



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101517068 B

(45)授权公告日 2017.02.08

(21)申请号 200680041490.3

(22)申请日 2006.09.06

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 101517068 A

(43)申请公布日 2009.08.26

(30)优先权数据

60/715,292 2005.09.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2008.05.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/035096 2006.09.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02007/040912 EN 2007.04.12

(73)专利权人 安进弗里蒙特公司

地址 美国加利福尼亚

专利权人 辉瑞大药厂

(72)发明人 M·A·诺斯 K·K·阿蒙森

V·比蒂安 S·S·贝洛斯基

D·D·胡-洛 蒋欣

S·M·卡利希克 S-A·科勒曼

J·A·汤姆森 王建英

G·R·威克曼 J·张

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.

C12N 5/06(2006.01)

G07K 16/00(2006.01)

(56)对比文件

US 5968752 A, 1999.10.19,

US 6692925 B1, 2004.02.17,

Africa Fernandez-L等.Blood outgrowth
endothelial cells from Hereditary.

《Cardiovascular Research》.2005,(第68期),
第235—248.

审查员 朱晓乐

权利要求书2页 说明书78页

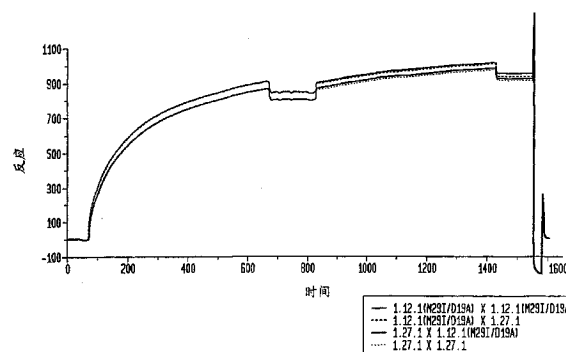
序列表55页 附图15页

(54)发明名称

活化素受体样激酶-1的人单克隆抗体

(57)摘要

本发明涉及与活化素受体样激酶-1(ALK-1)胞外域(ECD)结合的人单克隆抗体及其抗原结合部分,其对ALK-1/TGF- β -1/Smad11信号传导通路具有消除作用。本发明还涉及衍生自抗ALK-1抗体的重链和轻链免疫球蛋白以及编码此类免疫球蛋白的核苷酸分子,本发明还涉及制备抗ALK-1人抗体的方法,含有使用这些抗体和抗原结合部分的组合物以及这些抗体。还涉及包含本发明的核酸分子的转基因动物或植物。



1. 结合ALK-1的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中
所述抗体或抗原结合部分的重链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3是SEQ ID NO:6的重链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3;且
所述抗体或抗原结合部分的轻链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3是SEQ ID NO:8的轻链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3。
2. 根据权利要求1的抗体或抗原结合部分,其中所述抗体的V_H和V_L结构域分别是下列序列:
SEQ ID NO:6和8;
SEQ ID NO:6和127;
SEQ ID NO:104和8;
SEQ ID NO:104和127;或
以ATCC保藏号PTA-6864保藏的大肠杆菌克隆中的质粒插入核苷酸序列所编码的V_H氨基酸序列,和以ATCC保藏号PTA-6865保藏的大肠杆菌克隆中的质粒插入核苷酸序列所编码的V_L氨基酸序列。
3. 结合ALK-1的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分包括:包括SEQ ID NO:6作为可变区的重链和包括SEQ ID NO:8作为可变区的轻链。
4. 包括重链和轻链的单克隆抗体,其中所述重链和轻链的氨基酸序列分别是SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4。
5. 根据权利要求3的抗体或抗原结合部分,其包括:SEQ ID NO:6的重链可变结构域和SEQ ID NO:8的轻链可变结构域。
6. 根据权利要求3或5的抗体或抗原结合部分,所述单克隆抗体为IgG1或IgG2分子。
7. 根据权利要求1-3和5中任何一项的抗体或抗原结合部分,其是IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子。
8. 编码根据权利要求1-7中任一项的抗体的重链或其抗原结合部分的第一核苷酸序列和编码所述抗体的轻链或其抗原结合部分的第二核苷酸序列,其中所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列存在于相同或不同的分离的核酸分子上。
9. 根据权利要求8的第一和第二核苷酸序列,其中所述第一和第二核苷酸序列选自下列组合:
SEQ ID NOs:1和3;
SEQ ID NOs:1和101;
SEQ ID NOs:5和7;
SEQ ID NOs:5和126;
SEQ ID NOs:95和3;
SEQ ID NOs:95和101;
SEQ ID NOs:103和7;
SEQ ID NOs:103和126;
SEQ ID NOs:128和101;和
SEQ ID NOs:129和126。
10. 杂交瘤,其以ATCC保藏号PTA-6808保藏。

11. 由根据权利要求10的杂交瘤产生的抗体或其抗原结合部分。

12. 根据权利要求1的抗体或抗原结合部分, 其中,

a) 所述抗体或抗原结合部分的重链氨基酸序列是SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:100;

b) 所述抗体或抗原结合部分的轻链氨基酸序列是SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:102;

c) 所述抗体或抗原结合部分的重链可变结构域氨基酸序列是SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:104、或以ATCC保藏号PTA-6864保藏的大肠杆菌克隆中的质粒插入核苷酸序列所编码的V_H氨基酸序列;或

d) 所述抗体或抗原结合部分的轻链可变结构域氨基酸序列是SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:127、或以ATCC保藏号PTA-6865保藏的大肠杆菌克隆中的质粒插入核苷酸序列所编码的V_L氨基酸序列。

13. 根据权利要求12的抗体或抗原结合部分, 其包括选自下列那些组合的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列:

a) SEQ ID NO:2的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:102的轻链氨基酸序列;

b) SEQ ID NO:100的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:4的轻链氨基酸序列;以及

c) SEQ ID NO:100的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:102的轻链氨基酸序列。

14. 用于在有此需要的人中抑制肿瘤血管生成的药物组合物, 其包括根据权利要求1-7和11-13中任一项所述的抗体或抗原结合部分以及药学上可接受的载体。

15. 治疗有效量的根据权利要求1-7和11-13中任一项所述的抗体或抗原结合部分在制备用于在有此需要的人中抑制肿瘤血管生成的药物组合物中的用途。

活化素受体样激酶-1的人单克隆抗体

[0001] 本申请依照35U.S.C.§119(e)要求2005年9月7日提交的美国临时专利申请的优先权,其以全部引用的方式并入本文中。

[0002] 发明领域

[0003] 本发明涉及与活化素受体样激酶-1(ALK-1)胞外域(ECD)结合的人单克隆抗体及其抗原结合部分。本发明也涉及编码此类抗体和抗原结合部分的核苷酸分子,获得抗ALK-1人抗体和抗原结合部分的方法,包括这些抗体和抗原结合部分的组合物以及这些抗体、抗原结合部分和组合物的使用方法。

[0004] 发明背景

[0005] ALK-1是转化生长因子 β 受体I型(TGF- β -1)的I型细胞表面受体。人ALK-1是503个氨基酸的多肽,其包括信号肽(氨基酸:1-21),N端的细胞外TGF- β -1配体结合结构域或ECD(氨基酸:22-118),单次跨膜结构域(氨基酸:119-141),富含甘氨酸/丝氨酸(GS)的调节结构域(氨基酸:142-202)以及C端的丝氨酸-苏氨酸激酶结构域(202-492)。Attisano et al.*Cell*,1993,vol.75,pp.671-680揭露的人ALK-1氨基酸序列包括172位的丝氨酸(基因库编号L17075),而美国专利6,316,217声称人ALK-1氨基酸序列172位为苏氨酸(基因库编号NM_000020)。Attisano等揭露的编码人全长ALK-1的ACVRL1基因可从Invitrogen公司购买得到,其克隆ID为IOH21048。ALK-1与其它I型受体(从ALK-2到ALK-7)享有60-80%的同源性,但是,ALK-1的ECD明显不同于ALK家族其它成员的ECD。例如,在人类中,只有ALK-2的ECD与ALK-1的ECD显著相关(享有25%左右的氨基酸同一性)。美国专利6,316,217;ten Dijke et al.*Oncogene*,1993,vol.8,pp.2879-2887;Attisano et al.*Cell*,1993,vol.75,pp.671-680。

[0006] 通常,TGF- β 超家族的配体发挥生物学活性,是通过结合至两类(I型和II型)丝氨酸/苏氨酸激酶形成的异型受体复合物。II型受体是具有组成活性的激酶,一旦与配体结合,就可以使I型受体磷酸化。其后,活化的I型激酶促使下游的信号分子(包括各种Smads)磷酸化,所述信号分子进入细胞核并引起转录反应。Heldin et al.*Nature*,1997,vol.390,pp.465-471。对于ALK-1,我们已经发现Smad1被特异磷酸化并进入细胞核直接调节Smad1应答基因Id1和EphB2的表达。

[0007] ALK-1在内皮细胞和其它高度血管化组织例如胎盘或脑中选择性高表达。通过Affymetrix分析和实时RT-PCR,我们已经发现ALK-1在内皮细胞中的表达明显超过它的共受体II型活化素和内皮因子,它的配体TGF- β -1或ALK-5。ALK-1的突变与遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)相关,表明ALK-1在调控血管发生或修复中的重要作用。Abdalla et al.*J.Med.Genet*,2003,vol.40,pp.494-502;Sadicket al.*Hematologica/The Hematology J.*,2005,vol.90,818-828。此外,两个ALK-1敲除小鼠的独立实验为ALK-1在血管生成中的作用提供了重要体内依据。Oh et al.*Proc Natl Acad Sci USA*,2000,vol.97,pp.2626-2631;Urness et al.*Nature Genetics*,2000,vol.26,pp.328-331。

[0008] 血管生成是一个生理学过程,包括从预先存在的血管和/或循环内皮干细胞形成新的血管。这在生长、发育以及创伤愈合中是一个正常过程。但是,在肿瘤从休眠状态到恶

性状态的转变过程中,这也是一个重要步骤。Hanahan and 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。发生疾病例如肿瘤时,机体丧失维持血管生成平衡的能力。新生血管滋生异常组织,破坏正常组织,并且对于某些肿瘤,新生血管允许肿瘤细胞逃逸到循环系统并在其它器官留居(肿瘤转移)。血管生成抑制剂,包括单克隆抗体(mAbs),是一类非常有希望的药物,所述药物靶向抑制该异常过程从而阻断或减缓肿瘤生长。

[0009] 除了在实体瘤生长和转移中的作用,其它值得注意的具有血管生成现象的症状例如有关节炎、牛皮癣、新生血管性与年龄相关的黄斑变性糖尿病性视网膜病。Bonnet et al."Osteoarthritis, Angiogenesis and Inflammation,"Rheumatology,2005,vol.44,pp.7-16;Creamer et al."Angiogenesis in psoriasis,"Angiogenesis,2002,vol.5,pp.231-236;Clavel et al."Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis,"Joint Bone Spine,2003,vol.70,pp.321-326;Anandarajah et al."Pathogenesis of psoriatic arthritis,"Curr. Opin. Rheumatol.,2004,vol.16,pp.338-343;Ng et al."Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration,"Can. J. Ophthalmol.,2005,vol.40,pp.352-368;Witmer et al."Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease,"Progress in Retinal & Eye Research,2003,vol.22,pp.1-29;Adamis et al."Angiogenesis and ophthalmic disease,"Angiogenesis,1999,vol.3,pp.9-14。

[0010] 抗血管生成疗法本质上是一个长期过程。相应地,具有高选择性内皮功能的靶标例如ALK-1,能够减少副反应引起的摩擦。此外,由于ALK-1的ECD与ALK家族其它成员的ECDs存在显著差异,针对人ALK-1ECD获得的mAb被指望选择性靶向ALK-1。基于这些考虑,针对ALK-1胞外域的单克隆抗体可以抑制II型受体的二聚化,并进而阻断Smad1磷酸化以及下游的转录反应,这是非常有希望的。

[0011] R&D Systems公司生产并销售抗人ALK-1的单克隆抗体(Cat.#MAB 370),所述抗体产自小鼠骨髓瘤和B细胞融合的杂交瘤,其中B细胞来自用纯化的、NS0衍生的、重组人ALK-1胞外域免疫后的小鼠。我们已经发现,该抗体既不中和ALK-1和TGF- β -1之间的反应,也不抑制Smad1磷酸化。已经获得兔抗血清,其针对相应于ALK-1部分胞内近膜结构域(氨基酸残基145-166)的合成肽(与钥孔血蓝素(KLH)(美国专利6,692,925)偶联),以及针对除前导序列以外的完整ALK-1胞外域(Lux et al.,J.Biol.Chem.,1999,vol.274,pp.9984-9992)。Abdalla等(Human Mol.Gen.,2000,vol.9,pp.1227-1237)用重组的痘苗病毒构建体获得抗ALK-1多克隆抗体。R&D Systems公司生产并销售抗人ALK-1的多克隆抗体(Cat.#AF370),其产自用纯化的、NS0衍生的、重组人ALK-1胞外域免疫后的山羊。

[0012] 迄今为止,还没有完整的抗ALK-1ECD的人单克隆抗体见诸报道,并且还没有人证明任一抗ALK-1ECD单克隆抗体在抑制ALK-1/TGF- β -1/Smad1信号通路中的作用。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明是分离的中和性抗ALK-1单克隆抗体或其抗原结合部分,与灵长类ALK-1结

合,优选灵长类ALK-1ECD结合,更优选与人ALK-1ECD结合。在一个优选的具体实施方式中,中和性抗体是完全的人单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0015] 另一方面,本发明是一个抗ALK-1抗体或其抗原结合部分,该抗体或其抗原结合部分抑制ALK-1/TGF- β -1/Smad1信号通路。在一个优选的具体实施方式中,抗体是完全的人单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0016] 另一方面,本发明是一个抗ALK-1抗体或其抗原结合部分,该抗体或其抗原结合部分是TGF- β -1激发的血管生成的拮抗剂。在一个优选的具体实施方式中,抗体是完全的人单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0017] 另一方面,本发明是一个完全的抗ALK-1人抗体或其抗原结合部分,该抗体或其抗原结合部分是TGF- β -1激发的肿瘤血管生成的拮抗剂。

[0018] 另一方面,本发明是一个具有良好耐受性、可注射的、完全的抗ALK-1人抗体或其抗原结合部分,该抗体或其抗原结合部分是TGF- β -1激发的血管生成的拮抗剂。

[0019] 另一方面,本发明是一个抗ALK-1抗体或其抗原结合部分,该抗体或其抗原结合部分抑制ALK-1某一特定下游靶基因Id1的上调。在一个优选的具体实施方式中,抗体是完全的人单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0020] 另一方面,本发明是一个抗ALK-1单克隆抗体或其抗原结合部分,其中,该抗体或其抗原结合部分至少符合如下所述若干功能特性之一。

[0021] 例如,在一个具体实施方式中,抗体或其抗原结合部分结合于灵长类ALK-1胞外域,其中亲和力值为1 μ M或更小(通过表面等离子共振技术测得)。在进一步的具体实施方式中,抗体或部分结合于灵长类ALK-1胞外域,其中亲和力值小于100nM、小于5nM、小于1nM、小于500pM、小于100pM、小于50pM、小于20pM、小于10pM、或小于1pM(通过表面等离子共振技术测得)。在特定的具体实施方式中,亲和力值从0.1pM到1 μ M。在其它具体实施方式中,亲和力值从1pM到100nM。在其它具体实施方式中,亲和力值从1pM到5nM。在其它具体实施方式中,亲和力值从1pM到500pM。在其它具体实施方式中,亲和力值从1pM到100pM。在其它具体实施方式中,亲和力值从1pM到10pM。

[0022] 在另一个具体实施方式中,抗体或其抗原结合部分结合于人ALK-1胞外域,其中亲和力值为100nM或更小(通过表面等离子共振技术测得)。在进一步的具体实施方式中,抗体或其部分结合于人ALK-1胞外域,其中亲和力值小于10nM、小于5nM、小于1nM、小于500pM、小于100pM、小于50pM、小于20pM、小于10pM、或小于1pM(通过表面等离子共振技术测得)。在特定的具体实施方式中,亲和力值从1pM到100nM。在其它具体实施方式中,亲和力值从1pM到5nM。在其它具体实施方式中,亲和力值从1pM到500pM。在其它具体实施方式中,亲和力值从1pM到100pM。在其它具体实施方式中,亲和力值从1pM到10pM。

[0023] 在另一个具体实施方式中抗体或其部分对人ALK-1的解离速率(k_{off})为 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或更小,其是通过表面等离子共振技术测得的。例如,在特定的具体实施方式中,抗体或片段对人ALK-1的 k_{off} 小于 10^{-3}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-4}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-5}s^{-1} 、或小于 $5 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 。在其它具体实施方式中, k_{off} 从 10^{-6}s^{-1} 到 10^{-4}s^{-1} 。在其它具体实施方式中, k_{off} 从 10^{-6}s^{-1} 到 $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 。

[0024] 在另一个具体实施方式中,抗体或其部分结合于灵长类ALK-1,其中 K_D 为1000nM或更少。在进一步的具体实施方式中,抗体或片段结合于人ALK-1,其中 K_D 小于500nM、小于

100nM、小于50nM、小于20nM、小于10nM、或小于1nM(通过表面等离子共振技术测得)。在特定的具体实施方式中, K_D 从1 μ M到100nM。在其它具体实施方式中, K_D 从100nM到10nM。在其它具体实施方式中, K_D 从50nM到0.1nM。该 K_D 值可通过所属领域技术人员已知的任一技术进行测定,例如通过ELISAs、RIAs、流式细胞术、或表面等离子共振技术,例如BIACORE™。

[0025] 在另一个具体实施方式中,抗体或其部分对灵长类ALK-1的结合亲和力($K_D(P)$)高于对啮齿类ALK-1的结合亲和力($K_D(R)$)。在一个具体实施方式中,本发明抗体或其抗原结合部分的 $K_D(R)/K_D(P)$ 大于或等于1.5。在进一步的具体实施方式中,本发明抗体或其抗原结合部分的 $K_D(R)/K_D(P)$ 大于或等于2、大于或等于3、大于或等于5、大于或等于10、大于或等于20、大于或等于50、大于或等于100、大于或等于200、大于或等于500、或大于或等于1000。对灵长类ALK-1或啮齿类ALK-1的 K_D 值可通过所属领域技术人员已知的任一技术进行测定,例如通过流式细胞术、ELISAs、RIA、或表面等离子共振技术,例如BIACORE™。

[0026] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分的 IC_{50} 为500nM或更小,其通过测定其抑制ALK-1的某一特定下游靶基因Id1上调的能力获得。在进一步的具体实施方式中,该 IC_{50} 小于300nM、小于200nM、小于150nM、小于100nM、小于50nM、小于20nM、小于10nM、或小于1nM。在特定的具体实施方式中, IC_{50} 从1nM到500nM。在其它具体实施方式中, IC_{50} 从5nM到250nM。在其它具体实施方式中, IC_{50} 从10nM到100nM。

[0027] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分的 IC_{50} 为250nM或更小,其通过测定其抑制Smad1磷酸化的能力获得,其中磷酸化的通过Western印迹,采用Odyssey Infrared成像系统而测定的。在进一步的具体实施方式中,该 IC_{50} 小于200nM、小于150nM、小于100nM、小于50nM、小于20nM、小于10nM、或小于1nM。在特定的具体实施方式中, IC_{50} 从1nM到250nM。在其它具体实施方式中, IC_{50} 从5nM到200nM。在其它具体实施方式中, IC_{50} 从10nM到100nM。

[0028] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分在移植了人包皮组织的SCID小鼠中抑制人血管生成,其中人黑色素瘤M24met肿瘤细胞通过皮内注射植入,且通过IHC分析人CD-31信号,与对照样品相比,至少40%被抑制。在进一步的具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分在移植了人包皮组织的SCID小鼠中抑制人血管生成,其中人黑色素瘤M24met肿瘤细胞通过皮内注射植入,且与对照样品相比,至少30%、至少40%、至少50%、或至少60%被抑制。

[0029] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分的 EC_{50} 为500nM或更小,其是通过测定其在移植了人包皮组织的SCID小鼠中抑制人血管生成的能力获得,其中人黑色素瘤M24met肿瘤细胞通过皮内注射植入。在进一步的具体实施方式中,该 EC_{50} 小于400nM、小于300nM、小于200nM、小于150nM、小于100nM、小于50nM、小于25nM、或小于5nM。在特定的具体实施方式中, EC_{50} 从5nM到500nM。在其它具体实施方式中, IC_{50} 从25nM到300nM。在其它具体实施方式中, IC_{50} 从50nM到150nM。

[0030] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分在移植了人包皮组织的SCID小鼠中抑制人血管生成,其中人大血管内皮细胞与胶原的混合物通过皮内注射植入,且通过IHC分析人CD-31信号,与对照样品相比,至少25%被抑制。在进一步的具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分在移植了人包皮组织的SCID小鼠中抑制人血管生成,其中胶原通过皮内注射植入,且与对照样品相比,至少50%被抑制。在进一步的具体实施方式中,与对照样

品相比,抗ALK-1抗体或其部分抑制至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。

[0031] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分与选自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和5.59.1的抗体竞争结合于ALK-1。

[0032] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分与选自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和5.59.1的抗体交叉竞争结合于ALK-1。

[0033] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分与选自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和5.59.1的抗体结合于ALK-1的相同抗原表位。

[0034] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分与选自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和5.59.1的抗体和ALK-1结合的 K_D 基本相同。

[0035] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其部分与选自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和5.59.1的一个抗体和ALK-1结合的 K_{off} 基本相同。

[0036] 本发明的另一方面是一个抗体或其抗原结合部分,其具有上述功能特性中的至少,并包括 V_H 结构域,该 V_H 结构域的其氨基酸序列至少90%相同于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中的任意一个。在一个具体实施方式中,该 V_H 结构域的氨基酸序列至少91%、至少93%、至少95%、至少97%、至少99%、或100%相同于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中的任意一个。

[0037] 在进一步的具体实施方式中,抗体或其部分至少具有上述功能特性之一,并包括 V_H 结构域,所述 V_H 结构域为一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中的任意一个,或者由于至少一个保守氨基酸置换而不同于任一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。例如, V_H 结构域由于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸置换不同于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中的任何一个。在进一步的具体实施方式中,这些保守氨基酸置换中的任何

一个可以出现在CDR1、CDR2和/或CDR3区。

[0038] 本发明的另一方面是一个抗体或其抗原结合部分,该抗体或其抗原结合部分至少符合上述功能特性之一,并包括一个V_L结构域,该结构域中90%的氨基酸序列等同于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中的任意一个。在一个具体实施方式中,该V_L结构域的氨基酸序列至少91%、至少93%、至少95%、至少97%、至少99%、或100%相同于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中的任意一个。

[0039] 在进一步的具体实施方式中,抗体或其部分至少具有上述功能特性之一,并包括一个V_L结构域,其为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中的任意一个,或者由于至少一个保守氨基酸置换而不同于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的序列中的任意一个。例如,V_L结构域由于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸置换不同于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中的任意一个。在进一步的具体实施方式中,这些保守氨基酸置换中任何一个可以出现在CDR1、CDR2和/或CDR3区。

[0040] 本发明的另一方面是一个抗体或其抗原结合部分,该抗体或抗原结合部分具有至少上述功能特性之一,其中,V_L和V_H结构域的氨基酸序列各自分别90%相同于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和5.59.1中任一单克隆抗体的V_L和V_H结构域。例如,V_L和V_H结构域的氨基酸序列各自分别至少91%、93%、95%、97%、99%或100%相同于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和5.59.1中任一单克隆抗体的V_L和V_H结构域。

[0041] 本发明的另一方面是一个单克隆抗体或其抗原结合部分,其选自:a)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:6所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:8所述的V_L结构域;b)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:10所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:12所述的V_L结构域;c)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:14所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:16所述的V_L结构域;d)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:18所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:20所述的V_L结构域;e)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:22所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:24所述的V_L结构域;f)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:26所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:28所述的V_L结构域;g)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:30所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:32所述的V_L结构域;h)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:34所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:36所述的V_L结构域;i)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:38所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:40所述的V_L结构域;j)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:42所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:44所述的V_L结构域;k)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:46所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:48所述的V_L结构域;l)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:50所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:52所述的V_L结构域;m)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:54所述的V_H结构域

和一个SEQ ID NO:56所述的V_L结构域;n)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:58所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:60所述的V_L结构域;o)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:62所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:64所述的V_L结构域;p)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:66所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:68所述的V_L结构域;q)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:70所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:72所述的V_L结构域;r)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:74所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:76所述的V_L结构域;s)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:78所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:80所述的V_L结构域;t)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:82所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:84所述的V_L结构域;u)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:86所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:88所述的V_L结构域;v)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:90所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:92所述的V_L结构域;w)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:104所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:127所述的V_L结构域;x)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:6所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:127所述的V_L结构域;y)抗体或其部分含有一个SEQ ID NO:104所述的V_H结构域和一个SEQ ID NO:8所述的V_L结构域。

[0042] 在进一步的具体实施方式中,对于上述a)到v)组的任一抗体或其部分,其V_H和/或V_L结构域可通过至少一个保守氨基酸置换不同于其中所述的特定SEQ ID NO。例如,V_H和/或V_L结构域由于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸置换而不同于所述SEQ ID NO。在进一步的具体实施方式中,这些保守氨基酸置换中的任何一个可以出现在CDR1、CDR2和/或CDR3区。

[0043] 在另一个具体实施方式中,本发明提供一个单克隆抗体或其抗原结合部分,其至少具有上述功能特性之一,其中,V_H结构域独立选自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中的任意一个,或由于至少一个保守氨基酸置换而不同于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的任意一个的序列,而V_L结构域独立选自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中的任意一个,或由于至少一个保守氨基酸置换不同于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的任意一个的序列。例如,V_H和V_L结构域各自由于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸置换分别不同于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,和8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92或127。

[0044] 在进一步的具体实施方式中,本发明提供一个单克隆抗体或其抗原结合部分,其具有至少上述功能特性之一,其中该抗体或片段含有V_H CDR1、CDR2和CDR3序列,它们分别独立选自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中任意一个序列的重链CDR1、CDR2或CDR3序列,或由于至少一个保守氨基酸置换不同于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中任一序列的重链CDR1、CDR2或CDR3序列。例如,V_H CDR1、CDR2和CDR3由于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸置换分别不同于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中任何一个序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0045] 在进一步的具体实施方式中,本发明提供一个单克隆抗体或其抗原结合部分,其

至少具有上述功能特性之一,其中,该抗体或片段含有V_LCDR1、CDR2和CDR3序列,它们分别独立选自任一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中任一序列的轻链CDR1、CDR2或CDR3序列,或由于至少一个保守氨基酸置换不同于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中任一序列的轻链CDR1、CDR2或CDR3。例如,V_L CDR1、CDR2和CDR3由于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸置换分别不同于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中任何一个序列的CDR1、CDR2和CDR3。

[0046] 本发明进一步提供一个单克隆抗体或其抗原结合部分,其至少具有上述功能特性之一,其中,该抗体或抗原结合部分含有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和5.59.1中任一单克隆抗体的V_H和V_LCDR1,V_H和V_LCDR2,以及V_H和V_LCDR3序列。

[0047] 本发明进一步提供一个单克隆抗体或其抗原结合部分,其至少具有上述功能特性之一,其中,该抗体或抗原结合部分含有,利用人V_H4-31、V_H3-11、V_H3-15、V_H3-33、V_H4-61或V_H4-59基因的重链。在某些具体实施方式中,重链利用人V_H3-33基因,人D 6-19基因和人J_H 3B基因;人V_H 4-31,人D 6-19基因和人J_H 4B基因;人V_H 4-61基因,人D 6-19基因和人J_H 4B基因;人V_H 4-31基因,人D 3-3基因和人J_H 3B基因;人V_H 4-31基因和人J_H 3B基因;人V_H 4-59基因,人D 6-19基因和人J_H 4B基因;人V_H 3-11基因,人D 3-22基因和人J_H 6B基因;人V_H 3-15基因,人D 3-22基因和人J_H 4B基因;人V_H 4-31基因,人D 5-12基因和人J_H 6B基因;人V_H 4-31基因,人D4-23基因和人J_H 4B基因;人V_H 4-31基因,人D 2-2基因和人J_H 5B基因;人V_H 4-31基因和人J_H 6B基因;人V_H 3-15基因,人D 1-1基因和人J_H 4B基因;人V_H 3-11基因,人D 6-19基因和人J_H 6B基因;人V_H 3-11基因,人D 3-10基因和人J_H 6B基因;或者人V_H 3-11基因,人D 6-6基因和人J_H 6B基因。

[0048] 本发明进一步提供一个单克隆抗体或其抗原结合部分,其至少具有上述功能特性之一,其中,该抗体或抗原结合部分含有一条轻链,利用人V_KA27、V_KA2、V_KA1、V_KA3、V_KB3、V_KB2、V_KL1或V_KL2基因的轻链。在某些具体实施方式中,轻链利用人V_K L1基因和人J_K 4基因;人V_K A27基因和人J_K 5基因或人J_K 4基因;人V_K B3基因和人J_K 1基因;人V_K L2基因和人J_K 3基因;人V_K A2基因和人J_K 1基因;人V_K A3基因和人J_K 4基因;人V_K A1基因和人J_K 1基因;人V_K B2基因和人J_K 4基因;或者人V_K A2基因和人J_K 1基因。

[0049] 本发明进一步提供一个单克隆抗体或其抗原结合部分,至少具有上述功能特性之一,其中,该抗体或抗原结合部分含有一条或多条重链和/或轻链FR1、FR2、FR 3或FR4氨基酸序列,其中所述氨基酸序列存在于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和5.59.1中的任一单克隆抗体。

[0050] 本发明进一步提供一个单克隆抗体,其氨基酸序列如a)SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4;b)SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:102;c)SEQ ID NO:100和SEQ ID NO:4;d)SEQ ID NO:100

和SEQ ID NO:102所示。

[0051] 在进一步的具体实施方式中,本发明是上述任一抗体,即,IgG、IgM、IgE、IgA、或IgD分子,或其衍生物。例如抗体可以是IgG₁或IgG₂。

[0052] 另一个具体实施方式提供上述任一抗体或抗原结合部分,基伙Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、单链Fv片段、单链V_H片段、单链V_L片段、人源化抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。

[0053] 在进一步的具体实施方式中,本发明是一个衍生化抗体或抗原结合部分,其包括上述任一抗体或其部分以及至少一个其它分子基团。例如,该分子基团可以是另一个抗体(例如一个双特异性抗体或双价小抗体),一种检测试剂,标签,细胞毒试剂,药学试剂,和/或蛋白或多肽,它们可介导抗体或其抗体片段与另一分子(例如链霉集合素核心区或多组氨酸标签)结合。例如,用于衍生本发明抗体或抗原结合部分的检测试剂包括荧光化合物,例如荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲氨基-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧磷光剂等等。抗体也可以用检测酶进行标记,例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等等。在进一步的具体实施方式中,本发明抗体或其部分也可以用生物素或预先设定的能被第二个受体识别的多肽抗原表位(例如亮氨酸拉链互补序列、第二个抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)进行标记。在本发明进一步的具体实施方式中,任一抗体或其部分也可以用一个化学基团衍生,例如聚乙二醇(PEG),甲基或乙基,或者糖基。

[0054] 在某些具体实施方式中,本文描述的抗ALK-1抗体或抗原结合部分连接在一个固体支撑物上。

[0055] 在某些具体实施方式中,本发明任一抗ALK-1抗体的重链C端赖氨酸被剪切在本发明的各个具体实施方式中,抗ALK-1抗体的重链和轻链可任选的包括一个信号序列。

[0056] 本发明也提供药物组合物,其包括上述任一抗体或其抗原结合部分以及一个药学可接受的载体。

[0057] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及分离的核酸分子,其含有编码描述的任一抗体或其抗原结合部分的核苷酸序列。在一个特定的具体实施方式中,分离的核酸分子含有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,该序列编码重链。在另一个特定的具体实施方式中,分离的核酸分子含有SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列,该序列编码轻链。

[0058] 在另一个特定的具体实施方式中,分离的核酸分子含有多聚核苷酸,该多聚核苷酸包括一个克隆的cDNA序列的开放阅读框,该克隆以ATCC保藏号PTA-6864保存。在另一个特定的具体实施方式中,分离的核酸分子含有多聚核苷酸,该多聚核苷酸包括一个克隆的cDNA序列的开放阅读框,该克隆以ATCC保藏号PTA-6865保存。

[0059] 在另一个特定的具体实施方式中,分离的核酸分子含有SEQ ID NO:95或128所示的核苷酸序列,两段序列各自编码重链。在另一个特定的具体实施方式中,分离的核酸分子含有SEQ ID NO:101所示的核苷酸序列,该序列编码轻链。

[0060] 本发明进一步涉及一个载体,其含有本文描述的任一核酸分子,其中,载体任选地含有表达调控序列,该表达调控序列任选的连接在酸分子上。

[0061] 另一个具体实施方式提供一种宿主细胞,其含有本文描述的任一载体或含有本文描述的任一核酸分子。本发明也提供一种分离的细胞系,其产生本文描述的任一抗体或抗

原结合部分或产生任一该抗体或该抗原结合部分的重链或轻链。

[0062] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及一种用于产生抗ALK-1抗体或其抗原结合部分的方法,其包括在合适的条件下培养本文描述的任一宿主细胞或细胞系并回收该抗体或抗原结合部分。

[0063] 本发明也涉及一种非人类转基因动物或转基因植物,其含有本文描述的任一核酸,其中非人类转基因动物或转基因植物表达该核酸。

[0064] 本发明进一步提供一种用于分离与ALK-1结合的抗体或其抗原结合部分的方法,其包括从本文描述的非人类转基因动物或转基因植物中分离抗体的步骤。

[0065] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及一株杂交瘤,其以ATCC保藏号PTA-6808保存。

[0066] 本发明也提供一种方法,用于测定物质是否抑制ALK-1某一特定下游靶基因Id1的上调,该方法包括用物质接触表达Id1的首选细胞样品,并测定Id1表达是否被抑制,其中,与对照细胞样品相比,Id1表达水平在与该物质接触的细胞样品中降低,表明该物质抑制Id1的表达。本发明进一步提供方法,其中,该物质是与ALK-1胞外域结合的抗体。

[0067] 本发明也提供一种用于治疗细胞在其所需哺乳动物中的异常生长的方法,其包括给药步骤,即给予该哺乳动物本文描述的任一抗体或其抗原结合部分或者任一药物组合物。本发明进一步提供一种方法,用于采用ALK-1结合的抗体或其抗原结合部分治疗细胞在其所需哺乳动物中的异常生长,其包括给药步骤,即将有效量本文描述的任一核酸分子的在允许该核酸分子表达的合适条件下施用至该哺乳动物。在另一个具体实施方式中,治疗异常细胞生长的方法包括施用一定量的一种或多种,选自抗肿瘤试剂、抗血管生成试剂、信号转导抑制剂以及抗增殖试剂的物质,所述量可联合有效治疗该异常细胞生长。在特定的具体实施方式中,该异常细胞生长是瘤性的。

[0068] 本发明也提供一个分离的短尾猴(*cynomolgus monkey*)ALK-1蛋白,其具有SEQ ID NO:93氨基酸序列。本发明进一步提供一个分离的核酸分子,其编码具有SEQ ID NO:93氨基酸序列的蛋白。本发明进一步提供一个分离的SEQ ID NO:94核酸分子。

[0069] 附图简述

[0070] 图1显示表位结合数据的例子。注射1.12.1(M29I/D19A)抗体10分钟,接着再注射1.12.1(M29I/D19A)抗体10分钟。这限定了该抗体注射20分钟的最大反应。同样测得1.27.1抗体注射20分钟的最大反应。注射1.12.1(M29I/D19A)抗体10分钟,接着注射1.27.1抗体10分钟。如果总反应跌落在两个限定的最大反应之间,则两种抗体一定结合于同一抗原表位。如果总反应超过最大反应的最高值,则两种抗体一定结合于不同抗原表位。根据例9描述的反向注射顺序重复本实验。

[0071] 图2表示人和狗ALK-1蛋白的序列比对。

[0072] 图3表示测定重组1.12.1抗体结合于细胞表面ALK-1的K_D。(a)人,(b)狗。

[0073] 1.12.1(rWT)是作为表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0074] 1.12.1(M29I/D19A)是作为含两个特定氨基酸突变(重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代以及轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代)的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0075] 1.12.1(M29I)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代。

[0076] 1.12.1(D19A)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代。

[0077] 图4表示ID1滴定的例子,用ID1 Taqman Assay滴定1.12.1抗体变体。

[0078] 1.12.1是mAb 1.12.1变体,其分离自杂交瘤。

[0079] 1.12.1(rWT)是作为表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0080] 1.12.1(M29I/D19A)是作为含两个特定氨基酸突变(重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代以及轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代)的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0081] 1.12.1(M29I)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代。

[0082] 1.12.1(D19A)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代。

[0083] 图5表示ID1滴定的例子,其中用ID1 Taqman Assay滴定1.12.1抗体序列变体和Fab衍生物。

[0084] 1.12.1是mAb 1.12.1变体,其分离自杂交瘤。

[0085] 1.12.1(rWT)是作为表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0086] 1.12.1(M29I)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代。

[0087] 1.12.1(D19A)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代。

[0088] 1.12.1(M29I/D19A)是作为含两个特定氨基酸突变(重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代以及轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代)的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0089] Fab 1.12.1(M29I/D19A)是mAb 1.12.1(M29I/D19A)的Fab片段,该片段用蛋白酶消化1.12.1(M29I/D19A)IgG1制备得到。

[0090] 图6表示ALK-1内化,(a)监测残留在细胞表面的中和抗体,(b)监测残留的细胞表面受体ALK-1。

[0091] 图7A表示本发明抗ALK-1抗体的可变区与种系序列的比对。与种系相比的突变是巨大的。下面加划线的是CDR序列。图7B表示抗ALK-1抗体1.12.1、1.14.1、1.162.1、1.31.1、4.62.1和4.72.1轻链可变区的预测氨基酸序列与人种系A27V_κ序列的比对。图7C和7D表示抗ALK-1抗体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和5.34.1重链可变区的预测氨基酸序列与人种系4-31V_H序列的比对。

[0092] 图8表示手术后人移植皮肤的解剖切片的组织学(H&E染色)分析的例子。

[0093] 图9(A)表示人皮肤嵌合体鼠中胶原的三色染色法。

[0094] 图9(B)表示检测移植于人包皮嵌合体鼠中的胶原凝胶的人血管。红:人血管。FITC:鼠血管。黄色:共染。

[0095] 图10表示人包皮SCID嵌合鼠中M24met肿瘤的人血管(红色)和鼠血管(绿色)的免疫荧光图。

[0096] 图11表示人包皮SCID嵌合鼠中M24met肿瘤的人血管(棕色)的IHC图。

[0097] 图12表示在人包皮SCID嵌合鼠中,经1.12.1(M29I/D19A)抗体(10mg/kg)处理的M24met肿瘤和对照中人血管(红色)和鼠血管(绿色)的代表性免疫荧光图。

[0098] 图13表示1.12.1(M29I/D19A)抗体在人包皮SCID嵌合鼠模型中剂量依赖性抑制人肿瘤血管生成。

[0099] 图14表示1.12.1(M29I/D19A)抗体的SCID小鼠血浆浓度。

[0100] 图15表示1.12.1(M29I/D19A)抗体在M24met包皮SCID嵌合鼠模型中估计的EC₅₀。0.1nM的人造血清浓度作为100%的对照值用于作图。这不改变表观EC₅₀。

[0101] 发明详述

[0102] 定义和一般技术

[0103] 除非在此另外定义,本发明使用的科学和技术术语具有所属领域的普通技术人员所普遍了解的含义。此外,除非上下文另外要求,单数术语应包括复数,而复数术语应包括单数。通常,本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核苷酸化学和杂交中使用的技术和术语是所属领域普遍使用和熟知的。

[0104] 除非另外指明,本发明的方法和技术通常根据此项技术上已熟知的常规方法并根据本说明书所引用和讨论的不同综合文献和更特殊的文献所描述的内容得以完成。例如见 Sambrook J.& Russell D..Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2000);Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Wiley,John & Sons,Inc.(2002);Harlow and Lane Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1998)和 Coligan et al.,Short Protocols in Protein Science,Wiley,John & Sons,Inc.(2003),将其以引用的方式并入本文中。酶促反应和纯化技术根据厂商说明书完成,如所属领域技术领域通常所完成的那样或根据本文描述的内容完成。本文描述的分析化学、合成有机化学、药物化学和药剂化学中使用的术语和实验操作及技术是所属领域普遍使用和熟知的。

[0105] 以下术语,除非另外指明,应理解成具有以下含义:

[0106] 在此使用的术语“ALK-1”是哺乳动物活化素受体样激酶-1。术语ALK-1包括重组ALK-1和ALK-1的重组嵌合体形式,它们可通过标准重组表达方法制备。

[0107] 在此使用的缩写“mAb”是单克隆抗体。

[0108] 在此使用的由编号指代的抗体是单克隆抗体(mAb),其来自同一编号的杂交瘤。例如,单克隆抗体1.12.1来自杂交瘤1.12.1。

[0109] 1.12.1是mAb 1.12.1变体,其分离自杂交瘤。

[0110] 1.12.1(rWT)是作为表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0111] 1.12.1(M29I/D19A)是作为含两个特定氨基酸突变(重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代以及轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代)的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0112] 1.12.1(M29I)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代。

[0113] 1.12.1(D19A)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代。

[0114] 在此使用的“异常细胞生长”,除非另外指明,是不依赖于正常调控机制(例如丧失接触抑制)的细胞生长。

[0115] 在此使用的术语“毗连”是直接连接在一起的核苷酸序列,不存在插入核苷酸。例如,五核苷酸5'-AAAAA-3'与三核苷酸5'-TTT-3'按5'-AAAAATTT-3'或5'-TTTAAAAA-3'方式连接,当按5'-AAAACTTT-3'方式连接时,两者则不是毗连的。

[0116] 在此使用的术语“试剂”表示一种化合物、化合物混合物、生物学大分子、或者来自生物学材料的提取物。

[0117] 在此使用的“减轻”疾病、障碍或状态表示降低疾病、障碍或状态症状的严重性。这包括但不限于,与治疗前患者或缺乏治疗患者的这些相同参数相比,影响患者的肿瘤体积、生长和/或重量、转移程度或进展等等。

[0118] 在此使用的缩写“Id1”指ALK-1某一特定下游靶基因Id1基因,对血管生成很重要。已经有报道,Id1基因在特定肿瘤中通过抑制天然存在的血管生成抑制剂凝血酶敏感素-1(TSP-1)产生而调控血管生成途径。例如,已经有报道,Id1基因在黑色素瘤、乳腺、头颈部、脑、颈部、前列腺、胰脏和睾丸肿瘤中高表达,从而降低TSP-1表达并增加肿瘤血管形成。Volpert, Olga V. et al, "Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1," Cancer Cell, Dec. 2002, Vol. 2, pp. 473-483。

[0119] 在此使用的术语“Smad”是在线虫到人类的一系列物种中发现的Smad结构域蛋白。这些高度保守的蛋白含有与DNA接触的N端MH1结构域,并通过下述短连接子区与C端的MH2结构域分开,后者与叉头相关(FHA)结构域表现出惊人的相似性。FHA和Smad(MH2)结构域共享一个相同结构,由11条 β 链在两个片层中的夹层结构和希腊钥匙拓扑结构组成。Smad蛋白通过TGF- β /活化素/BMP-2/4细胞因子介导从位于细胞表面的受体Ser/Thr蛋白激酶到细胞核内的信号传递。Smad蛋白按功能分为三类:受体调控的Smads(R-Smads),包括Smad1、-2、-3、-5和-8,其中每个都参与配体特异的信号通路;共介导者Smads(co-Smads),包括Smad4,其与R-Smads相互作用从而参与信号传递;抑制性Smads(I-Smads),包括Smad-6和-7,其阻断R-Smads和Co-Smads的激活,从而负调节信号通路。

[0120] 在此使用的术语“TGF- β ”是转化生长因子- β ,其组成一个调控细胞生长和分化的多功能细胞因子家族(TGF- β 1-5)。转化生长因子(TGF)是天然存在的许多特征性生长因子之一。它在重度联合免疫缺陷的“SCID”小鼠中发挥重要作用。许多细胞合成TGF- β ,并且基本上都存在该多肽的特异受体。TGF- β 调节其它许多多肽生长因子的作用,并决定这些效应的正或负方向。TGF- β 是一个肿瘤抑制细胞因子,具有抑制上皮细胞生长的作用。TGF- β 也通过引起上皮细胞到间质细胞的转变作为肿瘤启动剂发挥作用。TGF- β 使参与细胞周期进程的几个蛋白失活,通过引起细胞周期阻滞在G1期从而发挥抑制上皮细胞生长的作用。该蛋白作为一个二硫键连接的同型二聚体发挥作用。其序列特征是存在若干C端半胱氨酸残基,形成排列在结节样拓扑结构中的闭环二硫键连接。已经在某些与电压门控Ca²⁺通道结合的酶抑制剂和神经毒素结构中发现相似的“胱氨酸结节”排列,但精确的拓扑结构存在差异。TGF- β 基因的差异表达表明不同TGF- β 种类在体内可有不同的生理学功能。

[0121] 在此使用的术语“TGF- β 1”是转化生长因子 β 受体1型,是下述含有112个氨基酸残基的多肽,通过蛋白水解切割而从前体蛋白C端获得。比较成年鼠组织中TGF- β 1的mRNA水平,表明其主要在脾脏、肺和胎盘中表达。TGF- β 1被认为在病理学过程中发挥重要作用。

[0122] 在此使用的术语“SCID”是患有重度联合免疫缺陷的小鼠。

[0123] 在此使用的术语“HUVEC”是人脐静脉内皮细胞。

[0124] 在此使用的“氨基酸”用其全名、相应的三字母密码或相应的单

[0125] 字母密码表示,如下表所示:

[0126]	全名	三字母密码	单字母密码
[0127]	天门冬氨酸	Asp	D
[0128]	谷氨酸	Glu	E
[0129]	赖氨酸	Lys	K
[0130]	精氨酸	Arg	R
[0131]	组氨酸	His	H
[0132]	酪氨酸	Tyr	Y
[0133]	半胱氨酸	Cys	C
[0134]	门冬酰胺氨	Asn	N
[0135]	谷氨酰胺	Gln	Q
[0136]	丝氨酸	Ser	S
[0137]	苏氨酸	Thr	T
[0138]	甘氨酸	Gly	G
[0139]	丙氨酸	Ala	A
[0140]	缬氨酸	Val	V
[0141]	亮氨酸	Leu	L
[0142]	异亮氨酸	Ile	I
[0143]	蛋氨酸	Met	M
[0144]	脯氨酸	Pro	P
[0145]	苯丙氨酸	Phe	F
[0146]	色氨酸	Trp	W

[0147] 在此使用的二十个常规氨基酸及其缩写遵循常规用法。见Immunology-A Synthesis(2nd Edition,E.S.Golub and D.R.Gren,Eds.,Sinauer Associates, Sunderland,Mass.(1991)),以引用的方式将其并入本文中。

[0148] “保守氨基酸置换”指一个氨基酸残基被另一个带有具有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的R基侧链的氨基酸残基置换。通常,一个保守氨基酸置换不会在本质上改变一个蛋白的功能特性。两个或更多氨基酸序列由于保守置换彼此相同时,需要上调序列同一性百分数或相似程度来校正置换的保守性质。校正方法是所属领域技术人员已熟知的。例如见Pearson,Methods Mol.Biol.243:307-31(1994)

[0149] 带有化学性质相似的R基侧链氨基酸组例如包括1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺的侧链:门冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天门冬氨酸和谷氨酸;以及7)含硫侧链:半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸置换基团是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸,苯丙氨酸-酪氨酸,赖氨酸-精氨酸,丙氨酸-缬氨酸,谷氨酰胺-门冬酰胺,以及天门冬氨酸-谷氨酸。

[0150] 或者,保守置换是指任何变化,所述变化在Gonnet et al.,Science 256:1443-45 (1992)给出的PAM250 log-likelihood matrix中具有正值,将上述文献以引用的方式并入

本文中。“适度保守”置换是指在PAM250 log-likelihood matrix中具有非负值的任何变化。

[0151] 在特定的具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其抗原结合部分的氨基酸置换可以(1)降低蛋白水解的敏感性,(2)降低氧化作用的易感性,(3)改变形成蛋白复合物的结合亲和力,以及(4)添加或改变该类似物的其它生物化学特点或功能特性,但仍保留与ALK-1特异结合的能力。类似物可包括天然存在多肽序列的各种置换。例如,单个或多个氨基酸置换,优选保守氨基酸置换,可发生在天然存在的序列中,例如在形成分子间接触的结构域之外的多肽部分中。氨基酸置换也可以出现在形成分子间接触的结构域中,改善多肽活性。保守氨基酸置换不应该在本质上改变原序列的结构特征,例如,置换的氨基酸不应改变原序列中存在的形成免疫球蛋白结合结构域的反向平行 β 片层,或者破坏原序列特征性的其它二级结构类型。通常,甘氨酸和脯氨酸不应出现在反向平行 β 片层中。本领域认识到的多肽二级结构和三级结构的例子描述在Structures and Molecular Principles(Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York(1984))、Introduction to Protein Structure(C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y.(1991))和Thornton et al., *Nature* 354:105(1991)中,将其以引用的方式并入本文中。

[0152] 多肽的序列相似性,也指序列同一性,通常用序列分析软件进行测得。通过指定各种置换、缺失和其它修饰包括保守氨基酸置换为相似性,蛋白分析软件匹配相似序列。例如,GCG有“Gap”和“Bestfit”程序,其可采用缺省参数测定两个紧密相关多肽之间的序列同源性或序列同一性,例如来自不同生物种类的同源多肽或者野生型蛋白与其突变蛋白之间。例如见GCG 6.1版本。多肽序列也可以用FASTA通过缺省参数或优选参数进行比较,这是GCG 6.1版本中的一个程序。FASTA(例如FASTA2和FASTA3)提供搜索序列和查询序列之间最佳重叠区域的序列比对和序列同一性百分数(Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98(1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219(2000))。将本发明的某一序列与含有来自不同生物的大量序列的数据库进行比较时,另一个优选是算法采用缺省参数的计算机程序BLAST,尤其是blastp或tblastn。例如见Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410(1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402(1997),以引用的方式并入本文中。

[0153] 用于同源性比较的多肽序列长度一般至少16个氨基酸残基左右,通常至少20个残基左右,更普遍的至少24个残基左右,典型的至少28个残基左右,以及优选35个以上残基。在含有来自不同生物的大量序列的数据库中搜索时,优选氨基酸序列比较。在此使用的术语“类似物”是至少25个氨基酸片段组成的多肽,与天然存在的推测的氨基酸序列片段基本相同,并且至少具有天然存在多肽的特点之一。通常,多肽类似物含有针对天然存在序列的一个保守氨基酸置换(或添加或缺失)。典型的类似物至少20个氨基酸长度,优选50个氨基酸长度或更长,并且经常与天然存在的全长多肽同一长度。

[0154] 多肽类似物通常作为非肽药物在制药工业中使用,具有与模版多肽类似的性质。这些类非肽化合物被称为“肽模拟物”或“拟肽”。Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29(1986); Veber and Freidinger *TINS* 392(1985)以及Evans et al. *J. Med. Chem.* 30:1229(1987),以引用的方式并入本文中。这些化合物通常在计算机分子模拟的帮助下得以产生。

[0155] 与用于治疗的多肽相似具有相似结构的肽模拟物可产生相当的治疗或预防效果。

通常,拟肽在结构上与一个多肽例子相似(即具有生化性质或药理学活性的多肽)例如人抗体,但具有一个或多个肽键,该肽键通过技术上已知的方法被选自由 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $\text{CH}_2\text{SO}-$ 组成的群组的键取代。用相同类型的D-氨基酸系统取代共有序列的一个或多个氨基酸(例如D-赖氨酸取代L-赖氨酸),可产生更稳定的多肽。此外,其中含有下述共有序列或下述基本相同的共有序列变体限制性多肽,可用本领域已知的方法获得(Rizo and Gierasch *Ann.Rev.Biochem.*61:387(1992),以引用的方式并入本文中);例如,添加内在的半胱氨酸残基,形成分子内二硫键,使多肽环化。

[0156] 一个完整的“抗体”或“免疫球蛋白”(Ig)包括通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链(50-70kDa左右)和两条轻(L)链(大约25kDa),。只存在两种轻链类型: λ 和 κ 。在人类中,两者相似,但每个抗体只存在一种类型。重链类型分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并分别规定同种型抗体为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。通常见Fundamental Immunology Ch.7(Paul,W.,ed.,2nd ed.Raven Press,N.Y.(1989))(整体以引用的方式并入本文中,用于各种目的)。在一个优选的具体实施方式中,抗体是IgG和IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型。在一个尤为优选的具体实施方式中,抗ALK-1抗体是IgG2亚类。

[0157] 每条重链包括一个重链可变区(V_H)和一个重链恒定区(C_H)。重链恒定区包括三个结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包括一个轻链可变区(V_L)和一个轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域 C_L 。在重链和轻链中,可变区和恒定区通过含12个氨基酸或更多氨基酸的“J”区连接,在重链中也包括一个含3个氨基酸或更多氨基酸的“D”区。 V_H 和 V_L 区可进一步细分为高变异区,被称为“互补决定区”(CDR),其被更保守的称为“框架区”(FR)的区域隔开。每个 V_H 和 V_L 包括3个CDRs和4个FRs,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。每个结构域的氨基酸排列遵循Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,MD(1987and 1991))或者Chothia&Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Chothia et al.,Nature342:878-883(1989)的定义。

[0158] 每对重/轻链可变区(V_H 和 V_L)形成与抗原相互作用的抗体结合位点。因此,一个完整的IgG抗体,例如,存在两个结合位点。除了双功能或双特异性抗体,两个结合位点相同。抗体的恒定区可能介导免疫球蛋白结合于宿主组织或因子,包括免疫系统的多种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0159] 抗体必须具有足够的抗原结合多样性来识别每个可能的病原体(许多V区),同时维持它们C区的生物学有效性(少数C区)。Ig基因由基因节段随机拼接在一起,其允许使用多个V区和少数C区。编码Ig H、 κ 和 λ 链的基因节段出现在三个不同染色体中。在B细胞的发育过程中,重组酶去除DNA的内含子和某些外显子,并将节段拼接获得功能性Ig基因。

[0160] 哺乳动物的Ig基因节段成组排列:“可变”(V)、“多样”(D)、“连接”(J)和“恒定”(C)。每个 V_K (V_K)节段编码 κ 链V区的前2个CDR和3个FR,外加几个CDR3的残基。每个 J_K (J_K)节段编码CDR3剩余部分和第4个FR。 C_K (C_K)编码 κ 轻链的完整C区。编码人 κ 链的DNA包括大约40个功能性 V_K (V_K)节段,5个 J_K (J_K)节段,和1个 C_K (C_K)基因节段,某些基因节段还含有终止密码子(假基因)。人 λ (λ)链DNA含有大约30个功能性 V_λ (V_λ)节段以及4个 J_λ (J_λ)和 C_λ (C_λ)节段的组合。一个特定的 J_λ (J_λ)始终与它相应的 C_λ (C_λ)配对,而不像 J_K (J_K)均与同一 C_K (C_K)配

对。人H链的DNA和含有大约50个功能性V_H节段,30个D_H节段和6个J_H节段。重链可变区的前2个CDR和3个FR由V_H编码。CDR3由V_H的几个核苷酸、整个D_H和部分J_H编码,而FR4由J_H基因节段的剩余部分编码。对于每个同种型的各个重链结构域和细胞膜区域,DNA中也存在单基因节段,按其在B细胞中表达的顺序进行排列。

[0161] 术语“多肽”包括天然或人工蛋白,蛋白片段以及某一蛋白序列的多肽类似物。多肽可以是单体或多聚体。

[0162] 术语“分离的蛋白”、“分离的多肽”或“分离的抗体”是一个蛋白、多肽或抗体,其来源或衍生物来源(1)不带有其天然状态伴随的天然相关组分,(2)不带有同一物种的其它蛋白,(3)由不同物种的细胞表达,或者(4)不是天然存在的。因此,一个化学合成多肽或一个在非天然来源细胞形式的细胞系统中合成的多肽,与其天然相关组分“分离”。一个蛋白也可采用所属领域已知的蛋白纯化技术通过分离从本质上去除天然相关成分。

[0163] 分离的抗体例如包括但不限于,用ALK-1亲和纯化后的抗ALK-1抗体、由细胞系体外合成的抗ALK-1抗体。

[0164] 当至少60%到75%左右的样品表现出单一类型多肽时,蛋白或多肽是“纯净”、“基本同源”或“基本纯化”的。多肽或蛋白可以是单体或聚合体。一个基本纯净的典型多肽或蛋白包括50%、60%、70%、80%或90%w/w左右的纯净蛋白样品,95%左右更普遍,优选99%以上。蛋白纯度或均一性可通过技术上已知的许多方法指示,例如蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳,用本领域已知的染料对凝胶染色,观察单个多肽条带。为了特定用途,利用HPLC或纯化领域中已知的其它方法可获得更高的分辨率。

[0165] 在此使用的术语“多肽片段”是一个多肽,其具有氨基端和/或羧基端缺失,但其剩余的氨基酸序列与天然存在序列的相应位置相同。在某些具体实施方式中,片段至少5、6、8或10个氨基酸长度。在其它具体实施方式中,片段至少14、至少20、至少50或至少70、80、90、100、150或200个氨基酸长度。

[0166] 在此使用的术语“类似物”或“多肽类似物”是一个多肽,其包括这样的片段,即该片段与对照氨基酸序列基本相同并且与对照氨基酸序列的功能或活性基本相同。典型地,多肽类似物与对照序列相比包括保守氨基酸置换(或插入或缺失)。类似物至少20或25个氨基酸长度,或至少50、60、70、80、90、100、150或200个氨基酸长度或更长,并且经常与全长多肽一样长。本发明的某些具体实施方式包括多肽片段或多肽类似物抗体,与种系氨基酸序列相比存在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个置换。抗体或免疫球蛋白分子的类似物或片段可以由所属领域技术人员根据该说明书内容轻易制备得到。

[0167] 在此使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”)是一个或多个抗体片段,其保留了与抗原特异结合的能力(例如ALK-1或ALK-1ECD)。已经表明,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段完成。术语抗体的“抗原结合部分”包含的结合片段例如包括(i)Fab片段,由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')₂片段,包括两个Fab片段的二价片段,通过铰链区的二硫键连接。(iii)Fd片段,由V_H和C_{H1}结构域组成;(iv)Fv片段,由抗体单臂的V_L和V_H结构域组成;(v)dAb片段(Ward et al.,(1989)Nature341:544-546),由一个V_H结构域组成;以及(vi)一个分离的互补决定区(CDR)。此外,虽然Fv片段的两个结构域V_L和V_H由不同基因编码,但是,它们可以用重组方法进行连接,通过一个合成接头使其成为一条蛋白链,其中V_L和V_H区配对形成单价分子(已知有单链Fv(scFv));例如见Bird et

al.Science 242:423-426(1988)和Huston et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988))。该单链抗体也包含在抗体的“抗原结合部分”术语中。也包括单链抗体的其它形式,例如双体。双体是二价、双特异性抗体,其中, V_H 和 V_L 结构域在一条多肽链上表达,通过一个长度不足以使同一链的两个结构域配对的接头进行连接,从而使结构域与另一条链的互补结构域配对,并形成2个抗原结合位点(见Holliger et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993);Poljak et al.Structure2:1121-1123(1994))。

[0168] 另一方面,抗体或其抗原结合部分是更大的免疫球蛋白分子的一部分,所述抗体或抗体片段通过共价键或非共价键连接一个或多个其它蛋白或多肽而形成。该免疫粘分子例如包括利用抗生物素蛋白链菌素核区获得scFv四聚体分子((Kipriyanov et al.HumanAntibodies and Hybridomas 6:93-101(1995))以及利用半胱氨酸残基、标记肽和C端多组氨酸标签获得二价scFv分子和生物素化scFv分子(Kipriyanov et al.Mol.Immunol.31:1047-1058(1994))。其它例子包括抗体的一个或多个CDRs以共价或非共价形式整合到分子中,使其成为一个免疫粘合素,该粘合素特异结合于目的抗原例如ALK-1或ALK-1ECD。在这些具体实施方式中,CDR(s)可被整合为更大多肽链的一部分,可共价连接于另一多肽链,或非共价整合。

[0169] 抗体部分,例如Fab和 $F(ab')_2$ 片段,可分别利用常规技术从完整抗体中制备得到,如番木瓜蛋白酶或胃蛋白酶水解完整抗体。此外,如本文所述抗体、抗体片段和免疫粘分子可以利用标准重组DNA技术获得。

[0170] 在此使用的术语“人抗体”表示其可变区和恒定区序列是人序列的任一抗体。该术语包括序列衍生自人基因的抗体,但其已经发生变化,以降低例如可能的免疫原性,增加亲和力,去除可能引起不良折叠的半胱氨酸等等。该术语也包括非人类细胞重组产生的抗体,可能含有人细胞不存在的糖基化。这些抗体可通过多种方法制备,如下所述。

[0171] 在此使用的术语“中和抗体”、“抑制性抗体”或拮抗抗体表示能够抑制ALK-1/TGF- β -1/Smad1信号通路的抗体。在一个优选的具体实施方式中,抗体抑制ALK-1/TGF- β -1/Smad1信号通路至少20%左右,优选40%,更优选60%,尤其优选80%或85%。抗ALK-1人抗体的中和能力或抑制能力可被测定,例如通过它们抑制ALK-1某一特定下游靶基因Id1上调的能力,如在实施例12中所示;抑制Smad1磷酸化的能力是通过Western印迹,并利用来自LI-COR Biosciences的OdysseyInfrared成像系统来测定的,如在实施例13中所示。

[0172] 在此使用的术语“嵌合抗体”表示一个抗体,其含有两个或更多不同抗体的结构域。例如,嵌合抗体的一个或多个CDRs来自一个抗ALK-1人抗体。再例如,所有CDRs都来自抗ALK-1人抗体。再例如,来自一个以上抗ALK-1人抗体的CDRs可组合在一个嵌合抗体中。例如,嵌合抗体可包括来自第一个抗ALK-1人抗体轻链的CDR1,来自第二个抗ALK-1人抗体轻链的CDR2,以及来自第三个抗ALK-1人抗体轻链的CDR3,以及来自来自一个或多个其它抗ALK-1抗体重链的CDRs。此外,框架区可来自一个抗ALK-1抗体,该抗体被去除了其中的一个或多个CDRs,或者来自一个或多个不同的人抗体。此外,如上所述,嵌合抗体包括一个抗体,其包含来自一个物种以上的种系序列的部分。

[0173] 在某些具体实施方式中,本发明嵌合抗体是一个人源化抗ALK-1抗体。本发明人源化抗ALK-1抗体含有来自本发明一个或多个抗ALK-1人抗体至少一个恒定区部分的一个或多个框架区的氨基酸序列,和/或氨基酸序列,并进一步包括来自一个抗ALK-1非人抗体的

序列,例如CDR序列。

[0174] 在此使用的术语“ELISA”指酶联免疫吸附试验。该分析方法是所属领域技术人员已知的。该分析例子可在Vaughan,T.J.et al.,Nature Biotech.14:309-314(1996)中以及在本申请的例2中找到。

[0175] 在此使用的术语“表面等离子共振技术”是一种光学现象,其允许通过检测生物传感器基质中蛋白浓度的变化,例如利用BIAcore™系统(Pharmacia Biosensor AB,Uppsala, Sweden and Piscataway,N.J.)用于实时分析生物特异性反应。更多描述见Jonsson et al.,Ann.Biol.Clin.51:19-26(1993);Jonsson et al.,Biotechniques11:620-627(1991);Jonsson et al.,J.Mol.Recognit.8:125-131(1995)和Johnsson et al.,Anal.Biochem.198:268-277(1991)。

[0176] 术语“亲和力”是抗原和抗体之间的吸引力大小。抗体对抗原的内在吸引力通常表示为特定抗体-抗原相互作用的结合平衡常数(K_D)。当 $K_D \leq 1\text{mM}$,尤其 $\leq 100\text{nM}$ 时,表示与抗原特异结合。 K_D 结合平衡常数可例如利用例7和例8描述的BIAcore™系统通过表面离子共振技术测得。

[0177] 术语“ k_{off} ”是特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。 k_{off} 解离速率常数可例如利用例7和例8表示的BIAcore系统通过表面离子共振技术测得。

[0178] 术语“亲和力”是抗体与其抗原的功能性结合强度,由抗体效价和亲和力同时决定。在此使用的该术语描述了免疫球蛋白多个抗原结合位点导致的亲和力增加。

[0179] 在此使用的术语“分子选择性”是抗体对某个特定抗原的结合亲和力高于其它抗原。例如,本发明抗体选择ALK-1而不是ALK-2到ALK-7,表示该抗体对ALK-1的结合亲和力比ALK-2到ALK-7至少高2倍,例如高4倍或10倍或50倍或100倍或更高。结合亲和力可利用所属领域技术人员已知的标准技术测得。

[0180] 术语“抗原表位”包括能与免疫球蛋白或T细胞受体或其它相互作用分子特异结合的任一蛋白。抗原表位的决定因素通常由分子的化学活性表面基团包括氨基酸或糖类或糖基侧链组成,并且通常具有特异的三维结构特征以及以及特异的电荷特征。抗原表位可以是“线性”或“构象”结构。在线性抗原表位中,蛋白和相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用位点线性排列于蛋白的初级氨基酸序列上。在构象抗原表位中,相互作用位点出现在彼此隔离蛋白的氨基酸残基上。确定了抗原的一个目的抗原表位后,可以产生针对该抗原表位的抗体,例如利用本发明描述的技术。或者,在发现过程中,抗体的产生和鉴定可能提供目的抗原表位的信息。其后,根据该信息,可竞争筛选结合于同一抗原表位的抗体。其完成方法是开展交叉竞争试验,找到彼此竞争结合的抗体,例如抗体竞争结合于抗原。基于其交叉竞争的高通量“框并”抗体方法描述在国际专利申请WO 03/48731中。

[0181] 在此使用的术语“框并”是一种根据其抗原结合特征对抗体分类的方法。框的指定在一定程度上是随意的,这取决于所有受试抗体中观察到的结合模式差异程度。因此,框不一定与其它方法测得的抗原表位相关,并不能用于定义抗原表位。

[0182] 关于抗体,在此使用的术语“竞争”表示第一个抗体或其抗原结合部分与第二个抗体或其抗原结合部分竞争结合于抗原,其中,存在第二个抗体时,检测到第一个抗体与其同种抗原表位的结合降低(与不存在第二个抗体时第一个抗体的结合相比)。或者,同时检测到,存在第一个抗体时,第二个抗体与其抗原表位的结合降低,这种情形可以出现,但不是

必需的。即,第一个抗体可以抑制第二个抗体与其抗原表位结合,而第二个抗体不抑制第一个抗体与其抗原表位结合。但是,当检测到每个抗体都抑制另一个抗体与其同种抗原或配体结合时,无论程度是否相同、更高或更低,认为抗体彼此“交叉竞争”结合于它们各自的抗原表位。竞争和“交叉竞争”抗体都包括在本发明中。除了竞争或交叉竞争的发生机制(例如位阻,构象变化,结合于相同抗原表位或其片段,等等),技术人员将根据在此提供的内容,了解其包括的竞争和/或交叉竞争抗体,并可用于本文描述的方法。

[0183] 在此涉及的术语“多聚核苷酸”表示至少10个碱基长度的核苷酸的聚合形式,可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一核苷酸类型的修饰形式。该术语包括单链和双链形式。

[0184] 在此使用的术语“分离的多聚核苷酸”表示基因组、cDNA或合成来源的多聚核苷酸或其组合,由于“分离的多聚核苷酸”的来源(1)不与天然“分离的多聚核苷酸”的多聚核苷酸的一部分或全部结合,(2)与天然状态时不连接的下述多聚核苷酸连接,或者(3)不是天然存在的更大序列的一部分。

[0185] 在此使用的术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。在此使用的术语“修饰核苷酸”包括带有修饰或取代糖基的核苷酸等等。在此涉及的术语“寡核苷酸键”包括寡核苷酸键,例如磷硫酰、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、磷酰胺酸酯等等。例如见LaPlanche et al.,Nucl.Acids Res.14:9081(1986);Stec et al.,J.Am.Chem.Soc.106:6077(1984);Stein et al.,Nucl.Acids Res.16:3209(1988);Zon et al.,Anti-Cancer Drug Design 6:539(1991);Zon et al.,Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach,pp.87-108(F.Eckstein,Ed.,Oxford University Press,OxfordEngland(1991));美国专利5,151,510;Uhlmann和Peyman,ChemicalReviews 90:543(1990),其内容以引用的方式并入本文中。需要时,寡核苷酸可包括检测标签。

[0186] “可操作连接的”序列同时包括与目的基因相邻的表达调控序列,以及远距离调控目的基因或起反式控制目的基因的表达调控序列。

[0187] 在此使用的术语“表达调控序列”表示多聚核苷酸序列,是影响其连接的编码序列表达和加工所必需的。表达调控序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列,有效的RNA加工信号例如剪接和多腺苷酸化信号,稳定细胞质mRNA的序列,提高翻译效率的序列(即Kozak共有序列),增加蛋白质稳定性的序列,以及需要时,增加蛋白质分泌的序列。调控序列的性质根据不同宿主生物存在差别;在原核生物中,调控序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列;在真核生物中,调控序列通常包括启动子和转录终止序列。术语“调控序列”至少包括表达和加工必需的所有组分,也可包括有益的其它组分,例如前导序列和融合伴侣序列。

[0188] 在此使用的术语“载体”表示核酸分子,能够转运其已经连接的另一核酸。在某些具体实施方式中,载体是一个质粒,即环状双链DNA,能够连接其它DNA片段。在某些具体实施方式中,载体是一个病毒载体,其中,其它DNA片段可连接在病毒基因组中。在某些具体实施方式中,载体能够在其导入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起始区的细菌载体和游离的哺乳动物载体)。在其它具体实施方式中,载体(例如非游离的哺乳动物载体)在导入宿主细胞后能够整合到宿主细胞的基因组中,从而随宿主基因组进行复制。此外,特定

载体能够指导它们连接的基因的表达。在此,这些载体指“重组表达载体”(或简称“表达载体”)。

[0189] 在此使用的术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)表示已经导入重组表达载体的细胞。应了解“重组宿主细胞”和“宿主细胞”不仅表示特定的处理细胞也包括该细胞的子代。由于突变或环境影响,连续传代可能产生特定修饰,因此,子代实际上可能与母代细胞不同,但仍然属于在此使用的术语“宿主细胞”范畴。

[0190] 在此使用的术语“种系”指通过生殖细胞从亲代传递到子代的。种系序列不同于成熟B细胞抗体的编码核苷酸序列,其在B细胞成熟过程中由于重组和高突变事件发生变化。抗体“利用”特定种系时,其核苷酸或氨基酸序列与种系核苷酸序列或其对应的氨基酸序列具有最接近的比对。这些抗体与种系序列相比通常发生突变。

[0191] 在核苷酸序列的上下文中,术语“序列同一性百分数”表示两条序列在最佳对准时相同的残基。序列同一性比较的长度至少大于9个核苷酸左右,通常至少18个核苷酸左右,更普遍的至少24个核苷酸左右,典型的至少28个核苷酸左右,更典型的至少32个核苷酸左右,优选至少36、48个核苷酸左右或更多。技术上已知有多种不同算法可用于测定核苷酸序列同一性。例如,多聚核苷酸序列可利用FASTA、Gap或Bestfit进行比较,这是Wisconsin Package 10.0版本、Genetics Computer Group(GCG)、Madison、Wisconsin中的程序。FASTA例如包括FASTA2和FASTA3,提供搜索序列和查询序列之间最佳重叠区域的序列比对和序列同一性百分数(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);以引用的方式并入本文中)。除非另外说明,特定程序或算法采用缺省参数。例如,核苷酸序列之间的序列同一性百分数可以利用FASTA及其缺省参数(字体大小为6,以及NOPAM因素作为评分字母)或者利用GCG 6.1版本提供的Gap及其缺省参数进行测定,在此将它们以引用的方式并入本文中。

[0192] 除非另外说明,核苷酸序列的对照包括其互补序列。因此,具有特定序列的核苷酸对照应理解成包括具有其互补序列的互补链。

[0193] 术语“基本相似”或“基本序列相似”,在涉及核苷酸或其片段时,表示在具有适当的核苷酸插入或缺失(或其互补链)的最佳对准时,核苷酸序列同一性至少为85%左右,优选至少90%左右,更优选至少95%、96%、97%、98%或99%左右,其中它们由任一已知的序列同一性算法测得,例如上述的FASTA、BLAST或Gap。

[0194] 在氨基酸序列上下文中,术语“序列同一性百分数”表示两条序列在最佳对准时相同的残基。序列同一性比较的长度至少大于5个氨基酸左右,通常至少20个氨基酸左右,更普遍的至少30个氨基酸左右,典型的至少50个氨基酸左右,更典型的至少100个氨基酸左右,尤其典型的至少150、200个氨基酸左右或更多。所属领域已知有多种不同算法可用于测定氨基酸序列同一性。例如,氨基酸序列利用FASTA、Gap或Bestfit进行比较,这是Wisconsin Package 10.0版本、Genetics Computer Group(GCG)、Madison、Wisconsin中的程序。

[0195] 用于多肽时,术语“基本相同”或“基本相似”表示两个氨基酸序列通过GAP或BESTFIT程序利用程序提供的缺省空白参数最佳对准时,共享至少70%、75%或80%的序列同一性,优选至少90%或95%的序列同一性,更优选至少97%、98%或99%的序列同一性。

在特定的具体实施方式中,存在差异的残基位置是由于保守氨基酸置换。

[0196] 术语“信号序列”,也称信号肽、前导肽,指位于蛋白N端的15到30个左右的氨基酸片段,能够促进蛋白分泌(通过细胞膜)。该前导肽在蛋白分泌时被去除。

[0197] 在此使用的术语“标签”或“标记的”涉及另一分子整合到抗体中。在一个具体实施方式中,标签是可检测的标记,例如整合一个放射标记的氨基酸或者连接一个生物素化多肽,其能被标记的抗生物素蛋白检测到(例如带有荧光标记或酶活性的抗生物素蛋白链菌素,可通过光学方法或比色法检测到)。在另一个具体实施方式中,标签或标记具有治疗作用,例如药物结合物或毒素。糖蛋白和多肽的多种标记方法在技术上已知并能利用。多肽标签例如包括但不限于: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),荧光标签(例如FITC、罗丹明、镧磷光剂),酶标签(例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶),化学发光标记,生物素基团,预先设定的能被第二个受体识别的多肽抗原表位(例如亮氨酸拉链互补序列、第二个抗体的结合位点、金属结合结构域、附加表位),磁性试剂例如钆螯合物,毒素例如百日咳毒素、紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、表鬼臼毒、鬼臼噻吩甙、长春新碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽二酮、盐酸米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素及其类似物或同系物。在某些具体实施方式中,标签通过不同长度的间隔臂进行连接,以此降低潜在位阻。

[0198] 术语“灵长类”涉及一种灵长类级别的哺乳动物,包括类人猿和原猴,其特征是:四肢进化,鼻子缩短,并有一个大体积的脑部。哺乳动物级别的灵长类包括人、猿、猴、以及原猴,或低等灵长类。

[0199] “治疗有效剂量”涉及治疗试剂的给药剂量,在一定程度上减轻治疗疾病的一种或多种症状。在治疗肿瘤时,治疗有效剂量涉及其剂量至少有以下一种效应:缩小肿瘤体积,抑制(即在一定程度上减缓,更好停止)肿瘤转移,在一定程度上抑制(即在一定程度上减缓,停止更好)肿瘤生长,在一定程度上减轻(或者,更好消除)肿瘤相关的一种或多种症状。

[0200] “处理”,“治疗”和“整治”涉及一种方法,减轻或消除生物学紊乱和/或其相关症状。对于肿瘤,这些术语只表示癌症患者的预期寿命延长,或者疾病的一种或多种症状减轻。

[0201] “接触”涉及本发明的抗体或其抗原结合部分与靶ALK-1或其抗原表位以抗体能够影响ALK-1生物学活性的方式集合在一起。该“接触”能够“在体外”完成,即在试管、培养皿中等等。在试管中,接触可以只包括一个抗体或其抗原结合部分和ALK-1或其抗原表位,或者可以包括全细胞。细胞也可以停留或生长在细胞培养皿中,并在该环境中接触抗体或其抗原结合部分。在上下文中,特定抗体或其抗原结合部分影响ALK-1相关疾病的能力,即抗体的 IC_{50} ,其可以在体内使用抗体前测定,以用于更复杂的活体。对于体外细胞,存在多种所属领域技术人员熟知的方法,用于ALK-1和抗体或其抗原结合部分的接触。

[0202] 缩写“FACS”指荧光激活细胞分选术。缩写FACS和流式细胞术可交换使用。荧光标记后可研究细胞的结构和功能。免疫荧光是使用最广泛的方法,包括用连接了荧光染料如萤光素和藻红蛋白的抗体对细胞进行染色。该方法通常用于标记细胞表面的分子,但是抗体可以靶向细胞质。在直接免疫荧光法中,针对某分子的抗体直接连接荧光染料,细胞染色一步完成。在间接免疫荧光法中,第一个抗体不标记,加入第二个与第一个抗体特异结合

的荧光偶联抗体。

[0203] 抗ALK-1抗体

[0204] 本发明关于分离的中和性抗ALK-1单克隆抗体或其抗原结合部分,与灵长类ALK-1结合,优选灵长类ALK-1ECD,更优选人ALK-1ECD。在一个优选的具体实施方式中,本发明关于分离的中和抗体,其为完整的人单克隆抗体或其抗原结合部分。优选地,人抗体是重组的抗ALK-1人抗体,其对ALK-1的亲合力比ALK-2到ALK-7强。在某些具体实施方式中,抗ALK-1人抗体通过免疫非人类转基因动物获得,例如啮齿类,其基因组含有人免疫球蛋白的基因,因此转基因动物产生人抗体。本发明的多个方面涉及这些抗体和抗原结合部分,及其药物组合物,以及用于获取这些抗体和抗原结合部分的核苷酸,重组表达载体和宿主细胞。利用本发明抗体和抗原结合部分,抑制ALK-1/TGF- β -1/Smad1信号通路或检测ALK-1(无论是在体内或体外)的方法也包括在本发明中。

[0205] 本发明抗ALK-1抗体可含有一条人 κ 轻链或人 λ 轻链或其来源的氨基酸序列。在某些含有人 κ 轻链的具体实施方式中,轻链可变区(V_L)利用人A27、A2、A1、A3、B3、B2、L1或L2V _{κ} 基因。在某些具体实施方式中,轻链利用人V _{κ} L1基因和人J _{κ} 4基因;人V _{κ} A27基因和人J _{κ} 5基因或人J _{κ} 4基因;人V _{κ} B3基因和人J _{κ} 1基因;人V _{κ} L2基因和人J _{κ} 3基因;人V _{κ} A2基因和人J _{κ} 1基因;人V _{κ} A3基因和人J _{κ} 4基因;人V _{κ} A1基因和人J _{κ} 1基因;人V _{κ} B2基因和人J _{κ} 4基因;或者人V _{κ} A2基因和人J _{κ} 1基因。

[0206] 在某些具体实施方式中,抗ALK-1抗体的V_L含有一个或多个氨基酸置换、缺失或插入(添加)(与种系V _{κ} 氨基酸序列相比)。在某些具体实施方式中,抗ALK-1抗体的V_L包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个置换(与种系V _{κ} 氨基酸序列相比)。在某些具体实施方式中,种系的一个或多个置换出现在轻链CDR区。在某些具体实施方式中,相对于种系的V _{κ} 氨基酸置换出现在一个或多个相同位置(与相对于种系的出现在此处提供的抗体的一个或多个V_L中的置换相同,例如见图7所示)。在某些具体实施方式中,氨基酸变化出现在一个或多个相同位置,但包括一个不同于对照抗体的置换。

[0207] 在某些具体实施方式中,相对于种系的氨基酸置换出现在一个或多个相同位置(抗体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和5.59.1的任一V_L中种系的置换相同),但是,这些置换可以代表这些位点的保守氨基酸置换(与对照抗体的氨基酸相比)。例如,如果其中一个抗体与种系相比,其某一特定位置发生变化,并谷氨酸化,那么可以取代该位置的是天门冬氨酸。相似的,在举例说明的抗体中,如果某一氨基酸置换与种系相比是丝氨酸,那么可以用苏氨酸保守置换该位置的丝氨酸。保守氨基酸置换如上所述。

[0208] 在某些具体实施方式中,抗ALK-1抗体含有SEQ ID NO:4的轻链氨基酸序列。在其它具体实施方式中,轻链含有抗体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的轻链氨基酸序列。

[0209] 在某些具体实施方式中,抗ALK-1人抗体轻链含有抗体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)的V_L氨基酸序列,或者所述氨基酸序列存在高达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸置换和/或总计达3个非保守氨基酸置换。在其它具体实施方式中,抗ALK-1抗体轻链含有抗体1.27.1、1.29.1或1.31.1的V_L氨基酸序列。在某些具体实施方式中,轻链含有上述任一抗体的从CDR1开始到CDR3结束的氨基酸序列。

[0210] 在某些具体实施方式中,轻链可含有CDR1、CDR2和CDR3区的氨基酸序列,其分别独立选自一个或多个单克隆抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR 3区,其中单克隆抗体选自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,或者CDR区各自含有小于3个或小于2个的保守氨基酸置换和/或总计3个或更少的非保守氨基酸置换。

[0211] 在特定的具体实施方式中,抗ALK-1抗体轻链含有选自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的单克隆抗体的轻链CDR1、CDR2和CDR3区氨基酸序列,或者所述CDR区各自含有小于3个或小于2个的保守氨基酸置换和/或总计3个或更少的非保守氨基酸置换。

[0212] 关于重链,在某些具体实施方式中,可变区(V_H)利用人V_H4-31、V_H3-11、V_H3-15、V_H3-33、V_H4-61或V_H4-59基因。在某些具体实施方式中,抗ALK-1抗体V_H序列含有一个或多个氨基酸置换、缺失或插入(添加)(均为相对于种系V_H氨基酸序列的“突变”)。在某些具体实施方式中,重链可变区包括种系V_H氨基酸序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个突变。在某些具体实施方式中,突变是非保守氨基酸置换,与种系氨基酸序列相比。在某些具体实施方式中,突变出现在重链的CDR区。在某些具体实施方式中,重链利用人V_H3-33基因,人D 6-19基因和人J_H 3B基因;人V_H 4-31,人D 6-19基因和人J_H 4B基因;人V_H 4-61基因,人D 6-19基因和人J_H 4B基因;人V_H 4-31基因,人D 3-3基因和人J_H 3B基因;人V_H 4-31基因和人J_H 3B基因;人V_H 4-59基因,人D 6-19基因和人J_H 4B基因;人V_H 3-11基因,人D 3-22基因和人J_H 6B基因;人V_H 3-15基因,人D 3-22基因和人J_H 4B基因;人V_H 4-31基因,人D 5-12基因和人J_H 6B基因;人V_H 4-31基因,人D 4-23基因和人J_H 4B基因;人V_H 4-31基因,人D 2-2基因和人J_H 5B基因;人V_H 4-31基因和人J_H 6B基因;人V_H 3-15基因,人D 1-1基因和人J_H 4B基因;人V_H 3-11基因,人D 6-19基因和人J_H 6B基因;人V_H 3-11基因,人D 3-10基因和人J_H 6B基因;或者人V_H 3-11基因,人D 6-6基因和人J_H 6B基因。

[0213] 在某些具体实施方式中,氨基酸置换出现在一个或多个相同位置(与抗体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的一个或多个V_H中种系的置换位置相同)。在其它具体实施方式中,氨基酸变化出现在一个或多个相同位置,但包括一个不同于对照抗体的置换。

[0214] 在某些具体实施方式中,重链含有SEQ ID NO:2的一条氨基酸序列。在其它具体实施方式中,重链含有抗体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的重链氨基酸序列。在某些具体实施方式中,重链含有抗体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)的V_H氨基酸序列,或者该V_H氨基酸序列存在高达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个保守氨基酸置换和/或总计3个非保守氨基酸置换。在其它具体实施方式中,重链含有抗体1.27.1、1.29.1或1.31.1的V_H氨基酸序列。在某些具体实施方式中,重链含有上述任一抗体从CDR1开始到CDR3结束的氨基酸序列。

[0215] 在某些具体实施方式中,重链包括抗体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的重链CDR1、CDR2和CDR3区,或者CDR区各自含有小于8个、小于6个、小于4个或小于3个的保守氨基酸置换和/或总计3个或更少的非保守氨基酸置换。

[0216] 在某些具体实施方式中,重链CDR区独立选自2个或更多抗体的CDR区,所述抗体选自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。在另一具体实施方式中,抗体包括上述轻链和上述重链。在进一步的具体实施方式中,轻链CDRs和重链CDRs来自相同抗体。

[0217] 在多个具体实施方式中,抗ALK-1抗体含有本文所提供的抗ALK-1抗体的全长的重链和全长轻链氨基酸序列,V_H和V_L氨基酸序列,重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,或者从CDR1开始到CDR3结束的重链氨基酸序列和从CDR1开始到CDR3结束的轻链氨基酸序列。

[0218] 氨基酸置换的一种类型是改变抗体的一个或多个可与另一残基起化学反应的半胱氨酸,所述另一残基例如,但不限于,丙氨酸或丝氨酸。在一个具体实施方式中,存在非标准半胱氨酸的置换。该置换可出现在可变区的CDR或框架区或者抗体的恒定区。在某些具体实施方式中,半胱氨酸是标准的。

[0219] 氨基酸置换的另一种类型是去除抗体中潜在的蛋白水解位点。该位点可出现在可

变区的CDR或框架区或者抗体的恒定区。置换半胱氨酸残基和去除蛋白水解位点可降低抗体产物的异质性风险从而提高其同质性。氨基酸置换的另一种类型是改变一个或两个残基以消除形成潜在的脱酰胺位点的门冬酰胺-甘氨酸配对。

[0220] 在某些具体实施方式中,本发明抗ALK-1抗体重链的C端赖氨酸被剪切。在本发明的多个具体实施方式中,抗ALK-1抗体重链和轻链任选的包括下述信号序列。

[0221] 一方面,本发明提供25个抑制性抗ALK-1人单克隆抗体和产生它们的杂交瘤细胞系。在特定的具体实施方式中,本发明抗体是IgGs,其被指定为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和5.59.1。在优选的具体实施方式中,抗ALK-1人抗体是抗体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。

[0222] 抗体识别抗原表面的暴露表位为线性(一级)序列或构象(二级)序列区。BIAcore用于定义功能性抗原表位范畴,并测定抗本发明例举的ALK-1抗体的抗原表位专一性。

[0223] 表1列出了编码1.12.1抗体变体全长重链和轻链以及本发明抗ALK-1抗体的含可变区部分以及相应的推测的氨基酸序列的核酸序列标识符(SEQ ID NO)。

[0224] 表1

抗体	序列标识符 (SEQ ID NO)							
	全长				含 V 结构域的片段			
	重链		轻链		重链		轻链	
	DNA	蛋白	DNA	蛋白	DNA	蛋白	DNA	蛋白
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

[0226] 1.12.1(M29I/D19A)涉及抗ALK-1抗体,其包括重链单个特定氨基酸突变(29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代),以及轻链单个特定氨基酸突变(19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代),如实施例4所述。

[0227] 1.12.1涉及mAb1.12.1变体,其分离自杂交瘤。

[0228] 1.12.1(rWT)涉及作为表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,描述在实施例3中。

[0229] 本发明进一步提供上述特定抗ALK-1人抗体的重链和/或轻链变体,其包括一个或多个氨基酸修饰。为了命名变体,第一个字母是天然存在抗体链的氨基酸单字母符号,数字表示氨基酸位置(其中第一位是FR1的N端氨基酸),而第二个字母是变体氨基酸的单字母符号。

[0230] 在进一步的具体实施方式中,本发明包括含有可变区氨基酸序列的抗体,该可变区序列与上述任一抗ALK-1人抗体的可变区氨基酸序列存在80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上的序列同一性。

[0231] 抗ALK-1抗体的类型和亚型

[0232] 抗ALK-1抗体的类型和亚型可通过本领域已知的任一方法测定。通常,抗体的类型和亚型可利用抗体类型和亚型的特异抗体进行测定。这种抗体可商业购买获得。类型和亚型可通过ELISA、Western印迹以及其它技术测定。或者,类型和亚型的测定可通过测定抗体重链和/或轻链部分或全部恒定区的序列,将它们的氨基酸序列与免疫球蛋白不同类型和亚型的已知氨基酸序列进行比较,从而确定抗体的类型和亚型。

[0233] 上述获得的抗ALK-1抗体类型可相互转换。在本发明的一方面,编码V_L或V_H的核苷酸分子利用本领域已知的方法分离,因此它不包括C_L或C_H的编码核苷酸序列。“Antibody Engineering”(Kontermann&Dubel,Eds.,Springer-Verlag,Berlin(2001))。其后,V_L或V_H的核编码核苷酸分子被分别连接到C_L或C_H的编码核苷酸序列,来自不同类型的免疫球蛋白分子。这可以利用一个载体或者含C_L或C_H链的核苷酸分子完成,如上所述。例如,最初为IgM的抗ALK-1抗体可类型转换成IgG。此外,类型转换可用于转换IgG亚型,例如从IgG1到IgG2。用于产生本发明含目的抗原表位的抗体的优选方法,包括步骤:分离抗ALK-1抗体重链的编码核苷酸分子和抗ALK-1抗体轻链的编码核苷酸分子,获得重链可变区,连接目的抗原表位的重链可变区和重链恒定区,在细胞中表达轻链和所连接的重链,以及回收带有目的抗原表位的抗ALK-1抗体。

[0234] 在某些具体实施方式中,抗ALK-1抗体是单克隆抗体。抗ALK-1抗体可以是IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子。在优选的具体实施方式中,抗ALK-1抗体是IgG以及IgG1、IgG2、IgG3、IgG4亚型。在另一个具体实施方式中,抗体是IgG2亚型。

[0235] 鉴定抗ALK-1抗体识别的ALK-1抗原表位

[0236] 本发明提供抗ALK-1人单克隆抗体,其与ALK-1结合,并竞争或交叉竞争和/或结合于相同抗原表位,如(a)选自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和5.59.1的抗体;(b)含有具有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的V_H结构域的氨基酸序列中的任一个重链可变区的抗体;(c)含有具有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的V_L结构域的氨基酸序列中的任一个轻链可变区抗体；(d)同时含有(b)定义的重链可变区和(a)定义的轻链可变区的抗体。

[0237] 利用本领域已知的方法能够测定抗体是否结合于相同抗原表位或交叉竞争结合抗ALK-1抗体。在一个具体实施方式中，允许本发明抗ALK-1抗体在高严谨度条件下与ALK-1结合，然后测定受试抗体结合ALK-1的能力。如果受试抗体能够与抗ALK-1对照抗体同时结合ALK-1，那么，受试抗体与抗ALK-1对照抗体结合不同抗原表位。但是，如果受试抗体不能同时结合ALK-1，那么，受试抗体结合相同抗原表位，重叠抗原表位或者抗原表位紧挨于本发明抗ALK-1抗体结合的抗原表位。该实验可利用ELISA、RIA、BIAcore™或流式细胞术完成。为了测定抗ALK-1抗体是否交叉竞争另一抗ALK-1抗体，可以利用上述竞争方法双向测定，即已知抗体是否阻断受试抗体，反之亦然。在优选的具体实施方式中，本发明用BIAcore™完成。

[0238] 抗ALK-1抗体与ALK-1的结合亲和力

[0239] 抗ALK-1抗体或其抗原结合片段与ALK-1的结合亲和力(K_D)和解离速率(k_{off})可通过本领域已知的方法测定。结合亲和力可用ELISA、RIA、流式细胞术或表面等离子共振技术测定，例如BIAcore™。解离速率用表面等离子共振技术测定。优选，结合亲和力和解离速率用表面等离子共振技术测定。更优选，结合亲和力和解离速率用BIAcore™测定。利用本领域已知的方法，可以测定抗体是否与抗ALK-1抗体存在大体相同的K_D。K_D和k_{off}的这些测定方法可用于初期筛选阶段以及后期优化阶段。

[0240] 抗ALK-1抗体抑制ALK-1活性

[0241] 抑制ALK-1结合的抗ALK-1单克隆抗体，可利用多种方法得以鉴定。例如，中和性抗ALK-1抗体通过抑制ALK-1某一特定下游靶基因Id1上调得以鉴定，描述在例12中。优选抗ALK-1抗体的IC₅₀不大于500nM、300nM、200nM、150nM、100nM、50nM、20nM、10nM或1nM。

[0242] 也可以通过Western印迹利用Odyssey Infrared成像系统测定测定抗ALK-1抗体抑制Smad1磷酸化的能力，如实施例13所述。在多个具体实施方式中，抗ALK-1抗体在该分析中的IC₅₀不大于250nM、200nM、150nM、100nM、50nM、20nM、10nM或1nM。

[0243] 抗ALK-1抗体抑制血管生成

[0244] 在另一个具体实施方式中，抗ALK-1抗体或其片段在移植了人包皮组织的SCID小鼠中抑制人血管生成，其中，将人黑色素瘤M24met肿瘤细胞通过皮内注射植入，通过IHC分析人CD-31信号，与对照样品相比，至少40%被抑制，如实施例17所述和表13所示。

[0245] 在另一个具体实施方式中，抗ALK-1抗体或其片段在移植了人包皮组织的SCID小鼠中抑制人血管生成，其中，通过胶原通过皮内注射植入，通过IHC分析人CD-31信号，与对照样品相比，至少50%被抑制，如实施例16中所述和表12所示。

[0246] 物种和分子选择性

[0247] 在本发明的另一方面，抗ALK-1抗体同时具有种族和分子选择性。根据本说明书的内容，能够测定抗ALK-1抗体的种族或分子选择性，利用本领域已知的方法。例如，用Western印迹，表面等离子共振技术例如BIAcore，ELISA，免疫共沉淀或RIA测定。

[0248] 在某些具体实施方式中，通过流式细胞术测定时，抗ALK-1抗体结合灵长类ALK-1的K_D比啮齿类ALK-1的K_D至少小2倍。在进一步的具体实施方式中，灵长类ALK-1的K_D比啮齿类ALK-1的K_D至少小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。

[0249] 在其它具体实施方式中,抗ALK-1抗体对ALK-1的选择性超过对ALK-2到ALK-7的。在某些具体实施方式中,除ALK-1外,抗ALK-1抗体不存在任何其它蛋白的任何可见特异性结合。优选,抗ALK-1抗体结合于人ALK-1的ECD。

[0250] 抗体和抗体产生细胞系的产生方法

[0251] ALK-1免疫原

[0252] 在某些具体实施方式中,ALK-1免疫原或抗原是分离的和/或纯化的ALK-1。在某些具体实施方式中,ALK-1免疫原是人ALK-1。在优选的具体实施方式中,ALK-1免疫原是人ALK-1ECD。人ALK-1或其抗原结合片段可根据所属领域技术人员已知的方法得以制备,或购买自供应商。人ALK-1氨基酸序列和核苷酸序列已知(例如见基因库编号L17075)。编码全长ALK-1的ACVRL1基因可以从Invitrogen公司购买得到,克隆ID为IOH21048。例如,R&D Systems公司销售重组人ALK-1/Fc嵌合体(目录号370-AL),制备自ALK-1ECD氨基酸残基1-118的DNA编码序列的表达,该DNA通过下述多肽接头的编码DNA序列连接于人IgG Fc区的DNA编码序列,在小鼠骨髓瘤细胞系中表达。重组的成熟人ALK-1/Fc嵌合体是二硫键连接的同种异形蛋白,氨基端含有Asp22。此外,实施例1中描述了ALK-1 ECD His-Tag蛋白的制备,其用于产生本发明的抗ALK-1抗体产生杂交瘤的形成。

[0253] 在其它具体实施方式中,ALK-1抗原是表达或过表达ALK-1的细胞。在其它具体实施方式中,ALK-1抗原是重组蛋白,表达自酵母、昆虫细胞、细菌例如E.coli,或者其它重组技术来源。

[0254] 免疫

[0255] 在某些具体实施方式中,人抗体通过ALK-1抗原免疫非人类转基因动物得以产生,其基因组中包括部分或全部人免疫球蛋白重链和轻链基因座。在一个优选的具体实施方式中,非人类动物是XENOMOUSE®动物(Abgenix, Inc., Fremont, CA)。

[0256] XENOMOUSE®小鼠是基因工程小鼠品系,含有人免疫球蛋白重链和轻链基因座的大量片段,并且在小鼠抗体产生中是免疫缺陷的。例如见Green et al., Nature Genetics 7:13-21(1994)和美国专利5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598、6,130,364、6,162,963和6,150,584,以及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和WO 00/037504。

[0257] 另一方面,本发明提供一种方法,从非人类、非小鼠动物中制备抗ALK-1抗体,通过ALK-1抗原免疫含有人免疫球蛋白基因座的非人类转基因动物。利用上文引用材料描述的方法,可以获得这些抗体。这些材料所示的方法可以改良,描述在美国专利5,994,619中,以引用的方式并入本文中。美国专利5,994,619描述了来自猪和牛的培养内细胞团(CICM)细胞和细胞系的产生方法,转基因CI CM细胞已经插入异源DNA。CICM转基因细胞可用于产生克隆化转基因胚胎、胎和子代。'619专利也描述了转基因动物的产生方法,能够把异源DNA传递给子代。在本发明优选的具体实施方式中,非人类动物是哺乳动物,例如兔、羊、猪、山羊、牛、马或鸡。

[0258] XENOMOUSE®小鼠产生完整人抗体在成人中的所有组成成分,并产生抗原特异的人抗体。在某些具体实施方式中,XENOMOUSE®小鼠含有人抗体V基因所有组成成分的80%

左右,通过导入酵母人工染色体(YAC)人重链基因座和 κ 轻链基因座的含大量碱基的种系结构片段。在其它具体实施方式中,XENOMOUSE®小鼠进一步包括几乎全部人 λ 轻链基因座。见Mendez et al.,Nature Genetics 15:146-156(1997),Green and Jakobovits, J.Exp.Med.188:483-495(1998)和W098/24893,其内容以引用的方式并入本文中。

[0259] 在某些具体实施方式中,含有人免疫球蛋白基因的非人类动物是带有人免疫球蛋白“微基因座”的动物。在微基因座方法中,通过纳入Ig基因座的单基因,模拟外源Ig基因座。因此,一个或多个V_H基因,一个或多个D_H基因,一个或多个J_H基因,一个 μ 恒定区和第二个恒定区(首选 γ 恒定区)形成一个构建产物,用于导入动物。方法描述在,尤其是,美国专利5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016、5,770,429、5,789,650、5,814,318、5,591,669、5,612,205、5,721,367、5,789,215和5,643,763,以引用的方式并入本文中。

[0260] 另一方面,本发明提供用于制备人源化抗ALK-1抗体的方法。在某些具体实施方式中,用ALK-1抗原免疫非人类动物,如下所述,在允许抗体产生的条件下。抗体产生细胞分离自动物,而抗ALK-1目的抗体重链和轻链的编码核苷酸从分离的抗体产生细胞中分离得到,或者来自于这些细胞产生的永生化细胞系。这些核苷酸随后用所属领域技术人员已知的技术进行改造,在下面进一步描述,以此降低非人类序列数目,即使抗体人源化以减少人体免疫反应。

[0261] 可以利用本领域已知的任一方法免疫动物。例如见Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990。非人类动物例如小鼠、大鼠、羊、山羊、猪、牛和马的免疫方法在本领域已知。例如见上述Harlow and Lane和美国专利5,994,619。在优选的具体实施方式中,ALK-1抗原与佐剂一起用于刺激免疫反应。典型的佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂, RIBI(胞壁酰二肽)或ISCOM(免疫刺激复合物)。这些佐剂可以保护多肽免于快速分散,将其隔离在局部沉淀中,或者它们含有某些物质,刺激宿主分泌巨噬细胞趋化因子以及免疫系统的其它组分。优选,在给予多肽时,免疫程序包括多肽给予两次或两次以上,跨越数周时间。例2举例说明XENOMOUSE®小鼠产生抗ALK-1单克隆抗体的方法。

[0262] 产生抗体和抗体产生细胞系

[0263] 用ALK-1抗原免疫动物后,抗体和/或抗体产生细胞可从动物中获得。在某些具体实施方式中,含抗ALK-1抗体的血清来自动物,通过取血或处死动物。可以利用来自动物的血清,免疫球蛋白成分可从血清中获得,或者抗ALK-1抗体可从血清中纯化得到。

[0264] 在某些具体实施方式中,抗体产生细胞系制备自从免疫动物分离的细胞。在免疫后,处死动物,淋巴结和/或脾B细胞通过本领域已知的任一方法永生化。细胞的永生化方法包括,但不限于,用致癌基因转染细胞,用致癌剂或突变剂处理细胞,将细胞与永生化细胞融合例如骨髓瘤细胞,以及使抑癌基因失活。例如见上述Harlow and Lane。采用骨髓瘤细胞融合时,优选骨髓瘤细胞不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌细胞系)。永生化细胞用ALK-1或其片段筛选。在优选的具体实施方式中,用酶联免疫测定法(ELISA)或放射免疫测定法进行初期筛选。ELISA筛选例子由W0 00/37504提供,以引用的方式并入本文中。

[0265] 抗ALK-1抗体产生细胞例如杂交瘤,经过筛选,克隆并进一步筛选,获得目的特征,包括生长快,抗体产生多以及目的抗体特征,在下面进一步描述。杂交瘤可以在同系动物和

免疫系统缺陷动物例如裸鼠中体内扩增,或者在培养细胞中体外扩增。杂交瘤的筛选、克隆和扩增方法是所属领域技术人员已知的。

[0266] 在优选的具体实施方式中,免疫动物是表达人免疫球蛋白基因的非人类动物,脾B细胞与来自同一非人类动物物种的骨髓瘤细胞系融合。在尤为优选的具体实施方式中,免疫动物是XENOMOUSE®小鼠,骨髓瘤细胞系是P3-X63-Ag8.653(美国典型培养物保藏中心),如实施例2所述。

[0267] 因此,在一个具体实施方式中,本发明提供方法用于产生细胞系,其产生针对ALK-1的人单克隆抗体或其片段,包括(a)用ALK-1、ALK-1片段或者表达ALK-1的细胞或组织免疫非人类转基因动物;(b)使转基因动物对ALK-1产生免疫反应;(c)从转基因动物中分离抗体产生细胞;(d)使抗体产生细胞永生化;(e)获得永生化抗体产生细胞的不同单克隆群体;以及(f)筛选永生化抗体产生细胞,鉴定针对ALK-1的抗体。

[0268] 在另一方面,本发明提供产生抗ALK-1的人抗体的细胞系。在某些具体实施方式中,细胞系是杂交瘤细胞系。在某些具体实施方式中,杂交瘤是鼠杂交瘤,如上所述。在其它具体实施方式中,杂交瘤来自非人类,非小鼠物种,例如大鼠、羊、猪、山羊、牛或马。在另一个具体实施方式中,杂交瘤是人杂交瘤。

[0269] 在另一个具体实施方式中,转基因动物用ALK-1抗原进行免疫,原代细胞例如脾B细胞或外周血B细胞分离自免疫的转基因动物,并鉴定抗原特异目的抗体的产生细胞。提取来自各种不同细胞的多腺苷酸化mRNA,进行反转录聚合酶链反应(RT-PCR),利用退火后连接在可变区序列的正义引物,例如简并引物,识别人重链和轻链可变区的大部分或全部FR1区基因,以及退火后连接在恒定区或连接区序列的反义引物。接着,重链和轻链可变区的cDNAs在适当的任一宿主细胞例如骨髓瘤细胞中扩增并表达,与各自免疫球蛋白的恒定区形成嵌合抗体,例如重链和 κ 或 λ 恒定区。见Babcock, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48, 1996,以引用的方式并入本文中。接着,可根据在此描述的方法鉴定并分离抗ALK-1抗体。

[0270] 在另一个具体实施方式中,用噬菌体展示技术产生抗体库,所述噬菌体展示技术其包括具有不同ALK-1亲和力的抗体的所有组成成分。为了产生所有组成成分,来自免疫动物的B细胞不需要永生化。当然,原代B细胞可直接作为DNA来源。来自B细胞,例如来自脾脏B细胞的cDNAs混合物,可用于制备表达库,例如,噬菌体展示库转染至E. coli。测定受体细胞对ALK-1的免疫反应性。从这些表达库中鉴定高亲和力人抗体的技术描述于Griffiths et al., EMBO J., 13:3245-3260(1994)、Nissim et al., ibid, pp.692-698以及Griffiths et al., ibid, 12:725-734,以引用的方式并入本文中。最后,鉴定来自表达库的克隆,其产生预期大小的抗原结合亲和力,将负责结合的产物的编码DNA回收并处理,用于标准重组表达。也可以利用先前处理过的核苷酸序列构建噬菌体展示库,用相似的方式进行筛选。通常,重链和轻链的编码cDNAs是独立提供或连接以形成Fv,用于产生噬菌体库。

[0271] 接着,筛选噬菌体库,获得具有最高ALK-1亲和力的抗体,并从适当的克隆中回收遗传物质。更多轮的筛选可增加最初分离的抗体的亲和力。

[0272] 制备抗体的核苷酸、载体、宿主细胞和重组方法

[0273] 核苷酸

[0274] 本发明也包括核苷酸分子,其编码抗ALK-1抗体或其抗原结合片段。在某些具体实

施方式中,不同核苷酸分子编码抗ALK-1免疫球蛋白的重链和轻链。在某些具体实施方式中,相同核苷酸分子编码抗ALK-1免疫球蛋白的重链和轻链。

[0275] 在某些具体实施方式中,轻链可变区(V_L)的编码核苷酸分子利用人A27、A2、A1、A3、B3、B2、L1或L2V_k基因,以及人J_k5、J_k1、J_k3或J_k4基因。在某些具体实施方式中,核苷酸分子利用人A27V_k基因和人J_k5基因。在其它具体实施方式中,核苷酸分子利用人A2基因和人J_k1基因。在某些具体实施方式中,轻链的编码核苷酸分子编码含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个置换的氨基酸序列,与种系氨基酸序列相比。在某些具体实施方式中,核苷酸分子包括下述核苷酸序列,其编码的V_L氨基酸序列与种系V_k和J_k序列相比,含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守氨基酸置换和/或1、2、或3个非保守氨基酸置换。置换可以在CDR区、框架区或恒定区。

[0276] 在某些具体实施方式中,核苷酸分子编码下述V_L氨基酸序列,其与种系序列相比含有一个或多个突变,其与在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中的任一抗体的V_L中发现的来自种系的突变一致。

[0277] 在某些具体实施方式中,与种系序列相比,核苷酸分子编码含有至少3个氨基酸突变的V_L氨基酸序列,其与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中的任一抗体的V_L中发现的来自种系的突变一致。

[0278] 在某些具体实施方式中,核苷酸分子包括下述核苷酸序列,其选自包括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的群组,编码单克隆抗体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的V_L氨基酸序列。

[0279] 在某些具体实施方式中,核苷酸分子包括下述核苷酸序列,其编码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其中之一的氨基酸序列。在某些具体实施方式中,核苷酸分子含有SEQ ID NO:3或其片段的核苷酸序列。在某些具体实施方式中,核苷酸编码该抗体1个,2个或3个CDR轻链的氨基酸序列。在某些具体实施方式中,该序列编码抗ALK-1抗体轻链从CDR1到CDR3的连续区域。

[0280] 在某些具体实施方式中,核苷酸分子编码下述V_L氨基酸序列,其至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相同于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中任一抗体的V_L氨基酸序列,或者SEQ ID NO:4的V_L氨基酸。本发明的核苷酸分子包括核苷酸,在高严谨度条件下可杂交

于,如上所述,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相同于编码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126V_L区氨基酸序列的核苷酸,或者含有SEQ ID NO:4的V_L区核苷酸序列的核苷酸。

[0281] 在其它优选的具体实施方式中,核苷酸分子编码重链可变区(V_H),其利用人V_H4-31、V_H3-11、V_H3-15、V_H3-33、V_H4-61或V_H4-59基因序列或其来源的序列。在某些具体实施方式中,核苷酸分子利用人V_H4-31基因、DH6-19基因和热JH4B基因。

[0282] 在某些具体实施方式中,核苷酸分子编码下述核苷酸序列,其与人V、D或J基因的种系氨基酸序列相比,含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个突变。在某些具体实施方式中,该突变在V_H区。在某些具体实施方式中,该突变在CDR区。

[0283] 在某些具体实施方式中,核苷酸分子编码下述V_H序列,与种系V_H序列相比含有一个或多个突变,与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中的任一单克隆抗体的V_H的氨基酸突变一致。在某些具体实施方式中,核苷酸编码至少3个氨基酸突变,与种系序列相比,与上述任一抗体的至少3个氨基酸突变一致。

[0284] 在某些具体实施方式中,核苷酸分子包括下述核苷酸序列,其选自包括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的组群,编码单克隆抗体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的V_H氨基酸序列。

[0285] 在某些具体实施方式中,核苷酸分子包括下述核苷酸序列,其编码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其中之一的氨基酸序列。在多个优选的具体实施方式中,核苷酸分子至少包括SEQ ID NO:1或95核苷酸序列的一部分。在某些具体实施方式中,该序列片段编码V_H区,1个CDR3区,3个CDR区,或包括CDR1到CDR3的连续区域。

[0286] 在某些具体实施方式中,核苷酸分子编码下述V_H氨基酸序列,至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相同于任一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的V_H氨基酸序列。本发明的核苷酸分子包括核苷酸,在高严谨度条件下可杂交于,如上所述,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相同于编码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氨基酸序列的核苷酸,或者含有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核苷酸序列或其V_H区编码核苷酸序列的核苷酸。

[0287] 在另一个具体实施方式中,核苷酸编码抗体的一条全长重链,抗体选自包括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和5.59.1的群组,或者含有SEQ ID NO:2氨基酸序列的重链。此外,核苷酸可含有SEQ ID

NO:1或95核苷酸序列。

[0288] 编码抗ALK-1抗体或其部分的重链或轻链的核苷酸分子可分离自产生该抗体的任一来源。在各个具体实施方式中,核苷酸分子分离自表达抗ALK-1抗体的B细胞或该B细胞来源的永生化细胞,抗体分离自ALK-1免疫的动物。抗体编码核苷酸的分离方法在技术上已知。例如见Sambrook J.&Russell D.Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press,ColdSpring Harbor,N.Y.(2000)。mRNA可被分离并产生cDNA,用于聚合酶链反应(PCR)或抗体基因的cDNA克隆。在优选的具体实施方式中,核苷酸分子分离自杂交瘤,其融合了一种非人类转基因动物的细胞作为其融合伴侣,该细胞产生人免疫球蛋白。在一个尤为优选的具体实施方式中,产生人免疫球蛋白的细胞分离自XENOMOUSE®动物。在另一个具体实施方式中,产生人免疫球蛋白的细胞分离自非人类、非小鼠转基因动物,如上所述。在另一个具体实施方式中,核苷酸分离自非人类、非转基因动物。分离自非人类、非转基因动物的核苷酸分子可以被利用,例如使抗体人源化,其包括一条或多条本发明抗ALK-1人抗体的氨基酸序列。

[0289] 在某些具体实施方式中,本发明抗ALK-1抗体一条重链的编码核苷酸可含有下述编码本发明V_H结构域的核苷酸序列,连接于任一来源的重链恒定区的编码核苷酸序列。相似的,本发明抗ALK-1抗体一条轻链的编码核苷酸分子可含有下述编码本发明V_L结构域的核苷酸序列,连接于任一来源的轻链恒定区的编码核苷酸序列。

[0290] 在本发明的另一方面,重链可变区(V_H)和/或轻链可变区(V_L)的编码核苷酸分子被“转换”成全长抗体基因。在一个具体实施方式中,V_H或V_L结构域的编码核苷酸分子被转换成全长抗体基因,其分别插入到已经编码重链恒定区(C_H)或轻链恒定区(C_L)的表达载体中,这样,V_H片段在载体中连接于C_H片段,和/或V_L片段在载体中连接于C_L片段。在另一个具体实施方式中,V_H和/或V_L结构域的编码核苷酸分子通过连接被转换成全长抗体基因,例如,利用标准分子生物学技术,连接V_H和/或V_L结构的编码核苷酸分子和C_H和/或C_L结构域的编码核苷酸分子。人重链和轻链免疫球蛋白恒定区基因的核苷酸序列在技术上已知。例如见Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.,NIH Publ.No.91-3242,1991。接着,全长重链和/或轻链的编码核苷酸分子可在其导入的细胞中表达,并分离抗ALK-1抗体。

[0291] 核苷酸分子可用于重组表达大量抗ALK-1抗体。核苷酸分子也可用于产生嵌合抗体、双特异性抗体、单链抗体、免疫粘合素、双体、突变的抗体和抗体衍生物,在下面进一步描述。如果核苷酸分子来自非人类、非转基因动物,核苷酸分子可用于抗体人源化,也如下所述。

[0292] 在另一个具体实施方式中,本发明的核苷酸分子可作为探针或特定抗体序列的PCR引物使用。例如,核苷酸可作为探针用于诊断方法,或者作为PCR引物用于扩增有用的DNA片段,尤其用于分离其它编码抗ALK-1抗体的可变区的核苷酸分子。在某些具体实施方式中,核苷酸分子是寡核苷酸。在某些具体实施方式中,寡核苷酸来自目的抗体重链和轻链的高可变区。在某些具体实施方式中,寡核苷酸编码抗体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或其本文描述的变体的

一个或多个CDRs的部分或全部。

[0293] 载体

[0294] 本发明提供载体,其含有本发明抗ALK-1抗体或其抗原结合部分重链的编码核苷酸分子。本发明也提供载体,其含有这些抗体或其抗原结合部分轻链的编码核苷酸分子。本发明进一步提供载体,其含有融合蛋白、改良抗体、抗体片段及其探针的编码核苷酸分子。

[0295] 在某些具体实施方式中,本发明抗ALK-1抗体或其抗原结合部分被表达,在表达载体中插入如上所述获得的部分或全长重链和轻链的编码DNAs,因而基因被连接在必需的表达调控序列上,例如转录和翻译调控序列。表达载体包括质粒、逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒(AAV)、植物病毒例如花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒、粘粒、YACs、EBV来源的游离基因等等。抗体基因被连接入载体,因而载体中的转录和翻译调控序列发挥它们调控抗体基因转录和翻译的预期功能。选择表达载体和表达调控序列,使其与所用的表达宿主细胞相匹配。抗体轻链基因和抗体重链基因可插入到独立的载体中。在优选的具体实施方式中,两个基因插入到同一表达载体中。抗体基因通过标准方法插入到表达载体中(例如,连接抗体基因片段和载体的互补限制性酶切位点,或者在不含限制性酶切位点时平端连接)。

[0296] 一个便利的载体可编码功能完整的人C_H或C_L免疫球蛋白序列,带有适当的限制性酶切位点,从而使任一V_H或V_L序列可以轻易插入并表达,如上所述。在这些载体中,剪接通常发生在插入J区的剪接供体位点和位于人C结构域之前的剪接受体位点之间,剪接区也发生在人C_H外显子。多腺苷酸化和转录终止发生在天然的染色体位点,位于编码区下游。重组表达载体也可编码下述信号肽,促进抗体从宿主细胞分泌。抗体链基因可克隆入载体,信号肽连接在免疫球蛋白链的氨基端。信号肽可以是一个免疫球蛋白信号肽或一个异源信号肽(即来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0297] 除了抗体链基因,本发明重组表达载体携带调控序列,调控抗体链基因在宿主细胞中表达。所属领域技术人员应了解表达载体的设计,包括调控序列的选择依赖于这些因素,例如转染细胞的选择,蛋白的预期表达水平等等。哺乳动物宿主细胞表达所优选的调控序列包括可指导蛋白在哺乳动物细胞中高表达的病毒元件,例如启动子和/或增强子,来自逆转录病毒LTRs、细胞巨化病毒(CMV)(例如CMV启动子/增强子),猿猴病毒40(SV40)(例如SV40启动子/增强子),腺病毒(腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)),多瘤和强哺乳动物启动子例如免疫球蛋白和肌动蛋白启动子。为进一步描述病毒调控元件及其序列,例如见美国专利5,168,062、美国专利4,510,245和美国专利No.4,968,615。抗体在植物中的表达方法,包括启动子和载体的描述以及植物的转化,在技术上已知。例如见美国专利6,517,529,以引用的方式并入本文中。多肽在细菌细胞或真菌细胞例如酵母细胞中的表达方法,在技术上也已知。

[0298] 除了抗体链基因和调控序列,本发明重组表达载体可携带其它序列,例如调控载体在宿主细胞中复制的序列(例如复制起始区)以及选择标记基因。选择标记基因促进筛选已导入载体的宿主细胞(例如见美国专利4,399,216、4,634,665和5,179,017,以引用的方式并入本文中)。例如,选择标记基因通常在已导入载体的宿主细胞上产生药物抗性,例如G418,潮霉素或甲氨喋呤。例如,选择标记包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于dhfr宿主细胞,用甲氨喋呤筛选/扩增),neo基因(用G418筛选),以及谷氨酸合成酶基因。

[0299] 非杂交瘤宿主细胞和重组产生蛋白的方法

[0300] 抗ALK-1抗体的编码核苷酸分子和含有这些核苷酸的载体可用于转染适当的哺乳动物、植物、细菌或酵母宿主细胞。在哺乳动物细胞中导入异源多聚核苷酸的方法在技术上已知,包括葡聚糖介导的转染,磷酸钙沉淀,聚凝胺介导的转染,原生质融合,电穿孔,将多聚核苷酸封装于脂质体,以及直接将DNA注射到细胞核。此外,核苷酸分子可通过病毒载体导入哺乳动物细胞。细胞的转化方法在技术上已知。例如见美国专利4,399,216、4,912,040、4,740,461和4,959,455,以引用的方式并入本文中。植物细胞的转化方法在技术上已知,例如农杆菌介导的转化,生物转化,直接注射,电穿孔和病毒转化。细菌和酵母细胞的转化方法在技术上也已知。

[0301] 可作为表达宿主的哺乳动物细胞系在技术上已知,包括许多来自美国典型培养物保藏中心(ATCC)的永生化细胞系。尤其包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,NS0细胞,SP2细胞,HEK-293T细胞,293 Freestyle细胞(Invitrogen),NIH-3T3细胞,HeLa细胞,幼仓鼠肾(BHK)细胞,非洲绿猴肾细胞(COS),人肝细胞癌细胞(例如Hep G2),A549细胞以及许多其它细胞系。具有特殊偏好的细胞系通过测定细胞系是否具有高表达水平进行筛选。其它可以利用的细胞系是昆虫细胞系,例如Sf9或Sf21细胞。编码抗体基因的重组表达载体被导入哺乳动物宿主细胞时,抗体被表达,通过培养宿主细胞下述时间足以使抗体在宿主细胞中表达,或者,抗体最好分泌到宿主细胞生长的培养基中。利用标准蛋白纯化方法从培养基中回收抗体。植物宿主细胞包括,例如烟草、拟南芥、浮萍、玉米、小麦、马铃薯等等。细菌宿主细胞包括E.coli和链霉菌。酵母宿主细胞包括粟酒裂殖酵母,酿酒酵母和毕赤酵母。

[0302] 此外,本发明抗体在产生细胞系中的表达可通过多种已知技术得以增强。例如,谷氨酰胺合成酶基因表达系统(GS系统)是特定条件下增加表达的通用方法。GS系统部分或完整描述于欧洲专利0 216846、0 256 055、0 323 997和0 338 841。

[0303] 不同细胞系或转基因动物表达的抗体彼此可能存在不同的糖基化。但是,不管抗体的糖基化,由在此提供的核苷酸分子编码的或含有在此提供的氨基酸序列的所有抗体都属于本发明。

[0304] 转基因动物和植物

[0305] 本发明抗ALK-1抗体也可以通过基因工程产生,产生含有免疫球蛋白重链和轻链目的序列的转基因动物或植物,并从中产生可回收形式的抗体。与哺乳动物的转基因产物一起,抗ALK-1抗体可产生于绵羊、牛或其它动物的乳汁中,并从中回收。例如见美国专利5,827,690、5,756,687、5,750,172和5,741,957,以引用的方式并入本文中。在某些具体实施方式中,含有人免疫球蛋白基因座的非人类转基因动物用ALK-1或其免疫原片段进行免疫,如上所述。在植物中制备抗体的方法描述于,例如美国专利6,046,037和5,959,177,以引用的方式并入本文中。

[0306] 在某些具体实施方式中,非人类转基因动物或植物被产生,通过标准转基因技术在动物或植物中导入本发明抗ALK-1抗体的一个或多个编码核苷酸分子。见上述Hogan和美国专利6,417,429。用于制备转基因动物的转基因细胞可以是胚胎干细胞或体细胞或受精卵。非人类转基因生物可以是嵌合体、非嵌合体杂合子以及非嵌合体纯合子。例如见Hogan et al.,Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual 2nd ed.,Cold Spring Harbor Press(1999);Jackson et al.,Mouse Genetics and Transgenics:A Practical Approach,OxfordUniversity Press(2000)以及Pinkert,Transgenic Animal Technology:

A Laboratory Handbook, Academic Press(1999),全部以引用的方式并入本文中。在某些具体实施方式中,非人类转基因动物存在一个靶向断裂和置换,通过一个编码目的重链和/或轻链的靶向构建产物。在一个优选的具体实施方式中,转基因动物包括并表达核苷酸分子,其编码的重链和轻链特异结合ALK-1,优选人ALK-1。在某些具体实施方式中,转基因动物包括核苷酸分子,其编码改良的抗体例如单链抗体、嵌合抗体或人源化抗体。抗ALK-1抗体可在任一转基因动物中产生。在一个优选的具体实施方式中,非人类动物是小鼠、大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马。非人类转基因动物在血液、乳汁、尿液、唾液、泪液、粘液和其它体液中表达所编码的多肽。

[0307] 噬菌体展示库

[0308] 本发明提供一种方法,用于产生抗ALK-1抗体或其抗原结合部分,其包括步骤:合成噬菌体表面人抗体库,用ALK-1或其抗原结合部分筛选文库,分离ALK-1结合的噬菌体,并从噬菌体中获取抗体。例如,一种在噬菌体展示技术中使用的抗体库制备方法,包括步骤:用ALK-1或其免疫原片段免疫含有人免疫球蛋白基因座的非人类动物,产生免疫反应,从免疫动物中选取抗体产生细胞;从选取的细胞中分离本发明抗体重链和轻链的编码RNA,将RNA逆转录成cDNA,利用引物扩增cDNA,并将cDNA插入到噬菌体展示载体中,从而使抗体在噬菌体上表达。本发明重组抗ALK-1抗体可通过这种方式获得。

[0309] 本发明重组人抗ALK-1抗体可通过筛选重组组合抗体库得以分离。优选文库是scFv噬菌体展示库,利用制备自从B细胞分离的mRNA的人V_L和V_HcDNAs产生。制备并筛选该文库的方法在技术上已知。产生噬菌体展示库的试剂盒可商业购买得到(例如the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no.27-9400-01和the Stratagene SurfZAPTM phage display kit, catalog no.240612)。也有其它方法和试剂可用于产生并筛选抗体展示库(例如见美国专利5,223,409;PCT Publication Nos.WO 92/18619、WO 91/17271、WO92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047、WO 92/09690; Fuchs et al., Bio/Technology 9:1370-1372(1991); Hay et al., Hum.Antibod.Hybridomas 3:81-85(1992); Huse et al., Science246:1275-1281(1989); McCafferty et al., Nature 348:552-554(1990); Griffiths et al., EMBO J.12:725-734(1993); Hawkinset al., J.Mol.Biol.226:889-896(1992); Clackson et al., Nature352:624-628(1991); Gram et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:3576-3580(1992); Garrad et al., Bio/Technology 9:1373-1377(1991); Hoogenboom et al., Nuc.Acid Res.19:4133-4137(1991)和Barbas et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7978-7982(1991)),全部以引用的方式并入本文中。

[0310] 在一个具体实施方式中,为了分离并产生具有目的特征的抗ALK-1人抗体,一个描述于此的抗ALK-1人抗体首先用于选择人重链和轻链序列,具有相似的ALK-1结合活性,采用PCT Publication No.WO 93/06213描述的抗原表位记忆方法,以引用的方式并入本文中。优选该方法使用的抗体库是scFv库,其制备和筛选描述于PCT Publication No.WO 92/01047, McCafferty et al., Nature348:552-554(1990)和Griffiths et al., EMBO J.12:725-734(1993),全部以引用的方式并入本文中。优选scFv抗体库筛选用人ALK-1作为抗原。

[0311] 选择了最初的V_L和V_H结构域后,开展“混合和匹配”实验,对最初选择的V_L和V_H片段的不同配对进行筛选,用于结合ALK-1,选择优选的V_L/V_H配对组合。此外,为了进一步改善抗

体特性,优选V_L/V_H配对的V_L和V_H片段可被随机突变,优选在V_H和/或V_L的CDR3区,用一个类似于体内体细胞突变的过程,其在天然免疫反应中负责抗体的亲和力突变。该体外亲和力突变可通过扩增V_H和V_L结构域得以完成,利用分别互补于V_H CDR3或V_LCDR3的PCR引物,通过四个核苷酸碱基在特定位置的随机混合,引物被“分叉”,因此,合成的PCR产物编码V_H和V_L片段,在其V_H和/或V_L CDR3区中已引入随机突变。这些随机突变的V_H和V_L片段可再次筛选,用于结合ALK-1。

[0312] 从重组免疫球蛋白展示库中筛选并分离到一个本发明抗ALK-1后,可从展示库中(例如从噬菌体基因座中)回收所选抗体的编码核苷酸,并通过标准重组DNA技术亚克隆入其它表达载体。需要时,可进一步处理核苷酸以产生本发明其它抗体形式,如下所述。为了使组合库筛选分离得到的重组人抗体表达,抗体的编码DNA被克隆入重组表达载体并导入哺乳动物宿主细胞,如上所述。

[0313] 脱免疫抗体

[0314] 在本发明的另一方面,抗体可脱免疫以降低免疫原性,其技术描述于,例如PCT Publication Nos.W098/52976和W000/34317(以引用的方式并入本文中)。

[0315] 突变的抗体

[0316] 在另一个具体实施方式中,核苷酸分子、载体和宿主细胞可用于获取突变的抗ALK-1抗体。抗体可突变在重链和/或轻链的可变区,例如,改变抗体的结合特性。例如,突变可发生在一个或多个CDR区,从而增加或降低抗体对ALK-1的K_D,增加或降低K_{off},或者改变抗体的结合特异性。定向诱变技术在技术上已知。例如见上述Sambrook等和Ausubel等。在另一个具体实施方式中,一个或多个突变可发生在与种系相比已经发生变化的氨基酸残基中,位于单克隆抗体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。突变可发生在可变区的CDR区或框架区,或恒定区。在一个优选的具体实施方式中,突变发生在可变区。在某些具体实施方式中,一个或多个突变发生在与种系相比已经发生变化的氨基酸残基中,位于可变区的CDR区或框架区,其氨基酸序列为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,或其核苷酸序列为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。

[0317] 在另一个具体实施方式中,框架区被突变,从而使框架区具有相应种系基因的氨基酸序列。突变可发生在框架区或恒定区,增加抗ALK-1抗体的半衰期。例如见PCT Publication No.WO 00/09560,以引用的方式并入本文中。框架区或恒定区的突变也可用于改变抗体的免疫原性,为另一个分子提供共价或非共价结合位点,或者改变抗体特性例如补体结合、FcR结合以及抗体依赖细胞介导的细胞毒性(ADCC)。根据本发明,单个抗体可突变在可变区的任一个或多个CDRs或框架区或者恒定区。

[0318] 在某些具体实施方式中,1到13个氨基酸突变,包括其中任何一个数字,可发生在突变的抗ALK-1抗体的V_H或V_L结构域中,与突变前的抗ALK-1抗体相比。在上述任一抗体中,

突变可发生在一个或多个CDR区。此外,任何一个突变可以是保守氨基酸突变。在某些具体实施方式中,恒定区存在不超过5、4、3、2或1个氨基酸突变。

[0319] 改良的抗体

[0320] 在另一个具体实施方式中,可制备融合抗体或免疫粘合素,包括本发明抗ALK-1抗体的部分或全部,连接于另一个多肽。在一个优选的具体实施方式中,只有抗ALK-1抗体的可变区连接于多肽。在另一个优选的具体实施方式中,抗ALK-1抗体的V_H结构域连接于第一个多肽,而抗ALK-1抗体的V_L结构域连接于第二个多肽,与第一个多肽以V_H和V_L结构域能够相互作用形成抗原结合位点的方式进行连接。在另一个优选的具体实施方式中,V_H结构域通过一个接头与V_L结构域隔开,从而使V_H和V_L结构域能够相互作用(见下面的单链抗体部分)。其后,V_H-接头-V_L抗体被连接到目的多肽上。此外,可制备融合抗体,其中,2个(或多个)单链抗体相互连接。这可用于制备一条多肽链上的单价或多价抗体,或制备双特异性抗体。

[0321] 为制备单链抗体,(scFv)V_H和V_L编码DNA片段连接于另一个片段,其编码柔性接头,例如编码氨基酸序列(Gly₄-Ser)₃,因而V_H和V_L序列可被表达为一个连续的单链蛋白,其V_L和V_H结构域通过柔性接头连接,例如见Bird et al.,*Science* 242:423-426(1988);Huston et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5879-5883(1988);McCafferty et al.,*Nature* 348:552-554(1990)。单链抗体可以是单价,在只有一个V_H和V_L被利用时;二价,在2个V_H和V_L被利用时;或多价,在2个以上V_H和V_L被利用时。可制备双特异性抗体或多价抗体,与ALK-1和另一个分子特异结合。

[0322] 在其它具体实施方式中,可制备其它改良的抗体,利用抗ALK-1抗体编码核苷酸分子。例如,“κ体”(III et al.,*Protein Eng.*10:949-57(1997)),“Minibodies”(Martin et al.,*EMBO J.*13:5303-9(1994)),“双体”(Holliger et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*90:6444-6448(1993))或“Janusins”(Traunecker et al.,*EMBO J.*10:3655-3659(1991)and Traunecker et al.,*Int.J.Cancer(Suppl.)*7:51-52(1992))可利用标准分子生物学技术根据本说明书的内容得以制备。

[0323] 双特异性抗体或抗原结合部分可通过多种方法制备,包括融合杂交瘤或连接Fab'片段。例如见Songsivilai & Lachmann,*Clin.Exp.Immunol.*79:315-321(1990),Kostelny et al.,*J.Immunol.*148:1547-1553(1992)。此外,双特异性抗体可以是“双体”或“Janusins”形式。在某些具体实施方式中,双特异性抗体结合于ALK-1的2个不同抗原表位。在某些具体实施方式中,双特异性抗体具有来自单克隆抗体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的第一条重链和第一条轻链,以及另一条抗体重链和轻链。在某些具体实施方式中,另一条轻链和重链也来自上述的一个单克隆抗体,但不同于第一条重链和轻链。

[0324] 在某些具体实施方式中,制备上述改良的抗体,利用用在此提供的抗ALK-1人单克隆抗体的一个或多个可变区或CDR区。

[0325] 衍生的和标记的抗体

[0326] 本发明抗ALK-1抗体或其抗原结合部分可被衍生并连接于另一个分子(例如另一个多肽或蛋白)。通常,抗体或其部分通过衍生化或标记被衍生,其ALK-1结合没有受到不利

影响。相应地,本发明抗体或抗体片段同时包括本文描述的抗ALK-1抗体的最初形式和改良形式。例如,本发明抗体或抗体片段功能性连接(通过化学偶合、基因融合、非共价连接或其它)于一个或多个其它分子基团,例如另一个抗体(例如双特异性抗体或双体),检测试剂,药用试剂,和/或能够介导抗体或抗体片段与另一个分子结合的蛋白或多肽(抗生物素蛋白链菌素核心区或多组氨酸标签)。

[0327] 一种类型的衍生化抗体产生是通过交叉连接2个或多个抗体(属于同一类型或不同类型,例如制备双特异性抗体)。适当的交联剂是异基双功能剂,存在2个不同的反应基团,由适当的间隔区隔开(例如m-丁烯酰胺苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯),或同基双功能剂(双琥珀酰亚胺辛二酸酯)。这种交联剂可从Pierce Chemical Company, Rockford, IL购买得到。

[0328] 另一种类型的衍生化抗体是标记的抗体。有用的检测试剂,用于衍生本发明抗体或抗原结合部分,包括包括荧光化合物,例如荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲氨基-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧磷光剂等等。抗体也可以用检测酶进行标记,例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等等。抗体用检测酶进行标记时,其检测是通过另外加入试剂,被酶利用并产生可以识别的反应产物。例如,存在辣根过氧化物酶时,加入过氧化氢和二氨基联苯,从而产生可检测的有色反应产物。抗体也可以用生物素进行标记,通过间接测定卵白素或抗生物素蛋白链菌素的结合得以检测。抗体也可以用预先设定的可被第二个报告分子识别的多肽抗原表位进行标记(例如亮氨酸拉链互补序列、第二个抗体的结合位点、金属结合结构域、附加表位)。在某些具体实施方式中,标签通过不同长度的间隔臂进行连接,以降低潜在的位阻。

[0329] 抗ALK-1抗体也可以用化学基团衍生,例如聚乙二醇(PEG),甲基或乙基,或者糖基。这些基团可用于改善抗体的生物学特性,例如增加血清半衰期。

[0330] 药物组合物和给药

[0331] 本发明也涉及一种药物组合物,在哺乳动物包括人类中,治疗异常血管生成增加相关的症状,其包括一定数量的本文描述的抗ALK-1抗体或其抗原结合部分,在治疗该症状中有效,以及一个药学可接受的载体。

[0332] 本发明抗体和抗原结合部分可组合成适合患者使用的药物组合物。典型地,药物组合物包括本发明的一个抗体或抗原结合部分,以及一个药学可接受的载体。在此适用的“药学可接受的载体”表示任一和所有溶剂、分散剂、包衣、抗细菌和真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等,具有生理学相容性。药学可接受的载体例如有水、盐、磷酸盐缓冲生理盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等等及其组合物。许多时候,优选在合剂中包括等渗剂,例如糖,多元醇例如甘露醇、山梨醇,或者氯化钠。其它药学可接受的物质例如有湿润剂或少量辅剂,例如湿润剂或乳化剂,防腐剂或缓冲剂,可延长贮存期或增加抗体有效性。

[0333] 本发明合剂可以有多种剂型,例如液体、半固体和固体剂型,例如液状溶液(例如注射剂和不溶性液体)、分散剂或悬浮剂、片剂、丸剂、粉剂、质体和栓剂。优选剂型依赖于预期给药方式和治疗用途。典型优选的合剂剂型是注射剂或不溶性溶液,例如合剂与用于人体被动免疫的剂型相似。优选的给药方式是胃肠道给药(例如静脉注射,皮下注射,腹膜内注射,肌肉注射)。在一个优选的具体实施方式中,抗体通过静脉输注或注射给予。在另一个具体实施方式中,抗体通过肌肉注射或皮下注射给予。注射剂型可以以单位剂量形式储存,

例如在安瓿或多剂量容器中,添加或不添加防腐剂。合剂剂型可以是悬浮剂、溶液或油状乳化剂或亲水性载体,并可含有配方试剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分是粉末形式,使用前分散在合适的载体中,例如灭菌无热原水。

[0334] 治疗合剂必须无菌并在生产和储存条件下稳定。合剂剂型可以是溶液、微乳剂、分散剂、脂质体或其它适于高药物浓度的有序结构。制备无菌注射溶液,在适当的溶剂中掺入必需剂量的抗ALK-1抗体,以及需要时,同时掺入上面列举的一种成分或其组合,随后过滤除菌。通常,制备分散剂,将活性成分掺入无菌载体中,其含有一种基础分散介质以及必需的上列列举的其它成分。用无菌粉末制备无菌注射溶液时,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,以此产生活性成分和其它任一目的成分的粉末,来自其预先过滤除菌的溶液。维持溶液固有的流动性可通过,例如,利用包衣例如卵磷脂,利用分散剂维持目的颗粒大小,以及利用表面活性剂。注射合剂吸收延长得以产生是通过在合剂中掺入一种可延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶。

[0335] 本发明抗体或抗原片段可通过技术上已知的多种方法给药,但是,对于许多治疗用途,优选的给药途径/方式是皮下注射、肌肉注射或静脉注射。技术人员应了解,给药途径和/或方式会根据预期目的发生变化。

[0336] 在特定的具体实施方式中,制备本发明抗体合剂,含有一个可以保护抗体免于快速释放的载体,例如缓释剂,包括埋植剂、透皮贴剂,以及微囊递药系统。可以利用可生物降解的生物相容多聚物,例如乙烯醋酸乙烯共聚物、聚酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯类和聚乳酸。这些剂型的许多制备方法是所属领域技术人员已知的。例如见 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems J.R.Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, 以引用的方式并入本文中。

[0337] 其它活性组分也可掺入合剂中。在特定的具体实施方式中,本发明的一个抑制性抗ALK-1抗体与一个或多个其它治疗试剂共同形成制剂和/或同时给药。这些试剂包括,但不限于,结合其它靶位的抗体,抗肿瘤试剂、抗血管生成试剂、信号转导抑制剂、抗增殖试剂、化疗试剂或者抑制ALK-1的多肽类似物。这些组合疗法可能要求更低剂量的抑制性抗ALK-1抗体和共给药试剂,从而避免多种单一疗法伴随的可能毒性或并发症。

[0338] 如上所述,除了整合剂,本发明合剂视情况可能进一步包括一个药学可接受的抗氧化剂。合适的抗氧化剂包括,但不限于,甲硫氨酸、硫代硫酸钠、过氧化氢酶和铂。例如,合剂可能含有甲硫氨酸,其浓度范围从1mM到100mM左右,尤其在27mM左右。例如,一个亲水制剂可以是:10mg/mL抗ALK-1抗体,20mM组氨酸,pH 5.5,84mg/mL海藻糖二水化物,0.2mg/mL吐温80,0.05mg/mL乙二醇四乙酸二钠,0.1mg/mL L-蛋氨酸。

[0339] 本发明合剂可包括“治疗有效剂量”或“预防有效剂量”的本发明抗体或抗原结合部分。“治疗有效剂量”涉及一个剂量,其剂量经过必需的时间段可有效达到预期的治疗目的。抗体或抗原结合部分的治疗有效剂量可发生变化,根据如下因素:患者的疾病状态、年龄、性别和体重,以及抗体或抗体片段在患者中引起目的反应的能力。治疗有效剂量也可以是抗体或抗原结合部分的治疗有利反应优于其毒性或副作用的一个剂量。“预防有效剂量”涉及一个剂量,其剂量经过必需的时间段可有效达到预期的预防目的。通常,由于预防剂量是用于疾病早期阶段或之前的患者,预防有效剂量应比治疗有效剂量小。

[0340] 可调整给药方案以获得最佳目的反应(例如治疗或预防反应)。例如,可以单次给

药,在下述时间内分次给药,或者剂量随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加。尤其有利的是,以单元剂量形式形成胃肠道合剂,方便给药并保证剂量的均一性。在此使用的单元剂量形式涉及物理不连续单元,适合作为单元剂量用于需治疗的哺乳动物患者。每个单元含有预先设定的活性组分剂量,与所需的药学载体一起用于产生目的治疗效应。本发明单元剂量形式的规格决定并直接依赖于(a)希望获得的抗ALK-1抗体或其部分的独特性以及特定治疗效应或预防效应,以及(b)技术上固有的局限性,将抗体混合用于患者敏感性治疗。

[0341] 本发明的一个抗体或抗体片段的治疗或预防有效剂量的典型非极限范围是0.025到50mg/kg,更优选0.1到50mg/kg,更优选0.1-25,0.1到10或0.1到3mg/kg。在某些具体实施方式中,制剂含有5mg/mL抗体,缓冲液为20mM枸橼酸钠,pH 5.5,140mM NaCl和0.2mg/mL吐温80。应注意的是,剂量随需要减轻的症状的类型和严重性不同而发生变化。应进一步了解,对于任一特定患者,特定给药方案应根据患者需要和患者的专业评价随时间调整,并指导合剂的用药,在此给出的剂量范围只是举例说明,并不限定合剂的使用或范围。

[0342] 本发明的另一方面提供试剂盒,含有本发明的一个抗ALK-1抗体或抗原结合部分或者含有该抗体或片段的合剂。除了抗体或合剂以外,试剂盒可包括诊断或治疗试剂。试剂盒也可包括诊断或治疗方法的使用说明书。在一个优选的具体实施方式中,试剂盒包括抗体或一个含有抗体的合剂以及一种可用于如下所述方法的诊断试剂。在另一个优选的具体实施方式中,试剂盒包括抗体或一个含有抗体的合剂以及一种或多种可用于如下所述方法的诊断试剂。

[0343] 有用的诊断方法

[0344] 抗ALK-1抗体或其抗原结合部分可在诊断方法中使用,在体内或体外检测生物样品的ALK-1。例如,抗ALK-1抗体可用于常规免疫分析,包括但不限于ELISA、RIA、流式细胞术、免疫组化、Western印迹或免疫共沉淀。本发明抗ALK-1抗体可用于检测人ALK-1。抗ALK-1抗体也可用于检测其它灵长类来源的ALK-1,例如短尾猴。

[0345] 本发明提供一种方法,用于检测生物样品的ALK-1,其包括用本发明的一个抗ALK-1抗体接触生物样品并检测结合的抗体。在一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体用检测标签直接标记。在另一具体实施方式中,抗ALK-1抗体(第一个抗体)未作标记,而能够结合抗ALK-1抗体的第二个抗体或其它分子被标记。所属领域技术人员已知的是,选择第二个抗体,使其特异结合特定物种和种类的第一个抗体。例如,如果抗ALK-1抗体是人IgG,那么,第二个抗体应为抗人IgG。其它能够结合于抗体的分子包括,但不限于,蛋白A和蛋白G,两者均可商业购买得到,例如来自Pierce Chemical Co。

[0346] 用于抗体或第二个抗体的适当标签已经在前面讨论,并包括不同的酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。适当的酶例如包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适当的辅基络合物例如包括抗生物素蛋白链菌素/生物素和卵白素/生物素;适当的荧光物质例如包括扇形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、dichlorotriazinylamine fluorescein、丹磺酰氯、藻红蛋白;发光物质例如包括鲁米诺;以及适当的放射性物质包括 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S 或 ^3H 。

[0347] 在其它具体实施方式中,生物样品的ALK-1可通过竞争免疫分析法进行分析,利用标记了可检测物质的ALK-1标准品以及一个未标记的抗ALK-1抗体。在这个分析中,混合生物样品、标记的ALK-1标准品和抗ALK-1抗体,并测定与未标记抗体结合的标记ALK-1标准品

的含量。生物样品中ALK-1的含量与结合于未标记抗体的标记ALK-1标准品的含量具有相反的比例。

[0348] 可以利用上述的免疫分析法,用于各种目的。例如,抗ALK-1抗体可用于检测培养细胞的ALK-1。在一个优选的具体实施方式中,抗ALK-1抗体用于测定ALK-1的含量,其来自不同化合物处理的细胞。该方法可用于鉴定化合物,其调节ALK-1蛋白水平。根据该方法,一份细胞样品经受试化合物处理下述时间,而另一份样品不处理。测定总ALK-1水平时,细胞被裂解,总ALK-1水平通过上述一种免疫分析法进行测定。比较处理细胞和未处理细胞的总ALK-1水平,从而测定受试化合物的影响。

[0349] 一个优选的测定总ALK-1水平的免疫分析法时流式细胞术或免疫组化。方法例如ELISA、RIA、流式细胞术、Western印迹、免疫组化、固有膜蛋白的细胞表面标记以及免疫共沉淀在技术上已知。例如见上述Harlow and Lane。此外,免疫分析可放大用于高通量筛选,测定大量化合物是否激活或抑制ALK-1表达。

[0350] 本发明抗ALK-1抗体也可用于测定组织或组织来源细胞的ALK-1水平。在某些具体实施方式中,组织时疾病组织。在该方法的某些具体实施方式中,组织或其活组织来自患者。其后,组织或活组织在免疫分析中用于测定,例如总ALK-1水平或ALK-1的定位,通过上述的方法。

[0351] 本发明抗体也在体内鉴定表达ALK-1的组织和器官。利用本发明抗ALK-1人抗体的一个优点是,它们可以在体内安全使用,给予抗体后不引起本质上的免疫反应,不同于非人类来源的抗体或人源化抗体或嵌合抗体。

[0352] 本方法包括步骤:将可检测的标记抗ALK-1抗体或含有该抗体的合剂用于需要这种诊断试验的患者,患者接受成像分析从而确定ALK-1表达组织的定位。成像分析在医学技术上已知,包括但不限于,X射线分析、核磁共振成像(MRI)或计算机断层摄影术(CT)。抗体可通过任何适合体内成像的试剂进行标记,例如一种造影剂如硫酸钡,用于X射线分析,或者一种磁性造影剂如钆螯合剂,用于MRI或CT。其它标记试剂包括,但不限于,放射性同位素例如⁹⁹Tc。在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体未作标记,其成像通过给予可以结合抗ALK-1抗体并可检测的第二个抗体或其它分子。在一个具体实施方式中,活组织来自患者,测定母的组织是否表达ALK-1。

[0353] 有用的治疗方法

[0354] 在另一个具体实施方式中,本发明提供一种抑制ALK-1活性的方法,通过给予所需患者一个抗ALK-1抗体。本文描述的任一抗体或其抗原结合部分可作为治疗使用。在一个优选的具体实施方式中,抗ALK-1抗体是一个嵌合人抗体或人源化抗体。在另一个优选的具体实施方式中,抗ALK-1抗体是人抗体,而患者是人类患者。或者,患者可以是哺乳动物,其表达的ALK-1与抗ALK-1抗体起交叉反应。抗体可用于其表达的ALK-1与抗ALK-1抗体起交叉反应的非人类哺乳动物(例如短尾猴),作为兽用,或者用于人疾病动物模型。这种动物模型在评价本发明抗体的治疗效果时有用。

[0355] 在另一个具体实施方式中,抗ALK-1抗体或其抗原片段可用于患者,其异常表达高水平ALK-1。抗体可以单次给药,但更优选多次给药。给予抗体可以从每天三次到每六个月一次或更长时间间隔。给药根据一个时间表,例如每天三次,每天两次,每天一次,每两天一次,每三天一次,每周一次,每两周一次,每月一次,每两个月一次,每三个月一次和每六个

月一次。抗体也可以通过一个微泵连续给药。抗体可通过粘膜、口腔、鼻内、吸入、静脉、皮下、肌内、胃肠道或瘤内途径给药。抗体可以给予一次,至少两次或至少持续下述时间直至症状被治疗、减轻或治愈。只要存在症状,抗体通常一直给予。抗体通常作为上述药学合剂的一部分给予。抗体的剂量范围通常是0.1到100mg/kg,更优选0.5到50mg/kg,更优选1到20mg/kg,尤为优选1到10mg/kg。血清抗体浓度可通过本领域已知的任一方法测定。

[0356] 在一个具体实施方式中,抗体在一个剂型中给予,例如无菌水溶液,其pH范围从约5.0到约6.5左右,并包括约1mg/ml到约200mg/ml左右的抗体,约1mmol到约100mmol左右的组氨酸缓冲液,约0.01mg/ml到约10mg/ml左右的吐温80,从约100mmol到约400mmol左右的海藻糖以及约0.01mmol到约1.0mmol左右的EDTA二钠二水化物。

[0357] 本发明进一步关注,此处的任一合剂可用于患者,其患有血管生成增加相关的症状或对该症状敏感(“血管原症状”)。

[0358] 可用本发明合剂/方法治疗/预防的血管原症状例子包括,但不限于,癌症(固体和血液)、与年龄相关的黄斑退行性改变(AMD)、发育异常(器官发生)、糖尿病性失明、子宫内膜异位症、眼睛新生血管形成、牛皮癣、类风湿性关节炎(RA)以及皮肤变色(例如血管瘤、毛细血管瘤或单纯痣)。

[0359] 例如,本发明涉及眼睛新生血管形成相关症状的治疗或预防方法。眼睛新生血管形成相关的症状包括,但不限于,糖尿病性视网膜病、与年龄相关的黄斑退行性改变(“ARM”)、虹膜红变性青光眼、实质性角膜炎、早产儿视网膜病、局部缺血性视网膜病(例如镰状细胞)、病理近视、眼组织胞浆菌病、翼状胬肉、凹点状内脉络膜病变等等。

[0360] 治疗异常细胞生长

[0361] 本发明也涉及一种方法,在哺乳动物包括人类中治疗异常细胞生长,其包括给予该哺乳动物一个治疗有效剂量的抗ALK-1抗体或其抗原结合部分,描述于此,在治疗异常细胞生长中有效。

[0362] 在该方法的一个具体实施方式中,异常细胞生长是肿瘤,包括但不限于,间皮瘤、肝胆管瘤(肝和胆管)、原发或继发CNS瘤、原发或继发脑癌、肺癌(NSCLC和SCLC)、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼黑色素瘤、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、胃肠道肿瘤(胃、结肠直肠和十二指肠)、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、阴户癌、Hodgkin疾病(Hodgkin's disease)、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、睾丸癌、慢性或急性白血病、慢性髓细胞样白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘生物、原发性CNS淋巴瘤、非霍杰金淋巴瘤、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、肾上腺皮质癌、胆囊癌、多发性骨髓瘤、胆管癌、纤维肉瘤、成神经细胞瘤、视网膜成神经细胞瘤、或上述一种或多种肿瘤的组合。

[0363] 在本发明的一个优选具体实施方式中,肿瘤选自肺癌(NSCLC和SCLC)、头颈癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、乳腺癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘生物、原发性CNS淋巴瘤、非霍金森氏淋巴瘤(non hodgkins's lymphoma)、脊柱肿瘤或上述一种或多种肿瘤的组合。

[0364] 在本发明另一个优选的具体实施方式中,肿瘤选自肺癌(NSCLC和SCLC)、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛区癌或上述一种或多种肿瘤的组合。

[0365] 在该方法的另一个具体实施方式中,该异常细胞生长是一种良性增殖疾病,包括但不限于牛皮癣、良性前列腺肥大或再狭窄(benignprostatic hypertrophy or restinosis)。

[0366] 本发明也涉及一种方法,用于治疗哺乳动物异常细胞生长,其包括给予该哺乳动物一定剂量的抗ALK-1抗体或其抗原结合部分,描述于此,与抗肿瘤药一起可有效治疗异常细胞生长,抗肿瘤药选自包括有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢药、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物效应调节剂、抗体、细胞毒素、抗激素药和抗雄激素药的群组。

[0367] 本发明也涉及一种药物组合物,用于治疗哺乳动物包括人类的异常细胞生长,其包括一定剂量的抗ALK-1抗体或其抗原结合部分,描述于此,与药学可接受的载体和抗肿瘤药一起可有效治疗异常细胞生长,抗肿瘤药选自包括有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢药、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物效应调节剂、抗激素药和抗雄激素药的群组。

[0368] 本发明也涉及一种方法,用于治疗哺乳动物的高增殖障碍(hyperproliferative disorder),其包括给予该哺乳动物治疗有效剂量的抗ALK-1抗体或其抗原结合部分,描述于此,以及一种抗肿瘤药,选自包括抗增殖药、激酶抑制剂、血管生成抑制剂、生长因子抑制剂、Cox-I抑制剂、Cox-II抑制剂、有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢药、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、放射线、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物效应调节剂、抗体、细胞毒素、抗激素药、他汀类和抗雄激素药的群组。

[0369] 在本发明的一个具体实施方式中,可与一种抗ALK-1抗体或其抗原结合部分以及本文描述的药物组合物一起使用的抗肿瘤药有抗血管生成药、激酶抑制剂、pan激酶抑制剂或生长因子抑制剂。优选的pan激酶抑制剂包括Sutent(辉瑞,SU-11248),描述于美国专利6,573,293(辉瑞,NY,USA)。

[0370] 抗血管生成药包括但不限于以下试剂,例如EGF抑制剂、EGFR抑制剂、VEGF抑制剂、VEGFR抑制剂、TIE2抑制剂、IGF 1R抑制剂、COX-II(环氧合酶II)抑制剂、MMP-2(基质金属蛋白酶2)抑制剂以及MMP-9(基质金属蛋白酶9)抑制剂。优选的VEGF抑制剂例如包括阿瓦斯丁(贝伐单抗),加拿大旧金山南部基因公司的一个抗VEGF单克隆抗体。

[0371] 其它VEGF抑制剂包括CP-547,632(辉瑞,纽约,美国)、阿西替尼(辉瑞;AG-013736)、ZD-6474(阿斯利康)、AEE788(诺华)、AZD-2171、VEGF Trap(Regeneron/安万特)、瓦他拉尼(也称PTK-787,ZK-222584;诺华和先灵公司)、Macugen(pegaptanib octasodium, NX-1838,EYE-001,辉瑞/吉利德/Eyetech)、IM862(Cytran Inc.ofKirkland,华盛顿,USA)和一个来自Ribozyme公司(Boulder,科罗拉多)和开隆(Emeryville,加利福尼亚)的合成核酶angiozyme及其组合。本发明使用的VEGF抑制剂在美国专利6,534,524和6,235,764中公开,两者以引用的方式并入本文中,用于各种目的。尤其优选的VEGF抑制剂包括CP-547,632、AG13736、瓦他拉尼、Macugen及其组合。

[0372] 其它VEGF抑制剂例如描述于WO 99/24440(1999年5月20日公开)、PCT国际专利申请PCT/IB99/00797(1999年5月3日递交)、WO 95/21613(1995年8月17日公开)、WO 99/61422(1999年12月2日公开)、美国专利6,534,524(公开AG13736)、美国专利5,834,504(1998年11月10日公开)、WO 98/50356(1998年11月12日公开)、美国专利5,883,113(1999年3月16日公

开)、美国专利5,886,020(1999年3月23日公开)、美国专利5,792,783(1998年8月11日公开)、美国专利6,653,308(2003年11月25日公开)、WO 99/10349(1999年3月4日公开)、WO 97/32856(1997年9月12日公开)、WO 97/22596(1997年6月26日公开)、WO 98/54093(1998年12月3日公开)、WO 98/02438(1998年1月22日公开)、WO 99/16755(1999年4月8日公开)以及WO 98/02437(1998年1月22日公开),全部以完整引用的方式并入本文中。

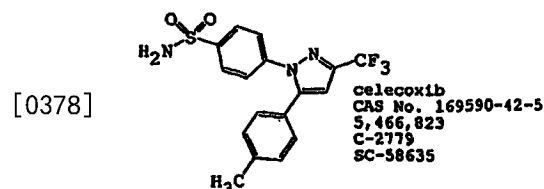
[0373] 可与抗体或其抗原结合部分一起使用的本发明其它抗增殖试剂包括法尼基蛋白转移酶抑制剂和受体酪氨酸激酶PDGFr抑制剂,包括下面的美国专利申请公开和要求的化合物:09/221946(1998年12月28日递交)、09/454058(1999年12月2日递交)、09/501163(2000年2月9日递交)、09/539930(2000年3月31日递交)、09/202796(1997年5月22日递交)、09/384339(1999年8月26日递交)以及09/383755(1999年8月26日递交),以及下面的美国临时专利申请公开和要求的化合物:60/168207(1999年11月30日递交)、60/170119(1999年12月10日递交)、60/177718(2000年1月21日递交)、60/168217(1999年11月30日递交)和60/200834(2000年5月1日递交)。上述每个专利申请和临时专利申请以完整引用的方式并入本文中。

[0374] 其它PDGFr抑制剂见2001年7月7日公开的W001/40217和2004年3月11日公开的W02004/020431,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。优选的PDGFr抑制剂包括辉瑞的CP-868,596及其药学可接受的盐。

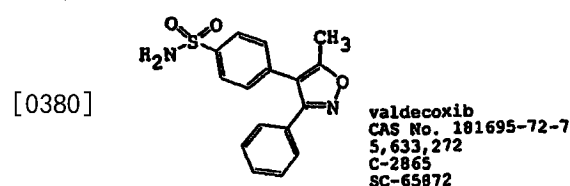
[0375] 优选的GARF抑制剂包括辉瑞的AG-2037(pelitrexol及其药学可接受的盐)。本发明使用的GARF抑制剂在美国专利5,608,082中公开,以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。

[0376] 可与本文描述的一种抗ALK-1抗体或其抗原结合部分以及本文描述的药物组合物一起使用的有效COX-II抑制剂例如包括CELEBREX™(塞来考昔)、帕瑞考昔、德拉昔布、ABT-963、MK-663(艾托考昔)、COX-189(鲁米考昔)、BMS 347070、RS 57067、NS-398、Bextra(伐地考昔)、帕雷考昔、韦克适(Vioxx)(罗非考昔)、SD-8381、4-甲基-2-(3,4-二甲苯基)-1-(4-氨磺酰苯基)-1H-吡咯、2-(4-乙氧苯基)-4-甲基-1-(4-氨磺酰苯基)-1H-吡咯、T-614、JTE-522、S-2474、SVT-2016、CT-3、SC-58125和Arcoxia(艾托考昔)。其它COX-II抑制剂见美国专利10/801,446和10/801,429,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。

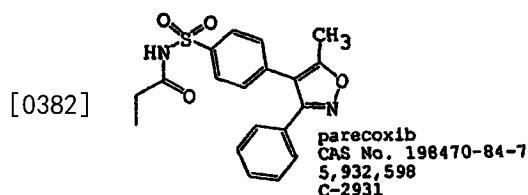
[0377] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是塞来考昔(celecoxib),见美国专利5,466,823,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。塞来考昔的结构如下所示:



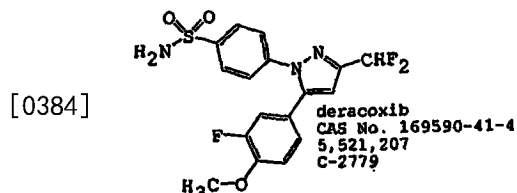
[0379] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是伐地考昔(valdecoxib),见美国专利5,633,272,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。伐地考昔的结构如下所示:



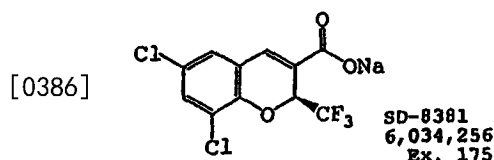
[0381] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是帕瑞考昔(parecoxib),见美国专利5,932,598,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。帕瑞考昔的结构如下所示:



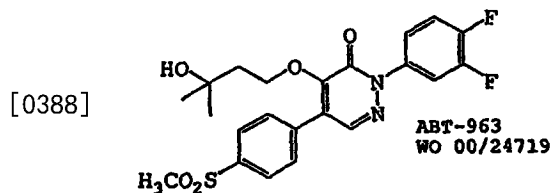
[0383] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是德拉昔布(deracoxib),见美国专利5,521,207,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。德拉昔布的结构如下所示:



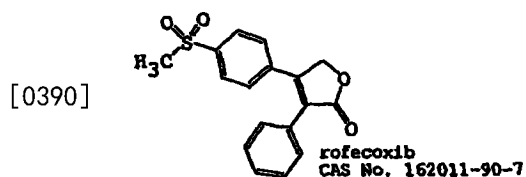
[0385] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是SD-8381,见美国专利6,034,256,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。SD-8381的结构如下所示:



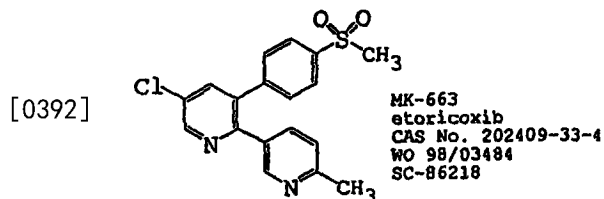
[0387] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是ABT-963,见国际公开WO 2002/24719,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。ABT-963的结构如下所示:



[0389] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是罗非考昔(rofecoxib),如下所示:

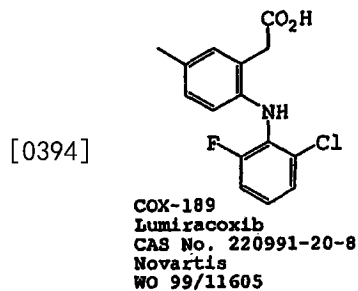


[0391] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是MK-663(艾托考昔,etoricoxib),见国际公开WO 1998/03484,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。艾托考昔的结构如下所示:

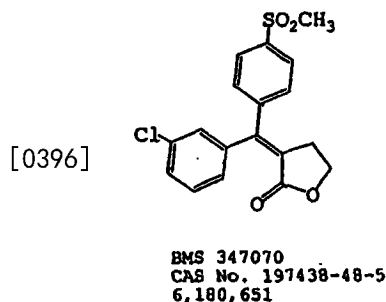


[0393] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是COX-189(鲁米考昔,Lumiracoxib),见国际公开WO 1999/11605,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。鲁米考昔

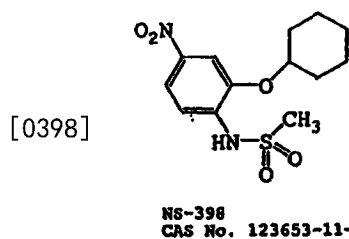
的结构如下所示:



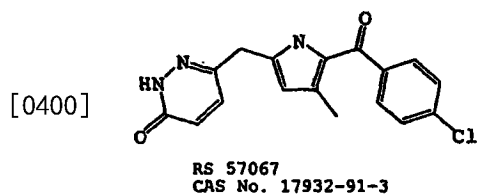
[0395] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是BMS-347070,见美国专利6,180,651,其内容以完整引用的方式并入本文中,用于各种目的。BMS-347070的结构如下所示:



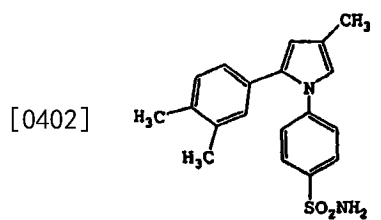
[0397] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是NS-398(CAS123653-11-2)。NS-398(CAS 123653-11-2)的结构如下所示:



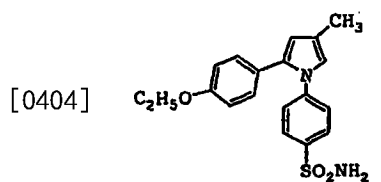
[0399] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是RS 57067(CAS17932-91-3)。RS-57067(CAS 17932-91-3)的结构如下所示:



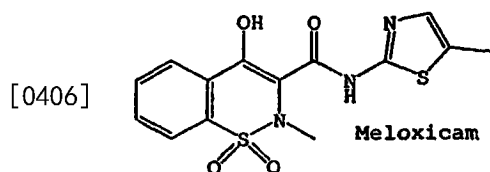
[0401] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是4-甲基-2-(3,4-二甲苯基)-1-(4-氨磺酰苯基)-1H-吡咯。4-甲基-2-(3,4-二甲苯基)-1-(4-氨磺酰苯基)-1H-吡咯的结构如下所示:



[0403] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是2-(4-乙氧苯基)-4-甲基-1-(4-氨磺酰苯基)-1H-吡咯。2-(4-乙氧苯基)-4-甲基-1-(4-氨磺酰苯基)-1H-吡咯的结构如下所示:



[0405] 在一个优选的具体实施方式中,抗肿瘤药是美洛昔康(meloxicam)。美洛昔康的结构如下所示:



[0407] 作为抗肿瘤药与本文描述的本发明抗体和药物组合物缀合使用的其它有用的抑制剂包括阿司匹林、非甾体抗炎药(NSAIDS),其抑制合成前列腺素的酶(环氧合酶I和II),导致前列腺素水平降低,所述抑制剂包括但不限于双水杨酸(Amigesic)、双弗尼酸(Dolobid)、布洛芬(Motrin)、优洛芬(Orudis)、萘普酮(Relafen)、吡罗昔康(Feldene)、甲氧萘丙烯酸(Aleve、萘普生)、双氯芬酸(Voltaren)、吲哚美辛(Indocin)、舒林酸(Clinoril)、托美汀(Tolectin)、依托度酸(Lodine)、痛力克(Toradol)、噁丙嗪(Daypro)及其组合。优选的COX-I抑制剂包括布洛芬(Motrin)、磺胺二甲噁唑、甲氧萘丙烯酸(Aleve)、吲哚美辛(Indocin)、萘普酮(Relafen)及其组合。

[0408] 与本文描述的抗ALK-1抗体或其抗原结合部分以及本文描述的其药物组合物一起使用的靶向试剂包括EGFr抑制剂,例如易瑞沙(吉非替尼,阿斯利康)、特罗凯(埃罗替尼或OSI-774, OSI Pharmaceuticals Inc.)、爱必妥(西妥昔单抗, Imclone Pharmaceuticals, Inc.)、EMD-7200(默克AG)、ABX-EGF(安进公司和亚伯基因公司(Abgenix Inc.))、HR3(古巴政府)、IgA抗体(纽伦堡大学)、TP-38(IVAX)、EGFR融合蛋白、EGF疫苗、抗EGFr免疫脂质体(Hermes Biosciences Inc.)及其组合物。

[0409] 优选的EGFr抑制剂包括易瑞沙、爱必妥、特罗凯及其组合。

[0410] 本发明还涉及选自pan erb受体抑制剂或ErbB2受体抑制剂的抗肿瘤制剂,例如CP-724,714(辉瑞)、CI-1033(卡奈替尼,辉瑞)、赫赛汀(曲妥单抗,基因公司)、Omitarg(2C4,帕妥珠单抗,基因公司)、TAK-165(武田)、GW-572016(lonafarnib,葛兰素史克)、GW-282974(葛兰素史克)、EKB-569(惠氏)、PKI-66(诺华)、dHER2(HER2疫苗, Corixa和葛兰素史克)、APC8024(HER2疫苗, Dendreon)、抗HER2/neu双特异性抗体(Decof Cancer Center)、B7.her2.IgG3(Agensys)、AS HER2(Research Institute for Rad Biology&Medicine)、三功能双特异性抗体(trifunctional bispecific antibodies)(慕尼黑大学)和mAB AR-209(Aronex Pharmaceuticals Inc)和mAB 2B-1(开隆)及其组合。优选的erb选择性抗肿瘤制剂包括赫赛汀、TAK-165、CP-724,714、ABX-EGF、HER3及其组合。优选的pan erbb受体抑制剂包括GW572016、CI-1033、EKB-569和Omitarg及其组合物。

[0411] 其它erbB2抑制剂包括WO 98/02434(1998年1月22日公开)、WO 99/35146(1999年7月15日公开)、WO 99/35132(1999年7月15日公开)、WO 98/02437(1998年1月22日公开)、WO 97/13760(1997年4月17日公开)、WO 95/19970(1995年7月27日公开)、美国专利5,587,458(1996年12月24日公开)以及美国专利5,877,305(1999年3月2日公开),每个都以完整引用

的方式并入本文中。本发明其它ErbB2受体抑制剂见美国专利6,465,449和6,284,764以及国际专利申请WO 2001/98277,每个都以完整引用的方式并入本文中。

[0412] 此外,其它抗肿瘤药可选自以下试剂:索拉非尼(Sorafenib, OnyxPharmaceuticals Inc.;BAY-43-9006)、根那三思(Genasense,安眠酮,Genta)、西妥昔单抗(亚伯基因(Abgenix)/安进)、泽维灵(Zevalin,先灵)、百克沙(Corixa/葛兰素史克)、阿巴瑞克、力比泰、EPO 906(诺华)、迪斯德末莱(discodermolide,XAA-296)、ABT-510(雅培)、新伐司他(Aeterna)、安佐司汀(enzastaurin,Eli Lilly)、考布他汀A4P(Oxigene)、ZD-6126(阿斯利康)、黄酮吡醇(安万特)、CYC-202(Cyclacel)、AVE-8062(安万特)、DMXAA(罗氏/Antisoma)、诺拉曲特(Eximias)、特莫达(Temodar,替莫唑胺,先灵葆雅)和来那度胺(Celegene)及其组合。

[0413] 其它抗肿瘤药可选自以下试剂:CyPat(醋酸环丙氯地孕酮)、组氨瑞林(醋酸组氨瑞林)、朴林纳西(Plenaixis,阿巴瑞克己酸孕酮)、阿曲生坦(ABT-627)、沙铂(JM-216)、thalomid(沙利度胺)、赛拉托扑(Theratope)、泰米立芬(Temilifene(DPPE))、ABI-007(紫杉醇)、易维特(雷洛昔芬)、阿他美坦(Biomed-777)、昔它司(Xyotax,聚谷氨酸紫杉醇)、贝卡洛汀(Targetin,贝沙罗汀)及其组合。

[0414] 此外,其它抗肿瘤药可选自以下试剂:替杂酮(Trizaone,替拉扎明)、Aposyn(依昔舒林)、新伐司他(AE-941)、赛普林(Ceplene,二盐酸组胺)、Orathecin(卢比替康)、维鲁利秦、Gastrimmune(G17DT)、DX-8951f(exatecan mesylate)、Onconase(豹蛙酶)、BEC2(米妥莫单抗)、Xcytrin(莫特沙芬钆)及其组合物。

[0415] 此外,抗肿瘤药可选自以下试剂:CeaVac(CEA)、三曲沙(NeuTrexin,曲美沙特葡萄糖醛酸)及其组合。其它抗肿瘤药可选自以下试剂:OvaRex(oregovomab)、Osidem(IDM-1)及其组合。其它抗肿瘤药可选自以下试剂:艾得新(Advexin,ING 201)、替扎酮(Triazone,替拉扎明)及其组合。其它抗肿瘤药可选自以下试剂:RSR13(乙丙昔罗)、可他拉(Cotara,131I chTNT 1/b)、NBI-3001(IL-4)及其组合。其它抗肿瘤药可选自以下试剂:康瓦新(Canvaxin)、GMK疫苗、PEG干扰能A(PEG Interon A)、他索瑞新(Taxoprexin,DHA/paciltaxel)及其组合。优选的其它抗肿瘤药包括辉瑞的MEK1/2抑制剂PD325901,Array Biopharm公司的MEK抑制剂ARRY-142886,Bristol Myer公司的CDK2抑制剂BMS-387,032,辉瑞的CDK抑制剂PD0332991和阿斯利康的AXD-5438及其组合。此外,还可以使用mTOR抑制剂,例如CCI-779(惠氏)和雷帕霉素衍生物RAD001(诺华)和AP-23573(Ariad),HDAC抑制剂SAHA(默克/Aton Pharmaceuticals)及其组合。其它抗肿瘤药包括aurora 2抑制剂VX-680(Vertex),Chk1/2抑制剂XL844(Exilixis)。

[0416] 下面的细胞毒试剂,例如选自包括表柔比星(Ellence)、多西他奇(泰索帝)、紫杉醇、右雷唑烷(Zinecard)(右丙亚胺)、利妥昔单抗(Rituxan)、甲磺酸伊马替尼(Gleevec)及其组合中的一种或多种试剂,可与本文描述的一种抗ALK-1抗体或其抗原结合部分以及本文描述的其药物组合物一起使用。

[0417] 本发明也包括与激素疗法一起使用本发明抗体及其抗原结合部分,包括但不限于依西美坦(阿诺新,辉瑞)、亮丙瑞林(Lupron或Leuplin,TAP/雅培/武田)、阿纳托司唑(瑞宁得,阿斯利康)、戈舍瑞林(诺雷德,阿斯利康)、度骨化醇、法倔唑、福美坦、枸橼酸他莫昔芬(它莫西芬,三苯氧胺,阿斯利康)、康士德(阿斯利康)、阿巴瑞克(Praecis)、曲普瑞林

(Trelstar)及其组合物。

[0418] 本发明也涉及激素治疗试剂,例如抗雌激素药,包括但不限于氟维司群、托瑞米芬、雷洛昔芬、拉索昔芬、来曲唑(弗隆,诺华),抗雄激素药例如比卡鲁胺、氟他米特、米非司酮、尼鲁米特、康士德®(4'-氰基-3-(4-氟苯磺酰)-2-羟基-2-甲基-3'-(三氟甲基)丙酰苯胺,比卡鲁胺)及其组合。

[0419] 此外,本发明提供单独使用或与一种或多种支持疗法产物一起使用的本发明抗体,例如产物选自包括非格司亭(Neupogen)、奥坦西隆(枢复宁)、法安明、普洛克里特(Procrit)、阿罗西(Aloxi)、艾曼德(Emend)或其组合。

[0420] 尤其优选的细胞毒试剂包括依利替康、爱必要、易瑞沙、格列味(Gleevec),泰索帝及其组合物。

[0421] 下面的拓扑异构酶I抑制剂可作为抗肿瘤药使用,喜树碱、盐酸依利替康(Camptosar)、厄度他卡芮(edotecarin)、卢比替康(Supergen)、依沙替康(Daiichi)、BN-80915(罗氏)及其组合物。尤其优选的拓扑异构酶II抑制剂包括表柔比星(Ellence)。

[0422] 本发明抗体可与抗肿瘤药、烷化剂、抗代谢物、抗生素、植物衍生的抗肿瘤药、喜树碱衍生物、酪氨酸激酶抑制剂、其它抗体、干扰素和/生物效应调节剂一起使用。

[0423] 烷化剂包括但不限于氮芥N-氧化物、环磷酰胺、异磷酰胺、美法仑、白消安、二溴甘露醇、卡波醌、塞替派、雷莫司汀、尼莫司丁、替莫唑胺、AMD-473、六甲密胺、AP-5280、阿帕奇魁酮(apaziquone)、布如斯利辛(brostallicin)、苯达莫司汀、卡氮芥、磷雌氮芥、福替目丁、葡磷酰胺、异磷酰胺、KW-2170,马磷酰胺和二溴卫矛醇;铂类烷化剂包括但不限于顺铂、伯尔定(碳铂)、依他铂、洛铂、奈达铂、依罗他新(Eloxatin,奥沙利铂,赛诺菲)或沙铂及其组合物。尤其优选的烷化剂包括依罗他新(奥沙利铂)。

[0424] 抗代谢物包括但不限于甲氨喋呤、6-巯基嘌呤、巯嘌呤、5-氟尿嘧啶(5-FU)单独使用或与亚叶酸联合、喃氟啶、UFT、去氧氟尿苷、嘧啶福、阿糖胞苷(cytarabine)、阿糖胞苷十八烷基磷酸钠(cytarabineocfosfate)、依诺他滨、S-1、力比泰(培美曲塞二钠,LY231514,MTA)、健择(吉西他滨,Eli Lilly)、氟达拉滨、5-氮杂胞苷、卡培他滨、克拉屈滨、克罗拉滨、地西他滨、依洛尼塞、乙炔替定(ethynylcytidine)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)、羟基脲、TS-1、美法仑、奈拉滨、诺拉曲塞、奥氟酯(ocfosfate)、培美曲塞二钠、喷司他汀、喷立他索(pelitrexol)、雷替曲塞、三阿平(triapine)、曲美沙特、阿糖腺苷、长春新碱、长春瑞滨;或者例如,欧洲专利申请239362给出的一个优选的抗代谢物N-(5-[N-(3,4-二氢-2-甲基-4-氧喹啉-6-ylmethyl)-N-甲基]-2-噻吩甲酰)-L-谷氨酸及其组合物。

[0425] 抗生素包括嵌入抗生素,但不限于:阿柔比星、放线菌素D、氨柔比星、阿纳霉素(annamycin)、阿霉素(adriamycin)、博来霉素、柔红霉素、阿霉素(doxorubicin)、依沙芦星、表柔比星、加柔比星、去甲氧正定霉素(idarubicin)、丝裂霉素C、奈莫柔比星、新制癌菌素(neocarzinostatin)、派来霉素、吡柔比星、培洛辉素(rebeccamycin)、丝酯(stimalamer)、链唑霉素、戊柔比星、新制癌菌素(zinostatin)及其组合物。

[0426] 植物衍生的抗肿瘤物质例如包括选自有丝分裂抑制剂的物质,例如长春碱、紫杉萜(泰索帝)、紫杉醇及其组合物。

[0427] 细胞毒拓扑异构酶抑制剂包括一种或多种试剂,选自包括阿柔比星、氨茶非特、贝洛替康、喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、氟替康(diflomotecan)、盐酸伊立替康

(Camptosar)、依朵卡新、表柔比星(Ellence)、鬼臼乙叉甙、依沙替康、基马替康、勒托替康、米托蒽醌、吡柔比星、吡仙蒽醌、卢比替康、索布佐生、SN-38、泰辅泊苷(tafluposide)、托泊替康及其组合物的群组。

[0428] 优选的细胞毒拓扑异构酶抑制剂包括一种或多种试剂,选自包括喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、盐酸伊立替康(Camptosar)、依朵卡新、表柔比星(Ellence)、鬼臼乙叉甙、SN-38、托泊替康及其组合物的群组。

[0429] 免疫物质包括干扰素和其它许多免疫增强剂。干扰素包括干扰素 α ,干扰素 α -2a,干扰素 α -2b,干扰素 β ,干扰素 γ -1a,干扰素 γ -1b(Actimmune),或干扰素 γ -n1及其组合物。其它试剂包括非格司亭、磨茹多糖、裂裯多糖、热胱(TheraCys)、乌苯美司、WF-10、阿地白介素、阿仑单抗、BAM-002,氮烯咪胺、达克珠单抗、地尼白介素、吉姆单抗、奥佐米星、替伊莫单抗、咪喹莫特、来诺拉提、磨茹多糖、黑瘤疫苗(Corixa)、莫拉司亭、OncoVAX-CL、沙莫司亭、他索纳明、替西白介素、胸腺法新、托西莫单抗、维鲁利素、Z-100、依帕珠单抗、米妥莫单抗、奥戈伏单抗、派土莫单抗(pemtumomab, Y-muHMG1)、朴如纹酯(Provence, Dendreon)及其组合物。

[0430] 生物效应调节剂是改变生命体的防御机制或生物反应的试剂,例如调节组织细胞的存活、生长或分化使其具有抗肿瘤活性。这些试剂包括及云芝多糖、磨茹多糖、西佐喃、溶血性链球菌制剂(picibanil)、乌苯美司及其组合物。

[0431] 其它抗肿瘤药包括阿利维A酸、聚肌胞、阿曲生坦、贝沙罗汀、硼替佐米、波生坦、钙三醇、依昔舒林、非那司提、福替目丁、伊班膦酸、米替福新、米托蒽醌、I-门冬酰胺酶、甲基苄肼、氮烯咪胺、羟基脲、天门冬酰胺酶、喷司他汀、他佐罗汀、Telcyta(TLK-286, Telik Inc.)、Velcade(bortemazib, Millenium)、维甲酸及其组合物。

[0432] 其它抗血管生成化合物包括阿昔曲丁、芬维A胺、沙利度胺、唑来膦酸、血管他汀、米替福新(aplidine)、昔兰昔(cilengtide)、考布他汀A-4、内皮他汀、溴氯哌啶酮、瑞马司他、莱莫凡布(removab)、来那度胺、角鲨胺、乌克兰(ukrain)、维他新(Vitaxin)及其组合物。

[0433] 铂类化合物包括但不限于顺铂、碳铂、奈达铂、奥沙利铂及其组合物。

[0434] 喜树碱衍生物包括但不限于喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、依立替康、SN-38、依朵卡新(edotecarin)、托泊替康及其组合物。

[0435] 其它抗肿瘤药包括米托蒽醌、I-门冬酰胺酶、甲基苄肼、氮烯咪胺、羟基脲、喷司他汀、维甲酸及其组合物。

[0436] 也可以利用能够增强抗肿瘤免疫反应的抗肿瘤药,例如CTLA-4(细胞毒淋巴细胞抗原4)抗体以及其它能够阻断CTLA-4的试剂,例如美国专利6,682,736公开的MDX-010(Medarex)和CTLA-4化合物;以及抗增殖试剂例如其它法尼基蛋白转移酶抑制剂,例如法尼基蛋白转移酶抑制剂。本发明也可以利用其它特异性CTLA-4抗体,见美国临时专利申请60/113,647(1998年12月23日提交)、美国专利6,682,736,两者都以完整引用的方式并入本文中。例如,根据本发明可以使用的另一个抗CTLA-4抗体是泰西立木单抗(ticilimumab),其含有美国专利6,682,736单克隆抗体11.2.1的序列。

[0437] 本发明使用的特异性IGF 1R抗体见国际专利申请WO 2002/053596,以完整引用的方式并入本文中。

[0438] 本发明使用的特异性CD40抗体见国际专利申请WO 2003/040170,以完整引用的方式并入本文中。

[0439] 基因治疗试剂也可作为抗肿瘤药使用,例如TNFerade(GeneVec),对反射疗法产生反应,表达TNF α 。

[0440] 在本发明的一个具体实施方式中,他汀类可与本文描述的一种抗ALK-1抗体或其抗原结合部分及其药物组合物一起使用。他汀类(HMG-CoA还原酶抑制剂)可选自包括阿伐他汀(立普妥,辉瑞)、帕伐他汀(普拉固,百时美施贵宝)、洛伐他汀(Mevacor,默克)、辛伐他汀(Zocor,默克)、氟伐地汀(来适可,诺华)、西立伐他汀(拜可,拜耳)、罗苏伐他汀(冠脂妥,阿斯利康)、洛伐他汀和烟酸(Advicor,Kos Pharmaceuticals),衍生物及其组合物的群组。

[0441] 在一个优选的具体实施方式中,他汀类选自包括阿伐他汀和洛伐他汀,衍生物及其组合物的群组。

[0442] 其它作为抗肿瘤药使用的试剂包括卡度特(Caduet)。

[0443] 抗ALK-1抗体或抗原结合部分与至少一种其它治疗试剂联合用药治疗本文描述的高增殖紊乱或异常细胞生长,对于其中任何一种方法,抗ALK-1抗体可与另一种抗肿瘤药偶联或衍生。这种治疗试剂也可以独立给药,或者以非衍生或非偶联的形式给药。当这种治疗试剂不衍生或不偶联于抗体时,它可以与抗体在同一个制剂中给予,或者以一个独立的制剂给予。

[0444] 治疗视力减退

[0445] 本发明的化合物和包括它们的药物组合物可用于治疗严重的视力减退,来自与年龄相关的黄斑退行性改变和影响眼睛后段的其它疾病,例如脉络膜新生血管、糖尿病性视网膜病、青光眼、色素性视网膜炎等等。

[0446] 例如,本发明合剂可在眼睛后部形成药物储备,并且,除了本文描述的一种或多种非活性辅料以外,可包括一种或多种药用活性试剂。用于本发明合剂的药用活性试剂例如包括,但不限于,抗生素、抗病毒药和抗真菌药;抗过敏反应试剂和肥大细胞稳定剂(antiallergenic agents and mast cell stabilizers);甾体和非甾体抗炎药(例如奈帕芬胺);环氧合酶抑制剂,包括但不限于Cox I和Cox II抑制剂;抗感染药和抗炎药联用;解充血药(减充血剂);抗青光眼试剂,包括但不限于肾上腺素能药物、 β -肾上腺素能阻滞剂、 α -肾上腺素能激动剂、拟副交感神经药、胆碱酯酶抑制剂、碳酸酐酶抑制剂和前列腺素;抗青光眼试剂联用;抗氧化剂;营养补充;治疗囊样黄斑水肿的药物,包括但不限于非甾体抗炎药;治疗与年龄相关的黄斑退行性改变(AMD)(包括渗出性(湿)和非渗出性(干))的药物,包括但不限于血管生成抑制剂,例如抑制蛋白激酶受体的血管生成抑制剂,包括属于VEGF受体的蛋白激酶受体;以及营养补充;治疗疱疹感染和CMV眼部感染的药物;治疗增殖性玻璃体视网膜病变的药物,包括但不限于抗代谢药和纤溶剂;创伤调节剂(wound modulating agents),包括但不限于生长因子;抗代谢药;神经保护药物,包括但不限于依利罗地;以及治疗后段26疾病或症状的血管生成抑制甾醇,包括但不限于与年龄相关的黄斑退行性改变(AMD)(包括渗出性(湿)和非渗出性(干))、脉络膜新生血管、视网膜病、视网膜炎、眼色素层炎(uveitis)、黄斑水肿和青光眼。这些血管生成抑制甾醇(angiostatic steroids)的其它信息见美国专利5,679,666和5,770,592。治疗囊样黄斑水肿的一个非甾体抗炎药是奈帕芬胺。

[0447] 眼睛用药时,本发明的化合物通过一个药学可接受的眼部载体输送,因而,化合物在眼睛表面停留足够长的时间使化合物渗透角膜和/或巩膜以及眼睛的内部结构,例如包括前房、后房、玻璃体、房水、玻璃体液、角膜、虹膜/睫毛(iris/ciliary's)、晶状体、脉络膜/视网膜和巩膜。药学可接受的眼部载体可以是软膏、植物油或胶囊材料。本发明的化合物也可以直接注射入玻璃体液或房水。

[0448] 此外,化合物也可以通过已知的可接受的方法给予,例如眼球下注射和/或结膜下注射。在眼部技术上已知的是,斑点主要包括在视网膜锥中,并位于视网膜最大视力区。眼球囊或眼球筋膜排列在巩膜上。结膜覆盖眼球的一小片区域,从眼球后部到膜(limbus,球结膜),并分别向上(上面的结膜穹窿)和向下(下面的结膜穹窿)折叠,从而覆盖上眼睑和下眼睑的内部区域。结膜排列在眼球囊上面。巩膜和眼球囊限定了眼球的外表面。治疗眼部疾病时,例如与年龄相关的黄斑退行性改变(AMD)(包括渗出性(湿)和非渗出性(干)),脉络膜新生血管、视网膜病(例如糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病)、糖尿病性黄斑水肿、视网膜炎、眼色素层炎、囊样黄斑水肿(CME)、青光眼和眼部后段的其它疾病或症状,优选在巩膜外表面和眼球囊下面直接形成眼部可接受药用活性试剂的特定剂量储备。此外,在治疗与年龄相关的黄斑退行性改变(AMD)(包括渗出性(湿)和非渗出性(干)AMD)和CME时,最好在在巩膜外表面、眼球囊下面并通常在斑点上面直接形成储备。

[0449] 化合物可形成储备制剂。这种长效制剂可通过肌肉注射或上述的眼球下注射或玻璃体内注射植入给药(例如皮下或肌肉)。或者,活性成分以粉末形式存在,使用前用适当的载体如无菌无热原水溶解。

[0450] 在本发明特别优选的具体实施方式中,化合物制备成局部给药,以盐(联合眼部制剂普遍使用的任一种防腐剂和抗微生物剂)和滴眼液的形式给予。溶液或混悬液制备成纯净形式,每天给药数次。或者,上述制备的本发明合剂也可以直接用于角膜。

[0451] 在优选的具体实施方式中,合剂用一种结合于角膜的粘膜粘着剂聚合物进行制备。因此,化合物例如可以与多聚物或疏水材料(例如,在可接受油中的乳剂)或离子交换树脂形成制剂,或形成微溶衍生物例如微溶的盐。

[0452] 用于疏水化合物的药用载体是一个潜溶剂系统,包括苯甲醇、一种非极性表面活性剂、一种可与水混溶的有机聚合物和一个水相。潜溶剂系统可以是VPD潜溶剂系统。VPD是一种溶液,含有3%w/v苯甲醇,8%w/v非极性表面活性剂吐温80,和65%w/v聚乙二醇300,溶于无水乙醇。VPD潜溶剂系统(VPD:5W)包括用5%葡萄糖水溶液1:1稀释的VPD。潜溶剂系统可溶解疏水性化合物,并在全身用药时产生低毒性。通常,潜溶剂系统的比例在不明显破坏其溶解性和毒性特征时可发生变化。此外,潜溶剂成分可发生变化:例如,其它低毒性的非极性表面活性剂可替代吐温80;聚乙二醇的比例可改变;其它生物相容的聚合物可替代聚乙二醇,例如聚乙烯吡咯酮;以及其它糖或多糖可替代葡萄糖。

[0453] 或者,可以利用疏水性药用化合物的其它递药系统。脂质体和乳剂是疏水性药物已知的输送介质或载体。也可以利用特定的有机溶剂,例如二甲基亚砜,但通常产生更大的毒性。此外,化合物可利用持续释放系统输送,例如含有治疗药物的固体疏水多聚物的半渗透性基质。已经确定了多种持续释放材料,并在技术上已知。持续释放胶囊可根据其化学性质在数周直至100天以上的时间内释放化合物。根据治疗药物的化学性质和生物稳定性,可以采用其它蛋白稳定策略。

[0454] 药物组合物也可包括适当的固相或水相载体或辅料。这些载体或辅料例如包括碳酸钙、磷酸钙、糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物例如聚乙二醇。

[0455] 任何形成制剂的合剂可用于患者。本发明的患者优选为哺乳动物，更优选人类。

[0456] 药用制剂在此可进一步包括一种治疗试剂，选自：抗肿瘤药、抗炎药、抗菌药、抗病毒药、血管生成药和抗血管生成药。这些试剂的例子显示于此。

[0457] 例如，抗肿瘤药可选自盐酸阿考达唑、阿克罗宁、阿多来新、阿地白介素、六甲密胺、安波霉素、醋酸阿美蒽醌(Ametantrone Acetate)、氨鲁米特、安吡啶、阿纳托司唑、安曲霉素、门冬酰胺酶、曲林菌素、氮杂胞苷、氮替派、固氮霉素、巴马司他、苄替派、比卡鲁胺、盐酸比生群、双奈法德双敏使朗(Bisnafide Dimesylate)、比折来新、硫酸博来霉素、布喹那钠、溴匹立明、白消安、放线菌素C(Cactinomycin)、卡普唑酮、卡醋胺、卡贝替姆、碳铂、卡氮芥、盐酸卡柔比星、盐酸卡柔比星、西地芬戈、苯丁酸氮芥、西罗里霉素、顺铂、克拉屈滨、克立那托敏使朗(Crisnatol Mesylate)、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯咪胺、更生霉素、盐酸柔红霉素、地西他滨、右奥马铂、地扎呱宁、地扎呱宁敏使朗(Dezaguanine Mesylate)、地吡醌、多西他奇、阿霉素、盐酸阿霉素、屈洛昔芬、柠檬酸屈洛昔芬、丙酸甲雄烷酮、偶氮霉素、依达曲沙、盐酸依洛尼塞、依沙芦星、恩洛铂、苯环丙炔酯、双环氧哌啶、盐酸表柔比星、厄布洛唑、盐酸依索比星、磷雌氮芥、雌氮芥磷酸钠、依他硝唑、乙碘油I 131、鬼臼乙叉甙、磷酸鬼臼乙叉甙、氯苯乙啶胺、盐酸法罗唑啉、法扎拉滨、芬维A胺、氟尿苷(Floxuridine)、磷酸氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟环胞苷、磷唑酮、福司曲星钠、吉西他滨、盐酸吉西他滨、金Au 198(Gold Au 198)、羟基脲、盐酸伊达比星、异磷酰胺、因氟新(Imofosine)、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n1、干扰素 α -n3、干扰素 β -1a、干扰素 γ -1b、异丙铂、盐酸依立替康、醋酸兰瑞肽、来曲唑、醋酸亮丙瑞林、盐酸利阿唑、洛美曲索钠、罗莫司丁、盐酸洛索蒽醌、马丙考、美登素、氮芥、醋酸甲地孕酮、醋酸甲地孕酮、美法仑、美诺立尔、巯嘌呤、丝裂吉菌素、丝裂马菌素、丝裂霉素C、丝裂帕菌素、米托坦、盐酸米托蒽醌、霉酚酸、噻氮酯吡唑、诺加霉素、奥马铂、亚磺酰吡啶、紫杉醇、天门冬酰胺酶、佩利霉素、溴新斯的明、硫酸培来霉素、过磷酰胺、溴丙哌嗪、噻消安、盐酸吡罗蒽醌、光神霉素、普洛美坦、吡吩姆钠、泊非霉素、泼尼莫司汀、盐酸甲基苄肼、嘌呤霉素、盐酸嘌呤霉素、吡唑咪喃菌素、异戊烯腺苷、洛太米特、沙芬戈、盐酸沙芬戈、甲环亚硝脲、辛曲秦、磷乙酰天冬氨酸钠、稀疏霉素、盐酸螺旋锗、螺莫司汀、顺螺铂、链黑霉素、链唑霉素、氯化锶Sr 89(Strontium Chloride Sr 89)、磺氯苯脲、他利霉素、紫杉烷(Taxane)、紫杉烷(Taxoid)、替可加兰钠、喃氟啶、盐酸替洛蒽醌、替莫泊芬、鬼臼噻吩甙、替罗昔隆、睾内酯、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤、塞替派、噻唑咪林、替拉扎明、盐酸拓扑替康、枸橼酸托瑞米芬、曲托龙(Trestolone Acetate)、磷酸曲西立滨、曲美沙特、曲美沙特葡萄糖醛酸(Trimetrexate Glucuronate)、曲普瑞林、盐酸妥布氯唑、尿嘧啶氮芥、尿烷亚胺、伐普肽、维替泊芬、硫酸长春碱(Vinblastine Sulfate)、硫酸长春新碱、长春碱酰胺、硫酸长春碱酰胺、硫酸长春匹定、硫酸长春甘酯、硫酸环氧长春碱、酒石酸长春瑞滨、硫酸异长春碱、硫酸长春利定、伏氯唑、折尼拉汀、新制癌菌素、盐酸佐柔比星。

[0458] 抗血管生成药是任何能抑制血管的试剂，在此公开或技术上已知的。在一个优选的具体实施方式中，抗血管生成药是抗VEGF试剂如Macugen™(Eyetechnology, New York, NY)，或抗VEGF抗体。

[0459] 药物组合物可通过标准技术形成制剂，利用一种或多种适当的载体、辅料和稀释

剂。例如见Remington's Pharmaceutical Sciences, (19th Ed. Williams & Wilkins, 1995) (以引用的方式并入本文中, 用于各种目的)。

[0460] 适合胃肠道外给药的制剂包括与目的受者血液等渗的水性和非水性制剂; 以及水性和非水性无菌混悬剂, 可包括混悬系统, 使化合物靶向血液成分或者一个或多个器官。制剂可存在于单元剂量或多剂量密封容器, 例如安瓿或玻璃瓶。对于眼内制剂, 优选单元剂量, 因为制剂中不存在任何防腐剂。对于其它肠道外制剂, 考虑到多剂量容器, 可以使用防腐剂。

[0461] 可制备临时注射溶液或混悬液, 例如来自无菌粉末。胃肠道外制剂和静脉注射制剂也可包括矿物质和其它物质, 使其与选择的注射类型或递药系统相匹配。

[0462] 本发明关注的特定胃肠道外给药包括眼球内和玻璃体内眼部给药。眼球内和玻璃体内给药的制剂配方包括磷酸盐缓冲液(PBS)和等渗平衡盐溶液(BSS), 有或无辅料, 例如作为蛋白稳定剂的甘露醇或山梨醇。

[0463] 通常, 水、合适的油、盐、水溶右旋糖(葡萄糖)或相关的糖溶液和二醇类(glycols)例如丙二醇或聚乙二醇是胃肠道外溶液的合适载体。胃肠道外给药的溶液优选包括活性成分的水溶性盐, 合适的稳定剂以及在需要时, 包括缓冲物质。抗氧化剂, 例如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠或维生素C, 可单独或联合用作适当的稳定剂。也可以使用其柠檬酸盐或EDTA钠。此外, 胃肠道外溶液可含有防腐剂, 例如氯化苯甲羟胺、甲基或对羟基苯甲酸丙酯、或三氯叔丁醇。适当的药用载体描述于上面引用的配方。

[0464] 在此处任一具体实施方式中, 此处的合剂或药用制剂可低压冻干。

[0465] 在此处任一具体实施方式中, 药用制剂每克治疗试剂中优选含有小于10单位左右的内毒素, 更优选小于5, 更优选小于3或更优选小于1。

[0466] 在某些具体实施方式中, 在此公开的治疗方法进一步包括给予患有血管生成症状的患者一种或多种治疗试剂, 选自包括抗肿瘤药、抗病毒药、抗炎药、抗菌药、血管生成药或抗血管生成药的群组。

[0467] 这种联合疗法得以完成, 可通过给予患者含有此处的合剂和其它治疗试剂的共制剂, 或者此处的合剂和治疗试剂作为两个独立的药用制剂给予。在一种以上合剂/治疗试剂被给予患者的具体实施方式中, 可利用更低剂量的合剂和/或治疗试剂, 这是两种活性成分的协同效应导致的。

[0468] 可用于患者的抗肿瘤药包括但不限于盐酸阿柔比星、盐酸阿考达唑、阿克罗宁、阿多来新、阿地白介素、六甲密胺、安波霉素、醋酸阿美蒽酮(Ametantrone Acetate)、氨鲁米特、安吡啶、阿纳托司唑、安曲霉素、门冬酰胺酶、曲林菌素、氮杂胞苷、氮替派、固氮霉素、巴马司他、苄替派、比卡鲁胺、盐酸比生群、双奈法德双敏使朗(Bisnafide Dimesylate)、比折来新、硫酸博来霉素、布喹那钠、溴匹立明、白消安、放线菌素C(Cactinomycin)、卡普唑酮、卡醋胺、卡贝替姆、碳铂、卡氮芥、盐酸卡柔比星、盐酸卡柔比星、西地芬戈、苯丁酸氮芥、西罗里霉素、顺铂、克拉屈滨、克立那托敏使朗(Crisnatol Mesylate)、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯咪胺、更生霉素、盐酸柔红霉素、地西他滨、右奥马铂、地扎呱宁、地扎呱宁敏使朗(Dezaguanine Mesylate)、地吡酮、多西他奇、阿霉素、盐酸阿霉素、屈洛昔芬、柠檬酸屈洛昔芬、丙酸甲雄烷酮、偶氮霉素、依达曲沙、盐酸依洛尼塞、依沙芦星、恩洛铂、苯环丙炔酯、双环氧哌啶、盐酸表柔比星、厄布洛唑、盐酸依索比星、磷雌氮芥、雌氮芥磷酸钠、依他硝唑、

乙碘油I 131、鬼臼乙叉甙、磷酸鬼臼乙叉甙、氯苯乙嘧啶、盐酸法罗唑啉、法扎拉滨、芬维A胺、氟尿苷(Floxuridine)、磷酸氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟环胞苷、磷喹酮、福司曲星钠、吉西他滨、盐酸吉西他滨、金Au 198(Gold Au 198)、羟基脲、盐酸伊达比星、异磷酰胺、Imofosine、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n1、干扰素 α -n3、干扰素 β -1a、干扰素 γ -1b、异丙铂、盐酸依立替康、醋酸兰瑞肽、来曲唑、醋酸亮丙瑞林、盐酸利阿唑、洛美曲索钠、罗莫司丁、盐酸洛索萘醌、马丙考、美登素、氮芥、醋酸甲地孕酮、醋酸甲地孕酮、美法仑、美诺立尔、巯嘌呤、丝裂吉菌素、丝裂马菌素、丝裂霉素C、丝裂帕菌素、米托坦、盐酸米托萘醌、霉酚酸、噻氨酯吡唑、诺加霉素、奥马铂、亚磺酰吡啶、紫杉醇、天门冬酰胺酶、佩利霉素、溴新斯的明、硫酸培来霉素、过磷酰胺、溴丙哌嗪、噻消安、盐酸吡罗萘醌、光神霉素、普洛美坦、吡吩姆钠、泊非霉素、泼尼莫司汀、盐酸甲基苄肼、嘌呤霉素、盐酸嘌呤霉素、吡唑呋喃菌素、异戊烯腺苷、洛太米特、沙芬戈、盐酸沙芬戈、甲环亚硝脲、辛曲素、磷乙酰天冬氨酸钠、稀疏霉素、盐酸螺旋锳、螺莫司汀、顺螺铂、链黑霉素、链唑霉素、氯化锶Sr 89(Strontium Chloride Sr 89)、磺氯苯脲、他利霉素、紫杉烷(Taxane)、紫杉烷(Taxoid)、替可加兰钠、喃氟啶、盐酸替洛萘醌、替莫泊芬、鬼臼噻吩甙、替罗昔隆、睾内酯、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤、塞替派、噻唑呋林、替拉扎明、盐酸拓扑替康、枸橼酸托瑞米芬、曲托龙(Trestolone Acetate)、磷酸曲西立滨、曲美沙特、曲美沙特葡萄糖醛酸(Trimetrexate Glucuronate)、曲普瑞林、盐酸妥布氯唑、尿嘧啶氮芥、尿烷亚胺、伐普肽、维替泊芬、硫酸长春碱(Vinblastine Sulfate)、硫酸长春新碱、长春碱酰胺、硫酸长春碱酰胺、硫酸长春匹定、硫酸长春甘酯、硫酸环氧长春碱、酒石酸长春瑞滨、硫酸异长春碱、硫酸长春利定、伏氯唑、折尼拉汀、新制癌菌素、盐酸佐柔比星。

[0469] 可用于患者的抗菌药包括但不限于青霉素类、氨基糖甙类、大环内酯类、单酰胺菌素类、利福霉素类、四环素类、氯霉素、克林霉素、林可霉素、亚胺培南、夫西地酸、新生霉素、磷霉素、夫西地酸钠、新霉素、多粘菌素、卷曲霉素、多粘菌素(粘菌素M,colistimethate)、可立其丁(粘菌素E,colistin)、短杆菌肽、米诺环素、脱氧土霉素、万古霉素、杆菌肽、卡那霉素、庆大霉素、乙琥红霉素和先锋霉素类

[0470] 可用于患者的抗炎药包括但不限于NSAIDS(例如阿司匹林(水杨酰胺)、水杨酰胺钠、吲哚布洛芬、吲哚美辛、吲哚美辛钠三水合物(sodiumindomethacin trihydrate)、贝螺杀™、巴非林™、西乐葆™、双氯芬酸、Ecotrin™、双氟尼酸、非诺洛芬、甲氧萘丙酸、舒林酸、万络™)、皮质激素或促肾上腺皮质激素(ACTH)、秋水仙碱和醋酸阿奈可他。

[0471] 可用于患者的抗病毒药包括但不限于 α -甲基-P-金刚烷甲胺、1,-D-呋核亚硝脲-1,2,4-三唑-3-三唑、9-[2-羟基-乙氧基]甲基鸟嘌呤、金刚烷胺、5-碘-2'-脱氧尿苷、三氟胸苷、干扰素、阿糖腺苷、CD4、3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)、9-(2-羟乙氧甲基)-鸟嘌呤(阿昔洛维)、磷酸三钠甲酸盐、1-金刚烷胺、多肽引(peptide T)和2',3'-双脱氧胞苷。

[0472] 本发明合剂给予体内靶细胞可通过所属领域技术人员已知的多种技术中的一种来完成。

[0473] 例如,本发明合剂可通过技术上已知的方法系统给药或局部给药(例如口服、眼球内、血管内(i.v.)、皮内、肌内、经皮、经粘膜、肠道、肠道外、通过吸入喷雾、经直肠或局部给药),以单元剂量的形式,并包括常规的药学可接受的载体、辅剂和介质。

[0474] 在此使用的术语眼球内包括玻璃体内、视网膜下等等。

[0475] 在此使用的术语胃肠道外包括皮下、静脉内、肌内、胸骨内、输注技术或腹膜内。直肠给药的栓剂可通过药物与一种合适的非灌注辅料混合得以制备,例如可可豆脂和聚乙二醇,其在室温下为固体,但在直肠温度下为液体,因而在直肠中融化并释放药物。

[0476] 利用本发明合剂治疗疾病或紊乱的给药方案是基于多种因素,包括疾病类型,患者的年龄、体重、性别、医学症状,症状的严重性,给药途径以及使用的特定化合物。因此,给药方案可发生变化,但可以用标准方法常规确定。

[0477] 对于全身用药,本发明抗ALK-1抗体或其抗原结合部分和/或一种或多种其它治疗试剂优选给药剂量为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150mg/kg体重。在其它具体实施方式中,此处多肽(优选二聚体或同型二聚体)和/或小分子的全身给药剂量为0.1-100mg/kg,0.5-50mg/kg更优选1-30mg/kg体重,或更优选5-20mg/kg。

[0478] 对于局部给药,本发明抗ALK-1抗体或其抗原结合部分和/或一种或多种其它治疗试剂优选给药剂量为至少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。在其它具体实施方式中,此处多肽(优选二聚体或同型二聚体)和/或小分子在每个位置的局部给药剂量为50-1000 μ g,更优选100-800 μ g,更优选200-500 μ g,或更优选300-400 μ g。

[0479] 例如,对于皮肤用药,本发明抗ALK-1抗体或其抗原结合部分和/或模拟肽(peptidomimetics)和/或一种或多种其它治疗试剂的给药剂量为50-1000 μ g/cm²,更优选100-800 μ g/cm²,或更优选200-500 μ g/cm²。再例如,对于眼部用药,本发明多肽和/或模拟肽(peptidomimetics)和/或小分子的给药剂量为50-1000 μ g/眼,更优选100-800 μ g/眼,或更优选200-500 μ g/眼。

[0480] 药物组合物优选包括活性成分(例如抗ALK-1抗体)的有效剂量,即,可获得有效治疗或预防效应的剂量。特定用法的实际有效剂量依赖于所治疗的症状和给药途径。确定有效剂量是在所属领域技术人员的能力范围之内,尤其在此处内容的帮助下。

[0481] 优选,活性成分例如抗ALK-1抗体的有效剂量为,患者每千克体重0.0001mg到500mg左右的活性试剂,更优选患者每千克体重0.001到250mg左右的活性试剂,更优选患者每千克体重0.01到100mg左右的活性试剂,更优选患者每千克体重0.5到50mg左右的活性试剂,以及最为优选患者每千克体重1到15mg左右的活性试剂。

[0482] 关于体重百分数,本发明制剂优选含有活性试剂例如抗ALK-1抗体的剂量为,更优选0.0001到10wt.%左右,更优选0.001到1wt.%左右,更优选0.05到1wt.%左右,或者更优选0.1到0.5wt.%左右。

[0483] 基因疗法

[0484] 编码本发明抗体或抗原片段的核苷酸分子可通过基因疗法用于其需要的患者。该疗法可以在体内或体外。在优选的具体实施方式中,编码一条重链和一条轻链的核苷酸分子可用于患者。在一个更优选的具体实施方式中,给予核苷酸分子使其稳定整合到B细胞的染色体上,因为这些细胞专门产生抗体。在一个优选的具体实施方式中,前体B细胞在体外转染或感染,并再植入其需要的患者。在另一个具体实施方式中,前体B细胞或其它细胞体外感染,用一种已知可感染目的细胞类型的病毒。用于基因疗法的典型载体包括脂质体、质粒和病毒载体。典型病毒载体有逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒。在体内或体外感染后,

抗体表达水平可通过获取治疗患者的样品进行监测,利用技术上已知的或本文描述的任一免疫测定法。

[0485] 在一个优选的具体实施方式中,基因治疗方法其步骤包括,给予编码抗ALK-1抗体重链或其抗原结合部分的分离的核苷酸分子,并表达核苷酸分子。在另一个具体实施方式中,基因疗法其步骤包括,给予编码抗ALK-1抗体轻链或其抗原结合部分的分离的核苷酸分子,并表达核苷酸分子。在一个更优选的方法中,基因治疗方法其步骤包括,给予编码抗ALK-1抗体重链或其抗原结合部分的分离的核苷酸分子和编码轻链或其抗原结合部分的分离的核苷酸分子,并表达核苷酸分子。基因治疗方法也可包括另一种治疗试剂的给药步骤,例如上述联合治疗中的任何一种试剂。

[0486] ALK-1拮抗剂或激动剂的筛选方法

[0487] 在一个具体实施方式中,本发明提供一种方法,用于测定一种物质是否抑制ALK-1某一特定下游靶基因Id1的上调,例如,Taqman分析Id1描述于实施例12中。方法包括用物质接触表达Id1的细胞样品,并测定Id1表达是否被抑制,其中,与对照细胞样品相比,Id1在接触物质的细胞样品中表达水平降低,表明该物质抑制Id1的表达。在一个特定的具体实施方式中,该物质是一个与ALK-1胞外域结合的抗体。在另一个具体实施方式中,该物质是一个小分子。根据本发明,细胞可同时固有表达ALK-1和Id1,例如HUVEC,描述于实施例12中,或者细胞已经转化或转染了其中一个或两个的编码DNA。可以确定Id1的表达,例如利用Taqman分析Id1,描述于实施例12中。

[0488] 相反,活化剂或激动剂也可以被试验或利用,根据相同的步骤。

[0489] 为了更好地理解本发明,给出了下面的实施例。这些实施例只作为说明,而不应逐字分析以任何方式限定本发明范围。

[0490] 实施例

[0491] 在下面的实施例和制备中,“MW”表示分子量;“His-Tag”表示C端的多组氨酸(6个组氨酸)标签,用于镍螯合树脂快速纯化和抗组氨酸(C端)抗体的检测;“BSA”表示牛血清白蛋白;“EDTA”表示乙二胺四乙酸;“DMSO”表示二甲基亚砷;“MOPS”表示3-(N-吗啉)丙磺酸;“MES”表示2-(N-吗啉)甲磺酸;“PBS”表示磷酸盐缓冲液;“dPBS”表示Dulbecco磷酸缓冲液;“HEMA”表示2-羟基-乙基异丁烯酸;“DMEM”表示Dulbecco改良的Eagle培养基;“FBS”表示胎牛血清;“NEAA”表示非必需氨基酸;“HEPES”表示N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-甲磺酸;以及“DMF”表示二甲替甲酰胺。

[0492] 实施例1. 制备ALK-1免疫原

[0493] ALK-1 ECD通过PCR从全长人ALK-1 ORF克隆(Invitrogen,克隆ID IOH21048)中克隆得到,利用上游引物5'-ACGGCCCAGCCGGCCGACCCTGTGAAGCCGTCT(SEQ ID NO:96)和下游引物5'-ACTAAGCTTTTAATGATGATGATGATGATGCTGGCCATCTGTTCCCG(SEQ ID NO:97)。纯化PCR产物,用SfiI/HindIII限制性内切酶处理,并克隆入哺乳动物表达载体pSecTag2/Hygro(Invitrogen公司,Catalog No.V910-20)的SfiI和HindIII位点。克隆用于瞬时转染293T细胞,利用Fugene 6转染试剂(罗氏,Catalog No.1814443),根据厂商的实验设计。在转染后72小时,收集含有其分泌的靶蛋白的细胞培养上清,并与Ni-NTA树脂(QIAGEN,Catalog No.30430)在4℃结合过夜。接着,树脂用缓冲液冲洗,其含有20mM Tris pH8.0,25mM咪唑和300mM氯化钠。His-Tag蛋白用缓冲液洗脱下来,其含有20mM Tris pH8.0,300mM咪唑和

300mM氯化钠。利用CM琼脂糖阳离子交换树脂在20mM磷酸钠(pH7.0)中进一步纯化蛋白,并收集未结合的部分,其含有靶蛋白。通过透析,将蛋白缓冲液更换成PBS或10mM HEPES,pH 7.4和150mM氯化钠,并浓缩至0.2-1mg/mL,最终纯度大于90%,通过考马斯蓝染色的SDS PAGE凝胶得以判断。ALK-1 ECD His-Tag蛋白被高度糖基化,表观分子量为26KDa,而蛋白的理论MW为11KDa。ALK-1 ECDHis-Tag protein(SEQ ID NO:98)已经用于产生杂交瘤,其产生抗ALK-1抗体,描述于实施例2中。

[0494] 人ALK-1ECD His-Tag蛋白:

[0495] 基因序列(小写字母部分是分泌信号):

[0496] atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtg

[0497] acgcgggcccagccggccGACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCGCTGGTGACCTGCACGTG

[0498] TGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAGTGCTGGTG

[0499] CGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACCTGCACAGGGAGCTCT

[0500] GCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCA

[0501] CAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCCTTCGGAGCAG

[0502] CCGGAACAGATGGCCAGCATCATCATCATCAT(SEQ ID NO:99)

[0503] 蛋白序列:

[0504] DPVKPSRGLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTWLVREEGRHPQEHRGCGNLHRELRCRGPTE

[0505] FVNHY CCDSHLCNHNVS LVLEATQPPSEQPGTDGQH HHHHHH(SEQ ID NO:98)

[0506] 实施例2.抗ALK-1抗体产生杂交瘤的产生

[0507] 8到10周龄的XENOMOUSE®小鼠在其后肢接受免疫,利用10μg/只小鼠的重组人ALK-1/Fc嵌合体(R&D Systems, Inc., Catalog Number370-AL)或实施例1描述的ALK-1 ECD His-Tag蛋白。该剂量在3到5周内重复5到7次。融合前3到4天,用溶于PBS的免疫原最后一次注射小鼠。来自免疫小鼠的淋巴结淋巴细胞与非分泌性骨髓瘤P3-X63-Ag8.653细胞系通过电细胞融合仪融合(ATCC Cat.No.CRL1580),接着,这些融合细胞接受HA-DMEM筛选,如上所述(DMEM/15%FBS/1%200mM L-谷氨酰胺/1%100X非必需氨基酸/1%100X青霉素/链霉素/10U/ml IL-6/1管/L OPI培养基补充物和0.5x HA(氮丝氨酸-次黄嘌呤, Sigma, Cat.# A9666))。收集一组杂交瘤,全部分泌ALK-1特异的人IgG2抗体。

[0508] ELISA用于检测抗体结合。用免疫原包被96孔免疫微量滴定板(NUNC-Immuno™ plate MaxiSorp™ surface, Nalge Nunc International, Cat.No.439454),以4μg/mL溶于50mM的碳酸氢钠缓冲液,4℃过夜。洗涤平板,接着用含有0.1%吐温20和0.5%牛血清白蛋白的PBS封闭。在封闭的ELISA平板中加入抗体,孵育1小时,用含有吐温20的PBS洗涤。结合的抗体通过抗人IgG辣根过氧化物酶(Pierce, CatalogNo.31420)继而加入ABTS(Pierce, Catalog No.37615)得以检测。比色法测定在405nm完成,利用酶标仪(SpectraMax Plus 384, MolecularDevices)。

[0509] 筛选了25株杂交瘤用于进一步研究。它们是通过有限稀释得到的单细胞克隆,命名为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和5.59.1。

[0510] 小鼠杂交瘤细胞系LN 15916(杂交瘤1.12.1)在2005年6月21日根据布达佩斯条约命名并保存于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Blvd.,Manassas,VA 20110-2209。(Mouse HybridomaCell line LN 15916(the hybridoma 1.12.1)was deposited under terms in accordance with the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection(ATCC),10801 University Blvd.,Manassas,VA 20110-2209 on June 21,2005.)杂交瘤1.12.1已经被指定为以下收藏号:PTA-6808。

[0511] 实施例3.抗ALK-1抗体的序列

[0512] 为了分析根据本发明产生的抗体的结构,核苷酸被克隆,其编码的重链和轻链片段来自于抗ALK-1单克隆抗体产生杂交瘤。根据标准方法完成克隆和测序。

[0513] 对于每个ALK-1抗体,Poly(A)⁺mRNA利用Fast-TrackTM试剂盒(Invitrogen)分离自 2×10^5 左右的杂交瘤细胞。利用随机引物,从mRNA合成cDNA。随机引物获得的cDNA用PCR进行扩增,利用人V_H或人V_K家族特异的可变区引物以及人C_γ 2恒定区或C_κ恒定区特异的引物来扩增抗体的可变区,包括所有框架区(FRs)和互补决定区(CDRs)。通过直接测定两条PCR产物的序列,获得核苷酸序列,其编码抗ALK-1产生杂交瘤的人重链和κ轻链转录本。序列分析利用Abgenix的所有者软件和免费获得的人V_H和V_K基因序列信息,“V碱基序列名录”(Tomlinson et al.,MRC Centre for Protein Engineering,Cambridge,UK)。相同的结果可以利用免费获得的序列比对软件来完成,通过所属领域技术人员利用MacVector和Geneworks软件程序。

[0514] 特别地,全长ALK-1抗体1.12.1被克隆入表达载体,如下:利用RNeasy Mini Kit(Qiagen)分离Poly(A)⁺mRNA,利用AdvantageRT-for-PCR试剂盒(BD Biosciences)和oligo(dT)引物从mRNA合成cDNA。Oligo(dT)引物获得的克隆1.12.1的cDNA利用表2列出的引物进行扩增。利用Pfu Ultra聚合酶(Stratagene)和PTC-200DNA Engine(MJ Research)完成扩增,循环如下:3',95℃;25x(20",95℃,30",52℃,1'20",72℃);10',72℃。克隆的序列验证利用Grills 16thBDTv3.1/dGTP化学(Applied Biosystems Inc)和3730xI DNA分析仪(Applied Biosystems Inc)完成。在处理克隆1.12.1V_H的过程中,在第8位的密码子上引入了一个沉默突变,“GGC”被转换成“GGT”。所有序列通过与“V碱基序列目录”的比对进行分析(Tomlinson,et al,J.Mol.Biol.,227,776-798(1992);Hum.Mol.Genet.,3,853-860(1994);EMBO J.,14,4628-4638(1995))

[0515] 表2

[0516] 用于克隆全长1.12.1的重链和轻链扩增引物

引物名称	引物序列	SEQ ID NO
4-61	5' tcttcaagcttgatattctctagaagccgccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCTCC3'	105
[0517] G1/2-FL-R	5' ttctctgatcagaattcctaCTATTACCCGGAGACAGGGAGAGGC3'	106
A11	5' tcttcaagcttcccgaggagccgccaccATGAAACCCAGCGCAGCTT3'	107
K-FL-R	5' ttctttgatcagaattctcaCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG3'	108

[0518] 用小写字母表示非杂交碱基

[0519] 实施例4.基因利用分析和CDR分析

[0520] 根据抗体的核苷酸序列和预期的氨基酸序列,可以鉴定每条抗体链的基因使用。

表3根据本发明给出了所选抗体杂交瘤克隆的基因利用。

[0521] 表3:重链和轻链基因利用

克隆	SEQ ID NO:	重链种系			SEQ ID NO:	κ 轻链种系	
		V _H	D _H	J _H		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
[0522] 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	V27	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
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

[0523] 克隆1.12.1的V_H(M29I)和V_κ(D19A)区的诱变是通过表4列出的引物和QuickChange试剂盒(Stratagene)根据厂商的实验设计得以完成。对突变变体的序列进行验证并通过标准程序克隆入表达载体。

[0524] 表4:诱变的寡核苷酸(从5'到3'):

引物	正义	反义
1. 12. 1	CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGG	CCTACAGGAGAGGGTGGCTCTTTCCCTGGAG
[0525] (D19A)	(SEQ ID NO: 109)	(SEQ ID NO: 110)
1. 12. 1	GGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGAATACTAC	GTAGTATTCACCACTGCTGATGGAGCCACC
(M29I)	(SEQ ID NO: 111)	(SEQ ID NO: 112)

[0526] 突变用黑体和下划线表示。

[0527] 编码1.12.1(M29I/D19A)抗体重链可变区(SEQ ID NO:5)和轻链可变区(SEQ ID:7)的核苷酸分子在2005年7月14日根据布达佩斯条约命名并保存于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209。保存的菌种已经被指定为下列收藏号:含有质粒pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_H(M29I):UC 25502的E.coli DH5α为ATCC

No.PTA-6864;含有质粒pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_K(D19A):UC25503的E.coli DH5α为ATCC No.PTA-6865。

[0528] 许多抗ALK-1特异性人抗体在重链可变区的CDR1上具有相同模式。这些前导分子利用4-31或4-61重链V基因片段。与这些抗体重链对应的FR1和CDR1序列显示在表4A中,与种系序列进行比对。比对中的短横线(-)表示与种系相同的残基。任何时候,CDR1末尾的GGYWS(SEQID NO:136)模式已经通过体细胞突变产生新的序列模式,其中,12个例子中有9个,其G残基变成一个酸性残基(D或E),而最后的S残基变成N。V_H其它区段的序列多样性表明,可能是独立的体细胞突变事件导致V_H的CDR1末尾出现相同的序列模式。

[0529] 表4A

[0530] ALK-1抗体重链序列模式

克隆	V-基因	D-基因 生殖系	J-基因	FR1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS (SEQ ID NO: 122)	CDR1 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	-----I-----	----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

[0531]

				QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS(SEGGSVSSGGYYWS Q ID NO: 124)	(SEQ ID NO: 125)
1.13.1	VH4-61	D6-19	JH4B	--H-----	----D--N
1.14.1	VH4-61	D6-19	JH4B	-----	----D--N

[0532] 实施例5.制备1.12.1Fab分子

[0533] 1.12.1(M29I/D19A)Fab片段的制备是通过番木瓜蛋白酶水解1.12.1(M29I/D19A) IgG1获得。经蛋白酶A纯化的全长1.12.1(M29I/D19A) IgG1与番木瓜蛋白酶(VWR)以1:50的比例(番木瓜蛋白酶:蛋白)在含有30mM磷酸钠(pH 7.0)、2mM EDTA和2mM半胱氨酸的缓冲液中37℃孵育2-3小时。接着,酶切混合物用蛋白A小柱去除其中未酶切的全长蛋白和Fc片段。未结合的Fab在通过柱子的液体中被收集。其后,利用体积排阻柱(Superdex 200,

AmershamPharmacia Biotech)进一步纯化Fab蛋白并将缓冲液更换成PBS。蛋白溶液先后通过Detoxi凝胶(PIERCE)和Vivapure Mini Q离子交换柱(VivaScience),从而去除内毒素。蛋白用0.2 μ m的注射器式滤器过滤,并用LAL鲎热原试剂盒(Cambrex)检测内毒素水平。纯化蛋白的终浓度为2-3mg/mL,内毒素水平小于0.1EU/mg,纯度大于95%。1.12.1(M29I/D19A) Fab片段在非还原状态下经电子喷雾质谱法显示,其分子量为47,347。Edman N端序列分析分别证实轻链N端序列为EIVLTQSPG(SEQ ID NO:113)以及重链序列为QVQLQESG(SEQ ID NO:114)。

[0534] 实施例6.利用BIAcore™通过表面等离子共振技术(SPR)测定全长抗ALK-1人单克隆抗体的亲和力值

[0535] 根据厂商的实验设计利用BIAcore™3000仪器通过表面等离子共振技术测定抗ALK-1抗体的亲和力,如下所述。

[0536] 为完成动力学分析,重组人ALK-1/Fc融合蛋白(hALK-1/Fc)和短尾猴ALK-1/Fc融合蛋白(cALK-1/Fc)利用常规胺偶联固定在CM5BIAcore传感器芯片的流动细胞上。表面的制备利用pH5.0的10mM醋酸盐缓冲液作为缓冲液,hALK-1/Fc和cALK-1/Fc融合蛋白的蛋白浓度分别达到300和150RU。利用pH 8.5的1M乙醇胺灭活惰性N-羟基琥珀酰亚胺酯。制备流动缓冲液中的抗体样品,浓度范围为0.125到2nM(包括只含有流动缓冲液的0nM溶液,作为空白对照)。样品随机化并注射10分钟,设置2个平行,每个样品都通过4组流动细胞,HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20)作为流动缓冲液。(Samples were randomized and injected induplicate for 10minutes each across all 4 flow cells using HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005% SurfactantP20)as running buffer.)观察到结合速率不依赖于流速,从1到100 μ L/min,这表明不存在物质传递限制。(On-rates were observed tobe independent of flow rates from 1 to 100 μ L/min indicating nomass transport limitation.)利用25 μ L/min的流速测定亲和力值。监测抗体解离10分钟,表面通过注射100mM H₃PO₄(25 μ L/min)12秒得以再生。原始数据利用Scrubber(©BioLogic Software)软件包进行处理,并用CLAMP(©BioLogic Software)软件包进行分析。来自单个表面的多个数据组以及同一个时间点的6个数据组,利用相同的变量R_{max}值,同时整体拟合成简单1:1 Langmuir结合模型。表5列出了本发明代表性抗ALK-1抗体的亲和力值。代表性数据表明,根据本发明制备的抗体对人ALK-1具有高亲和力和强结合常数。

[0537] 表5

[0538] 通过表面等离子技术(BIAcore)测定亲和力值

克隆	hALK-1/Fc 亲和力 (pM)	hALK-1/Fc K _{off} (1/s)	cALK-1/Fc 亲和力 (pM)
1. 12. 1 (M29I/D19A)	< 6. 8	$< 5. 0 \times 10^{-6}$	27
1. 14. 2	76	$5. 6 \times 10^{-5}$	280
1. 27. 3	2. 9	$1. 9 \times 10^{-5}$	60
1. 31. 1	< 13	$< 5. 0 \times 10^{-6}$	150
1. 162. 1	18	$1. 1 \times 10^{-5}$	62
[0539] 1. 183. 2	220	$3. 1 \times 10^{-5}$	1800
4. 24. 2	70	$4. 4 \times 10^{-5}$	430
4. 38. 1	100	$4. 0 \times 10^{-5}$	150
4. 58. 2	40	$1. 6 \times 10^{-5}$	130
4. 62. 1	9. 6	$7. 6 \times 10^{-6}$	19
4. 68. 2	86	$3. 8 \times 10^{-5}$	320
4. 72. 2	73	$3. 4 \times 10^{-5}$	280
5. 13. 3	91	$6. 3 \times 10^{-5}$	190

[0540] 1.12.1(M29I/D19A)涉及作为含两个特定氨基酸突变(重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代以及轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代)的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0541] 实施例7.利用BIAcore™通过表面等离子共振技术(SPR)测定全长抗ALK-1人单克隆抗体1.12.1的亲合常数(K_D)

[0542] 根据厂商的实验设计利用BIAcore™ 3000仪器通过表面等离子共振技术测定纯化的抗ALK-1抗体的亲和力,如下所述。

[0543] 为完成动力学分析,抗ALK-1人单克隆抗体1.12.1变体利用常规胺偶联固定在CM5生物传感器芯片的葡聚糖上。表面的制备利用pH5.0的10mM醋酸盐缓冲液作为固定缓冲液,蛋白浓度达到3500到4800RU。利用pH 8.5的1M乙醇胺灭活惰性N-羟基琥珀酰亚胺酯。制备流动缓冲液中的单体ALK-ECD样品,浓度范围为2.63到640nM(包括只含有流动缓冲液的0nM溶液,作为空白对照)。样品随机化并注射2分钟,每个样品都通过4组流动细胞,HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20)作为流动缓冲液。(Samples were randomized and injected for 2 minutes each across all 4 flowcells using HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005% Surfactant P20) as running buffer)。利用25μL/min的流速测定亲和常数。监测单体ALK-ECD解离10分钟,表面通过注射100mM H₃PO₄(25μL/min)12秒得以再生。原始数据利用Scrubber(©BioLogic Software)软件包进行处理,并用CLAMP(©BioLogic Software)软件包进行分析。数据被整体拟合简单1:1 Langmuir结合模型。表6列出了本发明抗ALK-1人单克隆抗体1.12.1变体的亲和力测定结果。

[0544] 表6

[0545] 通过表面等离子技术(BIAcore)测定mAb1.12.1变体的亲和常数K_D

	抗体	结合速率 ($M^{-1}s^{-1}$)	解离速率 (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
[0546]	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

[0547] *用2个独立的表面测得1.12.1(M29I/D19A)的(1)和(2)的2个亲和常数。

[0548] 1.12.1指分离自杂交瘤mAb 1.12.1变体。

[0549] 1.12.1(rWT)是作为表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0550] 1.12.1(M29I)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代。

[0551] 1.12.1(D19A)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代。

[0552] 1.12.1(M29I/D19A)是作为含两个特定氨基酸突变(重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代以及轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代)的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0553] 实施例8.利用BIAcore™通过表面等离子共振技术(SPR)测定抗ALK-1代表性人单克隆抗体的亲和常数(K_D)

[0554] 根据厂商的实验设计利用BIAcore™ 3000仪器通过表面等离子共振技术测定纯化的抗ALK-1抗体的亲和力(K_D 和 K_{off}),如下所述。

[0555] 为完成动力学分析,亲和纯化的mAbs利用常规胺偶联固定在CM5生物传感器芯片的葡聚糖上。表面的制备利用pH5.0的10mM醋酸盐缓冲液作为固定缓冲液,蛋白浓度达到200-400RU。利用pH 8.5的1M乙醇胺灭活惰性N-羟基琥珀酰亚胺酯。制备流动缓冲液中的单体ALK-ECD样品,浓度范围为3.125-400nM(包括只含有流动缓冲液的0nM溶液,作为空白对照)。样品随机化并注射2分钟,设置2个平行,每个样品都通过4组流动细胞,HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20)作为流动缓冲液。(Samples wererandomized and injected in duplicate for 2 minutes each acrossall 4 flow cells using HBS-EP(10mM HEPES pH 7.4,150mM NaCl,3mM EDTA,0.005%Surfactant P20)as running buffer)。观察到结合速率不依赖于流速,从1到100 μ L/min,这表明不存在物质传递限制。(On-rates were observed to be independent of flow ratesfrom 1 to 100 μ L/min indicating no mass transport limitation.)利用25 μ L/min的流速测定亲和常数。监测单体ALK-ECD解离10分钟,表面通过注射100mM H_3PO_4 (25 μ L/min)12秒得以再生。原始数据利用Scrubber(©BioLogic Software)软件包进行处理,并用CLAMP(©BioLogic Software)软件包进行分析。数据被整体拟合成简单1:1Langmuir结合模型。表7列出了本发明抗ALK-1代表性抗体的亲和力测定结果。

[0556] 表7

[0557] 通过表面等离子技术(BIAcore)测定代表性单克隆抗体的亲和常数 K_D

	mAb	结合速率 ($M^{-1}s^{-1}$)	解离速率 (s^{-1})	K_D (nM)
	1.12.1 (M29I/D19A)	3.3×10^4	8.2×10^{-4}	25
[0558]	1.31.1	3.2×10^4	1.9×10^{-4}	6.0
	4.72.1	3.2×10^4	2.5×10^{-5}	0.8
	Fab 1.12.1 (M29I/D19A)	3.8×10^4	8.2×10^{-4}	22

[0559] 产生实施例8数据的单体ALK-ECD不同于产生实施例7数据的单体ALK-ECD。

[0560] 1.12.1(M29I/D19A)是作为含两个特定氨基酸突变(轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代以及重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代)的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0561] Fab 1.12.1(M29I/D19A)是mAb 1.12.1(M29I/D19A)的Fab片段,通过番木瓜蛋白酶水解1.12.1(M29I/D19A)IgG1获得。

[0562] 实施例9. 鉴定抗ALK-1抗体的抗原表位选择性

[0563] 交叉竞争实验是根据厂商的实验设计利用BIAcore™ 3000仪器(Biacore International AB,Uppsala,Sweden and Piscataway,N.J)完成。

[0564] 重组人ALK-1/Fc嵌合体利用常规胺偶联固定在CM5生物传感器芯片的葡聚糖上。芯片的制备利用pH5.0的10mM醋酸盐缓冲液作为固定缓冲液,蛋白浓度达到940RU。利用pH 8.5的1M乙醇胺灭活惰性N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0565] 纯化的mAbs用HBS-EP流动缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15MNaCl,3mM EDTA,0.005%吐温20)稀释成50nM的浓度。选取第一抗体,并注射通过流动细胞,持续600秒,速率10 μ L/min。在注射完成后,选取第二抗体,并注射通过相同的流动细胞,持续600秒,速率10 μ L/min。感受器表面通过注射100mM H₃PO₄(25 μ L/min)12秒得以再生。

[0566] 再生后,第一抗体再次注射通过流动细胞,持续600秒,速率10 μ L/min。在注射完成后,选取不同的第二抗体,并注射通过相同的流动细胞,持续600秒,速率10 μ L/min。14个抗体作为第二抗体使用,全部完成后,选取一个新的第一抗体,并用该新的第一抗体重复上述过程。重复这些过程,直到第一和第二抗体的所有可能组合都已经注射通过流动细胞。如果两种抗体注射后观察到的总反应超过两者可能的阈值,那么,认为第二抗体发生了结合。阈值的测定是利用相同的抗体同时作为第一抗体和第二抗体。如表8所示,设立一个反应矩阵,依赖于是否观察到结合:-表示未结合第二抗体,x表示观察到结合(其反应大于单个抗体的阈值)。对表现出相同反应模式的克隆进行归组,从而产生2个不同抗原表位框,1.11.1在一个框中,而其它所有抗体在另一个框中。

[0567]

表 8. BIAcore 抗原表位框并反应矩阵 (BIAcore epitope binning response matrix)

第一抗体	第二抗体													
	1.9.1	1.11.1	1.12.1 Q291/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 Q291/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	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0568] 实施例10.分离短尾猴ALK-1基因

[0569] 短尾猴(“Cyno”)ALK-1基因提取自短尾猴肺组织。根据公开的人ALK-1基因序列(Genebank record L17075),设计引物,用于PCR扩增全长短尾猴ALK-1。利用mRNA纯化试剂

盒(Ambion,Catalog No.1915)根据厂商的实验设计从冻存的离体短尾猴组织(ca.1g)制备 mRNA。200ng的mRNA被逆转录,并用OneStep RT-PCR试剂盒(Qiagen,Catalog No.210210) PCR扩增,利用基因特异的引物:5'-AGCGGGCCCAGAGGGACC**ATG** (Seq ID NO:115)(上游)和 5'-CAGAAAGGAATCAGGTGCTCCTGG**CTA** (Seq ID NO:116)(下游),退火温度为61℃。适当大小 (~1.5Kb)的RT-PCR产物在电泳后从0.9%琼脂糖凝胶上切取并纯化,接着TOPO-TA克隆入 pCR4-TOPO载体(Invitrogen,Catalog No.K4575-01)。插入片段经测序验证后,具有短尾猴 ALK-1的ORF核苷酸序列。核苷酸序列和翻译后预期的氨基酸序列分别在SEQ ID NO:93和94 中给出。基因的细胞质部分编码相同的短尾猴和人蛋白序列,但是,在蛋白的胞外域(ECD, 包括22-118位)中存在5个不同氨基酸,在跨膜区存在1个不同氨基酸。人和短尾猴之间的 ECD序列同一性为94.8%。人和灵长类ECD的比对在图2中给出。

[0570] 将一对引物(上游:5'-GATTATGGCCTTGGGCTCCCCCAGGAAA(Seq ID NO:117))和下游:5'-GGGCTATTGAATCACTTTAGGCTTCTCTGGACTGTTG(Seq ID NO:118))用于PCR扩增全长短尾猴ALK-1基因。

[0571] 实施例11.通过流式细胞术(FACS)测定细胞表面结合特征和灵长类交叉杂交

[0572] 为产生可利用流式细胞术(FACS)检测抗ALK-1结合亲和力的ALK-1过表达细胞系, 人、短尾猴和大鼠的全长ALK-1基因被分别克隆入Invitrogen的pcDNA5/FRT/To TOPO (Catalog No.K6510-20),并转染入293 Flp-In T-Rex宿主细胞(Invitrogen,Catalog No.R780-07)。用潮霉素进行筛选,从而获得最终的稳定细胞系。代表性全长ALK-1蛋白的过表达是通过四环素(2μg/mL)得以实现,37℃/5%CO₂孵育24小时。

[0573] 用FACS测定抗ALK-1mAbs对细胞表面ALK-1的结合亲和力,利用ALK-1蛋白过表达的293稳定细胞。细胞用胰酶-EDTA消化,并用冰冷的PBS-SA洗涤。细胞被铺到96孔板以后, 用血清进行封闭,并与不同浓度的特异性mAb在4℃孵育1小时。接着,洗涤细胞,并与连接了 R-PE荧光基团的抗人κ第二抗体孵育,其后用FACSCalibur流式细胞仪(BDBiosciences)进行分析。在不设定门的条件下,每个样品收集10,000个细胞。如表9所示,每个样品直方图的几何平均值对mAb浓度作图,并在拟合成两状态平衡模型(two-state equilibrium model) 后计算每个mAb的K_D。人和灵长类相当的FACS实验实施例在图3中给出。

[0574] 表9

[0575] FACS测得的抗ALK-1单克隆抗体对细胞表面人或短尾猴ALK-1的平均结合亲和力 (K_D)结果

抗体	K_D (nM)	
	人	短尾猴
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

[0577] 此外,FACS分析显示1.12.1与大鼠存在非常有限的交叉结合($K_D > 100\text{nM}$),并且,由于大鼠/人和小鼠/人ALK-1之间的ECD序列同一性分别为74%和68%,预期1.12.1与小鼠存在非常低的交叉结合。

[0578] FACS也用于测定重组1.12.1mAb变体的 K_D 。如表10所示,结果表示与重组抗体相似的结合亲和力。

[0579] 表10

[0580] FACS测得的1.12.1(M29I/D19A)变体对细胞表面人或短尾猴ALK-1的平均结合亲和力和(K_D)结果

抗体	K_D (nM)	
	人	短尾猴
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

[0582] 1.12.1是mAb 1.12.1变体,分离自杂交瘤。

[0583] 1.12.1(rWT)是作为表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0584] 1.12.1(M29I)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代。

[0585] 1.12.1(D19A)是作为含单个特定氨基酸突变的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体,其中轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代。

[0586] 1.12.1(M29I/D19A)是作为含两个特定氨基酸突变(重链29位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代以及轻链19位的天门冬氨酸被丙氨酸取代)的表达的重组mAb的mAb 1.12.1变体。

[0587] Fab 1.12.1(M29I/D19A)是mAb 1.12.1(M29I/D19A)的Fab片段,通过番木瓜蛋白酶水解1.12.1(M29I/D19A)IgG1获得。

[0588] 实施例12.Taqman分析Id1

[0589] HUVECs(Biowhittaker,Cat.#CC-2519)被铺在24孔板上,12000个细胞/孔,用600 μ l完全HUVEC培养基(EGM-2 Bullet kit,Biowhittaker,Cat.#CC-3162)悬浮,培养过夜。第二天,细胞通常50%汇合。去除完全培养基,加入200 μ L饥饿培养基(只加0.2%FBS的EBM-2)。细胞孵育2小时。接着,用40 μ L溶于PBS的抗体溶液处理细胞。低压冻干的Ab用无菌PBS溶解。最后,细胞用1%FBS/基础培养基(终浓度)处理30分钟,去除培养基,根据厂商的实验设计用400 μ L RTL缓冲液(Rneasy 96kit,Qiagen,Cat.#74182)裂解细胞。其后,利用RNeasy试剂盒(根据厂商的实验设计)制备RNA。RNA被提取,并用RiboGreen®的RNA定量试剂盒(Molecular probes,Cat.#R-11490)进行定量。等量的总RNA被用于实时PCR,从而检测Id1的RNA表达(ABI 7900仪器)。PCR利用Taqman One Step PCR Master MixKit(ABI,Cat.#4309169)完成,并利用下面列出的ID1引物/探针序列。PCR通过40个循环完成,利用下面的退火和扩增条件:95℃,15秒,60℃,1分钟。

[0590] TaqMan探针:CPG连接的5'-6-FAM和3'-TAMRA。

[0591] 名称:ID1探针

[0592] 序列:5' CCAGCACGTCATCGACTACATCAGGGA 3' (Seq ID NO:119)

[0593] Taqman PCR引物:

[0594] 名称:ID1-F

[0595] 序列:5' AAGGTGAGCAAGGTGGAGATTC 3' (Seq ID NO:120)

[0596] 名称:ID1-R

[0597] 序列:5' TTCCGAGTTCAGCTCCAACCTG 3' (Seq ID NO:121)

[0598] 1.12.1(M29I/D19A)前导分子(包括1.12.1序列变体)以及Fab衍生物的Id1滴定实施例在图4和5中给出。

[0599] 该分析的平均IC₅₀值总结在表11中。所有IC₅₀测定重复进行三次。

[0600] 实施例13.用来自LI-COR Biosciences的Odyssey红外成像系统(Odyssey Infrared成像系统)检测Smad1磷酸化(24孔板)

[0601] HUVECs(Biowhittaker,Cat.#CC-2519)被铺在24孔板上,18000个细胞/孔,用600 μ l完全HUVEC培养基(EGM-2 Bullet kit,Biowhittaker,Cat.#CC-3162)悬浮,培养过夜。第二天,细胞通常50%汇合。去除完全培养基,加入200 μ L饥饿培养基(饥饿培养基:只加0.2%FBS的EBM-2)。细胞孵育2小时。接着,用40 μ L溶于PBS的抗体溶液处理细胞3小时。最后,细胞用0.3 $\times$ 完全培养基(终浓度)处理35分钟,去除培养基,用80 μ L 1.1 $\times$ 样品缓冲液(Invitrogen,Cat.No.NP0007)裂解细胞。磷酸化的Smad1通过Western印迹测定,利用X Cell Surelock Mini-Cell和Blot Module(Invitrogen,Cat.#EI0002)。磷酸化的Smad1利用抗磷酸化Smad1兔抗体进行检测(Cell Signalling Cat.NO.9511),接着,该抗体被IRDye™ 800连接的抗兔的IgG检测到(Rockland Immunochemicals,Cat.No.611-732-127)。磷酸化的Smad1利用Odyssey成像仪(Odyssey Infrared Imager)(Li-Cor)进行定量。Actin(Santa Cruz,#sc-8432)用于校正(抗鼠Alex 680,Molecular Probe,Cat.No.A-21058)。该分析的平均IC₅₀值总结在表11中。所有IC₅₀测定重复进行三次。

[0602] 表11

[0603]

克隆	ID1 Tagman IC ₅₀ nM	pSmad1 Western 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

[0604] 实施例14. 抗ALK-1单克隆抗体的内摄特征

[0605] FACS用于监测残留在细胞表面的受体ALK-1以及中和抗体的时间过程。残留在细胞表面的ALK-1通过一个标记抗体进行检测,该标记抗体能够结合细胞表面的ALK-1,与中和抗体识别不同的抗原表位。鉴定了一个抗人ALK-1ECD的鼠mAb(R&D systems, Cat.No# AF310),在本实验中作为标记抗体使用。

[0606] 利用内皮细胞系HUVEC和HUAEC研究内摄的时间过程。细胞在37℃、5%CO₂的条件下培养于24孔板,每孔含有200μL完全培养基。在48小时的11个时间点中,每个时间点在一个孔中加入2μL 1mg/mL抗体(中和抗体的终浓度为10μg/mL)。接着,平板放回到37℃孵箱,直至0小时时间点,将平板置于冰上以终止内摄过程。在该时间点,标记抗体被加入孔中(终浓度为10μg/mL)并在冰上孵育1小时。接着,细胞用PBS洗涤,用胰酶消化,并转移到96孔板上。其后,细胞经过洗涤,封闭,并用含有不同荧光基团的第二抗体处理,从而同时检测残留在细胞表面的中和抗体和受体ALK-1。样品在FACSCalibur流式细胞仪上进行分析,每个样品计数3,000-5,000个细胞。计算每个样品在特定荧光通道中的几何平均值,并对时间作图。数据被拟合成一个缓和的线性趋势方程(a modified radio-decay equation),从而获得内摄半衰期($t_{1/2}$)以及内摄作用达到稳态时残留在细胞表面的中和抗体或受体ALK-1的百分数。1.12.1(M29I/D19A)内摄半衰期为2小时左右。当50%抗体被内摄时,达到平衡。购买自R&D systems的一个多克隆抗体(Cat.No#AF370)内摄半衰期为1小时,并在~70%受体被内摄时达到稳态(图6)。在本发明其它抗ALK-1人mAbs中观察到相似的内摄特征(未给出)。

[0607] 实施例15. 建立人包皮-SCID嵌合体鼠

[0608] 手术步骤在先前已公开的步骤的基础上加以大量改良,例如H-CYan,et al"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"Regulation of Angiogenesis inVivo 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,et al "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。从National Disease Research Institute和Cooperative Human Tissue Network获得人包皮块后,去除其不健康的区域,并转移到RPMI培养基中(Cellgro/Mediatech,Cat#MT-15-040-CV,添加青霉素和链霉素(Gibco/Life Tech,Cat#15070-063))(每500mL RPMI加入5mL青霉素/链霉素储存液)。利用无菌有盖培养皿中的手术刀和镊子,皮肤被修剪成 8×13 mm左右的椭圆形,不含任何溃烂区域和结缔组织,使用前储存在冰中。适当体积($4\mu\text{L/g}$ 动物体重)的100mg/mL氯胺酮(Ketaset^{TR},Fort Dodge Animal Health)/1mg/mL美托咪定(Pfizer Animal Health-Dormitor)溶液被腹膜内注射入SCID小鼠的腹部(即,以 45° 角度,位于皮肤下,但没有过于深入中心)。麻醉后,小鼠给予眼睛润滑剂,皮下注射优洛芬(10mg/kg, Fort Dodge Animal Health),并剔除手术位置的毛。手术区用Clorahexiderm(Butler,Chc10-Scrub40,cat#WAB20109)如外科手术般洗涤3次,接着用酒精洗涤,从手术位置的中心开始,向外以环形运动,避免从脏的区域回到干净区域。小鼠转移到准备好的手术舱中,并放置在加热的水垫上(Gaymar Industries,cat#TP500T/Pump),维持在 37°C 。接着,小鼠在整个手术过程中接受异氟醚麻醉。小鼠背部用手术单覆盖,露出手术位置。用镊子夹起小鼠皮肤,并用弯形手术剪一次性剪去一块椭圆形皮肤组织。将一块适当大小的人皮肤放置在小鼠上。人皮肤和小鼠皮肤用Ethilon缝线(Ethicon cat#697H)缝合在一起,从椭圆的顶部开始,其后是底部,接着是右侧最远处,最后是左侧最远处。两者之间可缝合更多次以进一步缝合组织。在皮肤周围,等距离缝合8次左右。在手术过程中,含有生理盐水的注射器在皮肤/小鼠的手术伤口变干时用于冲洗。在伤口上放置一绷带。接着用透明胶带(3M TegadermTM)宽松地缠绕绷带。胶带被剪成一定大小,使其可以覆盖比绷带略大的区域。接着,小鼠被给予阿替美唑(50-100 μL ,Pfizer Animal Health-Antisedan),并在加热的笼子中复苏5-10分钟。7-10天以后,去除胶带和绷带,在第15天,大多数皮肤表现为斑点。完全治愈出现21-28天之间,此后,皮肤准备接种肿瘤细胞。图8所示是关于植入皮肤解剖切片组织学(H&E染色)分析的实施例。植入皮肤的组织学类似于Tahtis,et al"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所描述的小鼠所移植的皮肤的特征。h.e.:人表皮层;h.d.:人外胚层。

[0609] 实施例16.人包皮-SCID嵌合体鼠的胶原模型

[0610] 胶原1储存液(cat#354236,Becten-Dickinson)用0.02N的醋酸稀释成4mg/mL,植入前在冰上保存。酸性的胶原溶液(8份)与10XM199(Sigma,Cat#M9163)(1份)和人血浆纤维连接蛋白(Fn)(cat#354008,Becten-Dickinson)混合,使Fn的终浓度达到90 $\mu\text{L/mL}$;加入

NaOH(1.0N)调节pH为7.2左右。使用前,胶原/Fn混合物在冰上保存。利用上面的胶原/Fn混合物和血管生成抑制剂制备植入混合物,有或无人微血管内皮细胞(HMVEC)(Cascade Biologics,Cat#C-010-5C)。HMVECs用PBS制备成 6×10^6 个细胞/mL。50-100 μ L植入混合液通过皮内注射植入scid嵌合体鼠的包皮中。7-14天以后,获取胶原栓,用OCT化合物(cat#4583,Sajura Finetek,CA)包埋,冷冻切片用于免疫组织化学分析。包皮中的胶原栓通过Trichrome试剂盒(cat#KC1641,Mater Tech,CA)鉴定为蓝染,如图9(A)所示。人血管是通过人P-CAM的染色得以鉴定,利用抗人CD-31抗体(克隆13.3,Vector Laboratories)(图9(B))。表12总结了包皮-SCID嵌合体鼠胶原模型的人血管染色和定量。

[0611] 表12.胶原模型结果的总结

基质	基质中的HMVEC	治疗(Rx)	Rx天数	实验终点	人血管评分(1×10^3)	占对照的%(人血管)
1.6 mg/ml 胶原	无	未治疗	4	人CD-31染色	0.036 ± 0.001	40
1.6 mg/ml 胶原	7×10^3	未治疗	4		0.071 ± 0.022	78
1.6 mg/ml 胶原	1.4×10^4	未治疗	4		0.063 ± 0.016	69
2.4 mg/ml 胶原	无	未治疗	4		0.091 ± 0.056	100
2.4 mg/ml 胶原	7×10^3	未治疗	4		0.067 ± 0.049	74
2.4 mg/ml 胶原	1.4×10^4	未治疗	4		0.062 ± 0.047	68
3.0 mg/ml 胶原	8.8×10^3	未治疗	4	人CD-31染色	54 ± 9	100
3.0 mg/ml 胶原	8.8×10^3	抗原表位对照抗体 100 μ g/ml 混合于凝胶	4	人CD-31染色	52 ± 13	96
3.0 mg/ml 胶原	8.8×10^3	1.12.1(M29I/D19A) 抗体 100 μ g/ml 混合于凝胶	4		15 ± 3	28
3.0 mg/ml 胶原	无	未治疗	4	人CD-31染色	0.112 ± 0.026	100
5.0 mg/ml 胶原	无	未治疗	4		0.031 ± 0.012	28
3.0 mg/ml 胶原	无	抗原表位对照抗体 100 μ g/ml 皮内注射	4	人CD-31染色	75 ± 15	100
3.0 mg/ml 胶原	无	1.12.1(M29I/D19A) 抗体 100 μ g/ml 皮内注射	4		39 ± 11	52
3.0 mg/ml 胶原	无	1.14.1 抗体 100 μ g/ml 皮内注射	4		44 ± 28	59

[0613] 实施例17.人包皮-SCID嵌合体鼠的M24met肿瘤模型

[0614] 通常,在手术移植后5-10周之间,小鼠可用于这些实验。M24met细胞系由Mueller及其合作者描述在“Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells”,Cancer Research,55(8):1629-32,1995中。M24met细胞悬液制备如下:80%汇合的M24met细胞洗涤后,用胰酶/EDTA(Gibco,Cat#25200-056)消化,并收集在PRMI(Cellgro/Mediatech,cat#MT-15-040-CV)培养基中,培养基添加10%FBS(Cellgro/Mediatech,Cat#AKD-11775)和2mM L-谷氨酰胺(Cellgro/Mediatech,Cat#25-005-CI)。细胞在600rpm离心5min,用无菌PBS重悬。细胞数目用Coulter Counter(Beckman Coulter,Model Z2)估计。细胞在600rpm离心5分钟,并用胶

原/Fn(3mg/ml)混合液重悬,获得 4×10^7 个细胞/ml的细胞悬浮液,用于移植。

[0615] 接种时, 2×10^6 以上的细胞皮内注射($50 \mu\text{l}$, 4×10^7 个细胞/ml)入小鼠所移植的皮肤。移植后5-7天,可触及到肿瘤,小鼠在给药前被随机分成对照组和治疗组。对照组定义为不给药,给予溶解抗ALK-1抗体的溶剂,或者给予同种型配对的IgG₂人单克隆抗体抗KLH(辉瑞)的动物。治疗组定义为给予抗ALK-1抗体1.12.1(M29I/D19A)的动物。

[0616] 实施例18.人和鼠CD-31免疫荧光(IF)双重染色

[0617] 冰冻组织切片在空气干燥后,用丙酮(Fisher, Cat#A16S-4)在 -20°C 固定10分钟。样品再次空气干燥,并用PBS洗3次,每次5分钟。样品用溶解于PBS的5%兔血清(Vector Laboratories, Cat#S-5000)在室温下封闭30分钟。用5%兔血清制备第一抗体混合液,抗人CD-31抗体(Santa Cruz, Cat#SC1505)和抗鼠CD-31抗体(Pharmingen, CloneMec1 3.3, Cat#01951A)分别以1:100和1:150稀释。上述抗体混合液被加到组织样品中,室温下1小时。封闭后的切片用PBS洗3次,每次5分钟,接着与第二抗体混合液在室温下孵育1小时。第二抗体混合液用PBS/0.05%吐温20(Sigma, Cat#P1379)制备,德克萨斯红标记的兔抗羊抗体(Jackson Labs, Cat#305-075-003)和FITC标记的兔抗大鼠抗体(Jackson Labs, Cat#312-095-003)。利用冻存的抗体时,抗体以1:50稀释,或者,利用新鲜的抗体时,抗体以1:100稀释。切片再次用PBS洗3次,每次5分钟,接着用Vectashield(Hard Set, 含DAPI的包埋剂, Vector Lab, CA, Cat#H-1500)包埋。切片在图像分析前 4°C 避光保存。用Olympus BX60荧光显微镜进行图像分析,用Olympus数码彩色照相机摄取图片。图片摄取自3-5个视野/切片,1张切片/动物,4-7只动物/组,抗人CD-31阳性染色所指示的血管区通过3个工作人员利用Image Pro Plus v4.5(MediaCybernetics)进行定量。药效学终点(组平均)表示为相对于对照组的人CD-31抑制百分数,或者表示为人血管的总面积。统计学意义通过ANOVA得以测定。图10所示是人包皮SCID嵌合体鼠中M24met肿瘤的人血管(红色)和鼠血管(绿色)的免疫荧光图。

[0618] 实施例19.人CD-31免疫组织化学(IHC)染色

[0619] 冰冻组织切片在空气干燥后,用丙酮在 -20°C 固定10分钟。样品再次空气干燥,并用PBS洗2次,每次5分钟。样品用0.075% H_2O_2 /甲醇(Fisher Cat#A433-4)孵育15分钟,并用PBS洗3次,每次5分钟。样品用5%兔血清/PBS封闭30分钟,接着与抗人CD-31的抗体(SantaCruz, Cat#SC1505)在室温下孵育1小时,抗体用5%兔血清以1:100稀释。样品用PBS洗2次,每次5分钟,接着与兔抗羊抗体(Vector Labs, Cat#BA-5000)在室温下孵育35分钟,抗体用5%兔血清以1:200稀释。接着,切片用PBS洗2次,每次5分钟,加入新鲜配制的抗生物素蛋白链菌素(Vector Labs, ABC Elite kit, Cat#PK-6100)。切片再次用PBS洗2次,每次5分钟,接着在二氨基联苯(DAB)(Vector Labs, Cat#SK-4100)中显色。切片用PBS洗2次,每次5分钟,接着用Mayers苏木精(Sigma, Cat#HHS-32)染色5秒。样品用 diH_2O 冲洗,并在稀释的(1 L diH_2O 中加入5ml储存液)氨溶液(Sigma, Cat# A-6899)中短暂浸泡2次,再次用 diH_2O 冲洗。接着,样品用70%, 90%和100%的乙醇(Harleco, Cat#65347/85)脱水,每个1分钟,最后用二甲苯(JT Baker, Cat#516, 09)。切片用Cytoseal 60(Stephens Scientific, Cat#8310-4,)包埋,并盖上盖玻片,用于图像分析。图11所示是人包皮SCID嵌合体鼠中M24met肿瘤的人血管(棕色)的IHC图。

[0620] 实施例20.抗ALK-1抗体1.12.1(M29I/D19A)的治疗方法

[0621] 用于治疗时,给药可通过皮下注射(sc)或静脉注射(iv)完成。通常,每个实验给予一次1.12.1(M29I/D19A)抗体。需要时,在第9天或第10天,第二次给予ALK-1抗体。有时候,多个剂量水平,即1、5、10、50mg/kg,可用于研究人血管生长的剂量依赖性抑制。每天观察动物,每周三次用测径器测量肿瘤。在第14天到第17天时,肿瘤在250-350mm³之间,从小鼠中取出肿瘤,并用OCT包埋,冷冻,用于IF或IHC分析。图12所示是人包皮SCID嵌合体鼠中1.12.1(M29I/D19A)处理(10mg/kg)的M24met肿瘤和对照肿瘤的人血管(红色)和鼠血管(绿色)的代表性免疫荧光图。人包皮SCID嵌合体鼠中人血管被1.12.1(M29I/D19A)剂量依赖性抑制,其结果在图13中给出,相关实验的总结在表13中给出。

[0622] 表13:SCID嵌合体模型中M24met肿瘤的人血管生长抑制和体内模型特征的总结

[0623]

实验设计参数					终点		总的注意事项
肿瘤	药物	剂量	途径	时间表	CD31(与对照相比的抑制%)	实验天数	
MCF-7	无	无	无	无	未定量	19	肿瘤皮内植入。试验时有或无雌二醇和胶原植入。肿瘤生长缓慢并几乎不表达人CD31
M24met	无	无	无	无	未定量	19	肿瘤皮内植入。试验时有或无胶原/FN基质。有基质时,发现肿瘤生长良好,后面所有实验都添加基质。肿瘤表现出更好的人CD31染色。
M24met (小)	无	无	无	无	未定量	9	肿瘤大小 < 100 mm ³ 。几乎无人CD31
M24met (中等)	无	无	无	无	未定量	12	肿瘤大小 < 100-200 mm ³ 。有一些人CD31
M24met (大)	无	无	无	无	未定量	12	肿瘤大小 < 200 mm ³ 。大M24met肿瘤有更多的人血管染色数目,后面的实验都用大肿瘤
M24met	非特异性人IgG	10 mg/kg	IV	给药2次(第5和9天)	0	15	第一轮筛选实验。1.12.1(M29I/D19A)表现出人CD31染色显著减少。未观察到肿瘤生长抑制
	1.12.1(M29I/D19A)	10 mg/kg	IV	5和9天	42		
M24met	非特异性人	10 mg/kg	IV	给药2次	0	14	第二轮筛选实验。证实GW-366的结果。未观察到肿

[0624]

	IgG			(第			瘤生长抑制
	1.12.1 (M29I/ D19A)	10 mg/kg	IV	5 和 10 天)	40		
M24met	非特异 性 人 IgG	10 mg/kg	SC	给 药 2 次 (第	0	14	第 一 次 测 试 1.12.1 (M29I/D19A) 剂量依 赖性抑制人 CD31 的活性。 观察到一些剂量依赖性效 应。PK 结果表示单次给药足 以引起 CD31 的显著降低。 未观察到肿瘤生长抑制
	1.12.1 (M29I/ D19A)	10 mg/kg	SC	5 和 10 天)	43		
	1.12.1 (M29I/ D19A)	1mg/kg	SC		50		
	1.12.1 (M29I/ D19A)	0.1mg/ kg	SC		20		
M24met	未给药	0mg/kg	无	无	ND	16	第 二 次 测 试 1.12.1 (M29I/D19A) 剂量依 赖性抑制人 CD31 的活性。 观察到明确的抗-CD31 剂量 依赖性效应。未观察到肿瘤 生长抑制
	同种型 配对的 IgG	10 mg/kg	SC	给 药 1 次 (第	0		
	非特异 性 人 IgG	10 mg/kg	SC	5 天)	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	同种型 配对的 IgG2	10 mg/kg	SC	给 药 1 次 (第	0	14	1.12.1 (M29I/D19A) 最后 的大剂量范围试验。实验表 现出良好的剂量依赖效应。数 据拟合成 S 形剂量效应曲 线, 获得 IC ₅₀ 为 93 nM。未 观察到肿瘤生长抑制
	1.12.1 (M29I/ D19A)	1 mg/kg	SC	5 天)	33		
	1.12.1 (M29I/ D19A)	3 mg/kg	SC		41		
	1.12.1 (M29I/ D19A)	5 mg/kg	SC		60		

[0625]

D19A)						
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		

[0626] 实施例21. 体内EC₅₀测定

[0627] 人包皮SCID嵌合体鼠皮内移植入M24met细胞,并用1、3、5、7.5、10和50mg/kg的抗ALK-1抗体1.12.1(M29I/D19A)或同种型配对的抗人KLH抗体(10mg/kg)处理(SC)。实验结束后,每个肿瘤的人血管区根据上述方法定量。抗ALK-1抗体1.12.1(M29I/D19A)在鼠血浆中的浓度利用下面描述的方法进行测定:小鼠的血清样品通过ELISA(酶联免疫吸附试验)用于分析抗ALK-1抗体1.12.1(M29I/D19A)的浓度。ELISA板用溶解于PBS的10ug/ml羊抗人IgG Fc特异性抗体(Pierce, cat#31123)4℃孵育过夜,接着用StartBlock封闭缓冲液(Pierce, cat#37542)在室温下封闭1小时。血清样品在分析前用StartBlock封闭液稀释100倍或1000倍。用稀释100倍和1000倍的空白血清制备2组标准品。标准品和稀释的血清样品在平板上孵育1小时。结合的抗ALK-1抗体1.12.1(M29I/D19A)用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人IgG(Fab特异的)抗体(Sigma, cat#A0293)进行检测。利用的底物是3,3',5,5'-四甲基联苯胺(Sigma, cat#T8665)。在Vmax酶标仪(Molecular Devices, Menlo Park, CA)上读取450nm的吸收度。标准曲线用非线性回归进行拟合。该分析的检测限是10ng/ml的抗ALK-1抗体1.12.1(M29I/D19A)。

[0628] SCID小鼠血浆中抗ALK-1抗体1.12.1(M29I/D19A)的浓度在图15中给出。

[0629] 图15表示1.12.1(M29I/D19A)在M24met包皮SCID嵌合体模型中的估计EC₅₀。每个治疗组的人血管面积对实验过程(14天)中的平均血浆PK作图。拟合曲线通过Graphpad (Prizm)的S型剂量依赖程序(Sigmoidal Dose Dependent program)得以产生。从拟合曲线中获得EC₅₀为93ng/ml(EC₅₀定义为人血管面积与对照组相比降低50%所需的血浆浓度)。

[0630] 所有在本说明书中引用的公开、专利和专利申请,如果每个公开或专利申请特别被指明是以引用的方式并入本文中,则全部以引用的方式并入本文中。上述发明已经通过图解和实施例得以详细描述,从而增加理解的清晰度,但是,在不脱离附加的权利要求的范围或宗旨的条件下,所属领域技术人员可以在本发明内容的帮助下对本发明加以某些变化和改良。

序列表

<110> pfizer Inc
 Amgen Fremont Inc.
 <120> 活化素受体样激酶-1 的人单克隆抗体
 <130> ABX-PF9 PROV
 <140> 60/715,200
 <141> 095132933
 <150> 6006629206
 <151> 2005-09-07
 <160> 136
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 1332
 <212> DNA
 <213> 人

[0001]

```

<400> 1
cagggtgcagc tgcaggagtc ggggtccagga ctgggtgaagc cttcacagac cctgtccctc   60
accctgcactg tctctggtag ctccatcagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc   120
cagcaccacag ggaaggccct ggagtggaat ggggtacatct attacagtgg gagtacctac   180
tacaaccctt cctcaagag tcgagttacc atactcagtag acacgtctaa gaaccagttc   240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag   300
tcagtggtcgt ggtttgacta ctggggccag ggaacccctg tcaccgtctc ctacgccctc   360
accaagggcc catcggtctt cccctggcg ccttgcctca ggagcaccct cgagagcaca   420
gcggcccttg gctgcctggt caaggactac ttcccgaac cgggtgacgt gtcgtggaac   480
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctacaggactc   540
tactccctca gcagcgtagt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc   600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtaggaca agacagtga gcgcaaagt   660
tgtgtcagat gccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctctctcttc   720
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaacc ctgaggtcac gtgcgtggtg   780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag   840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gacagttca acagcacgtt ccgtgtggtc   900
agcgtcctca ccgtcgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc   960
tccaacaaag gccctccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc   1020
cgagaaccac aggtgtacac ctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc   1080
agcctgacct gccgtgtcaa aggcctctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc   1140
aatgggcagc cggagaccaa ctacaagacc acacctccca tgcgtggact cagcggctcc   1200
ttctctctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc   1260
tcattgtccg tgatgatga ggcctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg   1320
tctccgggta aa                                     1332
  
```

<210> 2
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> 人

<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
 [0002] 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

[0003]

<210> 3
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 3
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctccigtga gggccagtca gagggtcagc agcagctact tagccctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcaggggcac tggcatccca 180
 gacaggttca gttgcagttg gttctggaca gacttcaccc tcacatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtaaggta gctcgccgat caccttcggc 300
 caagggaacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatccagag aggccaaagt acagiggaag gttgataacg cctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagccicag cagcaccctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 4
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人

<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			
<400> 5			
caggtgcagc tgcaggagtc ggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc			60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtaat actacigga cggatccgc			120
cagcaccag ggaagggcct ggagtgatt ggtacatct attacagtgg gactacctac			180
tacaaccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc			240
tcctgaagc tgagctcigt gactgccgc gacacggccg tglattactg tgcgagagag			300
tcagtggtg ggttgacta ctgggcccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacg			355
<210> 6			

<211> 118
 <212> PRT
 <213> 人

<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

[0005]

<210> 7
 <211> 325
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 7

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctccctgta gggccagtc gagtgicagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgticag cagtaaggta gctcgccgat caccttcggc 300
 caaggacac gactggagat taaac 325

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人

<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

<400> 9
 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tccctgtgcag cgtctggatt cacccttcagt agtcatggca tgtactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga atagccigag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag 300
 gagcagtggc ccgatgtttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 360
 g 361

[0006]

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人

<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

<400> 11
 gacatccaga tgaccagtc tccatcccca ctgtctgcat ctglaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgic gggcgagica gggcattaga aattatttag cctggttica gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcctt gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aagttcagcg gcagtggaic tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatttgg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgctcac tticggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人

<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

[0007]

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

<400> 13
 caggigcacc tgcaggagtc gggcccagga ctgggaagc cticggagac cctgtccctc 60
 accitgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgg 120
 cagccccccg ggaaggagct ggagtggatt gggtatatct attacagtgg gacaccaaac 180
 tacaaccctt ccccaagag tcgaatcacc atatcaatag acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgaactctgt gaccgtgctg gacacggcct tgtattactg tgcgagagaa 300
 tcagtggcgg cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacag 355

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

<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

[0008]

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

<400> 15

gaaatlggtg tgaccgagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agtaggtact tagcctggta ccagcaggaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gcttgggaca gacttcacac tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcaa cactatggta gctcaccgat caccctcggc 300
 caaggggcac gactggagat taaac 325

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

<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

<400> 17
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgg 120
cagcccccag ggaaggagct ggagtggatt gggatatctc attacagtgg gagcaccaac 180
tacaaccctc cctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
gcagtgctcg cctltgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacag 355

[0009] <210> 18
<211> 118
<212> PRT
<213> 人

<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
 <400> 19
 gaaatigtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agtacctact tagcctggca ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgtatcca gcagggccag tggcgtccca 180
 gagcaggttca gggcagtggt gctcgggaca gacttcactc tcacatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttacgtcag cagtatggta gttaccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 20
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0010]

<210> 21
 <211> 370
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 21
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc ctccacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgct actactggag ctggatccgc 120
 cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt ggtatcatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagttctgt gactgccgcg gacacggccg tatattactg tgcgagagcg 300
 ggcgatttt tggagtgttc tgaatgtttt gatatctggg gccaggggac aatggtcacc 360
 gtctctcag 370

<210> 22
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人

<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

[0011]

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

<400> 23

gacatcgtga tgaccacgac tccagactcc ctggctgigt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagggtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggataccagc agaaaccagg gcagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatgatact 300
 cctccgacgt tggccaagg gaccaagggt gaaatcaaac 340

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人

<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		
	<400> 25		
	cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcacagac cctgtccctc	60	
	atcgttactg tttctggtgg ctccatcagc agtgggtaat actactggag ctggatccgc	120	
	cagcaccacg ggaaggccct ggagtggatt gggatcacct attacagtgg gaggacctac	180	
	tacaaccctt ccccaagag tcgacttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240	
[0012]	tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag	300	
	gggatcggig cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcag	355	
	<210> 26		
	<211> 118		
	<212> PRT		
	<213> 人		
	<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

<400> 27
gaaatttgtg tgacgcagtc gccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagica gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctccatagct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcacatcat cagactggac 240
cctgaagatt ttgcagtgt tttactgtcag cggataggta gctaccgat caccctcggc 300
caaggacac gactggagat taaac 325

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> 人

<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

<400> 29
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc cticggagac cctgtccctc 60
accgtcactg tctctggigg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccaggggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcagat caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtcgag agaggacgat 300

[0013]

agcagtggct gccctactt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtac cgcctcctca 360
g 361

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<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

[0014]

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

<400> 31

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtagca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccagggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagtc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccattcac tttcgccct 300

gggaccnaag tggatatcaa ac 322

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<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

[0015]

<400> 33
 cagatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgcagac cctgtccctc 60
 accctcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggc actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccgcc ggaagggcct ggagtggaat gggtacatct attacagtgg gagcgccctac 180
 tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagcg 300
 gggcgatttt tggagtggtc tgatgttttt gatattctgg gcccaaggac aatggtcacc 360
 gtctcttttag 370

<210> 34
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人

<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

<400> 35
gacatcgtga tgaccagcgc tccagactcc ctggctgigt cctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtcagcca gactgttita tacagctcca acaataagaa ctacttaact 120
tggtaccagc agaaaccagg acggcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gicaacaata ttataatact 300
cctccgacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaagc 340

<210> 36
<211> 113
<212> PRT
<213> 人

<400> 36

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

[0016]

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

<400> 37
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagcc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggcctggagtg ggtttcalac attagtagta gtggaatac catatactac 180
gcagactcig tgaaggcccg attcaccatc tccagggaaca acgccaggaa ctacatglat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgigt attactgtgc gagggaaagcc 300
tatgatagta gtggttacta ctactactac tacggtaagg acgtctgggg ccaaggggacc 360
acggtcaccg tctcctcag 379

<210> 38
<211> 126
<212> PRT
<213> 人
<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

[0017]

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
<400> 39

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgta cccctggaca gccggcctcc 60
atctcctgca agtctagta gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt cttgtatagg 120
tacctgcaga agccaggcca gccctccacag ctccctgatct atgaagtctt caaccggctt 180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgacaatc 240
agccgggtgg aggtgacga tgttgggttt tattactgca tgcaaagtac acaccttcct 300
tggacgttcg gccaaaggac caagggtgaa atcaaac 337

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> 人

<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

[0018]

<400> 41

gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
tccgtgicag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggittggccgt attaaaagca aaagtgatgg tgggacaaca 180
gactacgtcg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
gggaattact atgatggtag tggttattac tcttttgact actggggcca gggaaccctg 360
gtcaccgtct cctcag 376

<210> 42

<211> 125

<212> PRT

<213> 人

<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

<400> 43
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagta gagcctcctg catagtaatg gatacaacta ttggattgg 120
tacctgcaga agccaggga gctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccgggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaac 240
agcagatgg aggtcgagga tgttgggtt tattactgca tgcaagctct acaaacctct 300
cccactttcg gccgaggag caaggaggag atcaaac 337

[0019]

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> 人
<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

```

<400> 45
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
accitgcacig tctcigggtgg ctccatcagc aglaatgatt actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggcct ggagiggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt cctcaagag tcgagilacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tcccigaagc tgagctcigt gactgccgcg gacacggccg tglattactg tgcgagagaa 300
tccacggacg gtatggacgt ciggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacag 355

```

```

<210> 46
<211> 118
<212> PRT
<213> 人

```

```

<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

```

[0020]

```

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

```

```

<400> 47
gaaaatgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtcg gagtgtagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcctcca gcggggccac tggcatccca 180
gacaggittca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cattatggta gctcaccgat caccttcggc 300
caagggcacac gactggagat taaac 325

```

```

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

```

<213> 人

<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

[0021]

<400> 49

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga cigggaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtgatt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt ccccaagag tcgagtlacc atatcaatag acacgtctaa gaaccagttc 240
tcccigaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
cgigactacg gtgggtggctt tgactactgg ggccagggaa cctgggtcac cgtctcctca 360
g 361

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> 人

<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

<400> 51
gacatcgiga tgaccagtc tccagactcc ctggctgigt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagggtttta tacagctcca tcaataagat ctacttagct 120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaccaata ttatagtact 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggig gaaatcaaac 340

[0022]

<210> 52
<211> 113
<212> PRT
<213> 人

<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
 <400> 53
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cticacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtg cctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaagggcct ggagtggtatt gggatcatct attacagtggt gagcacctac 180
 tacaaccctg cctcaagag tcgagttacc attcagtag ccacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctcigt gactgccgcg gacacggccg igtattactg tgcgagagag 300
 gctacggagg gglttgacta cgggggccag ggaacccctgg tcaccgtctc ctacag 355

<210> 54
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0023]

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
 <400> 55
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggccacc ctgtctttgt ctccagggga aagggccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc accacctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggltca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcacatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcactgta ttactgtcag cactatggta cctcatcgat caccttcggc 300
 caaggacac gactggagat taaac 325

<210> 56
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0024]

<210> 57
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 57
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctacacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccacag ggaagggcct ggagtggtatt gggatcatct attacagtgg gacacacctac 180
 tacaaccctt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
 tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacag 355

<210> 58
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

<400> 59
 gaaagtgtgt tgacgcagtc tcttggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtica gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgtttcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gggcagtggt gtcgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacccat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

[0025]

<210> 60
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人

<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

<21> 355
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 61
 cagggtgcagc tgcaggagtc ggcccagga cttggaagc ctacacagac cctgtccctc 60
 acctgcacig tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa cttgatccgc 120
 cagcaccacag ggaaggccct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccctg cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 gatattgcag gattcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacg 355

<210> 62
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0026]

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

<400> 63
 gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctac ggtgcatcca gcaggccac tggcatcca 180
 gacaggttca gtggcagtg gtcgggaca gactccactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtata ttactgtcag cagtaaggta gctcacctat caccttcggc 300
 caaggacac gactggagat taaac 325

<210> 64
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0027]

<210> 65
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 65
 caggatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctccacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tcctcgtggg ctccalcagc agtggatgaat actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccacg ggaaggccct ggagtggatt gggtatatct ttacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccctt cctcaagag tcgagttacc atatcactag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgaactcgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
 tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacg 355

<210> 66
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人

<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		
<400>	67		
gaaatgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgt ctcaggggga aagagccacc		60	
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagclact tagcctggta ccagcggaaa		120	
cctggccagg ctcagggt cctcatatat ggigtatcca gtagggccac tggcatccca		180	
gacaggttca gggcagtg gtcgggaca gacttactc tcaccatcag cagactggag		240	
cctgaagatt ttgcagtga ttactgtcag caatatggta gctcaatgat caccttcggc		300	
caaggggacac gactggagat taaac		325	

[0028]

<210>	68
<211>	108
<212>	PRT
<213>	人
<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
 <400> 69
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 accgtcacig tcctcggggg ctccatcagc agtggigatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccacg ggaagggcct ggagtgatt ggttacatct attacagigg gagcacctac 180
 tacaacccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 ggccctgagg ctitigatat ctgggggtcaa gggacaatgg tcaccgactc ttcag 355

<210> 70
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0029] 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

<400> 71
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctccigca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gggcagtggt ctctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgt cttactgtcag caataaggta gctcacttct cactttcggc 300
 ggagggacca aggtggagat caaac 325

<210> 72
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0030]

<210> 73
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 73
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcacccag ggaagggccl ggagtggall gggtaacatc attacagtg gagcacctac 180
 tacaactcgt ccccaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagtic 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 ggccagaacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacg 355

<210> 74
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

<400> 75

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagta aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta ctggaattgg 120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataagglttc taactgggac 180
tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaac 240
agcagggtgg aggctgagga tgtlgggtt tattactgca tgcaaggta acactggcct 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac 340

[0031]

<210> 76

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

<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
 <400> 77
 gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180
 gactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
 ggggatggaa cgcactttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcag 358

<210> 78
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0032]

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
 <400> 79
 gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac 60
 atctcctgca aagccagcca agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca 120
 ggagaagctg ctattttcat tattcaagaa gctactactic tcgttcctgg aatcccacct 180
 cgattcagtg gcagcgggta tggacagat ttaccctca caattaataa catagaatct 240
 gaggatgctg catattactt ctgtctacaa catgataatt tcccgtcac ttccggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa ac

322

<210> 80
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人

<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

[0033]

<210> 81
 <211> 379
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 81

cagggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtaagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatatc attagtagta gtggtaglac cacatactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa gtcactgtat 240
 ctgcaaatga acagccctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggg 300
 tatagcagtg gctggtagca ggactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaaggggacc 360
 acggtcaccg tctcctcag 379

<210> 82
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人

<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		
	<400> 83 gatatgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60 atctcctgca agtttagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta ttgtattgg 120 taccctcaga agccaggcca gccctccacag ctccgatctc atgaagtctc caaccggttt 180 tcctggagtc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240 agccgggtgg agcctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300 cggacgttcg gccaaaggac caaggiggaa atcaaac 337		
[0034]	<210> 84 <211> 112 <212> PRT <213> 人 <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
 <400> 85
 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tccigtgcag cctctggatt caccctcagc gacttctaca tgagctggat ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctgggaatg gatitcatac attagtagta gtggtagtag catitactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatg tccaggggaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagccctgag agccgaggac acggccgtgt attattgtgc gagagaagga 300
 tactatgatt cgggggagtt ttataaggac tacgactact acgggtatga cgtctggggc 360
 caagggaacca cggtcaccgt ctctcag 388

<210> 86
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0035] 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
 <400> 87
 gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt ttgtattgg 120

taccctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtct caaccggctc 180
 tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agccgggtgg aggcctagga tgttgggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300
 cggacgttcg gccaaaggac caaggaggaa atcaaac 337

<210> 88
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0036] 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

<400> 89
 caggctgcgc tggctggagtc tgggggagc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tctgtgtag cctctggatt cacccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggcctggagt ggtttcatac attagtagta gtggtatttc catatactac 180
 gcagactctg tgaaggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaagga 300
 tatagcagct cgtcacatta ctacgactac tacggatagg acgtctggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctcag 379

<210> 90
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

[0037]

<400> 91
 gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt ttgtattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gccctccacag gtccttatct atgaagtctc caaccggttc 180
 tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agccgggtgg aggcigagga tgttgggttt tattactgca tgcaaagtac acagcttcct 300
 cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaac 337

<210> 92
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人

<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> 短尾猴：

<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

[0038]

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
 [0039] 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> 短尾猴
 <400> 94

	atgaccttgg gctccccgag gagaggcctt ctgatgctgc tgaaggcctt ggtgacctag	60
	ggtagccccg tgaagccctc tcggggcccg ctggtagcct gcacatgtga gagcccacat	120
	tgcagggggc ctacctgcca gggggcctgg tgcacagtag tgcctggctgc ggaggagggg	180
	aggcaccccc aggaacatcg ggctgctggg aacttgccca gggagctctg cagggggcgc	240
	cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgt gacagccacc tcgtcaaccg caacgtgtcc	300
	ctggctgtgg aggccaccca aactccttcg gacgagccgg gaacagacag ccagctggcc	360
	ctgatcctgg gccccgctgt ggcttgcctg gccctggctg ccctgggtgt cgtgggcctg	420
	tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cggggcctgc acagcgagct gggagagctc	480
	agttctatcc tgaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt	540
	gactgcacca caggagatgg ctccgggctc ccttccctgg tgcagaggac agtggcacgg	600
	caggttccct tggtaggtgt tggggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcttg	660
	tggcacgggt agagtgtggc cgtcaagatc ttctccctga gggacgaaca gtccctgttc	720
	cgggagactg agatctacaa cacagtgttg ctacagacag acaacatcct aggccttcatc	780
	gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgagcgtgt ggctcatcac gcattaccac	840
	gagcacggct cctctacga cttctgcag agacagacgc tggagccgca ttgggtcttg	900
	aggctagctg tgtccgcagc ctgtggcctg gcacacctgc acgtggagat ctccggtaca	960
	cagggcaaac cggccattgc ccaccgtgac ttcaagagcc gcaacgtgtt ggtcaagagc	1020
	aaactgcagt gttgcattgc tgacctgggc ctggctgiga tgcactcaca gggcagcgat	1080
[0040]	tacctggaca tcggcaacaa ccgagagta ggcaccaaga ggtacatggc acccgaggtg	1140
	ctggatgagc agatccgcac ggactgcttt gagtccctata agtggactga catctgggcc	1200
	tttggcctgg tgcctgtgga gatcgcccg cggaccatcg tgaacggcat cgtggaggac	1260
	tatagaccac ccttctatga tgtgggtccc aatgacccca gctttgagga catgaagaag	1320
	gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggctggctgc agacccggtc	1380
	ctctcaggcc tagctcagat gatcggggag tgcctgtacc caaacccctc tggccgactc	1440
	actgcgtcgc ggaatcaaga gacactacag aaaattagca acagtccaga gaagcccaaa	1500
	gtgattcagt ag	1512
	<210> 95	
	<211> 1332	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 95	
	cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtagaagc cttcacagac cctgtccctc	60
	acctgcactg tctctgggtg ctccatgagc agtggtagaat actactggaa ctggatccgc	120
	cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gactacctac	180
	tacaacccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240
	tccttgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag	300
	tcagtggctg gglttgacta ctggggccag ggaacccctg tcaccgtctc ctacgctcc	360
	accaagggcc catcggtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca	420
	gcggccctgg gctgcctgtt caaggactac ttcccgaac cggtagcgtt gtcgtggaac	480

	tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc tcccagctg tcctacagtc ctcaggactc	540
	tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc	600
	tgaacgttag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agacagtga gcgcaaatgt	660
	tgtgtcgtgt gccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctccctcttc	720
	ccccaaaac ccaaggacac cctcaltatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg	780
	gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag	840
	gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gaggcaglica acagcacgtt ccgtgtggtc	900
	agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc	960
	tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccaict ccaaaaccaa agggcagccc	1020
	cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc	1080
	agcctgacct gcctgtgcaa agccttctac ccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	1140
	aalgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctcca tgcgtgactc cgacggctcc	1200
	ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	1260
	tcattctccg tgaatcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg	1320
	tcctccggta aa	1332
[0041]	<210> 96	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于克隆 ALK-1 的 ECD 的正向引物	
	<400> 96	
	acggcccagc cggccgaccc tgtgaagccg tct	33
	<210> 97	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于克隆 ALK-1 的 ECD 的反向引物	
	<400> 97	
	actaagcttt taatgatgat gatgatgatg ctggccatct gtcccg	47
	<210> 98	
	<211> 103	
	<212> PRT	
	<213> 人	
	<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			
<400> 99			
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttcagg ttccactggt		60	
gacgcggccc agccggccga cctgtgaag cgtctcggg gcccgctggt gacctgcacg		120	
tgtgagagcc cacattgcaa ggggcctacc tggcggggg cctgggtgcac agtagtgctg		180	
glcggggagg aggggaggca ccccaggaa catcggggct gcgggaactt gcacaggagag		240	
ctctgcaggg ggcgcccccac cgagttcgtc aaccactact gctgcgacag ccacctctgc		300	
aaccacaacg tgtccctggg gctggaggcc acccaaccic ctcggagca gccgggaaca		360	
gatggccagc atcatcatca tcatcat		387	

[0042]

<210> 100	
<211> 444	
<212> PRT	
<213> 人	
<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
 [0043] 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

<400> 101
gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagacacc 60
ctctcctgia gggccagtca gaggcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct ccctatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg gtcctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgia ttactgtcag cagtaaggta gctcgccgat caccctcggc 300
caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gccctctgtg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtgaag gtggataacg cctccaatc gggtactcc 480
caggagagtgc tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccccg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 102
<211> 215
<212> PRT
<213> 人

<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

[0044]

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

<400> 103

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggigg ctccatgagc agtgggaat actactggaa ctggatccgc 120

cagcaccagc ggaaggccct ggagtggatt gggatcaatc attacagtgg gagtacctac 180

tacaaccgct cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccttgaagc tgagctcgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300

[0045]

tcagtggctg gggttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgctc ctcag 355

<210> 104

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<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> 用于克隆全长 1.12.1 的扩增引物	
	<400> 105	
	tcctcaagct tgatatctct agaagccgcc accatgaaac acctgtggtt ctctctcc	58
	<210> 106	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于克隆全长 1.12.1 的扩增引物	
	<400> 106	
	ttctctgac agaattccta ctatttaccg ggagacaggg agagggc	46
	<210> 107	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于克隆全长 1.12.1 的扩增引物	
[0046]	<400> 107	
	tcctcaagct tcccgggagc cgccaccatg gaaaccccag cgcagctt	48
	<210> 108	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于克隆全长 1.12.1 的扩增引物	
	<400> 108	
	ttctttgac agaattccta ctaacactct cccctgttga agctctttg	49
	<210> 109	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 突变性寡核苷酸	
	<400> 109	
	ctccagggga aagagccacc ctctcctgta gg	32
	<210> 110	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 突变性寡核苷酸	
	<400> 110	
	cctacaggag aggggtggctc ttccccctgg ag	32

	<210> 111 <211> 30 <212> DNA <213> 人工 <220> <223> 突变性寡核苷酸 <400> 111 ggtaggtcca tcagcagigg tgaatactac	30
	<210> 112 <211> 30 <212> DNA <213> 人工 <220> <223> 突变性寡核苷酸 <400> 112 gtagtatica ccactgctga tggagccacc	30
	<210> 113 <211> 9 <212> PRT <213> 人类 <400> 113 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 1 5	
[0047]	<210> 114 <211> 8 <212> PRT <213> 人类 <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 gagggacat g	21
	<210> 116 <211> 28 <212> DNA <213> 人工 <220> <223> 反向引物 <400> 116 cagaaaggaa tcaggigctc 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
 gggtattga atcactttag gcttctcigg actgttg 37
 <210> 119
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> TaqMan 探针 (ID1- 探针)
 <400> 119
 ccagcacgtc atcgactaca tcaggga 27
 <210> 120
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> Taqman PCR引物 (ID1-F)
 <400> 120
 aaggltgagca aggtggagal tc 22
 <210> 121
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> Taqman PCR引物 (ID1-R)
 <400> 121
 ttccgagttc agctccaact g 21
 <210> 122
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人
 <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

<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

<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

<400> 125

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

[0049]

<210> 126

<211> 325

<212> DNA

<213> 人

<400> 126

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagacacc 60
ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
ccctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtcctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300
caaggggacac gactggagat taaac 325

<210> 127

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<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

<400> 128
cagggtgcagc tgcaggagtc gggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggigg ctccatgagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagtacctac 180
tacaaccctg cctcaagagc tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
tcagtggctg gggttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacagccicc 360
accaagggcc catcggtctt ccccttgccg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
ggggccctgg gctgcctggt caaggactac tccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc tcccagctg tcctacagtc ctacaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtgaca agacagttga gcgcaaatgt 660
tgtgtcagat gccaccctg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctccctcttc 720
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccgaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
gtgcataat ccaagacaaa gccacgggag gacagctca acagcacgtt ccgtgtggtc 900
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
tccaacaaag gcctccagc ccccatcgag aaaaccaict ccaaaaccaa agggcagccc 1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
agccctgacct gcctgggtcaa aggcctctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgcctggactc cgacggctcc 1200
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
tcattgtccg tgaigcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320
tctccgggta aa 1332

<210> 129
<211> 355
<212> DNA
<213> 人

<400> 129
cagggtgcagc tgcaggagtc gggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggigg ctccatgagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc 120

[0050]

cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gactacctac 180
 tacaacccgt cccccaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 tcagtggtcg gggttgacta ctggggccag ggaacccctg tcaccgtctc ctacg 355

<210> 130

<211> 503

<212> PRT

<213> 人

<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

[0051]

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

[0052]

<210> 131
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人

<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

[0053]

<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

<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

<400> 134

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

[0054] 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

<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

[0055]

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

<210> 136

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 136

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

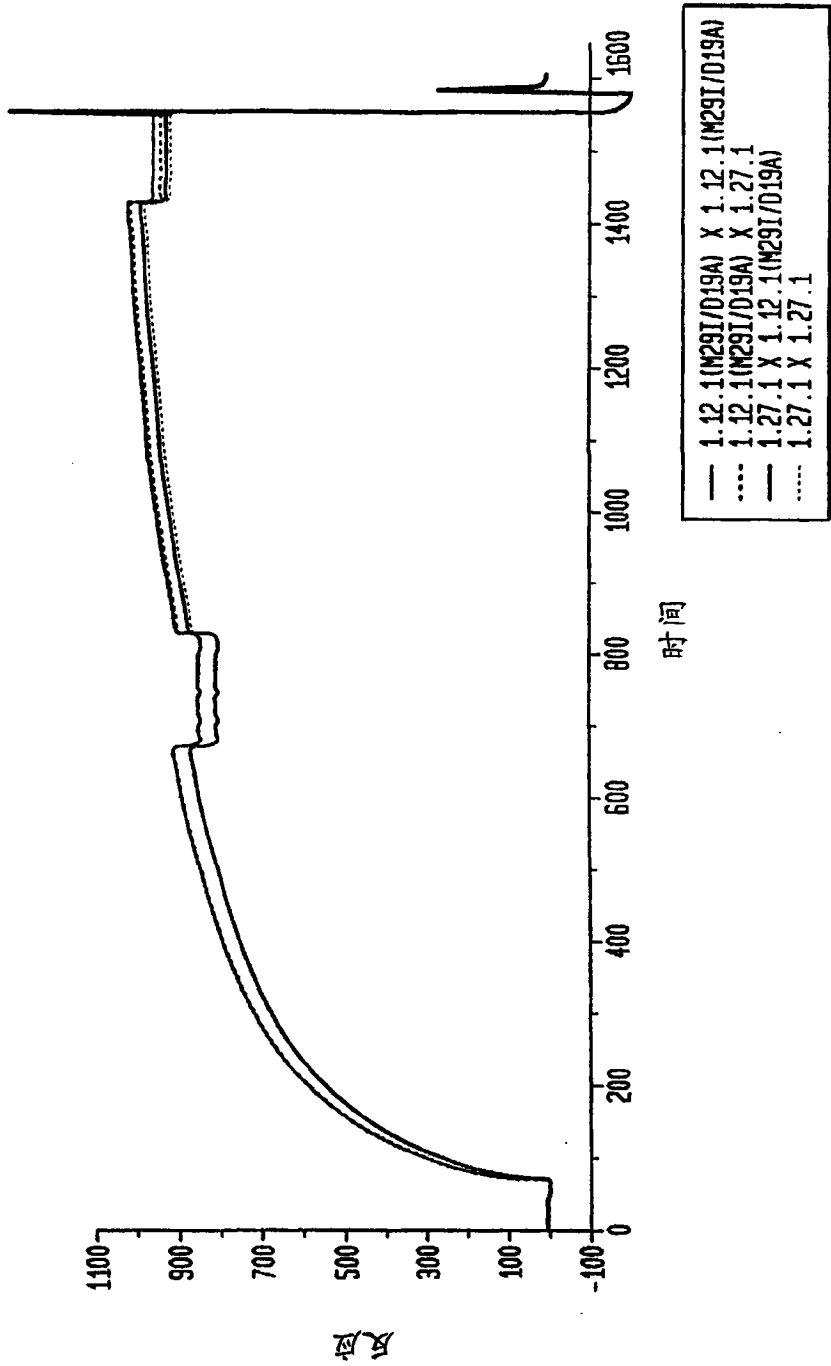


图 1

图 2

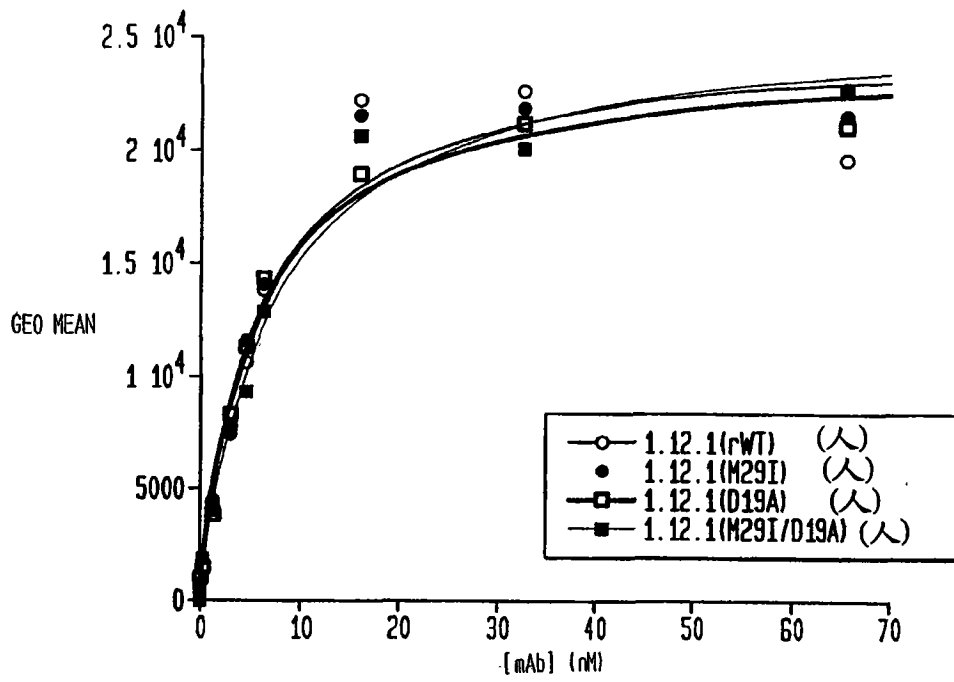


图3A

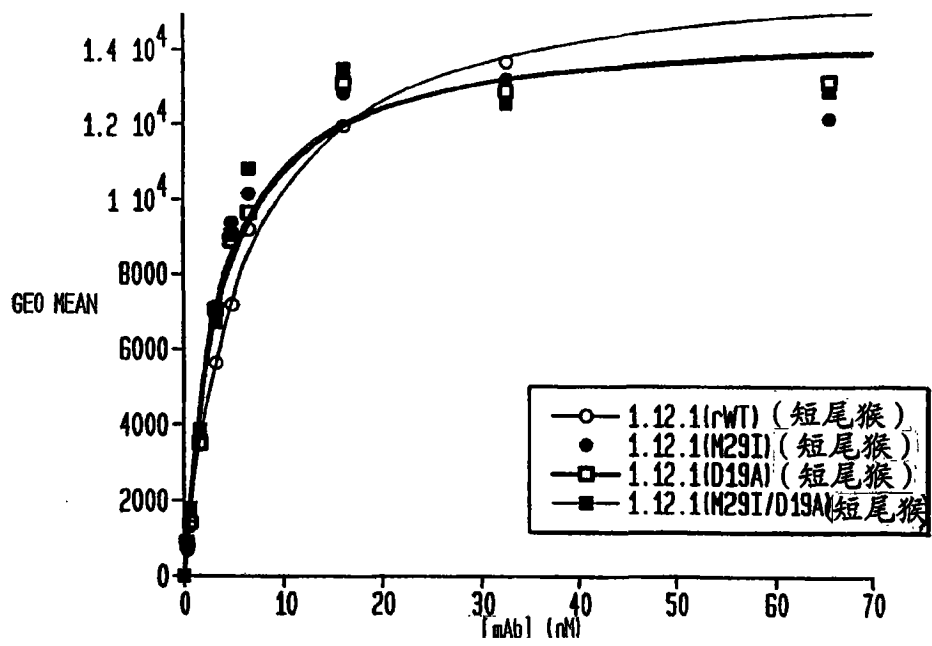
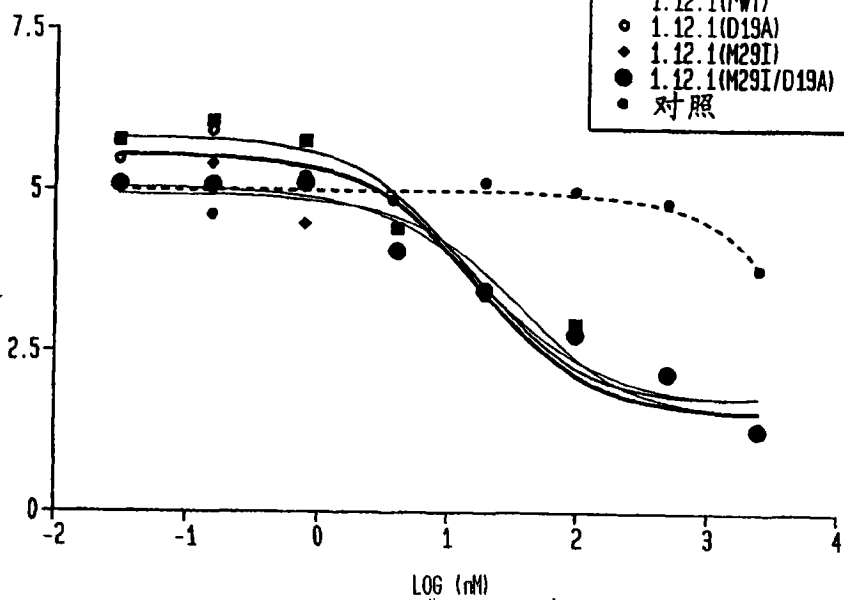


图3B

ID1
表达



SIGNOIDAL 剂量反应	1.12.1	1.12.1(rWT)	1.12.1(D19A)	1.12.1(M29I)	1.12.1(M29I/D19A)	对照
IC50, nM	13.89	8.2	17.06	34.66	22.15	1.10E+09
IC50 误差	1.61	1.91	1.35	1.62	1.67	NA
R ²	0.9559	0.922	0.9821	0.9544	0.9485	0.8488

图 4

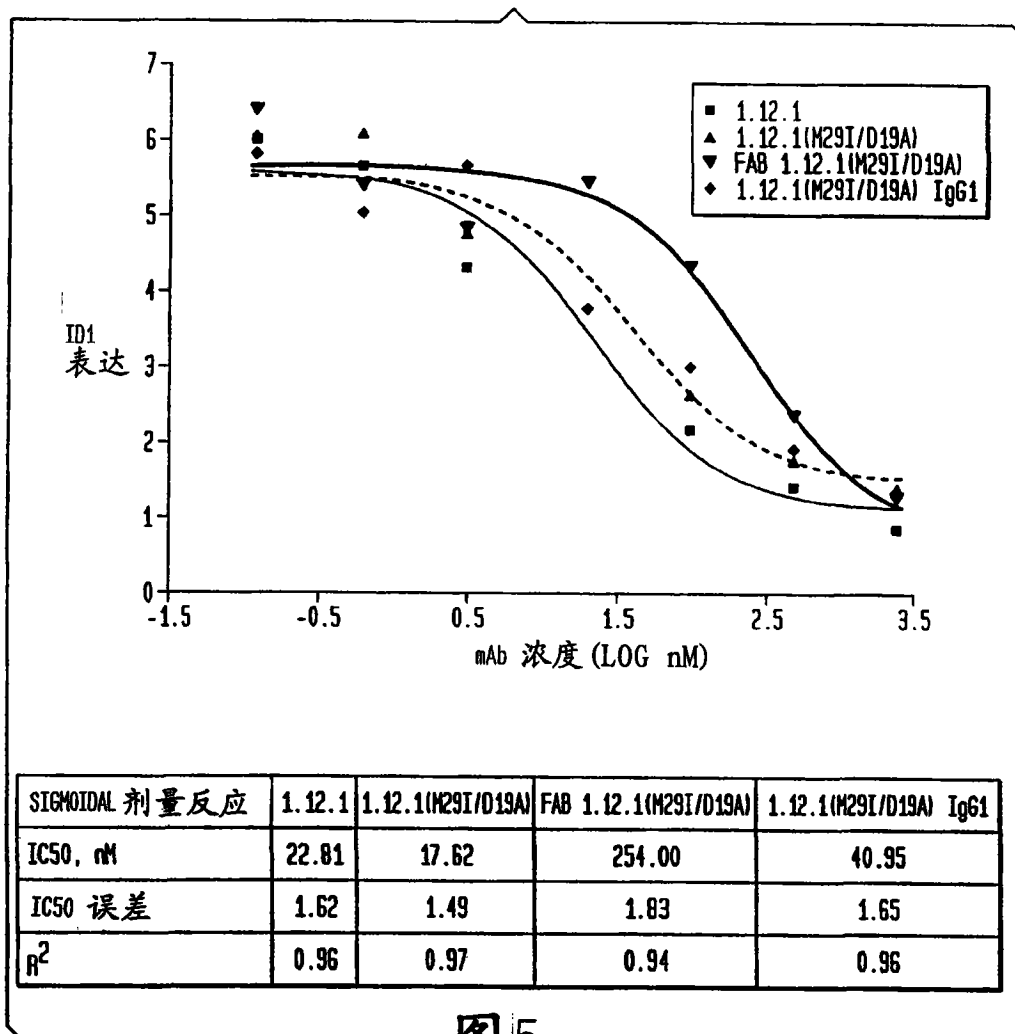


图5

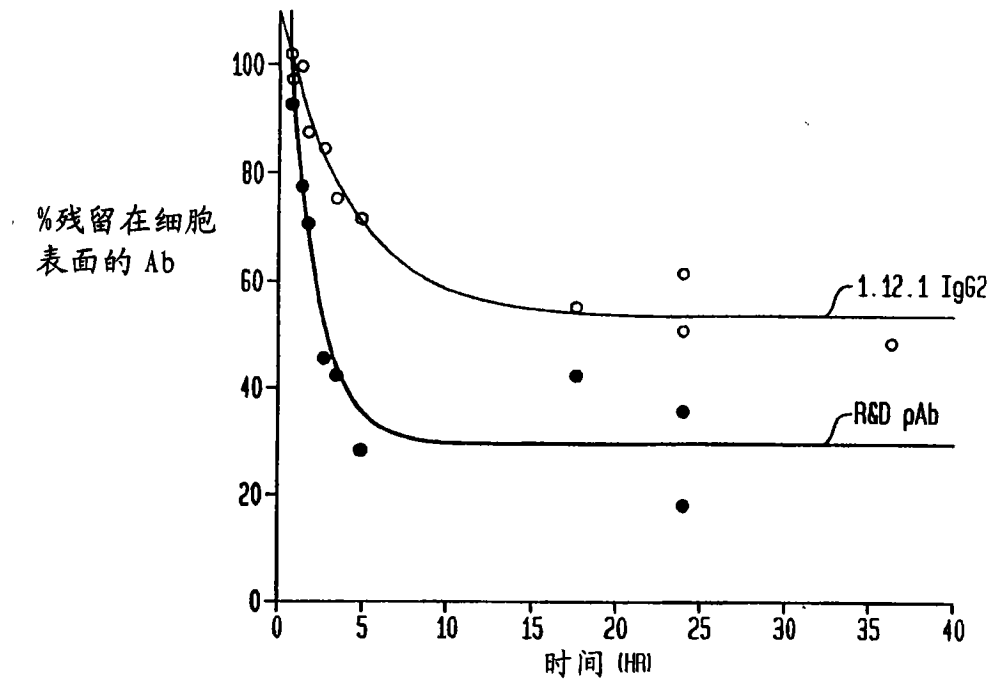


图6A

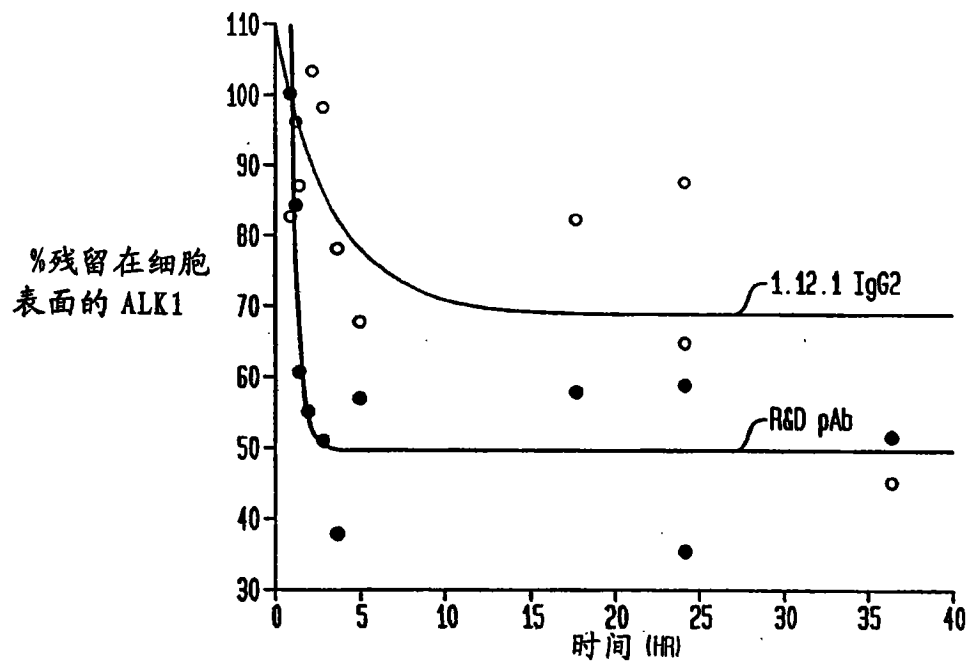


图6B

表达的: 1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGS SSG YYW WIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 60
(SEQ ID NO: 104)
种系: 1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY 60
(SEQ ID NO: 131)

表达的: 61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCAR - VAG-FDYWGQGLTVTVSS 118
种系: 61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAGYFDYWGQGLTVTVSS 120

表达的: 1 EIVLTQSPGTLSPGER TLSCRASQSVSSSYLAWYQOKPGQAPRLIYG SSRATGIP 60
(SEQ ID NO: 127)
种系: 1 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQOKPGQAPRLIYGASSRATGIP 60
(SEQ ID NO: 132)

表达的: 61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTREIK 108
种系: 61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTREIK 108

图7A

	10	20	30	
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERD	TLSCRASQSVS	1.12.1 VL (SEQ ID 127)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	1.14.1 VL (SEQ ID 20)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	1.162.1 VL (SEQ ID 28)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	1.31.1 VL (SEQ ID 135)
1	ESVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	4.62.1 VL (SEQ ID 60)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	4.72.1 VL (SEQ ID 68)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVS	种系 (A27) (SEQ ID NO:133)
	40	50	60	
31	SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG	TSSSRATGIP		1.12.1 VL
31	STYLAWHQKPGQAPRLLIYG	VSSSRASGV	P	1.14.1 VL
31	SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG	ASSSRATGIP		1.162.1 VL
31	SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG	ASSSRATGIP		1.31.1 VL
31	SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG	VSSSRATGIP		4.62.1 VL
31	SSYLAWYQQRKPGQAPRLLIYG	VSSSRATGIP		4.72.1 VL
31	SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG	ASSSRATGIP		种系 (A27)
	70	80	90	
61	DRFSGSGSGTDFTLTISRLE	PEPDFAVYYCQ		1.12.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLTISRLE	PEPDFAVYYCQ		1.14.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLTISRLE	PEPDFAVYYCQ		1.162.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLTISRLE	PEPDFAVYYCQ		1.31.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLTISRLE	PEPDFAVYYCQ		4.62.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLTISRLE	PEPDFAVYYCQ		4.72.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLTISRLE	PEPDFAVYYCQ		种系 (A27)
	100			
91	QYGSSPITFGQGTRLEIK			1.12.1 VL
91	QYGSSPITFGQGTRLEIK			1.14.1 VL
91	RYGSSPITFGQGTRLEIK			1.162.1 VL
91	HFGSSPITFGQGTRLEIK			1.31.1 VL
91	QYGSSPITFGQGTRLEIK			4.62.1 VL
91	QYGSSMITFGQGTRLEIK			4.72.1 VL
91	QYGSSP			种系 (A27)

图7B

		10	20	30	
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSHS				1.12.1 VH (SEQ ID 104)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				1.151.1 VH (SEQ ID 22)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				1.162.1 VH (SEQ ID 26)
1	QMQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				1.8.1 VH (SEQ ID 34)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				4.24.1 VH (SEQ ID 46)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				4.38.1 VH (SEQ ID 50)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				4.58.1 VH (SEQ ID 54)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				4.62.1 VH (SEQ ID 58)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				4.68.1 VH (SEQ ID 62)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				4.72.1 VH (SEQ ID 66)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				5.13.1 VH (SEQ ID 70)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				5.34.1 VH (SEQ ID 74)
1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSI S				4-31 种系 (SEQ ID NO: 134)
		40	50	60	
31	SGEYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				1.12.1 VH
31	SGGHYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				1.151.1 VH
31	SGEYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				1.162.1 VH
31	SGGHYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSAY				1.8.1 VH
31	SDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				4.24.1 VH
31	SGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				4.38.1 VH
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				4.58.1 VH
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				4.62.1 VH
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				4.68.1 VH
31	SGEYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIFYSGSTY				4.72.1 VH
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				5.13.1 VH
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				5.34.1 VH
31	SGGYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY				4-31 种系

图7C

		70	80	90	
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 1.12.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 1.151.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 1.162.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 1.8.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 4.24.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 4.38.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 4.58.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 4.62.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 4.68.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 4.72.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 5.13.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 5.34.1 VH
61	YNPSLKS	SRVT	ISVDT	SKNQFSLKLSSV	TAA 4-31 种系

91	DTAVYYCAR	1.12.1 VH
91	DTAVYYCAR	1.151.1 VH
91	DTAVYYCAR	1.162.1 VH
91	DTAVYYCAR	1.8.1 VH
91	DTAVYYCAR	4.24.1 VH
91	DTAVYYCAR	4.38.1 VH
91	DTAVYYCAR	4.58.1 VH
91	DTAVYYCAR	4.62.1 VH
91	DTAVYYCAR	4.68.1 VH
91	DTAVYYCAR	4.72.1 VH
91	DTAVYYCAR	5.13.1 VH
91	DTAVYYCAR	5.34.1 VH
91	DTAVYYCAR	4-31 种系

图7D



图8



图9A



图9B

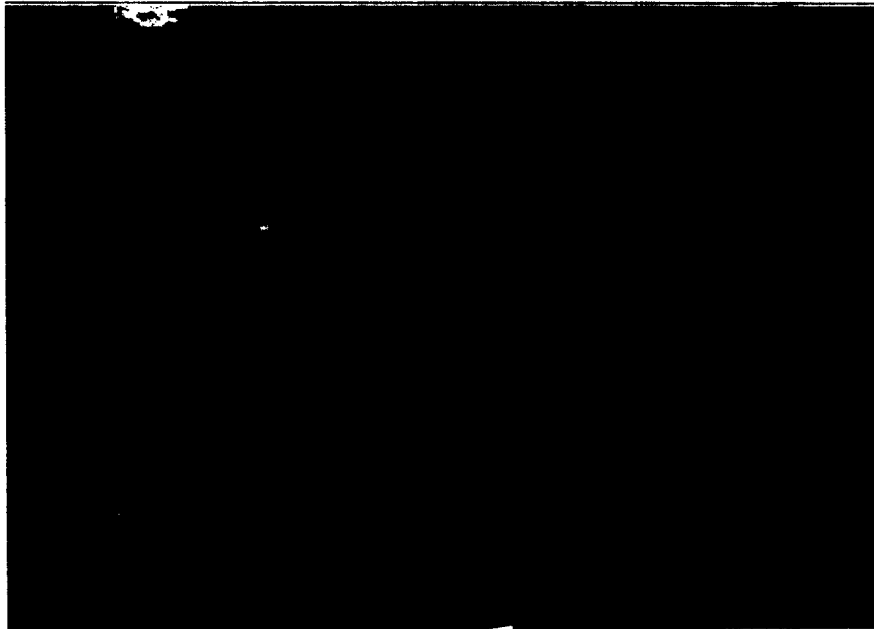


图10



图11



图 12

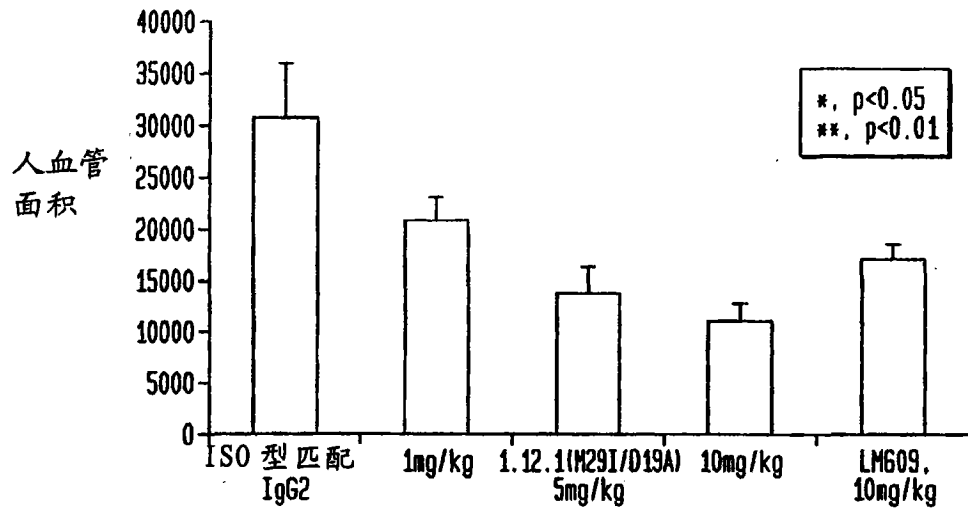


图13

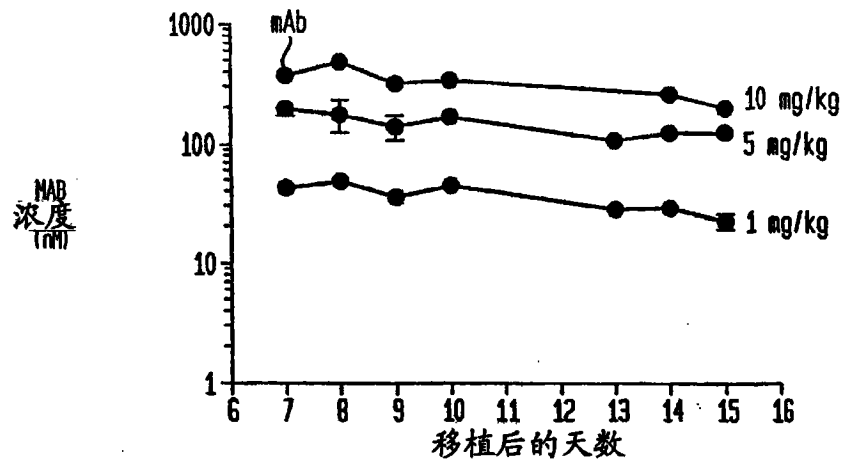


图14

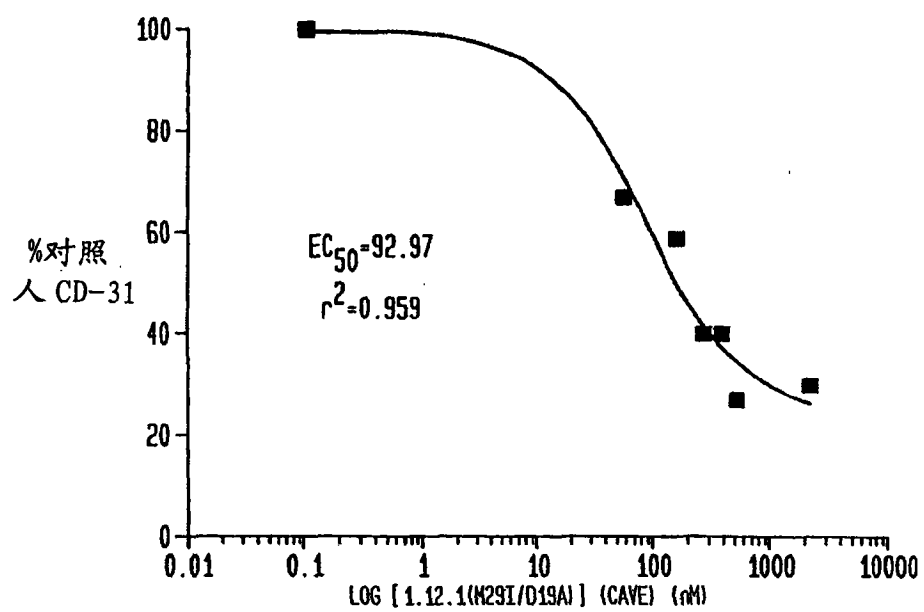


图15