描述。如下製備M24met細胞懸浮液：將80%長滿之M24met細胞洗滌、使用胰蛋白酶/EDTA(Gibco, 目錄號25200-056)胰蛋白酶化且收集於以10%之FBS(Cellgro/Mediatech, 目錄號AKD-11775)及2 mM L-麩醯胺酸(Cellgro/Mediatech, 目錄號25-005-C1)補充之PRMI(Cellgro/Mediatech, 目錄號MT-15-040-CV)培養基中。將該等細胞以600 rpm離心歷時5 min, 且再懸浮於無菌PBS中。使用Coulter計數器(Beckman Coulter, Model Z2)估計細胞計數。將該等細胞以600 rpm離心歷時5 min且再懸浮於膠原蛋白/及Fn(3 mg/ml)混合物中以獲得 4×10^7 個細胞/ml之細胞懸浮液以供植入。

為接種, 將 2×10^6 個上述細胞經皮內注射(50 μ l之 4×10^7 個細胞/ml)至小鼠中之移植人類皮膚中。植入後5-7天時, 腫瘤將可觸知且於開始給藥前將小鼠隨機分為對照組及治療組。將對照組定義為使該等動物不接收給藥, 接收抗ALK-1抗體於其中組成之媒劑之給藥或同型匹配之IgG₂人類單株抗體抗KLH(Pfizer Inc)之給藥。將治療組定義為使該等動物接收抗ALK-1抗體1.12.1(M29I/D19A)之給藥。

實例18人類及小鼠CD-31免疫螢光(IF)雙重染色

將冷凍組織部分風乾且於-20℃下固定於丙酮(Fisher, 目錄號A16S-4)中歷時10 min。將該等樣本再次風乾且於PBS中洗滌三次, 每次5分鐘。於室溫下, 在PBS中將該等樣本於5%兔血清(Vector Laboratories, 目錄號S-5000)中阻

斷歷時30 min。於5%兔血清中以分別稀釋為1:100及1:150之抗人類CD-31抗體(Santa Cruz, 目錄號SC1505)及抗小鼠CD-31(Pharmingen, Clone Mec1 3.3, 目錄號01951A)製備一級抗體混合物。於室溫下將上述抗體混合物添加至組織樣本中歷時1小時。將該等塊於PBS中洗滌三次, 每次5 min, 之後於室溫下以二級抗體混合物培育1小時。於PBS/0.05%吐溫-20(Sigma, 目錄號P1379)、Texas紅兔抗山羊抗體(Jackson Labs, 目錄號305-075-003)及FITC兔抗大鼠抗體(Jackson Labs, 目錄號312-095-003)中製備二級抗體混合物。若使用冷凍抗體, 則將該等抗體稀釋為1:50, 或若使用新鮮抗體, 則稀釋為1:100。將該等載片於PBS中再洗滌三次, 每次5 min, 之後將其安裝於Vectashield (Hard Set, Mounting medium with DAPI, Vector Lab, CA, 目錄號H-1500)中。將該等載片保持於黑暗及4°C下直至成像分析。使用Olympus BX60螢光顯微鏡進行成像分析, 且使用Olympus microfire數位彩色照相機進行攝影。採用來自3-5個熱點/載片、一個載片/動物、4-7個動物/組之圖片, 且使用Image Pro Plus v4.5(MediaCybernetics)由三個個體對由抗人類CD-31陽性染色表示之血管區進行定量。將藥物動力學終點(組平均)表現為與對照組相比之人類CD-31抑制作用百分比或總體人類血管區。由ANOVA判定統計顯著性。圖10展示人類包皮SCID嵌合小鼠中M24met腫瘤之人類(紅)及小鼠(綠)血管之免疫螢光成像。

實例19人類CD-31免疫組織化學(IHC)染色

將冷凍組織部分風乾且於-20℃下固定於丙酮中歷時10 min。將該等樣本再次風乾且於PBS中洗滌兩次，每次5分鐘。將該等樣本於0.075% H₂O₂/甲醇(Fisher，目錄號A433-4)中培育15 min且於PBS中洗滌三次，每次5 min。將該等樣本於5%兔血清/PBS中阻斷歷時30 min，且於RT下塗覆以5%兔血清中1:100之抗人類CD-31抗體(Santa Cruz，目錄號SC1505)歷時1小時。將該等樣本於PBS中洗滌兩次，每次5 min且於RT下塗覆以5%之兔血清中1:200之兔抗山羊(Vector Labs，目錄號BA-5000)歷時35 min。接著將該等載片於PBS中洗滌兩次，每次5 min且添加新鮮製造之抗生蛋白鏈菌素(Vector Labs, ABC Elite套組，目錄號PK-6100)。將該等載片於PBS中再洗滌兩次，每次5 min，且接著使其於二胺基聯苯胺(DAB)(Vector Labs，目錄號SK-4100)中發育。將該等載片於PBS中洗滌兩次，每次5 min，繼而以Mayers蘇木素(Sigma，目錄號HHS-32)洗滌5秒鐘。將該等樣本於diH₂O中良好沖洗且於稀釋(1L diH₂O中5 ml原料)氫氧化銨溶液(Sigma，目錄號A-6899)中簡單浸漬兩次且於diH₂O中再次沖洗。接著將該等樣本於70%、90%且接著於100%乙醇(Harleco，目錄號65347/85)中各自脫水1分鐘，且最後於二甲苯(JT Baker，目錄號516,09)中脫水。將該等載片安裝以Cytoseal 60(Stephens Scientific，目錄號8310-4)且以蓋玻片覆蓋以供成像分析。圖11展示人類包皮SCID嵌合小鼠中M24met腫瘤之人類血管(棕色)之IHC成像。

實例 20 藉由抗 ALK-1 抗體 1.12.1(M29I/D19A)之治療性治療

對於治療而言，給藥係於皮下(sc)或靜脈內(iv)進行。對於每次研究而言，一般給予一劑 1.12.1(M29I/D19A)抗體。若需要，在第 9 或 10 天投與第二劑 ALK-1 抗體。有時投與多次劑量，意即 1、5、10、50 mg/kg 以研究人類血管生長之劑量依賴性抑制作用。每日監控動物且藉由測徑器以每週三次對腫瘤進行量測。在第 14-17 天時，腫瘤介於 250-350 mm³ 之間且將其自小鼠移除，嵌入 OCT 且冷凍下來以供 IF 或 IHC 分析。圖 12 展示對照組及以 1.12.1(M29I/D19A)處理 (10 mg/kg) 之人類包皮 SCID 嵌合小鼠中 M24met 腫瘤之人類(紅)及小鼠(綠)血管的代表性免疫螢光成像。圖 13 中展示於人類包皮 SCID 嵌合小鼠模型中藉由 1.12.1(M29I/D19A)對人類腫瘤血管之劑量依賴性抑制作用且於表 13 中展示相關研究之概述。

表 13

SCID-嵌合模型中 M24met 腫瘤之人類血管生長的活體內模型特徵及抑制作用之概述

實驗程序參數					終點		通用註解
腫瘤	藥物	劑量	途徑	時程	CD31(與對照組相比之抑制%)	研究天數	
MCF-7	無	na	na	na	未定量	19	腫瘤係經皮內植入。以雌二醇及膠原蛋白植入物進行測試且不以其進行測試。腫瘤緩慢生長且幾乎不表現人類 CD31

實驗程序參數					終點		通用註解
腫瘤	藥物	劑量	途徑	時程	CD31(與對照組相比之抑制%)	研究天數	
M24met	無	na	na	na	未定量	19	腫瘤係經皮內植入。以膠原蛋白/FN基質進行測試或不以其進行測試。藉由發現優良腫瘤生長之基質，未來所有研究將含有基質補充物。腫瘤展示優良之人類CD31染色
M24met(小)	無	na	na	na	未定量	9	腫瘤尺寸<100 mm ³ 。幾乎無人類CD31
M24met (中等)	無	na	na	na	未定量	12	腫瘤尺寸<100-200 mm ³ 。一些人類CD31
M24met (大)	無	na	na	na	未定量	12	腫瘤尺寸<200 mm ³ 。大M24met腫瘤具有較多數目之人類血管染色，未來研究將以較大腫瘤進行
M24met	非特異性人類IgG	10 mg/kg	IV	2次給藥(第5及9天)	0	15	第一篩檢研究。1.12.1(M29I/D19A)展示人類CD31染色顯著降低。未觀測到腫瘤生長抑制作用
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	IV		42		
M24met	非特異性人類IgG	10 mg/kg	IV	2次給藥(第5及10天)	0	14	第二篩檢研究。證實GW-366結果；未觀測到腫瘤生長抑制作用
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	IV		40		

實驗程序參數					終點		通用註解
腫瘤	藥物	劑量	途徑	時程	CD31(與對照組相比之抑制%)	研究天數	
M24met	非特異性人類IgG	10 mg/kg	SC	2次給藥(第5及10天)	0	14	1.12.1(M29I/D19A)對人類CD31之劑量依賴活性之第一次測試。觀測到一些劑量依賴性效應。PK導致單一劑量將足以使CD31顯著降低。未觀測到腫瘤生長抑制作用
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	SC		43		
	1.12.1(M29I/D19A)	1 mg/kg	SC		50		
	1.12.1(M29I/D19A)	0.1 mg/kg	SC		20		
M24met	不給藥	0 mg/kg	na	na	ND	16	1.12.1(M29I/D19A)對人類CD31之劑量依賴活性之第二次測試。觀測到明確之劑量依賴性抗CD31效應。未觀測到腫瘤生長抑制作用
	同型匹配之IgG	10 mg/kg	SC	一次給藥(第5天)	0		
	非特異性人類IgG	10 mg/kg	SC		ND		
	1.12.1(M29I/D19A)	1 mg/kg	SC		24		
	1.12.1(M29I/D19A)	5 mg/kg	SC		59		
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	SC		72		
M24met	同型匹配之IgG	10 mg/kg	SC	一次給藥(第5天)	0	14	1.12.1(M29I/D19A)之最終廣泛劑量範圍測試。研究展示優良之劑量依賴性效應。將數據擬合為S形劑量反應曲線產生93 nM之IC ₅₀ 。未觀測到腫瘤生長抑制作用
	1.12.1(M29I/D19A)	1 mg/kg	SC		33		
	1.12.1(M29I/D19A)	3 mg/kg	SC		41		
	1.12.1(M29I/D19A)	5 mg/kg	SC		60		
	1.12.1(M29I/D19A)	7.5 mg/kg	SC		60		
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	SC		73		
	1.12.1(M29I/D19A)	50 mg/kg	SC		70		

實例 21 活體內 EC₅₀ 判定

以 M24met 細胞經皮內植入人類包皮 SCID 嵌合小鼠，且

以 1、3、5、7.5、10 及 50 mg/kg 之抗 ALK-1 抗體 1.12.1(M29I/D19A) 或以同型匹配抗人類 KLH 抗體 (10 mg/kg) 對其進行處理 (sc)。實驗結束時，如上文所述對每一腫瘤中之人類血管區定量。使用如下描述之方法量測抗 ALK-1 抗體 1.12.1(M29I/D19A) 之小鼠血漿濃度：藉由 ELISA (酶聯結免疫吸附劑分析法) 分析來自小鼠血清樣本之抗 ALK-1 抗體 1.12.1(M29I/D19A) 濃度。將 ELISA 盤塗覆以 PBS 中 10 µg/ml 山羊抗人類 IgG Fc 特異性抗體 (Pierce，目錄號 31123)，於 4°C 培育隔夜且接著於室溫下以 StartBlock 阻斷緩衝液 (Pierce，目錄號 37542) 阻斷歷時 1 小時。分析之前，將血清樣本於 StartBlock 阻斷緩衝液中稀釋 100 及 1000 倍。於稀釋 100 及 1000 倍之空白血清中製備兩組標準物。將標準物及稀釋血清樣本於盤上培育 1 小時。使用辣根過氧化物酶 (HRP) 標記之山羊抗人類 IgG (Fab 特異性) 抗體 (Sigma，目錄號 A0293) 偵測結合之抗 ALK-1 抗體 1.12.1(M29I/D19A)。所使用之基質為 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺 (Sigma，目錄號 T8665)。於 Vmax 盤讀取器 (Molecular Devices, Menlo Park, CA) 上讀取 450 nm 時之吸光率。使用非線性回歸擬合標準曲線。該檢定之偵測限制為 10 ng/ml 之抗 ALK-1 抗體 1.12.1(M29I/D19A)。

圖 15 中展示抗 ALK-1 抗體 1.12.1(M29I/D19A) 之 SCID 小鼠血漿濃度。

圖 15 表示 M24met 包皮 SCID 嵌合模型中 1.12.1(M29I/D19A) 之估計 EC₅₀。相對於各治療組整個研究時期 (14 天)

之平均血漿PK繪製人類血管區。藉由Graphpad之S形劑量依賴程式(Prizm)產生擬合曲線。由曲線擬合得到93 ng/ml之EC₅₀(EC₅₀定義為對照組中人類血管區降低50%需要之血漿濃度)。

如同特定及個別指示每一個別公開案或專利申請案以引用的方式併入，本說明書中引用之所有公開案、專利及專利申請案係以引用的方式併入本文。儘管為清楚理解之目的，已以說明及實例之方式詳細描述前述發明，但根據本發明之教示，一般熟習此項技術者將顯而易見，在不偏離附屬申請專利範圍之精神或範疇下，可進行特定改變及修正。

【圖式簡單說明】

圖1展示抗原決定基結合資料之實例。歷時10分鐘注入1.12.1(M29I/D19A)抗體，繼而歷時第二個10分鐘注入1.12.1(M29I/D19A)抗體。此界定歷時20分鐘注入彼抗體中之最大反應。20分鐘注入最大反應與對於1.27.1抗體所判定者類似。歷時10分鐘注入1.12.1(M29I/D19A)抗體，繼而歷時10分鐘注入1.27.1抗體。若總反應介於所界定之最大反應之間，則該兩個抗體必須結合至相同之抗原決定基。若總反應超過最高之最大反應，則該等抗體必須結合至不同之抗原決定基。以與實例9所述之反向注射順序重複該實驗。

圖2展示人類及犬類ALK-1蛋白質之序列對準。

圖3展示結合至細胞表面ALK-1之重組1.12.1抗體之K_D判

定。(a)人類。(b)犬類。

1.12.1(rWT)係指 mAb 1.12.1 變異體，即經表現之重組 mAb。

1.12.1(M29I/D19A)係指 mAb 1.12.1 變異體，即含有兩個特異性胺基酸突變(以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸，及以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(M29I)係指 mAb 1.12.1 變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(其中以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(D19A)係指 mAb 1.12.1 變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(其中以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

圖4展示對1.12.1抗體變異體使用ID1 Taqman檢定之ID1滴定實例。

1.12.1係指自融合瘤分離之mAb 1.12.1變異體。

1.12.1(rWT)係指 mAb 1.12.1 變異體，即經表現之重組 mAb。

1.12.1(M29I/D19A)係指 mAb 1.12.1 變異體，即含有兩個特異性胺基酸突變(以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸，及以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(M29I)係指 mAb 1.12.1 變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(其中以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫

胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(D19A)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(其中以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

圖5展示對1.12.1抗體序列變異體及Fab衍生物使用ID1 Taqman檢定之ID1滴定實例。

1.12.1係指自融合瘤分離之mAb 1.12.1變異體。

1.12.1(rWT)係指 mAb 1.12.1變異體，即經表現之重組 mAb。

1.12.1(M29I)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(其中以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(D19A)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有特異性單一胺基酸突變(其中以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

1.12.1(M29I/D19A)係指 mAb 1.12.1變異體，即含有兩個特異性胺基酸突變(以異白胺酸置換重鏈中位置29之甲硫胺酸，及以丙胺酸置換輕鏈中位置19之天冬胺酸)之經表現重組 mAb。

Fab 1.12.1(M29I/D19A)係指藉由使用木瓜蛋白酶消化1.12.1(M29I/D19A) IgG1製備之mAb 1.12.1(M29I/D19A)之Fab片段。

圖6展示ALK-1內化作用。(a)監控細胞表面上剩餘之中和抗體。(b)監控剩餘細胞表面受體ALK-1。

圖 7A 展示本發明之抗 ALK-1 抗體之可變結構域序列與生殖系序列之對準。與生殖系相比之突變以粗體顯示。CDR 序列為加下劃線。圖 7B 展示抗 ALK-1 抗體 1.12.1、1.14.1、1.162.1、1.31.1、4.62.1 及 4.72.1 之輕鏈可變結構域之預測胺基酸序列與人類生殖系 A27 V_K 序列之對準。圖 7C 及 7D 展示抗 ALK-1 抗體 1.12.1、1.151.1、1.162.1、1.8.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1 及 5.34.1 之重輕鏈可變結構域之預測胺基酸序列與人類生殖系 4-31 V_H 序列之對準。

圖 8 展示手術後部分經植入人類皮膚之組織學 (H&E 染色) 分析實例。

圖 9(A) 展示人類皮膚嵌合體小鼠中膠原蛋白之三色染色。

圖 9(B) 展示偵測植入人類包皮嵌合體小鼠中之膠原蛋白凝膠中之人類血管。Tex 紅：人類血管。FITC：小鼠血管。黃色：共染色。

圖 10 展示在人類包皮 SCID 嵌合體小鼠中，M24met 腫瘤之人類(紅)及小鼠(綠)血管的免疫螢光成像。

圖 11 展示在人類包皮 SCID 嵌合體小鼠中，M24met 腫瘤之人類血管(棕色)的 IHC 成像。

圖 12 展示在人類包皮 SCID 嵌合體小鼠中，對照樣本及以 1.12.1(M29I/D19A) 抗體處理 (10 mg/kg) 之 M24met 腫瘤之人類(紅)及小鼠(綠)血管的代表性免疫螢光成像。

圖 13 展示在人類包皮 SCID 嵌合體小鼠模型中，藉由

1.12.1(M29I/D19A)抗體對人類腫瘤血管生長之劑量依賴型抑制作用。

圖 14 展示 1.12.1(M29I/D19A) 抗體之 SCID 小鼠血漿濃度。

圖 15 展示在 M24met 包皮 SCID 嵌合體模型中 1.12.1 (M29I/D19A)抗體之估計 EC_{50} 。為製表之目的，以 0.1 nM 之人造血清濃度作為 100%之對照值。其不改變表現 EC_{50} 。

序列表

<110> 美商艾默根佛蒙特有限公司
美商輝瑞大藥廠
<120> 針對類活化素受體激酶-1之人類單株抗體
<130> ABX-PF9 PROV
<140> 095132933
<141> 2006-09-06
<150> 60/715,292
<151> 2005-09-07
<160> 136
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 1332
<212> DNA
<213> 人類

```

<400> 1
cagggtgcagc tgcaggagtc ggggtccagga cgggtgaagc ctacacagac cctgtccctc   60
acctgcactg tctctggtag ctccatcagc agtggtagat actactggaa ctggatccgc   120
cagcaccagc ggaaggccct ggagtggaat ggggtacatct attacagtag gagtacctac   180
tacaaccgtt ccttcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc   240
tcccigaagc tgagctcgtg gactgccgag gacacggccg tgtattacag tgcgagagag   300
tcagtgagct gggttgacta ctggggccag ggaacccctg tcaccgtctc ctacacctcc   360
accaaggggc catcggtctt cccctggcag cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca   420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtagcagg gtcgtggaac   480
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtcg tcctacagtc ctacaggactc   540
tactccctca gcagcgtagt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc   600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agacagttga gcgcaaatgt   660
tgtgtcagat gccaccctg cccagcacc cctgtggcag gaccgtcagt ctctctcttc   720
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggagcc ctgaggtcac gtgcgtggtg   780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag   840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc   900
agcgtcttca ccgtcgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc   960
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc  1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc  1080
agcctgacct gcctgggtcaa aggccttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc  1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc  1200
ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc  1260
tcatgtctcg tgatgatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg  1320
tctccgggta aa                                     1332

```

<210> 2
<211> 444
<212> PRT
<213> 人類
<400> 2

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300



Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 3
<211> 645
<212> DNA
<213> 人類

<400> 3
gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtcctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gctcgcgat caccttcggc 300
caaggagcac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
ccatctgatg agcagttgaa atctgggaact gcctctgttg ttgacctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtgggaag gtggataacg cccccaatc gggtactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgctac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 4
<211> 215
<212> PRT
<213> 人類

<400> 4

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1	5	10	15
Glu Arg Ala	Thr Leu Ser Cys Arg Ala	Ser Gln Ser Val	Ser Ser Ser
	20	25	30
Tyr Leu Ala	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala	Pro Arg Leu Leu	
	35	40	45
Ile Tyr Gly	Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile	Pro Asp Arg Phe Ser	
	50	55	60
Gly Ser Gly	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
	65	70	75
Pro Glu Asp	Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser	Ser Pro	
	85	90	95
Ile Thr Phe	Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
	100	105	110
Ala Pro Ser	Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
	115	120	125
Gly Thr Ala	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
	130	135	140
Ala Lys Val	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
	145	150	155
Gln Glu Ser	Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
	165	170	175
Ser Ser Thr	Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
	180	185	190
Tyr Ala Cys	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
	195	200	205
Ser Phe Asn	Arg Gly Glu Cys		
	210	215	

<210> 5
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> 人類

<400> 5	
cagggtgcagc tgcaggagtc ggggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc	120
cagcaccag ggaagggcct ggagtggtt gggtacatct attacagtgg gaggacctac	180
tacaaccct cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240
tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag	300
tcagtggtc ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacag	355

<210> 6

<211> 118
<212> PRT
<213> 人類

<400> 6

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

<210> 7
<211> 325
<212> DNA
<213> 人類

<400> 7
gaaatttgtg tgcgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgta gggccagica gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gctcgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300
caagggaacac gactggagat taaac 325

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> 人類

<400> 8

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 9
<211> 361
<212> DNA
<213> 人類

<400> 9
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgctcggatt caccttcagt agtcatggca tgtactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcctgtat 240
ctgcaaatga atagccctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag 300
gagcagtggc ccgatgtttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 360
g 361

<210> 10
<211> 120
<212> PRT
<213> 人類

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gln Glu Gln Trp Pro Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 322
<212> DNA
<213> 人類

<400> 11
gacatccaga tgacccagtc tccatctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgic gggcgagica gggcattaga aattatttag cctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtcctt gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgctcac tticggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> 人類

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 355
<212> DNA
<213> 人類

<400> 13
caggtgcacc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cticggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggigg ctccgtcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgg 120
cagccccccg ggaagggacl ggagtggatt gggtatatct attacagtgg gagcaccaac 180
tacaacccct ccttcaagag tcgaatcacc atatcaatag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgaactctgt gaccgctgcg gacacggcct tgtattactg tgcgagagaa 300
tcagtggccg cctttgacia ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacag 355

<210> 14
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 14

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15
 <211> 325
 <212> DNA
 <213> 人類

<400> 15
 gaaatttgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gattattagc agtaggtact tagcctggta ccagcaggaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggltca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcaa cactatggta gctcaccgat caccttcggc 300
 caaggacac gactggagat taaac 325

<210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 17
<211> 355
<212> DNA
<213> 人類

<400> 17
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccgtcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgg 120
cagccccccag ggaaggggact ggagtggatt gggtatatct attacagtgg gagcaccaac 180
tacaaccctt cctcaagag tgcagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
gcagtgltccg cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 18
<211> 118
<212> PRT
<213> 人類

<400> 18

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 325
<212> DNA
<213> 人類

<400> 19
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctccctgca gggccagtc gagtgtagc agtacctact tagcctggca ccagcagaaa 120
ccctggccagg ctcccaggct cctcatctat gggtatcca gcagggccag tggcgtcca 180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gattcactc tcaccatcag cagactggag 240
ccctaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggtt gttcaccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> 人類

<400> 20
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 370
<212> DNA
<213> 人類

<400> 21
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctccacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtag ctccatcagc agtggtagtc actactggag ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tcccgaagc tgagttctgt gactgccgag gacacggccg tatattactg tgcgagagcg 300
gggcgatttt tggagtggtc tgatgttttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc 360
gtctctcag 370

<210> 22
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人類
 <400> 22

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Ala Gly Arg Phe Leu Glu Trp Ser Asp Val Phe Asp Ile
 100 105 110

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

<210> 23
 <211> 340
 <212> DNA
 <213> 人類

<400> 23
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctcctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgittta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggatccagg agaaaccagg gcagcctcct aagctgctca ttacttgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttaigatact 300
 cctccgacgt tcggccaagg gaccaagggt gaaatcaaac 340

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人類
 <400> 24

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

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

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

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

Lys

<210> 25
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> 人類

<400> 25
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcacagac cctgtccctc 60
 atctgtactg tttctggtgg ctccatcagc agtggatgaat actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccctt ccttcaagag tgcacttacc atatcagtag acacgictaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 gggatcggtg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcag 355

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 26

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



Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 325
<212> DNA
<213> 人類

<400> 27
gaaattgtgt tgacgcagtc gccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcttaggt cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg gtcctggaca gacttcactc tcaccatcat cagactggac 240
cctgaagatt ttgcagtgt ttaactgicag cggtaaggta gctcaccgat caccctcggc 300
caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> 人類

<400> 28
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ile Arg Leu Asp
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 29
<211> 361
<212> DNA
<213> 人類

<400> 29
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tcctctggigg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gtctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agaggacgat 300

agcagtggct gcccttactt tgactactgg ggccagggaa ccttggcac cgcttctca 360
g 361

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> 人類

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Asp Asp Ser Ser Gly Cys Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Ala Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 322
<212> DNA
<213> 人類

<400> 31
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccagggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagtc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtc 240
gaagattttg cagtttattt ctgtcagcag tataataact ggccattcac tticggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa ac 322

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> 人類

<400> 32

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



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

<210> 33
<211> 370
<212> DNA
<213> 人類

<400> 33
cagatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtag ctccatcagc agtggtagtc actactggag ctggatccgc 120
cagcaccctc ggaaggacct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcgcttac 180
tacaaccctt cctcaagag tcgagtlacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagcg 300
gggcgatttt tggagtggtc tgatgttttt gatactctgg gccaaaggac aatggtcacc 360
gtctcttttag 370

<210> 34
<211> 123
<212> PRT
<213> 人類

<400> 34
Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30
Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ala Gly Arg Phe Leu Glu Trp Ser Asp Val Phe Asp Ile
100 105 110

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

<210> 35
<211> 340
<212> DNA
<213> 人類

<400> 35
gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttaact 120
tggtagcagc agaaaccagg acggcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaata ttataatact 300
cctccgacgt tggccaagg gaccaagggtg gaaatcaagc 340

<210> 36
<211> 113
<212> PRT
<213> 人類

<400> 36
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Asn Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 37
<211> 379
<212> DNA
<213> 人類

<400> 37
cagggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60



tcctgtgcag cctctggatt caccitcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggcctggagtg ggtttcatac attagtagta gttgtaatac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaggaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagggaagcc 300
tatgatagta gtggttacta ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctcctcag 379

<210> 38
<211> 126
<212> PRT
<213> 人類
<400> 38

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

<210> 39
<211> 337
<212> DNA
<213> 人類

<400> 39
gatatgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggccicc 60
atctcctgca agtctagtca gagccctcctg catagtgatg gaaagaccta ctgtattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctccctgatct atgaagtctc caaccggtc 180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgacaatc 240
agccgggtgg aggcctgacga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtac acaccttcct 300
tggacgttcg gccaaaggac caaggaggaa atcaaac 337

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> 人類

<400> 40

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

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

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

Thr His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 376
<212> DNA
<213> 人類

<400> 41
gaggatgcagc tggatggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc ccttagactc 60
tccatgagcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gggtggccgt attaaaagca aaagtgatgg tgggacaaca 180
gactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
gggaattact atgatgtag tggttattac tcttttgact actggggcca gggaaccctg 360
gtcaccgtct cctcag 376

<210> 42
<211> 125
<212> PRT
<213> 人類

<400> 42

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

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

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

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



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

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

Tyr Cys Thr Thr Gly Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Phe
100 105 110

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

<210> 43
<211> 337
<212> DNA
<213> 人類

<400> 43
gatatgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcttgca ggtctagtc gagctctctg catagtaatg gatacaacta ttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaac 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300
cccactttcg gccgagggac caaggtggag atcaaac 337

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> 人類
<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45
<211> 355
<212> DNA
<213> 人類

<400> 45
 caggltgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggigaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 accitgcactg tctctggigg ctccatcagc agtaalgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaagggcct ggagtggaat gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaacccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
 tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacg 355

<210> 46
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 46
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asn
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47
 <211> 325
 <212> DNA
 <213> 人類

<400> 47
 gaaaatgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcttcca gcggggccac tggcatccca 180
 gacaggitca gtggcagttg gtcigggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cattatggta gctaccgat caccitcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 48
 <211> 108
 <212> PRT



<213> 人類

<400> 48

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

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

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Gly Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 49

<211> 361

<212> DNA

<213> 人類

<400> 49

caggatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggatgaagc ctacacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggagg ctccatcagc agtggatgatt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccag ggaaggcct ggagtgatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180
tacaaccgt cccatcaagag tcgagttacc atatcaatag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
cgtgactacg gtggatggctt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360
g 361

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> 人類

<400> 50

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 340
<212> DNA
<213> 人類

<400> 51
gacatcgtga tgaccacgtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtglttta tacagctcca tcaataagat ctacttagct 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgtca ttactgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaccaata ttatagtact 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac 340

<210> 52
<211> 113
<212> PRT
<213> 人類

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 53
<211> 355
<212> DNA
<213> 人類

<400> 53
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cticacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggccct ggagtggtatt gggatcaatct attacagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt cctcaagag tgcagttacc attcagtag ccacgtctaa gaaccagttc 240
tcccigaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
gctacggagg gggttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 54
<211> 118
<212> PRT
<213> 人類

<400> 54

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Ala Thr Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 325
<212> DNA
<213> 人類

<400> 55
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ciccagggga aagggccacc 60
ctctcctgca gggccagtica gagtgttagc accacctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagttg gctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcactgta ttactgtcag cactatggta cctcatgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 56
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人類
 <400> 56

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Thr
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 57
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> 人類

<400> 57
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcacig tcctctgggtg ctcacatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaacccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
 tccacggacg gtagtgacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacag 355

<210> 58
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人類
 <400> 58

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

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

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



Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 325
<212> DNA
<213> 人類

<400> 59
gaaagtgtgt tgacgcagtc tcttggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgtttcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgia ttactgtcag cagtatggta gctcacgat caccttcggc 300
caaggacac gactggagat taaac 325

<210> 60
<211> 108
<212> PRT
<213> 人類

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 61

<211> 355
<212> DNA
<213> 人類

<400> 61
caggigcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcacig tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggatcatact attacagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
gatattgcag gattcgaccc ctggggccag ggaacccctg tcaccgtctc ctacg 355

<210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> 人類

<400> 62
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30
Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Glu Asp Ile Ala Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 325
<212> DNA
<213> 人類

<400> 63
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctccctgca gggccagtca gactgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctac ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggltca gggcagtggt gtcggggaca gactccactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtata ttactgtcag cagtatggta gctcacctat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 64
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人類
 <400> 64

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

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

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

<210> 65
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> 人類

<400> 65
 caggatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggatgaat actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggatatact ttacagtgg gagcacctac 180
 tacaacctgt cctcaagag tcgagttacc atactactag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
 tccacggacg gtaaggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 66
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 66

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

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

<210> 67
 <211> 325
 <212> DNA
 <213> 人類

<400> 67
 gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcggaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgtatcca gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtcctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caatatggta gctcaatgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 68
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 68

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

<210> 69
 <211> 355



<212> DNA
<213> 人類
<400> 69
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcacctac 180
tacaaccctg cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
ggcctcgagg cttttgatat ctgggggtcaa gggacaatgg tcaccgactc ttcag 355

<210> 70
<211> 118
<212> PRT
<213> 人類
<400> 70
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30
Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Glu Gly Leu Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Asp Ser Ser
115

<210> 71
<211> 325
<212> DNA
<213> 人類
<400> 71
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtcg gagtgltagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcaictat gatgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg ctctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ctactgtcag cattatggta gctcacttct cacittcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaac 325

<210> 72
<211> 108
<212> PRT
<213> 人類
<400> 72

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

<210> 73
<211> 355
<212> DNA
<213> 人類
<400> 73

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggaagc cttcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggatgatt actactggaa ctggatccgc	120
cagcaccag ggaaggccct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcacctac	180
tacaactcgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag	300
ggccagaacg giatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcag	355

<210> 74
<211> 118
<212> PRT
<213> 人類
<400> 74

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Gly Gln Asn Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 340
<212> DNA
<213> 人類

<400> 75
gatgttgga tgactcagc tccactctcc ctgcccgta cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggcttagica aagcctcgta tacagtgaag gaaacacctt ctgaattgg 120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac 180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaggtag acactggcct 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggt gaaatcaaac 340

<210> 76
<211> 113
<212> PRT
<213> 人類

<400> 76

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

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

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 77
<211> 358
<212> DNA
<213> 人類

<400> 77
gaggatgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggc ccttagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180
gactacgctg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
ggggatggaa cgcactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctcag 358

<210> 78
<211> 119
<212> PRT
<213> 人類

<400> 78
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Thr Gly Asp Gly Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
<211> 322
<212> DNA
<213> 人類

<400> 79
gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcac 60
atctcctgca aagccagcca agacattgat gatgatatga actgggtacca acagaaacca 120
ggagaagctg ctattttcat tattcaagaa gctactactc tcgttcctgg aatcccacct 180
cgattcagtg gcagcgggta tggaaacagat ttaccctca caattaataa catagaatct 240
gaggatgctg catattactt ctgtctacaa catgataatt tcccgtcac tttcggcgga 300



gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> 人類
<400> 80

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

<210> 81
<211> 379
<212> DNA
<213> 人類
<400> 81
cagggtgcagc tggtaggagtc tggggagggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtagtac cacatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa gtcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggg 300
tatagcagtg gctggtagca ggactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctcctcag 379

<210> 82
<211> 126
<212> PRT
<213> 人類
<400> 82

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

35	40	45	
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Glu Asp Tyr Tyr Tyr Gly			
	100	105	110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	125
<210> 83			
<211> 337			
<212> DNA			
<213> 人類			
<400> 83			
gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc			60
atctccgtga agtttagtga gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta ttgtattgg			120
tacctgcaga agccaggcca gccctcacag ctccgatct atgaagtct caaccggtt			180
tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggcaggga cagatttcac actgaaaac			240
agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct			300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaac			337
<210> 84			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> 人類			
<400> 84			
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly			
1	5	10	15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Phe Ser Gln Ser Leu Leu His Ser			
	20	25	30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro			
	35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser			
	85	90	95
Ile Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110



<210> 85
<211> 388
<212> DNA
<213> 人類

<400> 85
caggtgcagc tggtaggagc tgggggaggc ttggicaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gacttctaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggaatg gatttcatac attagtagta gtggtagtag catttactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatg tccagggaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attattgtgc gagagaagga 300
tactatgatt cggggagtta ttataaggac tacgactact acggtatgga cgtctggggc 360
caagggacca cggtcaccgt ctctcag 388

<210> 86
<211> 129
<212> PRT
<213> 人類

<400> 86
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys Asp Tyr Asp
100 105 110
Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 87
<211> 337
<212> DNA
<213> 人類

<400> 87
gatatgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgta cccctggaca gccggcctcc 60
atctctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta ttgtattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gccctccacag ctctgatct atgaagtct caaccggttc 180
tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agccgggtgg aggtgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300
cggacgttcg gccaggggac caaggaggaa atcaaac 337

<210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> 人類

<400> 88

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 89
<211> 379
<212> DNA
<213> 人類

<400> 89
cagggtcggc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tctctgtcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta ggggtatttc catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgigt attactgtgc gagagaagga 300
tatagcagct cgtcacatta ctacgactac tacggtatgg acgtctgggg ccaaggggacc 360
acggtcaccg tctcttcag 379

<210> 90
<211> 126
<212> PRT
<213> 人類

<400> 90

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



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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Ser Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly
100 105 110

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

<210> 91
<211> 337
<212> DNA
<213> 人類

<400> 91
gatatgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
atctccgtga agtctagtca gagcctcctg catagtgaig gaaagaccta ttgtattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gccccacag gtccctatct atgaagtctc caaccggctc 180
tctggagtgc cagatagggt cagttgcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agccgggtgg aggcctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtac acagcttctc 300
cggacgttcg gccaaaggac caagggtgaa atcaaac 337

<210> 92
<211> 112
<212> PRT
<213> 人類

<400> 92

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 93
<211> 503
<212> PRT
<213> 食蟹猴
<400> 93

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Arg Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala
1 5 10 15

Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val
20 25 30

Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Arg Gly Pro Thr Cys Gln Gly
35 40 45

Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln
50 55 60

Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg
65 70 75 80

Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn
85 90 95

Arg Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Thr Pro Ser Glu Gln
100 105 110

Pro Gly Thr Asp Ser Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala
115 120 125

Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Val Gly Leu Trp His Val Arg
130 135 140

Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser
145 150 155 160

Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Ser Met Leu Gly Asp
165 170 175

Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe
180 185 190

Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val
195 200 205

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu
210 215 220

Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe
225 230 235 240



Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile
245 250 255

Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln
260 265 270

Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
275 280 285

Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val
290 295 300

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr
305 310 315 320

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val
325 330 335

Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
340 345 350

Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro
355 360 365

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln
370 375 380

Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala
385 390 395 400

Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly
405 410 415

Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp
420 425 430

Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr
435 440 445

Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu
450 455 460

Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu
465 470 475 480

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro
485 490 495

Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln
500

<210> 94
<211> 1512
<212> DNA
<213> 食蟹猴
<400> 94

atgaccttgg gctccccgag gagaggcctt ctgatgctgc tgaaggcctt ggtgaccag 60
 ggtgaccccg tgaagccctc tcggggcccg ctggtagcct gcacatgiga gagccacat 120
 tgcagggggc ctacctgcca gggggcctgg tgcacagtag tgcctggctgc ggaggagggg 180
 aggcaccccc aggaacatcg gggctgcggg aacttgcaca gggagctctg cagggggcgc 240
 cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgt gacagccacc tctgcaaccg caacgtgtcc 300
 ctggtagctg agggcaccca aactccttcg gagcagccgg gaacagacag ccagctggcc 360
 ctgatcctgg gccccgtgct ggccttgctg gccctggctg ccctgggtgt cgtgggctg 420
 tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cggggcctgc acagcgagct gggagagtcc 480
 agtctcatcc tgaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt 540
 gactgcacca cagggagctg ctccgggctc cccttctg tgcagaggac agtggcacgg 600
 caggttgcct tggtagagtg tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcttg 660
 tggcacggtg agagtgtggc cgtaagatc ttctcctcga gggacgaaca gtcctggttc 720
 cgggagactg agatctacaa cacagtgttgc ctacagacag acaacatcct aggttctac 780
 gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagctgt ggctcatcac gcattaccac 840
 gagcacggct ccctctacga ctctctgcag agacagacgc tggagccgca ttgggtctg 900
 aggttagctg tgcctcgagc ctgtggcctg gcacacctgc acgtggagat ctctcggtaca 960
 cagggcaaac cggccattgc ccaccgtgac ttcaagagcc gcaacgtgtt ggtcaagagc 1020
 aacctgcagt gttgcattgc tgacctgggc ctggctgiga tgcactcaca gggcagcgat 1080
 tacctggaca tcggcaacaa cccgagagta ggcaccaaga ggtacatggc acccgaggtg 1140
 ctggatgagc agatccgcac ggactgcttt gagtcttata agtggactga catctgggcc 1200
 ttgggctgg tgcctgggga gatcgcccg cggacctcg tgaacggcat cgtggaggac 1260
 tatagaccac ccttctatga tgtgtgccc aatgacccca gclttgagga catgaagaag 1320
 gtgggtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggcctggctg agacccggtc 1380
 ctctcaggcc tagctcagat gatcggggag tgcctgtacc caaacccctc tccccgactc 1440
 actgcgctgc ggtcaagaa gacactacag aaaattagca acagtccaga gaagcccaaa 1500
 gtgattcagt ag 1512

<210> 95
 <211> 1332
 <212> DNA
 <213> 人類

<400> 95
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc ctacacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggctg ctccatgagc agtggtagat actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gattacctac 180
 tacaaccgtt cctcaagag tcgagtacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgcccg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccttgg tcaccgtctc ctacgctcc 360
 accaagggcc catcggtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcaccct cgagagcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac tccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac 480



tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ticcagctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agacagttga gcgcaaatgt 660
tgtgtcaggt gccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctccctcttc 720
ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaccc ctgagggtcac gtgcgtggtg 780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 900
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaacatct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
agcctgacct gccitgtcaa aggtctctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgcctggactc cgacggctcc 1200
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320
tctccgggta aa 1332

<210> 96
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 用於選殖ALK-1之ECD之正向引物

<400> 96
acggcccagc cggccgaccc tgtgaagccg tct 33

<210> 97
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 用於選殖ALK-1之ECD之反向引物

<400> 97
actaagcttt taatgatgat gatgatgatg ctggccatct gttcccg 47

<210> 98
<211> 103
<212> PRT
<213> 人類
<400> 98

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

```

50              55              60

Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu
65              70              75              80

Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly
85              90              95

Gln His His His His His His
100

<210> 99
<211> 387
<212> DNA
<213> 人類

<400> 99
atggagacag acacactcct gclatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacgcggccc agccggccga ccctgtgaag ccgtctcggg gcccgctggt gacctgcacg 120
tgtgagagcc cacattgcaa ggggcctacc tgcggggggg cctgggtgcac agtagtgctg 180
gtgcgggagg aggggaggca cccccaggaa catcgggggt gcgggaactt gcacagggag 240
ctctgcaggg ggcgccccac cgagttcgtc aaccactact gctgcgacag ccacctctgc 300
aaccacaacg tglccctggt gctggaggcc acccaaccic cticggagca gccgggaaca 360
gatggccagc atcatcatca tcatcat 387

<210> 100
<211> 444
<212> PRT
<213> 人類

<400> 100

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50              55              60

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

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

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100              105              110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115              120              125

```



Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 101
<211> 645
<212> DNA
<213> 人類

<400> 101
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagacacc 60
ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtcgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300
caaggagcac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctgggaact gccctgtttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggag gtggataacg ccctccaatc gggtacttcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 102
<211> 215
<212> PRT
<213> 人類

<400> 102

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

Glu Arg Asp Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 103
<211> 355
<212> DNA
<213> 人類

<400> 103
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatgagc agtggatgaat actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gaggatctac 180
tacaaccctg cccatcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacg 355

<210> 104
<211> 118
<212> PRT
<213> 人類

<400> 104

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 用於選殖全長1.12.1之擴增引物

<400> 105
tcctcaagct tgatatctct agaagccgcc accatgaaac acctgtggtt ctctctcc 58

<210> 106
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 用於選殖全長1.12.1之擴增引物

<400> 106
ttctctgalt agaattccta ctatttacct ggagacaggg agaggc 46

<210> 107
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 用於選殖全長1.12.1之擴增引物

<400> 107
tcctcaagct tcccgggagc cgccacctg gaaaccccag cgcagctt 48

<210> 108
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 用於選殖全長1.12.1之擴增引物

<400> 108
ttctttgalt agaattctca ctaacacctt cccctgttga agctctttg 49

<210> 109
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 誘突變性寡核苷酸

<400> 109
ctccaggga aagagccacc ctctcctgta gg 32

<210> 110
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 誘突變性寡核苷酸

<400> 110
cctacaggag aggggtggctc ttccccctgg ag 32



<210> 111
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 誘突變性寡核苷酸

<400> 111
ggtggctcca tcagcagtgg tgaatactac

30

<210> 112
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 誘突變性寡核苷酸

<400> 112
gtagtattca ccactgctga tggagccacc

30

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 人類

<400> 113
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
1 5

<210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> 人類

<400> 114
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
1 5

<210> 115
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 正向引物

<400> 115
agcgggccca gagggaccat g

21

<210> 116
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 反向引物

<400> 116
cagaaaggaa tcaggtgctc ctgggcta

28

<210> 117
<211> 28
<212> DNA

<213> 人工

<220>
<223> 正向引物

<400> 117
gattatggcc ttgggctccc ccaggaaa 28

<210> 118
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 反向引物

<400> 118
gggctattga atcactttag gcttctcigg actgttg 37

<210> 119
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> TaqMan 探針 (ID1-探針)

<400> 119
ccagcacgic atcgactaca tcaggga 27

<210> 120
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> Taqman PCR引物 (ID1-F)

<400> 120
aaggtagca aggtggagat tc 22

<210> 121
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> Taqman PCR引物 (ID1-R)

<400> 121
ttccgagttc agtccaact g 21

<210> 122
<211> 25
<212> PRT
<213> 人類

<400> 122

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 123
<211> 12
<212> PRT

<213> 人類

<400> 123

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 124

<211> 25

<212> PRT

<213> 人類

<400> 124

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 125

<211> 12

<212> PRT

<213> 人類

<400> 125

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 126

<211> 325

<212> DNA

<213> 人類

<400> 126

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagacacc 60
ctctccigtta gggccagtc gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggltca gtggcagtggt gtcigggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 127

<211> 108

<212> PRT

<213> 人類

<400> 127

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

Glu Arg Asp Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 128
<211> 1332
<212> DNA
<213> 人類

<400> 128
caggatgcagc tgcaggagtc gggatccagga ctggatgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatgagc agtggatgaat actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaaggccct ggagtggtt gggatcatct attacagtgg gactacctac 180
tacaacctgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
tcagtggcig ggtttgacta ctggggccag ggaaccttgg tcaccgtctc ctcagccctc 360
accaagggcc catcggctct cccctggcg cctgtctcca ggagcaccct cgagagcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac tccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac 480
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc tcccagctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agacagttga gcgcaaatgt 660
tgtgtcagat gccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 720
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccgaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
glgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 900
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaacctct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgaggag agatgaccaa gaaccaggtc 1080
agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgcaggactc cgacggctcc 1200
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320
tctccgggta aa 1332

<210> 129
<211> 355
<212> DNA
<213> 人類

<400> 129
caggatgcagc tgcaggagtc gggatccagga ctggatgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatgagc agtggatgaat actactggaa ctggatccgc 120

cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gaggacctac 180
 tacaaccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaacccctg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 130
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> 人類

<400> 130

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala
 1 5 10 15

Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val
 20 25 30

Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly
 35 40 45

Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln
 50 55 60

Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn
 85 90 95

His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln
 100 105 110

Pro Gly Thr Asp Gly Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala
 115 120 125

Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Leu Gly Leu Trp His Val Arg
 130 135 140

Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser
 145 150 155 160

Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Thr Met Leu Gly Asp
 165 170 175

Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe
 180 185 190

Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val
 195 200 205

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu
 210 215 220

Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe
 225 230 235 240

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile
245 250 255

Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln
260 265 270

Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
275 280 285

Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val
290 295 300

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr
305 310 315 320

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val
325 330 335

Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
340 345 350

Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro
355 360 365

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln
370 375 380

Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala
385 390 395 400

Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly
405 410 415

Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp
420 425 430

Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr
435 440 445

Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu
450 455 460

Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu
465 470 475 480

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro
485 490 495

Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln
500

<210> 131
<211> 120
<212> PRT
<213> 人類



<400> 131

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 132

<211> 108

<212> PRT

<213> 人類

<400> 132

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 133

<211> 96

<212> PRT

<213> 人類

<400> 133

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

<210> 134

<211> 99

<212> PRT

<213> 人類

<400> 134

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg

<210> 135

<211> 108

<212> PRT

<213> 人類

<400> 135

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30



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

<210> 136
<211> 5
<212> PRT
<213> 人類

<400> 136

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

公告本

發明專利說明書

分割案

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：99108743

※ 申請日期：95.9.6

※IPC 分類：C07K16/40 (2006.01)

原申請案號：095132933

一、發明名稱：(中文/英文)

針對類活化素受體激酶-1之人類單株抗體

HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES TO ACTIVIN RECEPTOR-LIKE KINASE-1

二、中文發明摘要：

本發明係關於包括人類抗體及其抗原結合部分之抗體，該等人類抗體及其抗原結合部分與類活化素受體激酶-1(ALK-1)之胞外域(ECD)結合，且對ALK-1/TGF- β -1/Smad1信號傳輸路徑具消除作用。本發明亦係關於衍生自人類抗ALK-1抗體之重鏈及輕鏈免疫球蛋白，及編碼該等免疫球蛋白之核酸分子。本發明亦係關於製造人類抗ALK-1抗體之方法、包含該等抗體之組合物及使用該等抗體及組合物之方法。本發明亦係關於包含本發明之核酸分子之轉殖基因動物或植物。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to antibodies including human antibodies and antigen-binding portions thereof that bind to the extracellular domain (ECD) of activin receptor-like kinase-1 (ALK-1) and that function to abrogate the ALK-1/ TGF-beta-1 /Smad1 signaling pathway. The invention also relates to heavy and light chain immunoglobulins derived from human anti-ALK-1 antibodies and nucleic acid molecules encoding such immunoglobulins. The present invention also relates to methods of making human anti-ALK-1 antibodies, compositions comprising these antibodies and methods of using the antibodies and compositions. The invention also relates to transgenic animals or plants comprising nucleic acid molecules of the present invention.

公告本

八、圖式：

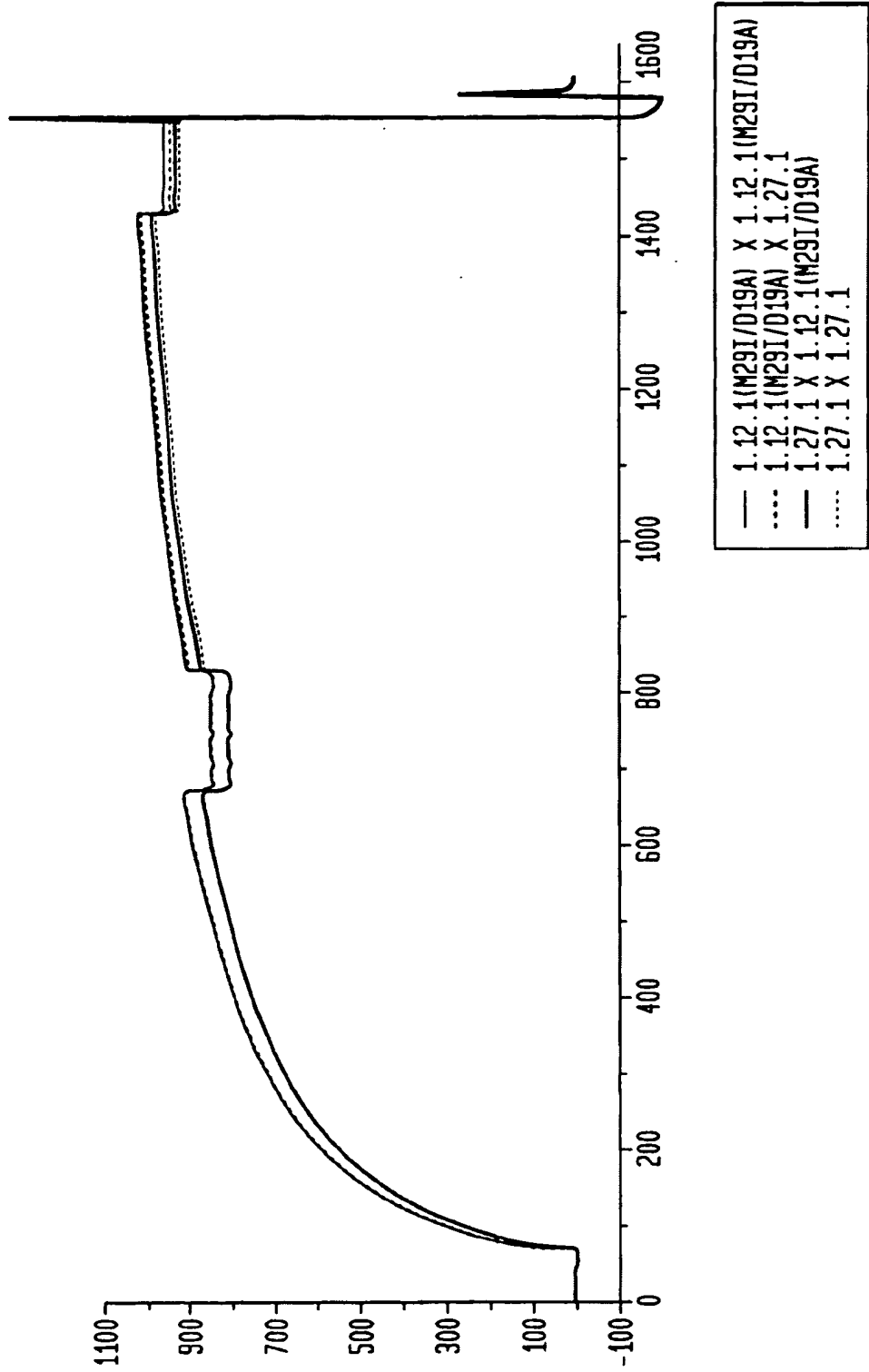


圖 1

人類 食蟹猴	MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEG 60 MTLGSPRRGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCRGPTCQGAWCTVVLVREEG 60 *****;*****;*****;*****
人類 食蟹猴	RHPQEHRCGCGNLHRELCRGRPTFEVNHYYCCDHLCHNVSLVLEATQPPSEQPGTDGQLA 120 RHPQEHRCGCGNLHRELCRGRPTFEVNHYYCCDHLCHNVSLVLEATQTPSEQPGTDSQLA 120 *****;*****;*****;*****
人類 食蟹猴	LILGPVLALLALVALGVLGLWHVRRRQEKQRGLHSELGESSLILKASEQGDMLGDLLDS 180 LILGPVLALLALVALGVVGLWHVRRRQEKQRGLHSELGESSLILKASEQGDMSMLGDLLDS 180 *****;*****;*****;*****
人類 食蟹猴	DCTTGSGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF 240 DCTTGSGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF 240 *****;*****;*****;*****
人類 食蟹猴	RETEIYNTVLLRHDNILGFIASDMTSRNSSTQLWLITHYHEHGSLYDFLQRQTLEPHLAL 300 RETEIYNTVLLRHDNILGFIASDMTSRNSSTQLWLITHYHEHGSLYDFLQRQTLEPHLAL 300 *****;*****;*****;*****
人類 食蟹猴	RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLOCCIADLGLAVMHSQSGD 360 RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLOCCIADLGLAVMHSQSGD 360 *****;*****;*****;*****
人類 食蟹猴	YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTDCEFESYKWTDIWAFGLVLWEIARRTIVNGIVED 420 YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTDCEFESYKWTDIWAFGLVLWEIARRTIVNGIVED 420 *****;*****;*****;*****
人類 食蟹猴	YRPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCDQQTPTIPNRLAADPVL SGLAQMRECWPNP SARL 480 YRPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCDQQTPTIPNRLAADPVL SGLAQMRECWPNP SARL 480 *****;*****;*****;*****
人類 食蟹猴	TALRIKKTLOKISNSPEKPKVIO 503 (SEQ. ID NO.:130) TALRIKKTLOKISNSPEKPKVIO 503 (SEQ. ID NO.:93) *****

圖2

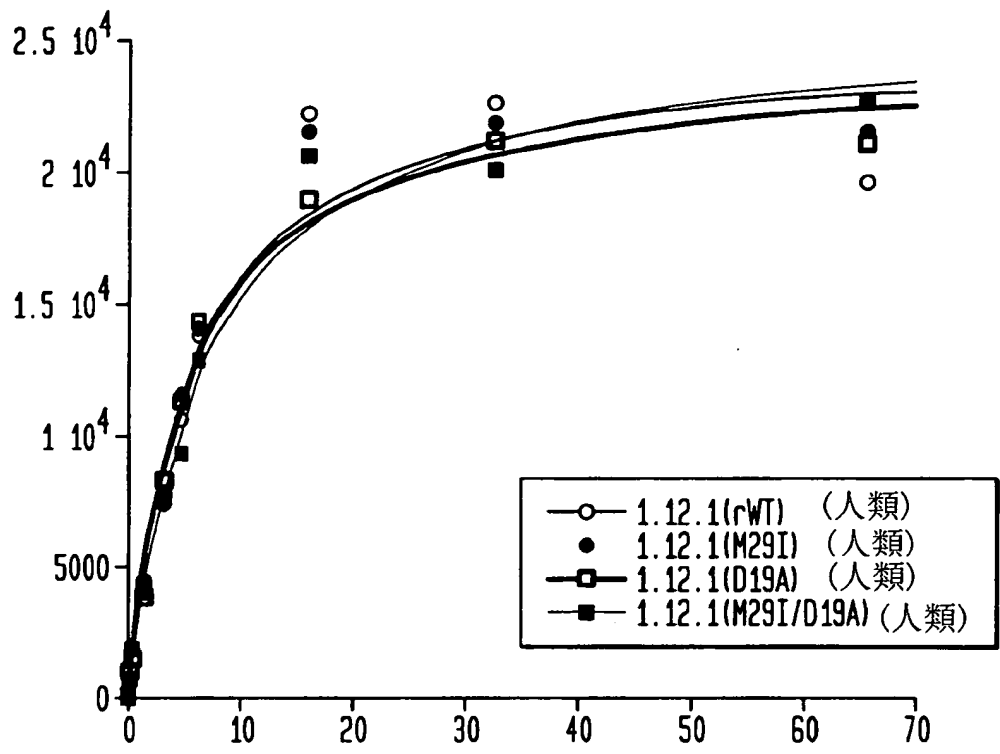


圖3A

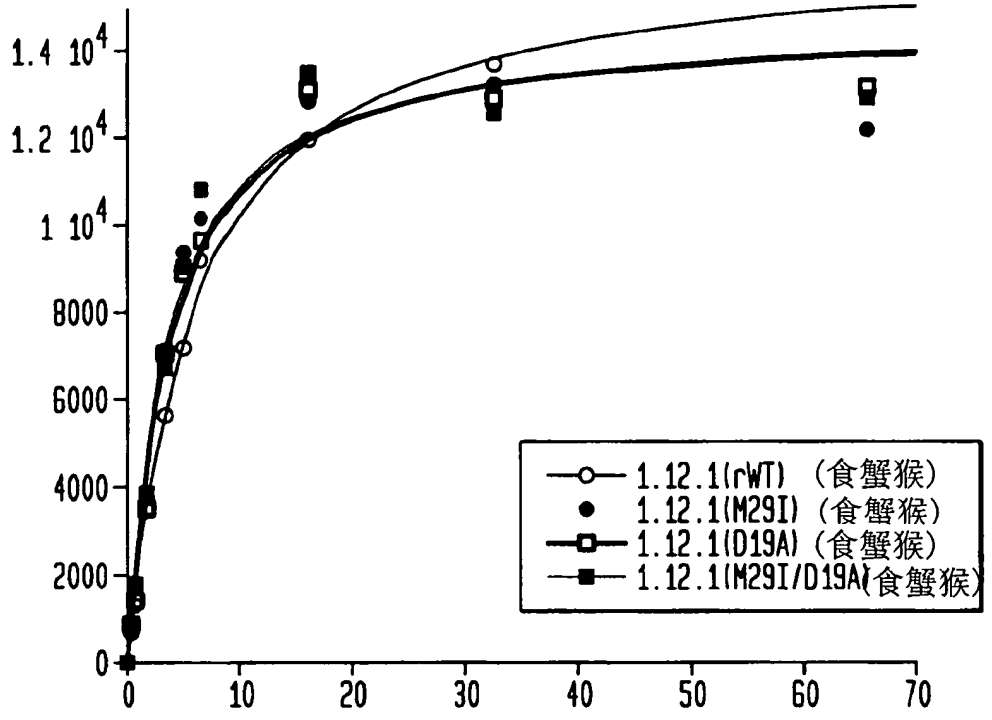
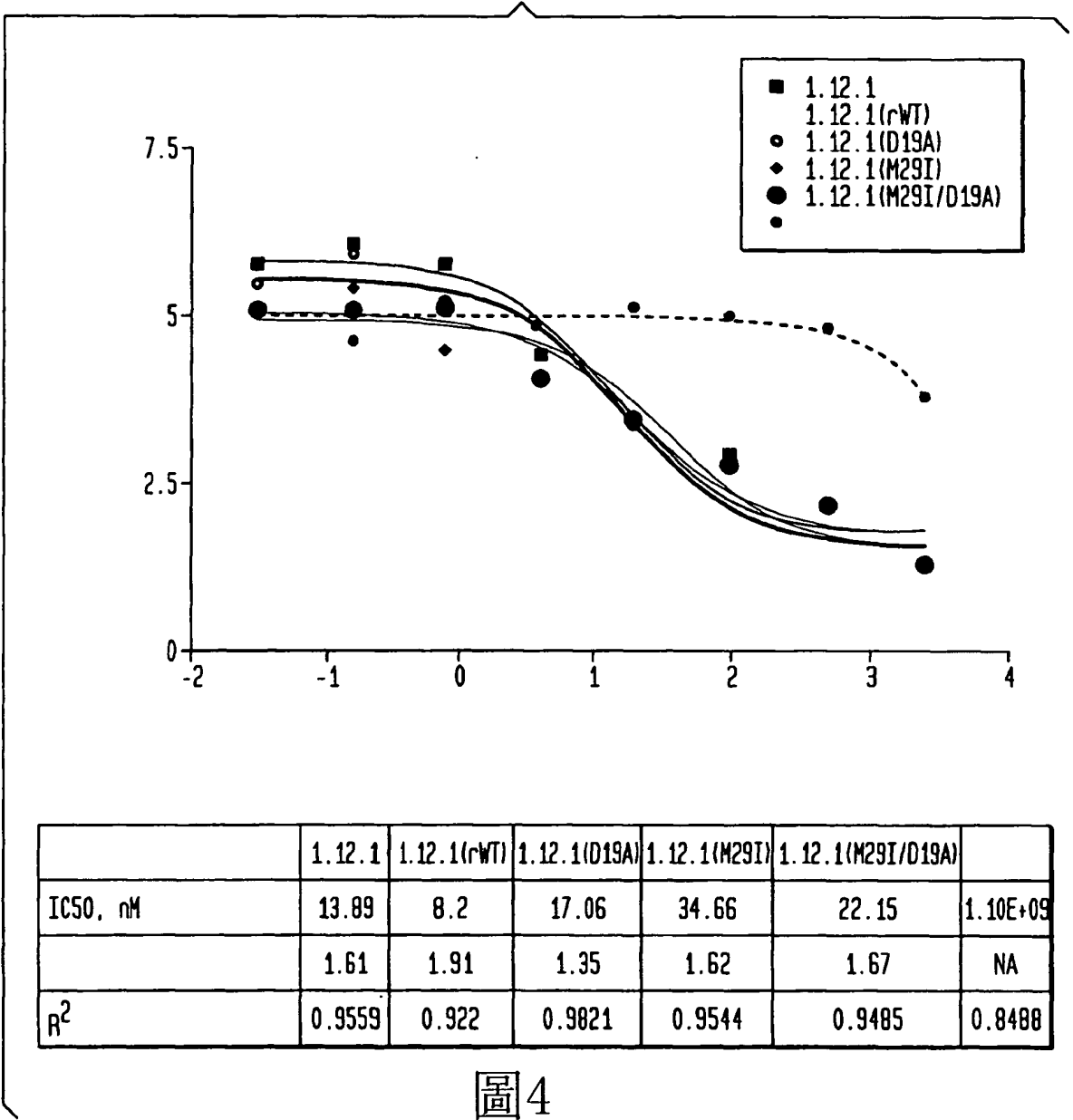
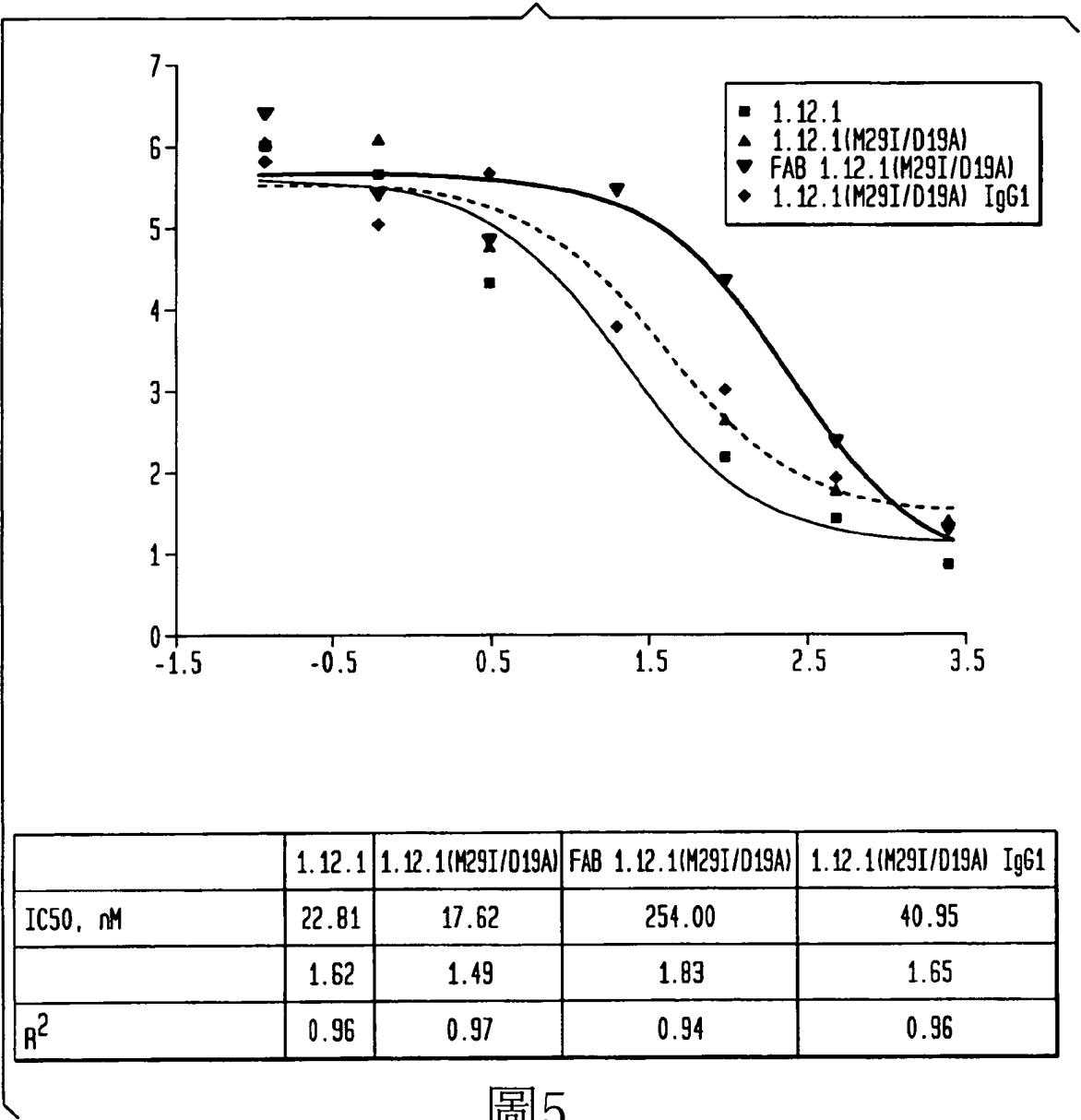


圖3B





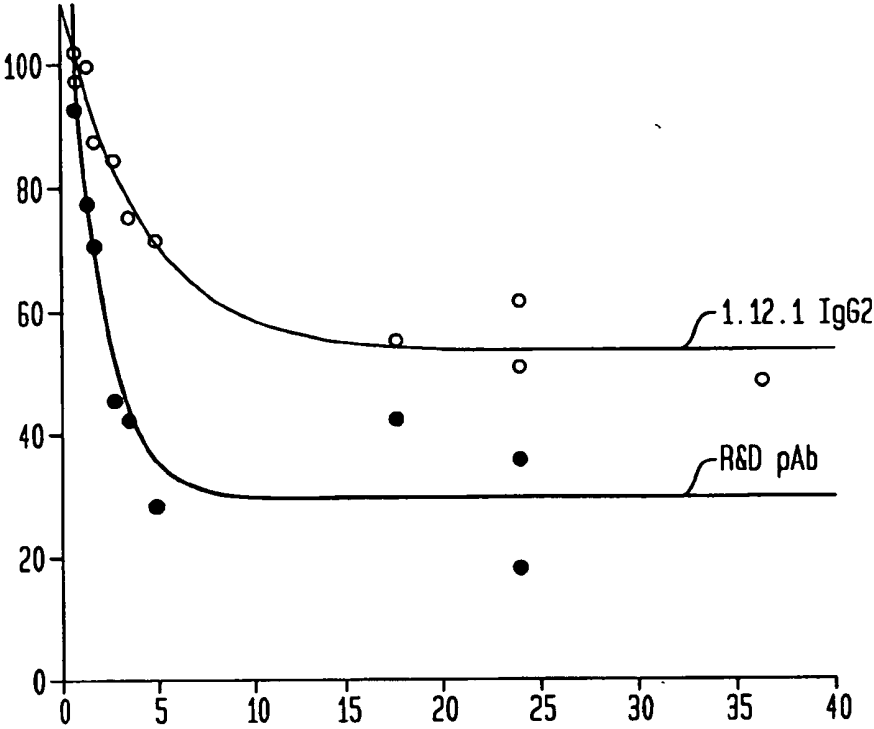


圖6A

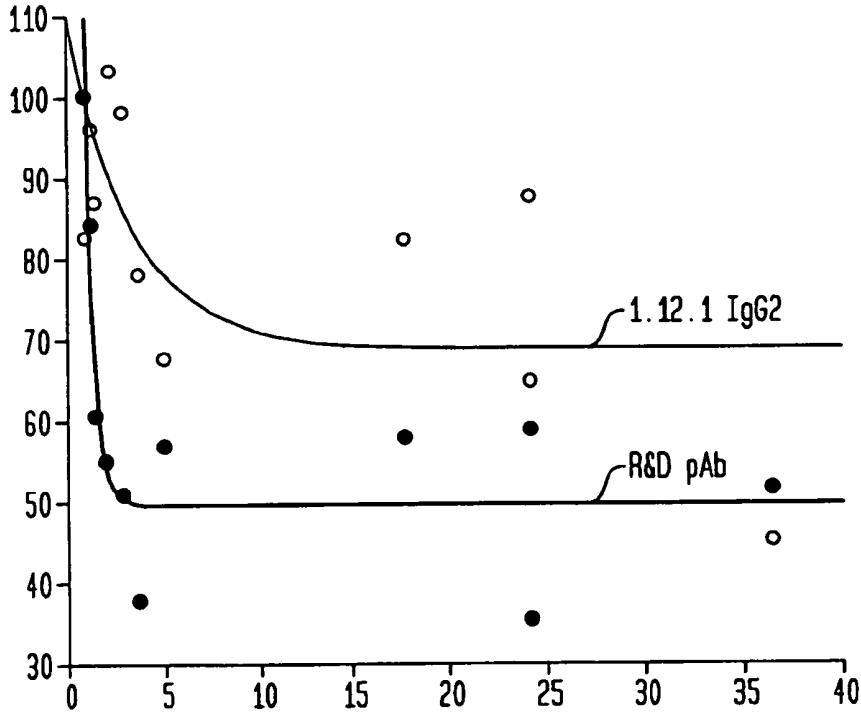


圖6B



表現體 : 1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGS SSG YYW WIRQHPGKGLEWIGYIYSGSTY 60
(SEQ ID NO: 104)
生殖系 : 1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSGSTY 60
(SEQ ID NO: 131)

表現體 : 61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR - VAG-FDYWGQGLTVTVSS 118
生殖系 : 61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAGYFDYWGGGLTVTVSS 120

表現體 : 1 EIVLTQSPGTLSLSPGER TLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYG SSRATGIP 60
(SEQ ID NO: 127)
生殖系 : 1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGGASSRATGIP 60
(SEQ ID NO: 132)

表現體 : 61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGRLEIK 108
生殖系 : 61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGRLEIK 108

圖 7A

	+-----+	
	100	
	+-----+	
91 Q Y G S S P I T F G Q G T R L E I K		1.12.1 VL
91 Q Y G S S P I T F G Q G T R L E I K		1.14.1 VL
91 Y G S S P I T F G Q G T R L E I K		1.162.1 VL
91 G S S P I T F G Q G T R L E I K		1.31.1 VL
91 Q Y G S S P I T F G Q G T R L E I K		4.62.1 VL
91 Q Y G S S I T F G Q G T R L E I K		4.72.1 VL
91 Q Y G S S P		生殖系 (A27)

圖 7B

	10										20										30										
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	M	S	1.12.1 VH (SEQ ID 104)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	1.151.1 VH (SEQ ID 22)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	I	C	T	V	S	G	G	S	I	S	1.162.1 VH (SEQ ID 26)
1	Q	M	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	1.8.1 VH (SEQ ID 34)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	4.24.1 VH (SEQ ID 46)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	4.38.1 VH (SEQ ID 50)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	4.58.1 VH (SEQ ID 54)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	4.62.1 VH (SEQ ID 58)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	4.68.1 VH (SEQ ID 62)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	4.72.1 VH (SEQ ID 66)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	5.13.1 VH (SEQ ID 70)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	5.34.1 VH (SEQ ID 74)
1	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S	4-31 生殖系 (SEQ ID NO:134)

			40										50										60											
			40										50										60											
31	S	G	E	Y	Y	W	N	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	1.12.1	VH		
31	S	G	G	H	Y	W	S	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	1.151.1	VH		
31	S	G	E	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	1.162.1	VH		
31	S	G	G	H	Y	W	S	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	A	Y	1.8.1	VH		
31	S	N	D	Y	Y	W	N	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	4.24.1	VH		
31	S	G	D	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	4.38.1	VH		
31	S	G	D	Y	Y	W	N	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	4.58.1	VH		
31	S	G	D	Y	Y	W	N	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	4.62.1	VH		
31	S	G	D	Y	Y	W	N	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	4.68.1	VH		
31	S	G	E	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	F	Y	S	G	S	T	Y	4.72.1	VH		
31	S	G	D	Y	Y	W	N	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	5.13.1	VH		
31	S	G	D	Y	Y	W	N	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	5.34.1	VH		
31	S	G	G	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	H	P	G	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	Y	4-31	生殖系		

圖7C

	70												80												90												
	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A							
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	1.12.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	1.151.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	1.162.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	1.8.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	4.24.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	I	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	4.38.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	A	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	4.58.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	4.62.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	4.68.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	L	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	4.72.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	5.13.1	VH					
61	Y	N	S	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	5.34.1	VH					
61	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	4-31	生殖系					

91	D T A V Y Y C A R	1.12.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	1.151.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	1.162.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	1.8.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.24.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.38.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.58.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.62.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.68.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.72.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	5.13.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	5.34.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4-31 生殖系

圖 7D

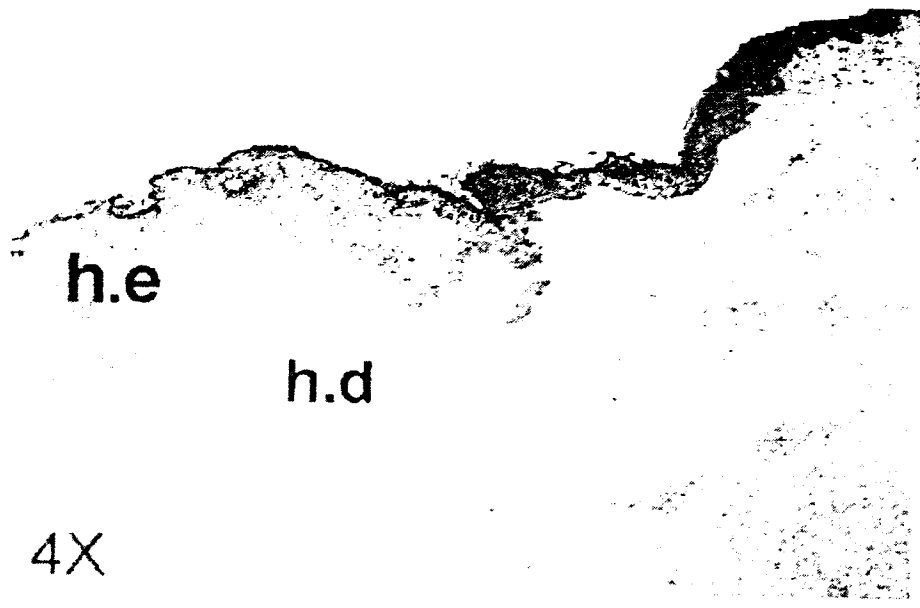


圖8

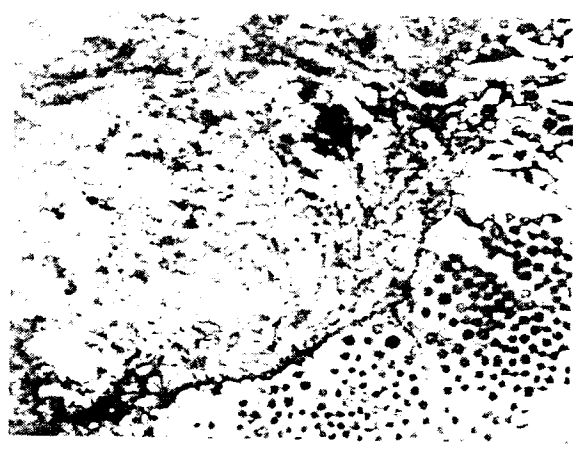


圖9A

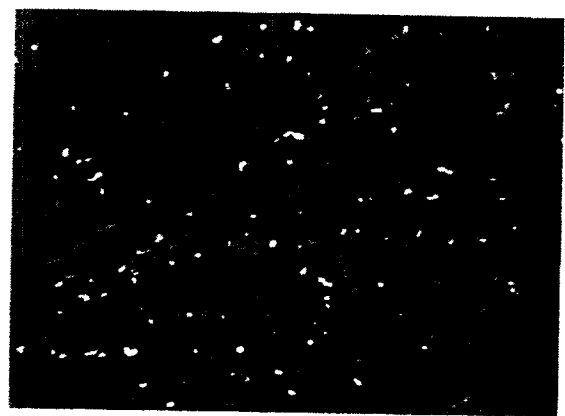


圖9B



圖 10

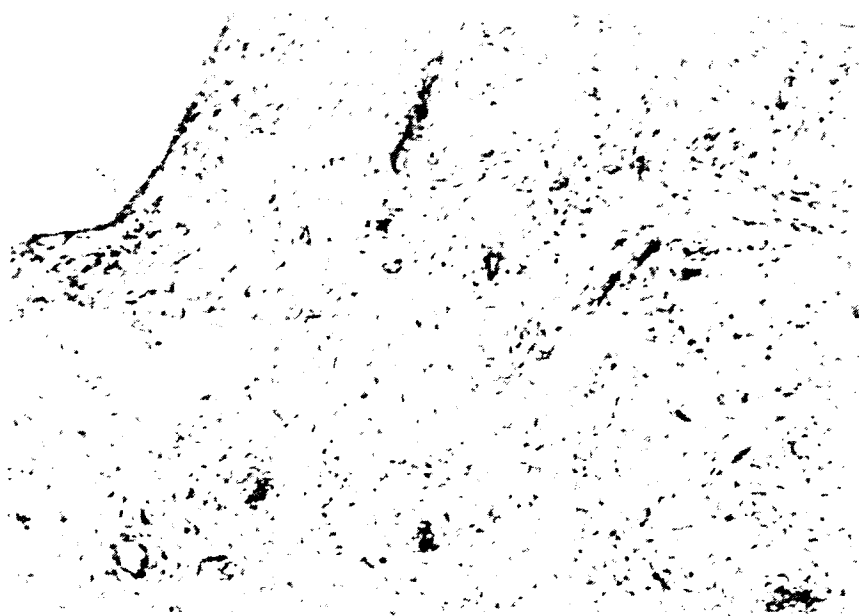


圖 11

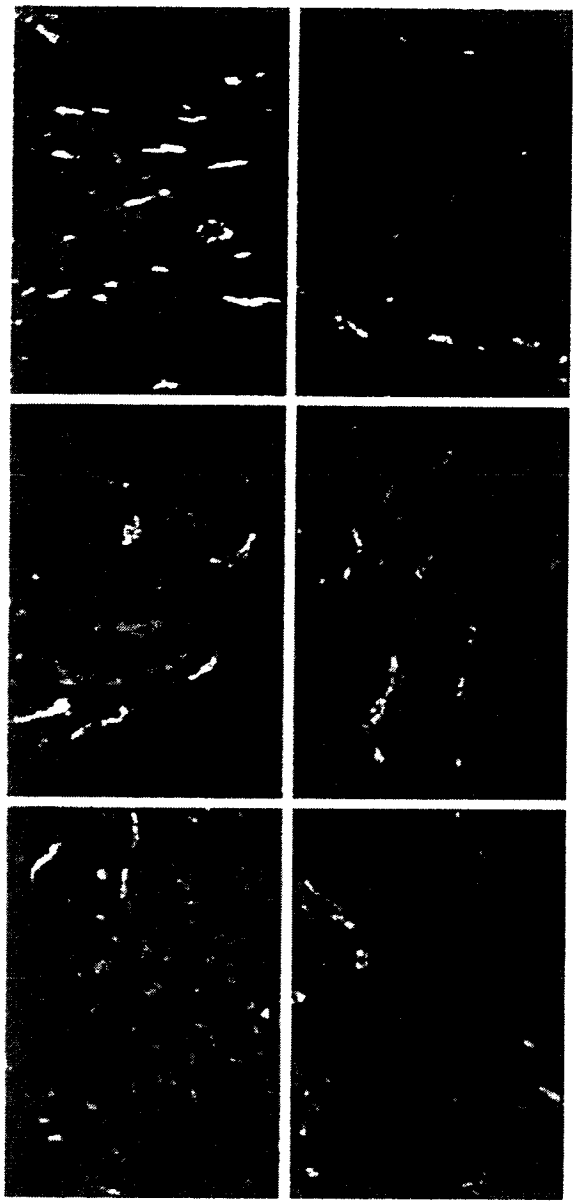


圖 12

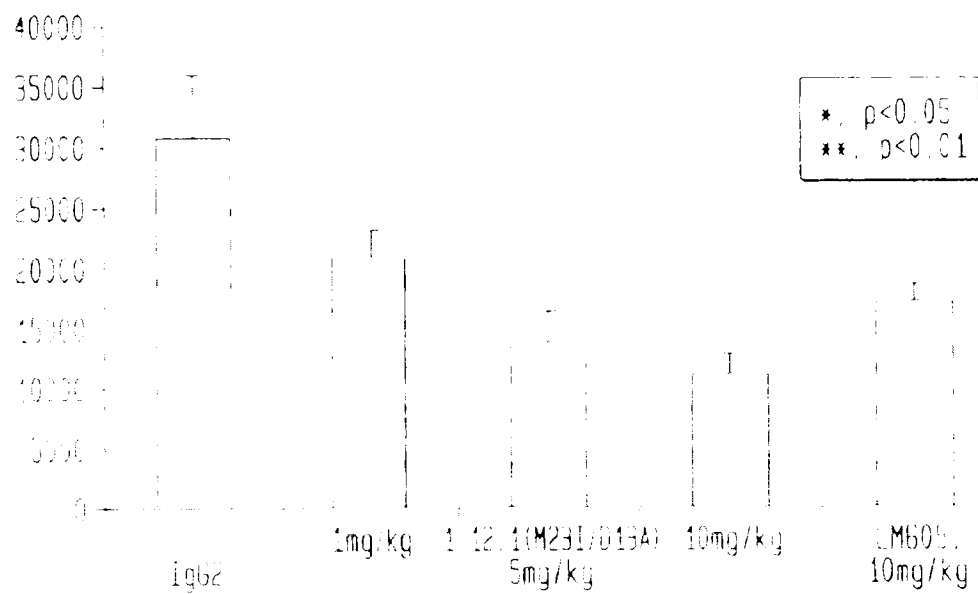


図 13

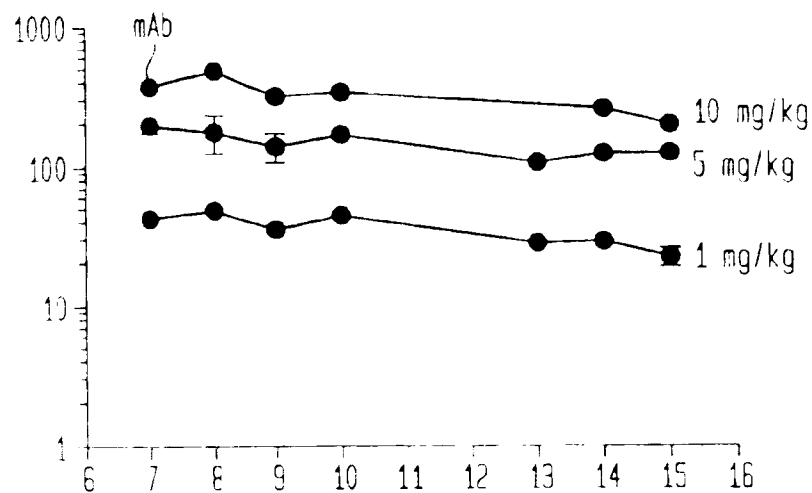
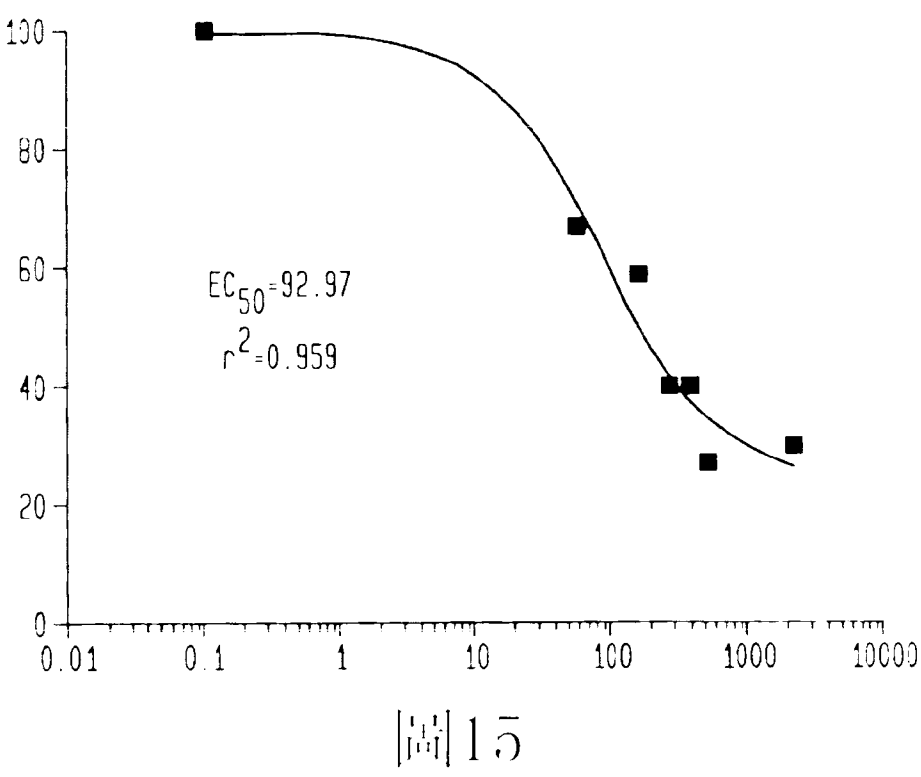


図 14



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

年10月11日修(更)正本

第 099108743 號專利申請案
中文申請專利範圍替換本(101 年 11 月)

七、申請專利範圍：

1. 一種單株抗體或其抗原結合部分，其結合至 ALK-1，其中該單株抗體包含如下所示重鏈及輕鏈可變結構域之 CDR1、CDR2 及 CDR3：

分別為 SEQ ID NOs: 14 及 16；

分別為 SEQ ID NOs: 18 及 20；

分別為 SEQ ID NOs: 26 及 28；

分別為 SEQ ID NOs: 30 及 32；

分別為 SEQ ID NOs: 38 及 40；

分別為 SEQ ID NOs: 46 及 48；

分別為 SEQ ID NOs: 50 及 52；

分別為 SEQ ID NOs: 54 及 56；

分別為 SEQ ID NOs: 58 及 60；

分別為 SEQ ID NOs: 62 及 64；

分別為 SEQ ID NOs: 66 及 68；或

分別為 SEQ ID NOs: 70 及 72。

2. 如請求項 1 之單株抗體或其抗原結合部分，其中該單株抗體之 V_H 及 V_L 結構域包含如下所示之序列：

分別為 SEQ ID NOs: 14 及 16；

分別為 SEQ ID NOs: 18 及 20；

分別為 SEQ ID NOs: 26 及 28；

分別為 SEQ ID NOs: 30 及 32；

分別為 SEQ ID NOs: 38 及 40；

分別為 SEQ ID NOs: 46 及 48；

分別為 SEQ ID NOs: 50及 52；

分別為 SEQ ID NOs: 54及 56；

分別為 SEQ ID NOs: 58及 60；

分別為 SEQ ID NOs: 62及 64；

分別為 SEQ ID NOs: 66及 68； 或

分別為 SEQ ID NOs: 70及 72。

3. 如請求項 1 或 2 之單株抗體或其抗原結合部分，其為 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子，或由該等分子所衍生者。
4. 如請求項 1 或 2 之單株抗體或其抗原結合部分，其為 IgG1 或 IgG2 分子。
5. 如請求項 1 或 2 之單株抗體或其抗原結合部分，其中該單株抗體或其抗原結合部分為衍生的或連接至另一分子。
6. 如請求項 5 之單株抗體或其抗原結合部分，其中該分子為肽或蛋白質。
7. 一種經分離核酸分子，其包含編碼如請求項 1 至 4 中任一項之單株抗體之重鏈或其抗原結合部分，或輕鏈或其抗原結合部分，或兩者之核苷酸序列。
8. 如請求項 7 之經分離核酸分子，其包含 SEQ ID NO: 13、15、17、19、25、27、29、31、37、39、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69 或 71 之核苷酸序列。
9. 一種醫藥組合物，其包含如請求項 1 至 6 中任一項之單株抗體或其抗原結合部分，及生理學上可接受之載劑。

10. 一種如請求項1至6中任一項之單株抗體或其抗原結合部分之用途，其係用於製造抑制哺乳動物中血管生成之藥劑。