



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118909117 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 08

(21) 申请号 202411049665.1

(22) 申请日 2020.08.14

(30) 优先权数据

62/886,918 2019.08.14 US

(62) 分案原申请数据

202080071918.9 2020.08.14

(71) 申请人 安托拉诊疗公司

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 萨奇德夫·西杜 潘国华

尼什·帕特尔 詹森·莫法特

斯蒂法尼·安格斯

贾勒特·亚当斯

贾加特·R·朱努图拉

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书2页 说明书40页

序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

与LRP6蛋白结合的抗体及使用方法

(57) 摘要

本申请涉及与LRP6蛋白结合的抗体及使用方法。本文提供了特异性结合LRP6的抗体及其使用方法。

克隆ID	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	表位组
LRP6-A1	SVSSA	SASSLYS	YYWPI	LSYYYI	SIYSSYGYTS	TVRGSKKPYESGWAM	1
LRP6-A10	SVSSA	SASSLYS	YSWGPF	ISYSSI	YISSYGYTY	AHYFPWAGAM	2
LRP6-B6	SVSSA	SASSLYS	YYFLI	ISYSSI	SISPYGYTY	SSYFPWFSAM	2
LRP6-E3	SVSSA	SASSLYS	AGSAPYHLI	LYYYSM	SIYSSYGYTY	YAGYYPWAYYGWPFSGL	1
LRP6-G3	SVSSA	SASSLYS	YYWPI	ISYSSI	SIYSSYGYTS	TVRGSKKPYESGWAM	1
LRP6-G9	SVSSA	SASSLYS	YYWPI	IYSSYI	SIYSSYGYTS	TVRGSKKPYESGWAM	1

1. 一种抗体,所述抗体特异性结合LRP6,所述抗体包含轻链可变区和/或重链可变区,所述重链可变区包含互补决定区CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含互补决定区CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中所述CDR的氨基酸序列包含选自以下的序列或由选自以下的序列组成:抗LRP6抗体LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9的CDR序列集。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述CDR的氨基酸序列包含选自以下列出的序列的序列或由选自以下列出的序列的序列组成:

CDR-H1选自由以下组成的组:LSYYYI (SEQ ID NO:2)、ISYSSI (SEQ ID NO:25)、LYYYSM (SEQ ID NO:4)、ISSYYI (SEQ ID NO:5)和IYSYYI (SEQ ID NO:26);

CDR-H2选自由以下组成的组:SIYSSYGYTS (SEQ ID NO:6)、YISSYGYTY (SEQ ID NO:7)、SISPYGYTY (SEQ ID NO:8)、SIYSSYGYTY (SEQ ID NO:9)和SIYSSYSYTS (SEQ ID NO:27);

CDR-H3选自由以下组成的组:TVRGSKKPYFSGWAM (SEQ ID NO:10)、AHYFPWAGAM (SEQ ID NO:11)、SSYFPWFSAM (SEQ ID NO:12)、YAGYYYYPWAYYGWPFSGL (SEQ ID NO:13);

CDR-L1是SVSSA (SEQ ID NO:14);

CDR-L2是SASSLYS (SEQ ID NO:15);和/或

CDR-L3选自由以下组成的组:YYSPI (SEQ ID NO:16)、YSWGPF (SEQ ID NO:17)、YYFLI (SEQ ID NO:18)、AGSAPYHLI (SEQ ID NO:19)和YYWPI (SEQ ID NO:20)。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体特异性结合LRP6。

4. 根据权利要求3所述的抗体,其中所述CDR的氨基酸序列是选自抗体LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9的抗体的CDR序列集。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,所述抗体阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点的结合。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗体,所述抗体阻断Wnt配体与LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。

7. 一种免疫缀合物,所述免疫缀合物包含权利要求1至6中任一项所述的抗体和可检测的标记物或细胞毒性剂。

8. 一种核酸分子,所述核酸分子编码权利要求1至6中任一项所述的抗体。

9. 一种载体,所述载体包含与权利要求8所述的核酸分子可操作地连接的表达控制序列。

10. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含重组核酸分子,所述重组核酸分子包含与权利要求8所述的核酸分子可操作地连接的表达控制序列。

11. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求9所述的载体。

12. 一种制备抗LRP6抗体的方法,所述方法包括培养权利要求10或11所述的宿主细胞。

13. 一种组合物,所述组合物包含权利要求1至6中任一项所述的抗体、权利要求7所述的免疫缀合物、权利要求8所述的核酸分子、权利要求9所述的载体或权利要求10或11所述的宿主细胞,以及任选地合适的稀释剂。

14. 一种试剂盒,所述试剂盒包含权利要求1至6中任一项所述的抗体、权利要求7所述的免疫缀合物、权利要求8所述的核酸分子、权利要求9所述的载体或权利要求10或11所述的宿主细胞。

15. 权利要求1至6中任一项所述的抗体或权利要求7所述的免疫缀合物在制造用于检测LRP6表达的试剂盒中的用途。

16. 权利要求1至6中任一项所述的抗体或权利要求7所述的免疫缀合物在制造用于抑制Wnt配体与LRP6受体结合、破坏Wnt信号传导途径、抑制Wnt诱导的转录活性、抑制散乱蛋白活化、促进 β -联蛋白破坏复合物的保持、促进 β -联蛋白积累或抑制细胞生长的试剂盒中的用途。

17. 权利要求1至6中任一项所述的抗体或权利要求7所述的免疫缀合物在制造用于治疗有相应需要的受试者的癌症的试剂盒中的用途,其中所述癌症选自结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、肾上腺皮质癌、成骨细胞瘤、急性髓性白血病、前列腺癌、胶质母细胞瘤、膀胱癌和宫颈癌。

与LRP6蛋白结合的抗体及使用方法

[0001] 本申请是申请日为2020年08月14日,申请号为202080071918.9,发明名称为“与LRP6蛋白结合的抗体及使用方法”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请的引用

[0003] 本申请要求2019年8月14日提交的美国临时申请62/886,918的优先权日的权益,该美国临时申请的内容通过引用以其整体并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包括序列表,所述序列表已经以ASCII格式电子提交并且在此通过引用以其整体并入。于2020年8月13日创建的所述ASCII副本被命名为27690-P62374PC00_MODM-006-PCT_SL.txt并且大小为24,580字节。

背景

[0007] Wnt信号传导在多种细胞过程(诸如细胞命运决定、增殖、存活、极性和迁移)的调节中具有关键作用¹。由于Wnt信号传导途径中改变的表达或突变而引起的扰动与胚胎发育缺陷以及多种病理诸如癌症和骨质疏松症有关²⁻⁴。Wnt信号导致典型和非典型信号传导途径的活化^{1,5}。非典型途径活化不涉及细胞核或转录的信号分子,而是活化调节细胞骨架和钙库(calcium store)的细胞质信号。该途径主要在调节细胞极性或迁移中起作用。典型途径主要通过调节 β -联蛋白的细胞质水平来控制转录活性。在非刺激条件下, β -联蛋白与由Axin、APC、CK1和GSK3b组成的破坏复合物缔合,这导致对 β -联蛋白的磷酸化、泛素化和蛋白酶体降解。Wnt信号传导使该复合物去稳定化,导致“游离” β -联蛋白在胞质溶胶中积累,移位至细胞核,并作为TCF/LEF介导的转录的共活化物起作用。Wnt与七跨膜域受体的卷曲受体(frizzled)家族以及LRP5或LRP6结合,导致典型信号传导途径的启动^{6,7}。

[0008] LRP5和LRP6是功能冗余的单次通过跨膜受体,它们共有约70%的同源性。Wnt配体与Fzd和LRP5/6的结合导致破坏复合物和散乱蛋白(Dishvelled, Dsh/Dvl)的募集以及LRP5/6的位于细胞内结构域中的PPPSPxS基序(SEQ ID NO:1)的磷酸化⁸。这种磷酸化由GSK3b和CK1介导,这进而导致GSK3b活性减弱,抑制 β -联蛋白磷酸化和随后的蛋白酶体降解,并增强TCF/LEF介导的转录活性。LRP6在胚胎发育期间和成人组织中广泛表达。LRP6中的突变与骨量疾病相关,并且几种具有LRP6敲除或突变的小鼠模型表现出骨发育中的改变⁹。LRP6的表达还被显示在人类恶性组织和人类癌细胞系中升高,并且这样的细胞系中的Wnt信号传导依赖于LRP6的表达¹⁰⁻¹²。在转导Wnt信号方面LRP6似乎比LRP5更有效的观察结果进一步支持了这点。由于LRP6在调节Wnt信号传导方面的重要性及其在几种人类疾病中已确定的作用,LRP6正成为治疗性药物开发的越来越重要的靶。最近,靶向LRP6的人类合成抗体揭示了Wnt配体如何与LRP6的细胞外结构域的不同区域结合的重要见解。此外,研究还显示LRP6的拮抗性抗体可以抑制Wnt驱动的异种移植肿瘤的体内生长^{15,16}。然而,这些抗体仍处于发现阶段,并且它们在临床中作为治疗剂的潜力仍有待阐明。有关LRP6及其在Wnt信号传导和多种疾病发病机制中的作用的生物学仍有待发现,并且合成抗体的深度工具箱将有助于系统地揭示这些作用,并还将提供另外的靶向疗法。

[0009] Wnt信号传导导致典型和非典型信号传导途径的活化。非典型途径活化不参与细胞核或转录而是活化调节细胞骨架和钙水平的细胞质信号的信号分子。该途径主要在调节细胞极性或迁移中起作用。

[0010] 典型途径主要通过调节 β -联蛋白的细胞质水平来控制转录活性。在未刺激条件下, β -联蛋白与破坏复合物(包含Axin、APC、CD1和GSK β)缔合,导致 β -联蛋白的磷酸化、泛素化和蛋白酶体降解。当Wnt与7次跨膜受体卷曲受体(FZD)结合并与共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP5或LRP6)结合时,Wnt信号传导活化。这种信号传导使破坏复合物去稳定化,部分通过将散乱蛋白(disheveled,Dsh/Dvl)吸引到质膜上,导致 β -联蛋白的积累,然后 β -联蛋白行进到细胞核并活化TCF/LEF介导的转录。

[0011] 以下描述的本发明通过利用最新技术水平的抗体噬菌体展示文库和技术,鉴定出一组新的靶向LRP6细胞外表位的合成抗体。

[0012] 概述

[0013] 在一方面,本文提供了特异性结合LRP6的抗体,该抗体包含轻链可变区和/或重链可变区,重链可变区包含互补决定区CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,轻链可变区包含互补决定区CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且所述CDR的氨基酸序列包含选自以下的序列或由选自以下的序列组成:抗LRP6抗体的CDR序列集:LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9。在一种实施方案中,所述CDR的氨基酸序列包含选自如以下列出的序列的序列或由选自如以下列出的序列的序列组成:CDR-H1选自由以下组成的组:LSYYYI(SEQ ID NO:2)、ISYSSI(SEQ ID NO:25)、LYYYSM(SEQ ID NO:4)、ISSYYI(SEQ ID NO:5)和IYSYYI(SEQ ID NO:26);CDR-H2选自由以下组成的组:SIYSSYGYTS(SEQ ID NO:6)、YISSYYGYTY(SEQ ID NO:7)、SISPYGYTY(SEQ ID NO:8)、SIYSSYGYTY(SEQ ID NO:9)和SIYSSYSYTS(SEQ ID NO:27);CDR-H3选自由以下组成的组:TVRGSKKPYFSGWAM(SEQ ID NO:10)、AHYFPWAGAM(SEQ ID NO:11)、SSYFPWFSA(SEQ ID NO:12)、YAGYYYYPWAYYGWPFSG(SEQ ID NO:13)、TVRGSKKPYFSGWAM(SEQ ID NO:10)、TVRGSKKPYFSGWAM(SEQ ID NO:10);CDR-L1是SVSSA(SEQ ID NO:14);CDR-L2是SASSLYS(SEQ ID NO:15);和/或CDR-L3选自由以下组成的组:YYSPI(SEQ ID NO:16)、YSWGPF(SEQ ID NO:17)、YYFLI(SEQ ID NO:18)、AGSAPYHLI(SEQ ID NO:19)和YYWPI(SEQ ID NO:20)。在另一种实施方案中,抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:i)如表2中列出的重链氨基酸序列;ii)与如表2中列出的重链氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或iii)保守取代的氨基酸。在另一种实施方案中,抗体包含轻链可变区,该轻链可变区包含:i)如表2中列出的轻链氨基酸序列,ii)与如表2中列出的轻链氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或iii)保守取代的氨基酸。在另一种实施方案中,CDR序列是选自表1中鉴定的抗体的全CDR序列集。在另一种实施方案中,抗体与LRP5交叉反应。在另一种实施方案中,CDR序列包含选自表1中鉴定的抗体的轻链或重链CDR序列集。在另一种实施方案中,抗体特异性结合LRP6。在另一种实施方案中,CDR序列是选自抗体LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9的抗体的CDR序列集。在另一种实施方案中,抗体阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点的结合。在另一种实施方案中,抗体阻断Wnt配体与LRP6的

非Wnt3a结合位点的结合。在另一种实施方案中,抗体是单克隆抗体。在另一种实施方案中,抗体是人源化抗体。在另一种实施方案中,其中抗体是单链抗体。在另一种实施方案中,抗体是选自以下的抗体结合片段:Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv,其二聚体、纳米抗体、微型抗体、双抗体及多聚体。在另一种实施方案中,抗体是双特异性抗体。在另一种实施方案中,抗体是还结合FZD受体的双特异性抗体。在另一种实施方案中,抗体包含非天然糖基化模式。在另一种实施方案中,抗体包含半胱氨酸取代或添加,例如在恒定区或框架区中。

[0014] 在另一方面,本文提供了包含如本文提供的抗体和可检测标记物或细胞毒性剂的免疫缀合物。在一种实施方案中,免疫缀合物包含选自以下的细胞毒性剂:美登素生物碱(maytansinoid)、澳瑞他汀(auristatin)、多拉司他汀(dolastatin)、tubulysin、念珠藻素、吡咯并苯二氮卓类(PBD)二聚体、吲哚并苯二氮卓类二聚体、 α -鹅膏蕈碱(α -amanitin)、trichothene、SN-38、倍癌霉素、CC1065、卡奇霉素(calicheamicin)、烯二炔(enediyne)抗生素、紫杉烷、多柔比星衍生物、蒽环类和它们的立体异构体、azanofide、电子等排体、类似物或衍生物。

[0015] 在另一方面,本文提供了编码如本文提供的抗体的核酸分子。在一种实施方案中,一种或更多种CDR序列由表2中的核酸编码。在另一种实施方案中,抗体包含由核酸编码的重链可变区,该核酸包含:i)如表2中列出的重链核酸序列;ii)与如表2中列出的重链核酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的核苷酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或iii)i)的密码子简并核酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集。在另一种实施方案中,抗体包含由核酸编码的轻链可变区,该核酸包含:i)如表2中列出的轻链核酸序列,ii)与如表2中列出的轻链核酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或iii)i)的密码子简并核酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集。

[0016] 在另一方面,本文提供了包含与如本文提供的核酸可操作地连接的表达控制序列的载体。

[0017] 在另一方面,本文提供了包含重组核酸分子的宿主细胞,该重组核酸分子包含与如本文提供的核酸可操作地连接的表达控制序列。在一种实施方案中,细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0018] 在另一方面,本文提供了包含如本文提供的载体的宿主细胞。

[0019] 在另一方面,本文提供了用于制备抗LRP6抗体的方法,该方法包括培养如本文提供的宿主细胞。

[0020] 在另一方面,本文提供了组合物,该组合物包含如本文提供的抗体、免疫缀合物、核酸分子、载体或宿主细胞,以及任选地合适的稀释剂。在一种实施方案中,组合物包含一种或更多种抗体或免疫缀合物,任选地其中组合物是药物组合物。

[0021] 在另一方面,本文提供了试剂盒,该试剂盒包含如本文提供的抗体、免疫缀合物、核酸分子、载体或宿主细胞。

[0022] 在另一方面,本文提供了检测LRP6表达的方法,该方法包括在允许形成抗体:细胞复合物的条件下,使包含一个或更多个细胞的样品与如本文提供的一种或更多种抗体或免

疫缀合物接触,并检测任何抗体复合物的存在。在一种实施方案中,检测是通过免疫荧光。在另一种实施方案中,检测是通过流式细胞术。在另一种实施方案中,该方法用于检测LRP6表达,并且抗体或免疫缀合物包含对应于选自LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9的抗体的CDR序列集。

[0023] 在另一方面,本文提供了抑制Wnt配体与LRP6受体结合、破坏Wnt信号传导途径、抑制Wnt诱导的转录活性、抑制散乱蛋白活化、促进 β -联蛋白破坏复合物的保持、促进 β -联蛋白积累或抑制细胞生长的方法,该方法包括使表达LRP6受体的细胞与如本文提供的抗体或免疫缀合物接触。在又另一方面,提供了如本文提供的抗体或免疫缀合物用于抑制Wnt配体与LRP6受体结合、破坏Wnt信号传导途径、抑制Wnt诱导的转录活性、抑制散乱蛋白活化、促进 β -联蛋白破坏复合物的保持、促进 β -联蛋白积累或抑制细胞生长。在另一方面,提供了如本文提供的抗体或免疫缀合物用于抑制Wnt配体与LRP6受体结合、破坏Wnt信号传导途径、抑制Wnt诱导的转录活性、抑制散乱蛋白活化、促进 β -联蛋白破坏复合物的保持、促进 β -联蛋白积累或抑制细胞生长的用途。在又另一方面,提供了如本文提供的抗体或免疫缀合物在制备用于抑制Wnt配体与LRP6受体结合、破坏Wnt信号传导途径、抑制Wnt诱导的转录活性、抑制散乱蛋白活化、促进 β -联蛋白破坏复合物的保持、促进 β -联蛋白积累或抑制细胞生长的药物中的用途。在一种实施方案中,抗体或免疫缀合物阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点的结合。在另一种实施方案中,抗体或免疫缀合物阻断Wnt配体与LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。在另一种实施方案中,抗体或免疫缀合物包含对应于选自LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9的抗体的CDR序列集。

[0024] 在另一方面,本文提供了治疗有相应需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的药物组合物,该药物组合物包含如本文提供的抗体或免疫缀合物。在另一方面,是用于在治疗有相应需要的受试者的癌症中使用的药物组合物,该药物组合物包含如本文提供的抗体或免疫缀合物。在另一种实施方案中,是药物组合物用于治疗有相应需要的受试者的癌症的用途,该药物组合物包含如本文提供的抗体或免疫缀合物。在又另一种实施方案中,是药物组合物在制备用于治疗有相应需要的受试者的癌症的药物中的用途,该药物组合物包含如本文提供的抗体或免疫缀合物。在一种实施方案中,癌症选自结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、肾上腺皮质癌和成骨细胞瘤。在另一种实施方案中,癌症选自急性髓性白血病、前列腺癌、胶质母细胞瘤、膀胱癌和宫颈癌。在另一种实施方案中,该方法包括向受试者施用如本文提供的第一抗体或抗体缀合物和第二抗体或抗体缀合物,其中第一抗体或抗体缀合物阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点的结合,并且第二抗体或抗体缀合物阻断Wnt配体与LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。在另一种实施方案中,第一抗体或免疫缀合物包含选自抗体LRP6-A10或LRP6-B6的CDR序列集,第二抗体或免疫缀合物包含选自抗体LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3或LRP6-G9的CDR序列集。在另一种实施方案中,抗体或免疫缀合物在至少一种测定中特异性结合LRP6,并在至少一种测定中抑制Wnt3a诱导的信号传导,任选地其中抗体或免疫缀合物是如本文提供的抗体或免疫缀合物。在另一种实施方案中,抗体或免疫缀合物包含对应于选自LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9的抗体的CDR序列集。

[0025] 在另一方面,本文提供了增强与LRP6的Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性的方法,该方法包括使表达LRP6的细胞与阻断Wnt配体与LRP6的非Wnt3a结合位点结合

的抗体接触。在一种实施方案中,该方法在体外进行。在另一种实施方案中,该方法在体内进行。

[0026] 在另一方面,本文提供了增强与LRP6的非Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性的方法,该方法是通过使表达LRP6的细胞与阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点结合的抗体接触。在一种实施方案中,该方法在体外进行。在另一种实施方案中,该方法在体内进行。

附图简述

[0028] 并入本文并且形成本说明书一部分的附图说明了示例性实施方案,并且与本说明书一起进一步用于使相关领域的技术人员能够进行和使用这些实施方案以及对本领域技术人员将明显的其他实施方案。将结合以下附图更具体地描述本发明,在附图中:

[0029] 图1A和图1B示出6种LRP抗体。(A) 呈现重链(H)和轻链(L)互补决定区(CDR)的氨基酸序列。抗体按照如竞争性ELISA确定的独特的表位分组。(B) 在用小鼠LRP5、小鼠LRP6和人类LRP6嵌合体的ECD包被的96孔Maxisorp免疫板上进行单点ELISA。将板与所示浓度的纯化的Fab或IgG1一起孵育,然后与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗 κ 抗体一起孵育。洗涤孔8次,然后与3,3',5,5'-四甲基联苯胺/ H_2O_2 过氧化物酶(TMB)底物一起孵育5-10min。通过添加1M H_3PO_4 停止反应,并在微量滴定板读取器中于450nm处光谱测量吸光度。

[0030] 图2示出通过流式细胞术对IgG1与细胞表面LRP6结合的分析。测试LRP6 IgG与NSCLC细胞系H23的结合。使用Alexa488缀合的抗F(ab')₂二抗检测抗LRP6 IgG1蛋白的结合。染色的抗LRP6群体显示为绿色,并且仅二抗染色的群体显示为填充的蓝色。

[0031] 图3A-图3C示出LRP6 IgG对癌细胞中转录活性的作用。在(A) MDAMB231、(B) T407D和(C) U2OS细胞中使用TOPflash(萤火虫萤光素酶基因)进行TCF/LEF报告物测定。将细胞接种在白色壁、白色底的96孔板中,并用所示浓度的IgG处理1小时,然后用条件培养基刺激。用条件培养基刺激后16-20小时裂解细胞,并通过测量通过添加萤火虫发光试剂产生的发光信号来评估报告物活性。将值针对在用阴性对照抗体(抗MBP)处理并用ConCM刺激的细胞中观察到的信号进行归一化。呈现的数据代表三个独立实验,其中每个条件是三次重复的平均值。

[0032] 图4A和图4B示出LRP6 IgG对癌细胞中转录活性的作用。在(A) 用条件培养基处理的H23细胞或(B) 用重组Wnt3a (500ng/ml) 或四环素 (2ng/ml) 刺激的HEK293_Wnt1细胞中,使用TOPflash(萤火虫萤光素酶基因)进行TCF/LEF报告物测定。按照图3A-图3C的描述中所描述的评估报告物活性。

[0033] 图5A和图5B示出LRP6 IgG对癌细胞中转录活性的作用。在用LRP6-A10和LRP6-G3 IgG1处理然后用重组Wnt3a (500ng/ml) 刺激的(A) MDAMB231和(B) T407D乳腺癌细胞中,使用TOPflash(萤火虫萤光素酶基因)进行TCF/LEF报告物测定。按照图3A-图3C的描述中所描述的评估报告物活性。

[0034] 图6A-图6C示出LRP6-A10 IgG1和Fab对癌细胞中转录活性的作用。在用递增浓度的LRP6-A10(A) IgG1或(B) Fab蛋白预处理的MDAMB231、U2OS和H23癌细胞中,使用TOPflash(萤火虫萤光素酶基因)进行Wnt3aCM诱导的TCF/LEF报告物测定。按照图3A-图3C的描述中所描述的评估报告物活性。(C) 通过非线性回归分析确定IC50。

[0035] 图7A和图7B示出LRP6 IgG1对 β -联蛋白信号传导的作用。H23细胞系用LRP6 IgG (100nM) 预处理持续所示时间段,然后用条件培养基刺激。产生(A) 总体全细胞裂解物或(B) 膜级分和胞质级分,并通过SDS-page分离。切割PVDF膜,并对磷酸化LRP6、LRP5、LRP6、Axin1、Dvl3和 β -联蛋白进行免疫印迹。肌动蛋白用作全细胞裂解物的上样对照,而Na/K ATP酶和GAPDH分别用作膜级分和胞质级分的上样对照。

[0036] 图8示出多点竞争性ELISA。剂量响应曲线和非线性回归图是针对LRP6抗体的。

[0037] 图9示出通过流式细胞术对IgG1与细胞表面LRP6结合的分析。测试LRP6 IgG与乳腺癌细胞系MDAMB231的结合。使用Alexa488缀合的抗F(ab')₂二抗检测抗LRP6 IgG1蛋白的结合。染色的抗LRP6群体显示为绿色,并且仅二抗染色的群体显示为填充的。

[0038] 图10示出通过流式细胞术对IgG1与细胞表面LRP6结合的分析。测试LRP6 IgG与乳腺癌细胞系T47D的结合。使用Alexa488缀合的抗F(ab')₂二抗检测抗LRP6 IgG1蛋白的结合。染色的抗LRP6群体显示为绿色,并且仅二抗染色的群体显示为填充的蓝色。

[0039] 图11示出Wnt典型信号传导途径的示意图。

详细描述

[0041] I. 定义

[0042] 除非另有定义,否则结合本公开内容使用的科学和技术术语应当具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。例如,术语“细胞”包括单个细胞以及多于一个细胞或细胞群体。一般来说,本文描述的结合细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白和寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交使用的命名和技术是本领域熟知且常用的那些(参见,例如,Green和Sambrook,2012)。

[0043] 如本文使用的,术语“多肽”是指具有通过肽键连接的天然和/或非天然氨基酸的序列的分子。术语“肽”是指短多肽,通常长度不多于30个氨基酸。多肽的氨基酸序列被称为其“一级结构”。术语“蛋白”是指具有二级、三级和/或四级结构(例如,通过氢键稳定的结构、二级结构之间的关系和由多于一个蛋白形成的结构)的多肽。蛋白可以被其他附接部分(诸如碳水化合物(糖蛋白)、脂质(脂蛋白)、磷酸基团(磷酸化蛋白(phosphoprotein))等)进一步修饰。

[0044] 如本文使用的,氨基酸序列仅“由该序列中的氨基酸组成”。

[0045] 如本文使用的,如果第一氨基酸序列(1)包含第二氨基酸序列,并且(2)比第二氨基酸序列长不超过1个、不多于2个或不多于过3个氨基酸,则第一氨基酸序列“主要由第二氨基酸序列组成”。

[0046] 如本文使用的,如果第二氨基酸序列包含第一氨基酸序列,则第一氨基酸序列是第二氨基酸序列的“片段”。在某些实施方案中,是第二氨基酸序列的片段的第一氨基酸序列可以比第二氨基酸序列少不超过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸中的任一种。

[0047] 如本文使用的,参考氨基酸序列的“功能等同物”是与参考序列不相同但包含微小的改变诸如,例如,一个或少量(a few)氨基酸的插入、缺失或取代的序列。功能等同的序列保留了与其等同的参考序列的功能(例如,免疫原性)。如果功能等同的氨基酸序列包含相对于参考序列的一个或更多个氨基酸的取代,则这些一般将是保守氨基酸取代。

[0048] 如本文使用的,“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基替换而不消除蛋白的期望特性的氨基酸取代。合适的保守氨基酸取代可以通过用疏水性、极性和R链长度相似的氨基酸彼此取代来进行。参见,例如,Watson等人,“Molecular Biology of the Gene,”第四版,1987,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,Menlo Park,CA,第224页。保守氨基酸取代的实例包括以下(注意,一些类别并不相互排斥):

保守取代	
氨基酸的类型	可取代的氨基酸
亲水性	Ala、Pro、Gly、Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Thr
[0049] 巯基	Cys
脂族(非极性、疏水性)	Ala、Val、Ile、Leu、Met、Gly、Pro
碱性	Lys、Arg、His
芳族	Phe、Tyr、Trp

[0050] 如本文使用的,术语“基本相同”是指第一氨基酸序列与第二氨基酸序列之间的同一性,第一氨基酸序列含有足够或最少数目的i) 与比对的第二氨基酸序列中的氨基酸残基相同,或ii) 为比对的第二氨基酸序列中的氨基酸残基的保守取代的氨基酸残基,使得第一氨基酸序列和第二氨基酸序列具有共同的结构域和/或共同的功能活性和/或共同的免疫原性。例如,含有具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的共同结构或抗原结构域的氨基酸序列被称为充分或基本相同。在核苷酸序列的上下文中,术语“基本相同”在本文中用于指第一核酸序列含有足够或最少数目的与比对的第二核酸序列中的核苷酸相同的核苷酸,使得第一核苷酸序列和第二核苷酸序列编码具有共同功能活性的多肽,或编码共同结构多肽结构域或共同功能多肽活性,或编码具有相同免疫原性的多肽。

[0051] 如本文使用的,术语“抗原”、“免疫原”和“抗体靶”是指被抗体识别(即,可以被抗体结合)的分子、化合物或复合物。该术语可以指能够被抗体识别的任何分子,例如,多肽、多核苷酸、碳水化合物、脂质、化学部分或其组合(例如,磷酸化多肽或糖基化多肽等)。本领域技术人员将理解,该术语并不指示该分子在每种情况下都是免疫原性的,而只是指示它可以被抗体靶向。

[0052] 如本文使用的,术语“表位”是指抗原上被抗体识别和结合的定位位点。表位可以包含少量氨基酸或少量氨基酸的部分,例如,5个或6个或者更多个,例如,20个或更多个氨基酸,或这些氨基酸的部分。在一些情况下,表位包含非蛋白组分,例如,来自碳水化合物、核酸或脂质的组分。在一些情况下,表位是三维部分。因此,例如,当靶是蛋白时,表位可以包含连续的氨基酸,或者通过蛋白折叠而接近的来自蛋白不同部分的氨基酸(例如,不连续的表位)。

[0053] 如本文使用的,术语“抗体”是指识别并特异性结合一个或更多个靶抗原(诸如蛋白、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或其组合)的免疫球蛋白。这种结合通过免疫球蛋白可变区内的至少一个抗原识别位点在抗原上的一个或更多个表位处发生。可变区在结合特异性和亲和力方面最为关键。如本文使用的,术语“抗体”包括完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、抗体片段、单链Fv(scFv)突变体、多特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人类

抗体、杂种抗体、融合蛋白和任何其它包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子,只要抗体表现出期望的生物活性。抗体可以(i)基于其重链恒定结构域的身份属于五大类免疫球蛋白中的任一种—— α (IGA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IGg)和 μ (IGm),或(ii)其亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。轻链可以是 λ 或 κ 。抗体可以是裸的或者与其他分子诸如毒素、药物、放射性同位素、化学治疗剂缀合。

[0054] 在一种实施方案中,“完整抗体”包含由两对相同的多肽链组成的四聚体,每对具有一条“轻链”(约25kDa)和一条“重链”(约50-70kDa)。重链和轻链通过共价键和非共价键(例如,二硫键)连接,这些键在不同免疫球蛋白类别之间的数目和量不同。在一方面,每条链包含可变区和恒定区。可变区的抗原识别位点由高变区或互补决定区(CDR)和框架区组成。框架区通常不与抗原接触,而是为CDR提供结构支持。恒定区与身体的其他免疫细胞相互作用。恒定区和可变区之间(仅IgG、IgD、IgA,而非IgM或IgE)是位于两条重链之间的中心的铰链区,铰链区为铰接(articulate)抗原结合提供柔性。

[0055] 以下是不同抗体形式的非穷尽列表,所有都保留了抗原结合活性:

[0056] (1) 全免疫球蛋白(也称为“完整”抗体)(两条轻链和两条重链,例如,四聚体)。

[0057] (2) 免疫球蛋白多肽(轻链或重链)。

[0058] (3) 抗体片段,诸如Fv(单价或二价可变区片段,并且可以仅包含可变区(例如, V_L 和/或 V_H)、Fab($V_L C_L$ $V_H C_H$)、F(ab')₂、Fv($V_L V_H$)、scFv(单链Fv)(包含通过接头(例如,肽接头)连接的 V_L 和 V_H 的肽)、(scFv)₂、sc(Fv)₂、双特异性sc(Fv)₂、双特异性(scFv)₂、微型抗体(minibody,与CH3结构域融合的sc(FV)₂),三抗体(triobody)是三价sc(Fv)₃或三特异性sc(Fv)₃。

[0059] (4) 多价抗体(包含结合两种不同表位或蛋白的结合区的抗体,例如,“蝎形”抗体)。

[0060] (5) 融合蛋白,其包含与另一氨基酸序列(诸如荧光蛋白)融合的免疫球蛋白的结合部分。

[0061] 如本文使用的,术语“抗体片段”是指抗体或抗体链的一些或一部分,其包含比完整或完全抗体或抗体链更少的氨基酸残基,并且其结合抗原或与完整抗体竞争。片段可以经由对完整或完全的抗体或抗体链的化学或酶处理获得。片段也可以通过重组手段获得。例如,可以通过用胃蛋白酶处理抗体来产生F(ab')₂片段。所得的F(ab')₂片段可以被处理以还原二硫桥从而产生Fab'片段。木瓜蛋白酶消化可以导致Fab片段的形成。Fab、Fab'和F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、微型抗体、双抗体、双特异性抗体片段和其他片段也可以通过重组表达技术构建。

[0062] 虽然在完整抗体的消化产物方面定义了各种抗体片段,但技术人员将理解,这样的片段也可以从头化学合成或利用重组DNA方法构建和表达被。

[0063] 单链抗体(scFv)是指包含由接头(例如,肽接头)连接的 V_L 和 V_H 的多肽。ScFv也可以用于形成串联(或二价)ScFv或双抗体。串联scFv和双抗体的产生和特性在以下中描述:例如,Asano等人J Biol.Chem.286:1812(2011);Kenanova等人(2010)Prot Eng Design Sel 23:789;Asano等人(2008)Prot Eng Design Sel 21:597。

[0064] 抗体片段还包括Fd(包含在Fab片段中的重链部分)和单结构域抗体。单结构域抗体(sdAb)是通过重组方法产生的重链或轻链的可变结构域。

[0065] 如本文使用的措辞“CDR序列集”是指本文描述的特定抗体的3个重链CDR和/或3个轻链CDR。“轻链”CDR序列集是指轻链CDR序列。“重链”CDR序列集是指重链CDR序列。“全”CDR序列集是指重链CDR序列和轻链CDR序列两者。例如,对于如表1中示出的抗体LRP6-A1,全CDR序列集包含以下或由以下组成:SVSSA(SEQ ID NO:14)(CDR L1)、SASSLYS(SEQ ID NO:15)(CDR L2)、YYWPI(SEQ ID NO:20)(CDR L3)、LSYYYI(SEQ ID NO:2)(CDR H1)、SIYSSYGYTS(SEQ ID NO:6)(CDR H2)和TVRGSKKPYPFSGWAM(SEQ ID NO:10)(CDR H3)。每个CDR的CDR序列可以,例如,包含表1中的CDR、主要由表1中的CDR组成或由表1中的CDR组成。基于IMGT序列比对预测CDR。

[0066] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”是指对抗原上的特定表位具有单一结合特异性和亲和力的抗体克隆制品或组合物(“单克隆抗体组合物”)。“多克隆抗体”是指针对单一抗原产生,但具有不同的结合特异性和亲和力的抗体制品或组合物(“多克隆抗体组合物”)。

[0067] 如本文使用的,术语“嵌合抗体”是指具有源自两个或更多个物种的氨基酸序列的抗体。在一种实施方案中,轻链和重链两者的可变区对应于源自一个物种的哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔等)的具有期望的特异性、亲和力和能力(capability)的抗体的可变区,而恒定区与源自另一物种(通常为接受治疗的受试者,例如,人类)的序列同源以避免引发免疫应答。

[0068] 如本文使用的,术语“人源化抗体”是指其中从具有期望的特异性、亲和力和能力的从非人类抗体的VH区和VL区获得的CDR被嫁接到人类框架序列上的嵌合抗体。在一种实施方案中,人源化抗体的框架残基被修饰以改进和优化抗体的特异性、亲和力和能力。人源化,即,将非人类CDR序列取代为人类抗体的相应序列,可以按照以下中描述的方法进行:例如,美国专利第5,545,806号、第5,569,825号、第5,633,425号、第5,661,016号;Riechmann等人,Nature 332:323-327(1988);Marks等人,Bio/Technology10:779-783(1992);Morrison,Nature 368:812-13(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnology 14:845-51(1996)。

[0069] 如本文使用的,术语“人类抗体”是指由人体产生的抗体或通过本领域已知的任何技术制备的具有与由人体产生的抗体对应的氨基酸序列的抗体。

[0070] 如本文使用的,术语“杂种抗体(hybrid antibody)”是指这样的抗体,其中来自具有不同抗原决定区的抗体的重链和轻链对被组装在一起,使得所得的四聚体可以识别和结合两种不同的表位或两种不同的抗原。杂种抗体可以是双特异性的(结合2种不同的抗原或表位)或多特异性的(>1种不同的抗原或表位)。

[0071] 如本文使用的,如果抗体的所有抗原结合位点都与相同的表位结合,则该抗体是“单特异性的”。

[0072] 如本文使用的,如果抗体具有各自与不同的表位或抗原结合的至少两个不同的抗原结合位点,则该抗体是“双特异性的”。

[0073] 如本文使用的,如果抗体具有多于一个抗原结合位点,则该抗体是“多价的(polyvalent)”。例如,四价的抗体具有四个抗原结合位点。

[0074] 结合的特异性可以根据与抗体和环境中其它物质或一般无关分子的解离常数相比抗体(或其它靶向部分)对靶与抗体和环境中其它物质或一般无关分子的解离常数相比的比较解离常数(K_d)来定义。较大(较高)的K_d是描述较低亲和力相互作用的K_d。相反,较小

(较低)的 K_d 是描述较高亲和力相互作用或较紧密结合的 K_d 。仅以实例的方式,抗体与靶特异性结合的 K_d 可以是飞摩尔浓度、皮摩尔浓度、纳摩尔浓度或微摩尔浓度,而与无关物质结合的抗体的 K_d 可以是毫摩尔浓度或更高。结合亲和力可以在微摩尔浓度范围($kD=10^{-4}$ 至 10^{-6})、纳摩尔浓度范围($kD=10^{-7}$ 至 10^{-9} M)、皮摩尔浓度范围($kD=10^{-10}$ M至 10^{-12} M)或飞摩尔浓度范围($kD=10^{-13}$ M至 10^{-15} M)内。

[0075] 如本文使用的,如果抗体以小于 10^{-4} M(即,微摩尔浓度范围内)的 K_d 结合抗原或表位,则该抗体“结合”或“识别”该抗原或表位。对于细胞类型(例如,结合癌细胞的抗体),术语“结合”通常指示剂结合这些细胞的纯群体中的大多数细胞。例如,结合特定细胞类型的抗体通常结合该指定细胞群体中至少2/3的细胞(例如,67%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)。在一些情况下,与多肽的结合可以通过比较抗体与呈现该多肽的细胞的结合和抗体与不表达该多肽的细胞的结合(或缺乏结合)来测定。技术人员将认识到,取决于确定结合的方法和/或阈值,会出现一些可变性。抗体对靶的亲和力可以根据本领域已知的方法来确定,例如,如Ernst等人Determination of Equilibrium Dissociation Constants, *Therapeutic Monoclonal Antibodies* (Wiley& Sons ed.2009)中评述的。

[0076] 如本文使用的,术语“更大的亲和力”是指其中抗体X与靶Y的结合比与靶Z的结合更强(K_{on})和/或具有更小的解离常数(K_{off})的抗体结合的相对程度,并且在这种情况下抗体X对靶Y比对靶Z具有更大的亲和力。同样,术语“更小的亲和力”在本文中是指其中抗体X与靶Y的结合比与靶Z的结合强度更小和/或具有更大的解离常数的抗体结合的程度,并且在这种情况下抗体X对靶Y比对靶Z具有更低的亲和力。抗体与其靶抗原之间的结合亲和力可以表示为 K_A 等于 $1/K_D$,其中 K_D 等于 k_{on}/k_{off} 。 k_{on} 和 k_{off} 值可以使用表面等离子体共振技术来测量,例如,使用分子亲和筛选系统(Molecular Affinity Screening System, MASS-1)(Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany)。拮抗剂或阻断性抗体是相对于相似生理条件下抗体不存在时的活性,部分或完全阻断抑制或中和与靶抗原相关的生物活性的抗体。拮抗剂可以是竞争性的、非竞争性的或不可逆的。竞争性拮抗剂是在与天然配体-受体相互作用相同的位点处与天然配体或受体结合的物质,或以诱导变化以阻止正常结合的方式别构结合的物质。非竞争性拮抗剂在不同于天然配体-受体相互作用的位点处结合,但使相互作用产生的KD或信号降低。不可逆抑制剂引起对受体的共价修饰,阻止任何后续结合。

[0077] 如本文使用的,术语“亲合力(avidity)”是指抗体和靶抗原之间的结合复合物的总体稳定性。它由三个因素控制:(i)抗体对抗原的固有亲和力(affinity), (2)抗体的价,和(3)相互作用组分的几何排列。亲和力是抗体和单个靶之间相互作用的强度,而亲合力是多于一个亲和力的累积强度。在一种实施方案中,本文提供的抗体是二价的。

[0078] 如本文使用的,如果抗体以比其结合第二抗原更大的亲和力结合第一抗原,则相对于第二抗原,抗体“优先结合”第一抗原。优先结合可以是以至少2倍、5倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、500倍或1000倍大的亲和力中的任一种。因此,例如,如果抗体以比其结合LRP5更大的亲和力结合LRP6,则相对于LRP5,抗体优先结合LRP6。

[0079] 如本文使用的,如果抗体以 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M中的至少任一种亲和力结合靶抗原或靶抗原组中的每个成员,并且例如以对与靶抗原进行比较的对非靶抗原的亲和力至少2倍大的亲和力结合靶抗原或者靶抗原组

中的每个成员,则抗体“特异性结合”靶抗原或靶抗原组或者对靶抗原或靶抗原组是“特异性的”。通常,特异性结合的特征在于以足够的亲和力结合抗原,使抗体可用作检测抗原或表位的诊断剂和/或可用作靶向抗原或表位的治疗剂。

[0080] 如本文使用的,当抗体竞争性地减少或阻止所有配体与受体的相互作用时,抗体“阻断”或“拮抗”配体与受体的结合。在实施方案中,测量到的减少水平可以是对照(例如,未处理的)细胞的至少5%、10%、25%、50%、80%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.9%中的任一种。例如,拮抗或阻断Wnt配体与LRP6受体结合的抗体竞争性地减少或阻止Wnt蛋白与LRP6受体的相互作用。这导致与Wnt信号传导相关的下游信号传导事件的减弱或阻断。这包括,例如,散乱蛋白的活化, β -联蛋白破坏复合物的溶解, β -联蛋白的较低胞质水平,和/或TCF/LEF介导的转录的较低活性。

[0081] 对于抗体靶(例如,抗原、分析物、免疫复合物),术语“捕获”通常指示抗体结合纯群体中的大多数抗体靶(假设适当的摩尔比)。例如,与特定抗体靶结合的抗体通常与溶液中至少2/3的抗体靶(例如,至少67%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任一种)结合。技术人员将认识到,取决于确定结合的方法和/或阈值,会出现一些可变性。

[0082] 术语“缀合物”是指与部分(诸如可检测标记物或生物活性部分,诸如药物、毒素或化学治疗剂或细胞毒性剂)化学偶联的第一分子,例如,抗体(“免疫缀合物”)。因此,本公开内容设想了与一种或更多种部分缀合的抗体。此外,抗体可以是“缀合抗体”或“非缀合抗体”(即,不与部分缀合)。

[0083] 如本文使用的,术语“抗体-药物缀合物”或(“ADC”)是指与药物缀合的抗体。通常,缀合包括通过接头的共价结合。

[0084] 如本文使用的,术语“标记的”分子(例如,核酸、蛋白或抗体)是指与可检测标记物共价(通过接头或化学键)或非共价(通过离子键、范德华键、静电键或氢键)结合的分子,使得分子的存在可以通过检测与该分子结合的可检测标记物的存在来检测。

[0085] 如本文使用的,术语“可检测标记物”是指可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理手段检测的组合物。本文描述了可检测标记物的实例,并且其包括但不限于比色标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标记物和放射性标记物。为了本公开内容的目的,可检测标记物也可以是本身不产生信号但结合能够产生信号的第二部分(例如,标记的亲合素)的部分(例如,生物素)。

[0086] 关于抗体的术语“交联”是指抗体与固体或半固体基质(例如,琼脂糖凝胶、珠、微量滴定板)或另一种蛋白或抗体的附接。例如,抗体可以多聚体化以产生具有多个(多于2个)抗原结合位点的抗体复合物。抗体可以通过将抗体表达为高价同种型(例如,IgA或IgM,它们通常分别形成2个或5个抗体的复合物)来多聚体化。抗体多聚体化也可以通过使用包含能够连接蛋白的反应性基团的交联剂(例如,碳二亚胺、NHS酯等)来进行。用于使抗体与基质交联的方法和组合物在例如Abcam和New England Biolab目录和网站(在abcam.com和neb.com可获得)中描述。具有各种反应性基团的交联剂化合物在例如Thermo Fisher Scientific目录和网站(在piercenet.com可获得)中描述。

[0087] 如本文使用的,术语“免疫测定”是指通过检测识别分析物的抗体和分析物之间的结合来检测分析物的方法。

[0088] 如本文使用的,术语“表达构建体”是指包含与将是表达对象的异源核苷酸序列(即,在自然界中表达控制序列通常不与之连接的序列)可操作地连接的表达控制序列的多核苷酸。如本文使用的,术语“表达载体”指包含表达构建体和足以在宿主细胞中复制或插入到宿主染色体中的序列的多核苷酸。质粒和病毒是表达载体的实例。如本文使用的,术语“表达控制序列”是指调节与其可操作地连接的核苷酸序列的转录和/或翻译的核苷酸序列。表达控制序列包括启动子、增强子、阻遏子(转录调节序列)和核糖体结合位点(翻译调节序列)。

[0089] 如本文使用的术语“载体”包括核酸分子的任何中间媒介物,其使得所述核酸分子能够例如被引入到原核细胞和/或真核细胞中和/或整合到基因组中,并且包括质粒、噬菌粒、噬菌体或病毒载体,诸如基于逆转录病毒的载体、腺相关病毒载体等。如本文使用的术语“质粒”一般指染色体外遗传物质的构建体,通常是环状的DNA双链体,其可以独立于染色体DNA复制。

[0090] 如本文使用的,当表达控制序列在细胞中起调节核苷酸序列转录的作用时,核苷酸序列与表达控制序列“可操作地连接”。这包括通过聚合酶和启动子之间的相互作用来促进核苷酸序列的转录。

[0091] 如本文使用的,“宿主细胞”是指包含表达构建体的重组细胞。

[0092] 如本文使用的,术语“生物样品”是指含有细胞(例如,肿瘤细胞)或源自细胞的生物分子的样品。生物样品可以从受试者(例如,患者)、从动物(诸如,动物模型)或从培养的细胞(例如,细胞系或从患者中取出并在培养基中生长以供观察的细胞)获得。生物样品可以包括组织和/或液体。它可以从任何生物来源获得,包括但不限于血液、血液级分(例如,血清或血浆)、脑脊液(CSF)、淋巴、眼泪、唾液、痰、颊拭子、乳液、尿液或粪便。生物样品可以是活检样品,诸如组织活检样品,诸如针穿刺活检样品、细针穿刺活检样品、手术活检样品等。样品可以包括带有病变或可疑病变的组织样品,尽管生物样品也可以源自另一个部位,例如怀疑的转移部位、淋巴结或来自血液。生物样品可以是取自受试者的样品的一部分。组织样品的实例包括脑组织样品或神经组织样品。获得这样的生物样品的方法是本领域已知的,包括但不限于标准的血液回收程序。

[0093] 如本文使用的,术语“诊断”是指受试者患有紊乱诸如癌症的相对概率。类似地,术语“预后”是指受试者可能出现某种未来结果的相对概率。例如,在本公开的上下文中,预后可以指个体将发展出癌症、复发、癌症将转移、癌症将被治愈的可能性,或者疾病的可能严重程度(例如,症状的严重程度、功能下降的速率、存活等)。这些术语并不意图是绝对的,如医学诊断领域的任何技术人员都将理解的。

[0094] 如本文使用的,术语“疗法”、“治疗”、“治疗性干预”和“改善”是指导致症状严重程度减少的任何活动。在癌症的情况下,治疗可以指例如减少肿瘤尺寸、癌细胞数目、生长速率、转移活性、减少非癌细胞的细胞死亡、减少恶心和其他化学疗法或放射疗法副作用等。术语“治疗”和“预防”不意图是绝对术语。治疗和预防可以指任何发作的延迟、症状的改善、患者存活提高、存活时间或存活率的增加等。治疗和预防可以是完全的(检测不到赘生性细胞的水平)或部分的,使得在患者体内发现的赘生性细胞比没有本发明干预时出现的更少。治疗的效果可以与未接受治疗的个体或个体的集合进行比较,或者与同一患者治疗前或治疗期间不同时间进行比较。在一些方面,与例如施用前的个体或未经治疗治疗的对照个

体相比,疾病的严重程度减少至少10%。在一些方面,疾病的严重程度减少至少25%、50%、75%、80%或90%,或者在一些情况下,使用标准诊断技术不再可检测到。

[0095] 如本文使用的,术语“有效量”、“有效剂量”和“治疗有效量”是指足以产生期望的响应(诸如减少或消除状况的病征或症状或改善紊乱)的剂(诸如抗体或免疫缀合物)的量。在一些实例中,“有效量”是治疗(包括预防)任何紊乱或疾病的一种或更多种症状和/或潜在原因和/或预防疾病进展的量。例如,对于特定参数,治疗有效量将显示出治疗效果的至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%中的任一种的增加或降低。治疗效力也可以被表示为增加或降低“...倍”。例如,治疗有效量相比于对照可以具有至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更多倍效果中的任一种。

[0096] 如本文使用的,术语“药物组合物”是指包含药物化合物(例如,药物)和药学上可接受的载体的组合物。

[0097] 如本文使用的,术语“药学上可接受的”是指与药物组合物的其他成分相容并且可以安全地向受试者施用的载体。该术语与“生理学上可接受的”和“药理学上可接受的”同义使用。药物组合物及它们的制备和使用技术是本领域技术人员根据本公开内容已知的。对于合适的药理组合物和它们的施用技术的详细列表,人们可以参考诸如以下的教科书: Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版1985;Brunton等人,“Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,”McGraw-Hill,2005; University of the Sciences in Philadelphia(编著),“Remington:The Science and Practice of Pharmacy,”Lippincott Williams&Wilkins,2005;和University of the Sciences in Philadelphia(编著),“Remington:The Principles of Pharmacy Practice,”Lippincott Williams&Wilkins,2008。

[0098] 药学上可接受的载体一般将是无菌的,至少对于人类使用是如此。根据施用途径,药物组合物一般将包含用于在储存中缓冲和防腐的剂,并且可以包含用于适当递送的缓冲剂和载体。药学上可接受的载体的实例包括但不限于生理(0.9%)盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、汉克氏平衡盐溶液(HBSS)和多种电解质溶液,诸如PlasmaLyte ATM(Baxter)。

[0099] 可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒性的,并且包括缓冲剂,诸如磷酸(phosphate)、柠檬酸(citrate)和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、甲硫氨酸和柠檬酸;防腐剂(诸如乙醇、苯甲醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯铵或其组合);氨基酸,诸如精氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸及其组合;单糖、二糖和其他碳水化合物;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白,诸如明胶或血清白蛋白;螯合剂,诸如EDTA;糖类诸如海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡糖胺、N-甲基葡糖胺、半乳糖胺和神经氨酸;和/或非离子表面活性剂,诸如Tween、Pluronic、Triton-X或聚乙二醇(PEG)。

[0100] 术语“剂量(dose)”和“剂量(dosage)”在本文中可互换使用。剂量是指每次施用给予个体的活性成分的量。对于本发明,剂量可以指抗体或相关组分的浓度,例如治疗剂的量或放射性标记物的剂量。剂量将根据许多因素而变化,包括施用频率、个体的尺寸和耐受性、状况的严重程度、副作用的风险、施用途径和可检测标记物(如果存在的话)的成像模

式。本领域的技术人员将认识到,剂量可以根据以上因素或基于治疗进展进行修改。术语“剂型”是指药物的特定形式并取决于施用途径。例如,剂型可以呈液体,例如,用于注射的盐水溶液。

[0101] 如本文使用的,术语“受试者”是指个体动物。如本文使用的术语“患者”是指处于健康护理提供者诸如医生或护士的护理或监督下的受试者。受试者包括哺乳动物,诸如人类和非人灵长类动物,诸如猴,以及狗、猫、马、牛、兔、大鼠、小鼠、山羊、猪和其他哺乳动物物种。受试者也可以包括禽类。患者可以是寻求治疗、监测、调整或修改现有治疗方案等的个体。术语“癌症受试者”是指已经被诊断为患有癌症的个体。癌症患者可以包括尚未接受治疗的个体、目前正在接受治疗的个体、已经做过手术的个体以及已经停止治疗的个体。

[0102] 在治疗癌症的背景下,需要治疗的受试者可以指患有癌症或癌前状况的个体、已经患有癌症并且处于复发风险的个体、怀疑患有癌症的个体、正在经受标准癌症治疗(诸如放射疗法或化学疗法等)的个体。

[0103] “癌症”、“肿瘤”、“转化的”等术语包括癌前细胞、赘生性细胞、转化细胞和癌性细胞,并且可以指实体瘤或非实体瘤(参见,例如,Edge等人AJCC Cancer Staging Manual(第7版2009);Cibas和Ducatan Cytology:Diagnostic principles and clinical correlates(第3版2009))。癌症包括良性和恶性赘生物(异常生长)两者。“转化”是指自发或诱导的表型变化,例如细胞的无限增殖化(immortalization)、形态学变化、异常细胞生长、接触抑制和锚定的减少和/或恶性肿瘤(参见,Freshney,Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique(第3版1994))。虽然转化可以由感染转化性病毒和掺入新的基因组DNA或摄取外源DNA引起,但转化也可以自发发生或在暴露于致癌物后发生。

[0104] 术语“癌症”可以指任何癌症,包括但不限于白血病、癌、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、实体癌和淋巴样癌等。不同类型癌症的实例包括但不限于肺癌(例如,非小细胞肺癌或NSCLC)、乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、膀胱癌、卵巢癌、白血病、肝癌(liver cancer,即,hepatocarcinoma)、肾癌(即,肾细胞癌)、甲状腺癌、胰腺癌、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、食管癌、胃(stomach,gastric)癌、肾癌、中枢神经系统癌、皮肤癌、胶质母细胞瘤和黑素瘤。

[0105] 如本文使用的,如果化学实体,诸如多肽,是组合物中该种类(例如,多肽)的主要化学实体,则它是“基本上纯的”。这包括代表组合物中的该种类的化学实体的多于50%、多于80%、多于90%、多于95%、多于98%、多于99%、多于99.5%、多于99.9%或多于99.99%的化学实体。

[0106] 措辞“分离的抗体”是指在体内或体外产生的已从产生抗体的来源(例如动物、杂交瘤或其他细胞系(诸如产生抗体的重组昆虫细胞、酵母细胞或细菌细胞))中取出的抗体。

[0107] “基本上纯的”或“分离的”意指目标物类是存在的主要物类(即,在摩尔基础上,比组合物中任何其它个体大分子物类更丰富),并且基本上纯化的级分是其中目标物类构成存在的所有大分子物类的至少约50%(在摩尔基础上)的组合物。一般来说,基本上纯的组合物意味着组合物中存在的大分子物类的约80%至90%或更多是纯化的感兴趣的物类。如果组合物主要由单一大分子物类组成,则目标物类被纯化至基本的均一性(通过常规检测方法不能在组合物中检测出污染物类)。就本定义而言,溶剂物类、小分子(<500道尔顿)、稳定剂(例如,BSA)和元素离子物类不被认为是大分子物类。

[0108] 如本文使用的术语“序列同一性”是指两个多肽序列或两个核酸序列之间序列同

一性的百分比。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,对序列进行比对以实现最佳比较目的(例如,可以在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入空位以与第二氨基酸或核酸序列进行最佳比对)。然后将对应的氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸进行比较。当第一序列中的位置被与第二序列中对应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置处是相同的。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数目的函数(即,同一性% = 相同重叠位置数目/位置总数目乘以100%)。在一种实施方案中,两个序列长度相同。两个序列之间的同一性百分比的确定也可以使用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的优选的非限制性的实例是以下的算法: Karlin和Altschul,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:2264-2268,如Karlin和Altschul,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:5873-5877中修改的。这样的算法被并入Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.215:403的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸检索可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行,例如评分=100,字长=12,以获得与本申请的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白检索可以用XBLAST程序参数集进行,例如评分=50,字长=3,以获得与本文描述的蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以利用如Altschul等人,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402中描述的Gapped BLAST。可选地,PSI-BLAST可以用于进行检测分子之间的距离关系的迭代检索(同上)。当利用BLAST、Gapped BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用相应程序的默认参数(例如,XBLAST和NBLAST的默认参数)(参见,例如NCBI网站)。用于序列比较的数学算法的另一种优选的非限制性实例是Myers和Miller,1988,CABIOS 4:11-17的算法。这样的算法被并入作为GCG序列比对软件包一部分的ALIGN程序(2.0版)中。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分。两个序列之间的同一性百分比可以使用类似于以上描述的那些的允许空位或不允许空位的技术来确定。在计算同一性百分比时,通常仅对准确匹配计数。

[0109] 对于抗体,当抗体序列通过IMGT最大程度地对齐时,可以确定百分比序列同一性。比对后,如果受试抗体区域(例如,重链或轻链的整个成熟可变区)与参考抗体的相同区域进行比较,则受试抗体区域和参考抗体区域之间的序列同一性百分比是受试抗体区域和参考抗体区域两者中被相同氨基酸占据的位置的数目除以两个区域的比对位置的总数,乘以100以转化成百分比。

[0110] 氨基酸序列同一性百分比也可以使用序列比较程序NCBI-BLAST2(Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1997))来确定。NCBI-BLAST2序列比较程序可以从美国国家卫生研究院(National Institute of Health,Bethesda,Md.)获得。NCBI-BLAST2使用几个检索参数,其中所有这些检索参数都被设置为默认值,包括,例如,未屏蔽(unmask)=是,链=全部,预期出现=10,最小低复杂度长度=15/5,多遍e值(multi-pass e-value)=0.01,多遍常数=25,最终空位比对下降(dropoff)=25和评分矩阵=BLOSUM62。

[0111] 在采用NCBI-BLAST2进行氨基酸序列比较的情况下,特定氨基酸序列A对、与或相对于特定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(也可以替代地表述为特定氨基酸序列A对、与或相对于特定氨基酸序列B具有或包含一定的氨基酸序列同一性%)计算如下:

[0112] 100乘以分数X/Y

[0113] 其中X是序列比对程序NCBI-BLAST2在该程序对A和B的比对中评分为相同匹配的

氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。应理解当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A对B的氨基酸序列同一性%将不等于B对A的氨基酸序列同一性%。如本文使用的术语“核酸序列”是指由天然存在的碱基、糖和糖间(主链)连接组成的核苷或核苷酸单体的序列,并且包括cDNA。该术语还包括包含非天然存在的单体或其部分的修饰或取代的序列。本申请的核酸序列可以是脱氧核糖核酸序列(DNA)或核糖核酸序列(RNA),并且可以包括天然存在的碱基,包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。序列也可以含有修饰的碱基。这样的修饰的碱基的实例包括氮杂和脱氮腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶;以及黄嘌呤和次黄嘌呤。应理解,包含不可转录的核苷酸碱基的多核苷酸可用作例如杂交测定中的探针。核酸可以是双链或单链的,并且代表正义或反义链。此外,术语“核酸”包括互补核酸序列以及密码子优化的或同义密码子等同物。

[0114] 如本文使用的术语“分离的核酸”是指当通过重组DNA技术产生时基本上不含细胞物质或培养基的核酸,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质的核酸。分离的核酸也基本上不含核酸所源自的天然位于核酸的侧翼的序列(即位于核酸的5'端和3'端的序列)。

[0115] “至少中等严格的杂交条件”意味着选择促进溶液中两种互补核酸分子之间选择性杂交的条件。杂交可以发生于核酸序列分子的全部或一部分。杂交部分的长度通常为至少15个(例如,20个、25个、30个、40个或50个)核苷酸。本领域技术人员将认识到,核酸双链体或杂交体的稳定性由 T_m 决定,在含钠缓冲液中, T_m 是钠离子浓度和温度的函数($T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%(\text{G}+\text{C}) - 600/1)$,或类似方程)。因此,洗涤条件中决定杂交体稳定性的参数是钠离子浓度和温度。为了鉴定与已知核酸分子相似但不相同的分子,可以假设1%的错配导致 T_m 降低约 1°C ,例如,如果寻找具有>95%同一性的核酸分子,最终洗涤温度将减少约 5°C 。基于这些考虑,本领域技术人员将能够容易地选择适当的杂交条件。在优选的实施方案中,选择严格的杂交条件。以实例的方式,可以采用以下条件来实现严格杂交:基于以上方程,在 $5\times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)/ $5\times$ Denhardt's溶液/1.0% SDS于 $T_m - 5^\circ\text{C}$ 杂交,然后在 60°C $0.2\times$ SSC/0.1% SDS洗涤。中等严格杂交条件包括在 42°C 以 $3\times$ SSC的洗涤步骤。然而,应理解,可以使用替代的缓冲液、盐和温度来实现等同的严格性。关于杂交条件的其他指导可以在以下中找到:Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y., 2002, 和 Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001。

[0116] 如本文使用且本领域熟知的术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指用于获得有益或期望的结果(包括临床结果)的方法。有益或期望的临床结果可以包括但不限于减轻或改善一种或更多种症状或状况、减少疾病的程度、使疾病状态稳定(即不恶化)、预防疾病传播、延缓或减缓疾病进展、改善或缓和疾病状态、减少疾病复发以及缓解(无论是部分或全部),无论是可检测的还是检测不到的。“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”还可指与如果不接受治疗预期的存活相比延长的存活。如本文使用的“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”也包括预防性治疗。例如,患有癌症的受试者可以用本文描述的抗体、免疫缀合物、核酸或组合物治疗以预防进展。

[0117] 如本文使用的,术语“施用”意指通过有效途径(诸如瘤内或静脉内施用途径)向受试者提供或给予剂,诸如包含有效量的抗体的组合物。

[0118] 如本文使用的,术语“稀释剂”是指药学上可接受的载体,其不抑制待施用的活性化合物(诸如抗体或免疫缀合物)的生理活性或特性,并且不刺激受试者,并且不消除所施用的化合物的生物活性和特性。稀释剂包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐性盐、防腐剂、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、类似材料及其组合,如本领域普通技术人员已知的(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Science,第18版.Mack Printing Company,1990,第1289-1329页,通过引用并入本文)。任何常规的载体除非与活性成分不相容,否则预期其在药物组合物中的使用。

[0119] “包含”或“包括”一个或更多个列举的要素的组合物或方法可以包括未具体列举的其他要素。例如,“包含”或“包括”抗体的组合物可以含有单独的抗体或与其他成分组合的抗体。

[0120] 在理解本公开内容的范围时,如本文使用的术语“由...组成”及其衍生形式意图是封闭的术语,其指定所陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在,并且还排除其他未陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在。

[0121] 本文中通过端点阐述的数值范围包括归入该范围内的所有数字和分数(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.90、4和5)。还应理解,所有数字及其分数都被假定为是由术语“约”修饰的。此外,应理解冠词的单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指示物,除非上下文另有明确规定。例如,术语“抗体”或“至少一种抗体”可以包括多于一种抗体,包括其混合物。

[0122] 根据上下文,术语“卷曲受体(Frizzled)”和“FZD”是指卷曲受体家族的任何基因或蛋白成员。卷曲受体蛋白参与胞质溶胶中散乱蛋白的活化。卷曲受体是指卷曲受体-1、卷曲受体-2、卷曲受体-3、卷曲受体-4、卷曲受体-5、卷曲受体-6、卷曲受体-7、卷曲受体-8、卷曲受体-9和卷曲受体-10中的任一种。

[0123] “脂蛋白受体相关蛋白”、“低密度脂蛋白受体相关蛋白”(HGNC)或“前低密度脂蛋白受体相关蛋白”(UniProt),缩写为“LRP”,是一组基因和蛋白。它们包括:LRP1、LRP1B、LRP2(巨蛋白(megalin))、LRP3、LRP4、LRP5、LRP6、LRP8(载脂蛋白e受体)、LRP10、LRP11和LRP12。LRP5和LRP6是参与典型Wnt途径的LRP5/LRP6/卷曲受体共受体组的部分。LRP5也称为LRP5、BMND1、EVR1、EVR4、HBM、LR3、LRP-5、LRP7、OPPG、OPS、OPTA1、VBCH2和LDL受体相关蛋白5。LRP5基因具有ENTREZ基因ID:4041,并且该蛋白具有NCBI参考序列:NP_002326。LRP6基因具有ENTREZ基因ID:4040,并且该蛋白具有NCBI参考序列:NP_002327。LRP6也称为ADCAD2、STHAG7。

[0124] II. 与LRP信号传导失调相关的紊乱

[0125] Wnt与LRP5或LRP6的结合使导致 β -联蛋白降解的 β -联蛋白结合复合物去稳定化。结果是细胞内 β -联蛋白水平增加。因此,本文提供了阻断Wnt与LRP家族蛋白(诸如LRP5或LRP6)结合的方法。

[0126] “LRP相关紊乱”(例如“LRP5相关紊乱”或“LRP6相关紊乱”)是指与所提及的特定LRP受体的失调相关的状况或疾病。失调是指影响正常 β -联蛋白介导的转录变化的信号传导或由这些受体控制的任何其他细胞内信号传导途径的异常降低或增加。因此,例如,异常的LRP相关的信号传导(例如,通过典型Wnt信号传导途径(Wnt3/Wnt3A))增加与某些癌症相关并与骨密度增加相关,而异常的LRP相关的信号传导降低与骨密度降低相关。

[0127] 阻断Wnt与LRP5或LRP6结合的抗体可用于治疗癌症。特别地,阻断Wnt与LRP6结合的方法可用于治疗脑癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、皮肤癌、胃癌和睾丸癌。

[0128] III. 抗LRP抗体

[0129] A. 抗体

[0130] LRP5和LRP6各自具有两个Wnt结合位点。 β -联蛋白信号传导的大多数Wnt活化物,包括Wnt 1、2、2b、6、8a、9a、9b、10b等,与LRP5和LRP6的 β 推进器(β propeller)1和2区域缔合。该位点在本文中被称为“非Wnt3a结合位点”。已知Wnt蛋白Wnt3和Wnt3a与LRP5和LRP6的 β 推进器区域3和4上的独特位点缔合。该位点在本文中被称为“Wnt3a结合位点”。阻断Wnt配体与特定结合位点的结合的抗体与LRP5或LRP6的结合,降低与结合该位点的Wnt配体相关的信号传导途径的活性。在某些情况下,这样的阻断活性也可以增强与结合其他结合位点的Wnt配体相关的信号传导途径的活性。因此,例如,阻断Wnt配体与Wnt3a结合位点结合的抗体抑制Wnt3a信号传导途径的活性,并且可以增强非Wnt3a信号传导途径的活性。类似地,阻断Wnt配体与非Wnt3a结合位点结合的抗体抑制非Wnt3a信号传导途径的活性,并且可以增强Wnt3a信号传导途径的活性。

[0131] 本文描述了针对LRP6受体的抗体。这些抗体中的某些抗体阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点的结合。这些抗体中的其他抗体阻断Wnt配体与非Wnt3a结合位点的结合。这些抗体阻断配体Wnt结合并调节Wnt信号传导途径的活性。这些抗体还具有抗增殖作用,对治疗癌症和其中LRP受体失调的其他疾病具有治疗潜力。

[0132] 因此,本公开内容的一方面包括特异性结合LRP6受体的分离的抗体。抗体包含轻链可变区和重链可变区,重链可变区包含互补决定区CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,轻链可变区包含互补决定区CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且所述CDR的氨基酸序列包含选自表1或表2中的序列的序列、基本上由选自表1或表2中的序列的序列组成或由选自表1或表2中的序列的序列组成。

[0133] 在实施方案中,抗体包含选自表1中的CDR序列集(即,克隆LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3、LRP6-G9)的CDR序列集。

[0134] 本文还描述了重链和轻链可变区。表2提供了来自克隆LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3、LRP6-G9的Fab重链和轻链的示例性可变结构域序列。还设想了包含表2中的序列或与其基本相同的序列的抗体,其中CDR是表1中鉴定的CDR序列集。在另一种实施方案中,抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:i)如表2中列出的重链氨基酸序列;ii)与如表2中列出的重链氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或iii)i)的保守取代的氨基酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集。

[0135] 在另一种实施方案中,抗体包含轻链可变区,该轻链可变区包含i)如表2中列出的轻链氨基酸序列,ii)与如表2中列出的轻链氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或iii)i)的保守取代的氨基酸序列,其中CDR序列是如表1中列出的CDR序列集。

[0136] 抗体LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3、LRP6-G9特异性结合LRP6并抑制Wnt配体诱导的信号传导。抗体LRP6-A10和LRP6-B6显著抑制Wnt3a诱导的活性,可能是通过阻断Wnt配体与Wnt3a结合位点的结合,从而阻断响应于Wnt3a条件培养基(CM)的TCF/LEF介导的转录。抗体LRP6-A1、LRP6-G3和LRP6-G9抑制非Wnt3a诱导的活性,可能是通过阻断Wnt配体与非Wnt3a结合位点的结合。此外,抗体LRP6-G3和LRP6-G9显著增强Wnt3a诱导的活性。

[0137] 这些抗体的CDR的氨基酸序列在表1中提供。

[0138] 表1:抗LRP6抗体的CDR序列

	CDLR -L1	CDR-L2	CDR-L3	CDR-H 1	CDR-H2	CDR-H3	表位组
[0139] LRP6-A1	SVSS A (SEQ ID NO:	SASSLY S (SEQ ID NO:	YYWPI (SEQ ID NO: 20)	LSYYY I (SEQ ID NO:	SIYSSYGY TS (SEQ ID NO: 6)	TVRGSKKPYFSG WAM (SEQ ID NO: 10)	1

[0140]

	ID NO: 14)	15)		2)			
LRP6-A10	SVSS A (SEQ ID NO: 14)	SASSLY S (SEQ ID NO: 15)	YSWGPF (SEQ ID NO: 17)	ISYSSI (SEQ ID NO: 25)	YISSYYGY TY (SEQ ID NO: 7)	AHYFPWAGAM (SEQ ID NO: 11)	2
LRP6-B6	SVSS A (SEQ ID NO: 14)	SASSLY S (SEQ ID NO: 15)	YYFLI (SEQ ID NO: 18)	ISYSSI (SEQ ID NO: 25)	SISPYGY TY (SEQ ID NO: 8)	SSYFPWFSA (SEQ ID NO: 12)	2
LRP6-E3	SVSS A (SEQ ID NO: 14)	SASSLY S (SEQ ID NO: 15)	AGSAPYH LI (SEQ ID NO: 19)	LYYYS M (SEQ ID NO: 4)	SIYSSYGY TY (SEQ ID NO: 9)	YAGYYYYPW WAYYG WPFSG (SEQ ID NO: 13)	1
LRP6-G3	SVSS A (SEQ ID NO: 14)	SASSLY S (SEQ ID NO: 15)	YYWPI (SEQ ID NO: 20)	ISSYYI (SEQ ID NO: 5)	SIYSSYGY TS (SEQ ID NO: 6)	TVRGSKKPYFSG WAM (SEQ ID NO: 10)	1
LRP6-G9	SVSS A (SEQ ID NO: 14)	SASSLY S (SEQ ID NO: 15)	YYWPI (SEQ ID NO: 20)	IYSSYYI (SEQ ID NO: 26)	SIYSSYSY TS (SEQ ID NO: 27)	TVRGSKKPYFSG WAM (SEQ ID NO: 10)	1

[0141] 可变速重链结构域和可变速轻链结构域的氨基酸序列和核苷酸序列在表2中提供:

[0142] 表2-LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3、LRP6-G9的重链和轻链DNA和氨基酸序列。

[0143] LRP6-A1:

[0144] VH-DNA:

[0145] GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTGC
AGCTTCTGGCTTCAACCTCTCTATTATTATATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTT
GCATCTATTTATTCTTCTTATGGCTATACTTCTTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACA
CATCCAAAAACACAGCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCAC
TGTTTCGTGGATCCAAAAAACCGTACTTCTCTGGTTGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCG (SEQ ID NO: 28)

[0146] VH-AA

[0147] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLSYYYIHWVRQAPGKGLEWVASIYSSYGYTSYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVRGSKKPYFSGWAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:29)

[0148] VL-DNA

[0149] GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACCTG
CCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTTCTGATT
TACTCGGCATCCAGCCTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCGGGGACGGATTTCACTCTGA
CCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAATACTACTGGCCGATCACGTTTCGGACA
GGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGT (SEQ ID NO:30)

[0150] VL-AA

[0151] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYWPITFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:31)

[0152] LRP6-A10

[0153] VH-DNA

[0154] GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTGC
AGCTTCTGGCTTCAACATCTCTTATTCTTCTATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGT
GCATATATTTCTTCTTATTATGGCTATACTTATTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACA
CATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGC
TCATTACTTCCCGTGGGCTGGTGTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID
NO:32)

[0155] VH-AA

[0156] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISYSSIIHWVRQAPGKGLEWVAYISSYGYTTYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHYFPWAGAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:33)

[0157] VL-DNA

[0158] GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACCTG
CCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTTCTGATT
TACTCGGCATCCAGCCTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCGGGGACGGATTTCACTCTGA
CCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAATACTCTTGGGGTCCGTTACGTTTCGG
ACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGT (SEQ ID NO:34)

[0159] VL-AA

[0160] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSWGPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:35)

[0161] LRP6-B6

[0162] VH-DNA

[0163] GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTGC
AGCTTCTGGCTTCAACATCTCTTATTCTTCTATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGT
GCATCTATTTCTCCTTATTATGGCTATACTTATTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACA
CATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCTC
TTCTTACTTCCCGTGGTTCTCTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID
NO:36)

[0164] VH-AA

[0165] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISIYSSIHVVRQAPGKGLEWVASISPYGYTYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSYFPWFSAVDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:37)

[0166] VL-DNA

[0167] GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACCTG
CCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTTCTGATT
TACTCGGCATCCAGCCTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCGGGACGGATTTCCTCTGA
CCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAATACTACTTCCTGATCACGTTCCGACA
GGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGT (SEQ ID NO:38)

[0168] VL-AA

[0169] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYFLITFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:39)

[0170] LRP6-E3

[0171] VH-DNA

[0172] GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTGC
AGCTTCTGGCTTCAACCTCTATTATTATTCTATGCACTGGGTGCGTCAGGCCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTT
GCATCTATTTATTCTTCTTATGGCTATACTTATTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACA
CATCCAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCTA
CGCTGGTTACTACTACTACCCGTGGGCTTACTACGGTTGGCCGTTTCTCTGGTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACC
CTGGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO:40)

[0173] VH-AA

[0174] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLYYYSMHVVRQAPGKGLEWVASIYSSYGYTYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYAGYYYPWAYYGWPFSGLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:41)

[0175] VL-DNA

[0176] GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACCTG
CCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTTCTGATT
TACTCGGCATCCAGCCTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCGGGACGGATTTCCTCTGA
CCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAAGCTGGTTCTGCTCCGTACCATCTGAT
CACGTTCCGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGT (SEQ ID NO:42)

[0177] VL-AA

[0178] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAGSAPYHLITFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:43)

[0179] LRP6-G3

[0180] VH-DNA

[0181] GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTGC
AGCTTCTGGCTTCAACATCTCTTCTTATTATATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTT
GCATCTATTTATTCTTCTTATGGCTATACTTCTTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACA
CATCCAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCAC
TGTTTCGTGGATCCAAAAAACCGTACTTCTCTGGTTGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTC

TCCTCG (SEQ ID NO:44)

[0182] VH-AA

[0183] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIISSYYIHWVRQAPGKGLEWVASIYSSYGYTSYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVRGSKKPYFSGWAMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:45)

[0184] VL-DNA

[0185] GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACCTG
CCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTTCTGATT
TACTCGGCATCCAGCCTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCGGGACGGATTTCACTCTGA
CCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAATACTACTGGCCGATCACGTTTCGGACA
GGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGT (SEQ ID NO:30)

[0186] VL-AA

[0187] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYWPITFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:31)

[0188] LRP6-G9

[0189] VH-DNA

[0190] GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTGTGC
AGCTTCTGGCTTCAACATCTATTCTTATTATATCCACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTT
GCATCTATTTATTCTTCTTATAGCTATACTTCTTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACA
CATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCAC
TGTTTCGTGGATCCAAAAAACCGTACTTCTCTGGTTGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCG (SEQ ID NO:46)

[0191] VH-AA

[0192] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIISSYYIHWVRQAPGKGLEWVASIYSSSYTSYADSVKGR
FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVRGSKKPYFSGWAMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:47)

[0193] VL-DNA

[0194] GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACCTG
CCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAGCTTCTGATT
TACTCGGCATCCAGCCTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTAGCCGTTCGGGACGGATTTCACTCTGA
CCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAATACTACTGGCCGATCACGTTTCGGACA
GGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGT (SEQ ID NO:30)

[0195] VL-AA

[0196] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYWPITFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:31)

[0197] 在一些实施方案中,可变结构域序列在CDR区之外至少95%、96%、97%、98%或99%相似,并且CDR序列集与表1中提供的氨基酸序列100%相同。

[0198] 在另一种实施方案中还提供了与包含本文描述的CDR序列集的抗体竞争结合的竞争抗体。例如,在一种实施方案中,竞争抗体使包含所述CDR序列集的抗体与LRP6的结合减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%。

[0199] 在另一种实施方案中,还提供了与Wnt3a配体竞争结合LRP6的抗体,例如LRP6-A10

和LRP6-B6。

[0200] 在另一种实施方案中,还提供了与非Wnt3a Wnt配体竞争结合LRP6的抗体,例如LRP6-A1、LRP6-E3、LRP6-G3、LRP6-G9。

[0201] 如本文展示的,本文描述的抗体对LRP6具有高亲和力。例如,在一种实施方案中,抗体具有通过表面等离子体共振测量的约1nM和约50nM之间的结合亲和力。

[0202] 抗体可以是如本文描述的人源化抗体或嵌合抗体。

[0203] 在一些实施方案中,抗体是单链抗体,所述单链抗体可以例如通过将重链和轻链或其部分融合在一起而获得。

[0204] 在一些实施方案中,抗体是选自以下的抗体结合片段:Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv,其二聚体、纳米抗体、微型抗体、双抗体及多聚体。

[0205] 在一些其他实施方案中,抗体是结合片段Fab。对于一些实施方案,结合片段是优选的,例如,在体外使用。

[0206] 在其他实施方案中,可以优选多价抗体或包含Ig部分的抗体。

[0207] 如实施例中展示的,Fab片段可以与Ig诸如IgG组合。在实施方案中,IgG是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0208] B. 可检测地标记的抗体

[0209] 可检测的标记物可以包括肽序列(诸如myc标签、HA-标签、V5-标签或NE-标签)、荧光蛋白或发光蛋白(例如绿色荧光蛋白或萤光素酶),它们可以附加到或引入到本文描述的抗体中,并且它们能够直接或间接产生可检测的信号。例如,标记物可以是辐射不透明的(radio-opaque)、发射正电子的放射性核素(例如,用于PET成像),或放射性同位素,诸如³H、¹³N、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I;荧光(荧光团)或化学发光(发色团)化合物,诸如异硫氰酸荧光素、罗丹明或萤光素;酶,诸如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶;成像剂;或金属离子。

[0210] C. 抗体-药物缀合物

[0211] 另一方面包括包含本文描述的抗体和可检测的标记物或细胞毒性剂的免疫缀合物。

[0212] 化学治疗(抗癌)剂可以是能够减少癌症生长、干扰癌细胞复制、直接或间接杀伤癌细胞、减少转移、减少肿瘤血液供应等的任何剂。化学治疗剂因此包括细胞毒性剂。细胞毒性剂包括但不限于皂草素、紫杉烷、长春花生物碱、蒽环类和基于铂的剂。化学治疗剂的类别包括但不限于烷化剂、抗代谢物(例如,氨甲蝶呤)、植物生物碱(例如,长春新碱)和抗肿瘤抗生素诸如蒽环类(例如,多柔比星)以及不属于特定类别的各种药物,诸如羟基脲。以顺铂和奥沙利铂例示的基于铂的药物代表一类重要的化学治疗剂。这些药物与DNA结合并干扰复制。以紫杉醇例示的紫杉烷代表另一类重要的化学治疗剂。这些化合物通过干扰细胞骨架和纺锤体的形成起作用来抑制细胞分裂,并从而阻止快速分裂的癌细胞的生长。其他化学治疗药物包括激素疗法。化学治疗剂还包括抑制微管蛋白组装或聚合的剂,诸如美登素、mertansine和澳瑞他汀。化学治疗剂还包括DNA损伤剂,诸如卡奇霉素(calicheamicin)。

[0213] 化学治疗剂可以包括美登素生物碱、澳瑞他汀、多拉司他汀、tubulysin、念珠藻素、吡咯并苯二氮卓类(PBD)二聚体、吲哚并苯二氮卓类二聚体、 α -鹅膏蕈碱、trichothene、

SN-38、倍癌霉素、CC1065、卡奇霉素、烯二炔抗生素、紫杉烷、多柔比星衍生物、蒽环类和它们的立体异构体、azanofide、电子等排体、类似物或衍生物。

[0214] IV. 核酸

[0215] 其他方面包括如本文描述的核酸分子或多核苷酸、重组核酸分子、表达构建体和载体。

[0216] A. 核酸分子

[0217] 另一方面包括如表2中列出的核酸分子以及例如在严格的杂交条件下与所述序列之一杂交的多核苷酸。CDR和可变结构域核酸序列可用于例如制备表达构建体。

[0218] B. 表达构建体和载体

[0219] 核酸分子可以以已知的方式掺入确保蛋白表达的适当的表达构建体或表达载体中。表达构建体可以包含表达控制序列,例如启动子,其与包含编码本公开内容的抗体的核苷酸序列的多核苷酸可操作地连接。可能的表达载体包括但不限于黏粒、质粒或修饰的病毒(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。载体应当与所用的宿主细胞相容。表达载体“适于转化宿主细胞”,这意味着表达载体含有编码对应于本文描述的表位或抗体的肽的核酸分子。

[0220] 在实施方案中,载体适于通过基因疗法表达例如单链抗体。在实施方案中,载体包含IRES并允许表达轻链可变区和重链可变区。这样的载体可用于在体内递送抗体。

[0221] 合适的调节序列可以源自各种来源,包括细菌基因、真菌基因、病毒基因、哺乳动物基因或昆虫基因。

[0222] 这样的调节序列的实例包括:转录启动子和增强子或RNA聚合酶结合序列,核糖体结合序列,包括翻译起始信号。此外,根据所选择的宿主细胞和采用的表达载体,其他序列(诸如复制起点、另外的DNA限制性位点、增强子和赋予转录诱导性的序列)可被掺入表达载体中。

[0223] 在实施方案中,调节序列指导或增加神经组织和/或细胞中的表达。

[0224] 载体可以是任何载体,包括适于产生本文描述的抗体的载体。

[0225] 在实施方案中,载体是病毒载体。

[0226] 重组表达载体还可以含有标志物基因,标志物基因有助于选择用表达本文描述的抗体或表位肽的载体转化、感染或转染的宿主细胞。

[0227] 重组表达载体还可以含有编码融合部分(即“融合蛋白”)的表达盒,其提供重组肽的增加的表达或稳定性;重组肽的增加的溶解度;并且通过在亲和纯化中充当配体(包括例如本文描述的标签和标记物)来帮助靶重组肽的纯化。此外,可以将蛋白水解裂解位点添加到靶重组蛋白,以允许在纯化融合蛋白后将重组蛋白与融合部分分离。典型的融合表达载体包括pGEX(Amrad Corp., Melbourne, Australia)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, MA)和pRIT5(Pharmacia, Piscataway, NJ),它们分别将谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋白A融合到重组蛋白。

[0228] 用于在体外和体内转移基因的系统包括基于病毒的载体,最值得注意的是单纯疱疹病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)和逆转录病毒包括慢病毒。基因递送的可选的方法包括使用裸质粒DNA以及脂质体-DNA复合物。

[0229] 在一方面,本公开内容包括用于制备本文描述的抗体的方法,该方法包括合成包

含本文描述的抗体框架和CDR序列集的核酸分子。

[0230] V. 重组细胞

[0231] 另一方面是表达本文描述的抗体的重组宿主细胞。

[0232] 如本文描述的抗体可以通过编码抗体序列的核酸的重组表达来制备。

[0233] 如本文公开的抗体可以通过培养被工程化以表达编码免疫球蛋白多肽的核酸构建体的细胞来制备。

[0234] 重组宿主细胞可以使用适于产生多肽(例如,适于产生抗体)的任何细胞产生。例如,为了将核酸(例如,载体)引入细胞中,细胞可以被转染、转化或感染,取决于所采用的载体。

[0235] 合适的宿主细胞包括各种各样的原核和真核宿主细胞。例如,本文描述的蛋白可以在细菌细胞(诸如大肠杆菌,*E.coli*)、昆虫细胞(使用杆状病毒)、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。

[0236] 在实施方案中,细胞是选自酵母、植物、蠕虫、昆虫、禽类、鱼类、爬行动物和哺乳动物细胞的真核细胞。

[0237] 在另一种实施方案中,哺乳动物细胞是CHO细胞、骨髓瘤细胞、脾细胞或杂交瘤细胞。

[0238] 适于表达抗体的酵母和真菌宿主细胞包括但不限于酿酒酵母(*S.cerivisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、毕赤酵母属(*Pichia*)或克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)以及曲霉属(*Aspergillus*)的各物种。用于在酵母酿酒酵母中表达的载体的实例包括pYepSec1、pMFa、pJRY88和pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, CA)。用于转化酵母和真菌的方案是本领域普通技术人员熟知的。

[0239] 可能合适的哺乳动物细胞包括,尤其是: COS(例如, ATCC No. CRL 1650或1651)、BHK(例如, ATCC No. CRL 6281)、CHO(ATCC No. CCL 61)、HeLa(例如, ATCC No. CCL 2)、293(ATCC No. 1573)和NS-1细胞。用于在哺乳动物细胞中指导表达的合适的表达载体一般包含启动子(例如,源自病毒材料,诸如多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒和猿猴病毒40)以及其他转录和翻译控制序列。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8和pMT2PC。

[0240] VI. 药物组合物

[0241] 另一方面是组合物,其包含本文描述的抗体、免疫缀合物、核酸分子、载体或重组细胞,以及任选地合适的稀释剂,例如药学上可接受的载体。

[0242] 组合物可以例如包含一种或更多种抗体或免疫缀合物。

[0243] 用于多肽(包括抗体和/或细胞)的合适的稀释剂包括但不限于盐水溶液、pH缓冲溶液和甘油溶液或适用于冷冻多肽和/或细胞的其他溶液。

[0244] 用于核酸的合适的稀释剂包括但不限于水、盐水溶液和乙醇。

[0245] 在实施方案中,组合物是药物组合物,其包含本文公开的抗体、核酸或载体中的任一种,并且任选包含药学上可接受的媒介物,诸如稀释剂或载体。

[0246] 本文描述的组合物可以通过本身已知的方法来制备,该方法用于制备可以施用至受试者的药学上可接受的组合物,使得有效量的活性物质与药学上可接受的媒介物以混合物的形式组合。

[0247] 药物组合物包括但不限于冻干粉末或水性或非水性无菌可注射溶液或悬浮液,其

可以还含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使组合物与预期接受者的组织或血液基本上相容的溶质。可以存在于这样的组合物中的其它组分包括水、表面活性剂(诸如Tween)、醇、多元醇、甘油和植物油。即时注射溶液和悬浮液可以从无菌粉末、颗粒和片剂或浓缩溶液或悬浮液制备。组合物可以,例如但不以限制的方式,以冻干粉末提供,其在向患者施用之前用无菌水或盐水重构。

[0248] 药物组合物可以包含药学上可接受的载体。合适的药学上可接受的载体包括基本上化学惰性且无毒性的组合物,其不干扰药物组合物的生物活性的有效性。合适的药物载体的实例包括但不限于水、盐水溶液、甘油溶液、乙醇、N-(1(2,3-二油氧基)丙基)N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、二油酰基磷脂酰基乙醇胺(DOPE)和脂质体。这样的组合物应含有治疗有效量的化合物以及合适的量的载体,以便提供用于直接施用至患者的形式。

[0249] 组合物可以是以药学上可接受的盐的形式,包括但不限于那些与游离氨基基团形成的那些盐,诸如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些盐,和与游离羧基基团形成的那些盐,诸如衍生自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基乙醇胺的那些盐。

[0250] 在实施方案中,组合物包含本文描述的抗体。在另一种实施方案中,组合物包含本文描述的抗体和稀释剂。在实施方案中,组合物是无菌组合物。

[0251] 另一方面包括抗体复合物,其包含本文描述的与LRP蛋白(例如LRP5或LRP6)结合的抗体。复合物可以在溶液中或包含在组织中,任选地在体外。

[0252] 还提供了用于制备和使用本文描述的试剂的方法。

[0253] VII. 试剂盒

[0254] 另一方面是试剂盒或包装,其包含本文包含的任何抗体、免疫缀合物、核酸分子、载体、重组细胞和/或组合物。抗体、免疫缀合物、核酸分子、载体、重组细胞和/或组合物可以包含在小瓶诸如无菌小瓶或其他壳体中。如本文使用的,术语“试剂盒”是指意图一起使用的物品的集合。试剂盒可以任选地包括参考剂和/或其使用说明书。试剂盒还可以包括适于容纳含有如本文公开的组合物的容器(诸如小瓶)的运输容器。

[0255] VIII. 使用抗体的方法

[0256] 本文描述的抗体可用于许多体外和体内方法。

[0257] A. 检测LRP6表达的方法

[0258] 如本文展示的,抗体可用于检测LRP6的表达。

[0259] 相应地,本公开内容在一方面提供了检测LRP6表达的方法,该方法包括在允许形成抗体:LRP6复合物的条件下,使包含一个或更多个细胞的样品与本文描述的一种或更多种抗体或免疫缀合物接触,并检测任何抗体复合物的存在。通常,抗体是免疫缀合物的一部分,免疫缀合物包含与可检测的标记物偶联的抗体。

[0260] 样品可以包含存活细胞或细胞提取物。抗体:LRP6复合物可以通过免疫测定检测,诸如免疫荧光、流式细胞术、蛋白印迹、ELISA、SPR和免疫沉淀,然后进行SDS-PAGE、免疫细胞化学。在一些实施方案中,检测是通过免疫荧光。在一些实施方案中,检测是通过流式细胞术。

[0261] 如本文展示的,一些鉴定的抗体优先识别LRP6。因此,在其中该方法用于检测LRP6表达的实施方案中,抗体或免疫缀合物包含对应于选自LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-

E3、LRP6-G3、LRP6-G9的抗体的CDR序列集。

[0262] B. 抑制Wnt与LRP6结合的方法

[0263] 本文公开的抗体抑制Wnt与LRP蛋白特别是与LRP6的结合。不希望受理论限制,对Wnt与LRP6结合的抑制影响由特定Wnt配体的结合诱导的信号转导。例如,抗体与LRP6受体的结合抑制LRP6对 β -联蛋白磷酸化的促进。因为磷酸化的 β -联蛋白在细胞中被标记以进行破坏,所以非磷酸化形式逐渐累积。 β -联蛋白的积累与恶性肿瘤相关。

[0264] 可以期望通过LRP6减少或抑制Wnt配体信号传导。因此,另一方面是抑制Wnt配体与LRP6结合或Wnt诱导的转录活性的方法,该方法包括使表达一种或更多种LRP6多肽的一种或更多种细胞与有效量的本文描述的抗体或免疫缀合物接触。

[0265] 在实施方案中,抗体或免疫缀合物包含对应于选自LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3、LRP6-G9的抗体的CDR序列集(全部、轻链或重链)。

[0266] 接触可以例如通过向受试者施用抗体或免疫缀合物在体内完成。这样的抑制可能是合意的,特别是当Wnt信号传导失调时,如在癌细胞中。

[0267] C. 增强WNT信号传导途径的方法

[0268] 某些阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的Wnt3a结合位点结合的抗体增强与非Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性。类似地,某些阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的非Wnt3a结合位点结合的抗体增强与Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性。阻断活性可以是竞争性的或别构性的。因此,本文提供了通过使LRP5或LRP6与阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的非Wnt3a结合位点结合的抗体接触来增强与LRP5或LRP6的Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性的方法。本文还提供了通过使LRP5或LRP6与阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的Wnt3a结合位点结合的抗体接触来增强与LRP5或LRP6的非Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性的方法。接触可以在体外或体内进行。体内接触可以包括向受试者施用适当的抗LRP5或抗LRP6抗体。

[0269] 例如,包含来自抗体LRP6-A10或LRP6-B6的CDR序列集的抗体可用于增强与LRP5或LRP6的非Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性。包含来自抗体LRP6-G3和LRP6-G9以及可能的LRP6-A1和LRP6-E3的CDR序列集的抗体可用于增强与LRP5或LRP6的Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性。

[0270] D. 用于治疗癌症的方法和用途

[0271] 治疗癌症的方法包括对有相应需要的受试者使用或施用本公开内容的包含与LRP6结合的抗体的药物组合物。其中的受试者可以是罹患癌症或有癌症风险(诸如癌症复发)的受试者,例如,人。

[0272] 在一种实施方案中,癌症选自急性髓性白血病、前列腺癌、胶质母细胞瘤、膀胱癌和宫颈癌。

[0273] 在另一种实施方案中,癌细胞选自脑癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、皮肤癌、胃癌和睾丸癌。

[0274] 不希望受理论限制,这样的治疗可以通过抑制典型Wnt途径的活化来发挥作用,例如,通过抑制Wnt与LRP6的结合,通过抑制Wnt诱导的转录活性,通过抑制散乱蛋白活化,通过抑制对 β -联蛋白破坏复合物的抑制和通过促进 β -联蛋白积累。

[0275] 由于在癌症中LRP5和/或LRP6经常上调,因此本公开内容在另一方面包括用于治

疗癌症的方法,该方法包括向有相应需要的受试者施用有效量的抗体或免疫缀合物,该抗体或免疫缀合物在至少一种测定中特异性结合LRP5或LRP6,并在至少一种测定中抑制Wnt3a诱导的信号传导。本公开内容还包括有效量的抗体或免疫缀合物用于治疗癌症或在制备用于治疗癌症的药物中的用途,该抗体或免疫缀合物在至少一种测定中特异性结合LRP5或LRP6,并在至少一种治疗癌症的测定中抑制Wnt3a诱导的信号传导。本公开内容还包括用于在治疗癌症中使用的有效量的抗体或免疫缀合物,该抗体或免疫缀合物在至少一种测定中特异性结合LRP5或LRP6,并在至少一种测定中抑制Wnt3a诱导的信号传导。

[0276] 在实施方案中,抗体或免疫缀合物,例如抗体-药物缀合物,包含在药物组合物中。

[0277] 在实施方案中,癌症选自脑癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、皮肤癌、胃癌和睾丸癌。在实施方案中,抗体或免疫缀合物包含对应于选自LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3、LRP6-G9的抗体的CDR序列集。

[0278] 如本文展示的,抗体也能够抑制癌细胞增殖。因此,还提供了用于抑制癌细胞增殖的方法,该方法包括使一种或更多种表达LRP6的癌细胞与有效量的抗体或免疫缀合物接触,该抗体或免疫缀合物在至少一种测定中特异性结合LRP6,并在至少一种测定中抑制Wnt3a诱导的信号传导。

[0279] 在一种实施方案中,治疗癌症的方法包括向有相应需要的受试者施用抗体或包含抗体的免疫缀合物,其中第一抗体阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的Wnt3a结合位点的结合,第二抗体阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。本公开内容还提供了用于在治疗癌症中使用的抗体或包含抗体的免疫缀合物,其中第一抗体阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的Wnt3a结合位点的结合,第二抗体阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。本公开内容还提供了抗体或包含抗体的免疫缀合物用于治疗癌症的用途,其中第一抗体阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的Wnt3a结合位点的结合,第二抗体阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。本公开内容还提供了抗体或包含抗体的免疫缀合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中第一抗体阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的Wnt3a结合位点的结合,第二抗体阻断Wnt配体与LRP5或LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。

[0280] 在实施方案中,抗体或免疫缀合物是本文描述的抗体或免疫缀合物,例如,包含对应于选自LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3、LRP6-G9的抗体的CDR序列集(全部、轻链或重链)的抗体或免疫缀合物。

[0281] IX. 施用方法

[0282] 本发明的抗LRP抗体可以有效地将治疗组合物体内递送至经历Wnt信号传导的细胞。在一些实施方案中,治疗方法包括向个体施用有效量的治疗性抗LRP缀合物,例如附接于治疗剂的抗LRP抗体。在一些实施方案中,个体已被诊断为患有癌症。在一些实施方案中,个体正在接受或已经接受癌症治疗,例如手术、放射疗法或化学疗法。在一些实施方案中,个体已经被诊断但癌症正在缓解。

[0283] 在一些实施方案中,抗LRP缀合物包括脂质体。在一些实施方案中,该方法还包括监测个体的癌症进展。在一些实施方案中,每次施用的抗LRP缀合物的剂量基于个体的治疗进展来确定,例如,如果个体对治疗没有足够的响应,则施用更高剂量的化学治疗剂。

[0284] 在一些实施方案中,本发明可以包括抗体或抗体靶向组合物和生理上(即,药学上)可接受的载体。术语“载体”是指用作诊断剂或治疗剂的稀释剂或媒介物的通常惰性的

物质。该术语还包括赋予组合物粘聚性 (cohesive quality) 的通常惰性的物质。生理上可接受的载体可以是液体, 例如生理盐水、磷酸盐缓冲液、生理缓冲盐水 (135-150mM NaCl)、水、缓冲水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸、提供增强的稳定性的糖蛋白 (例如, 白蛋白、脂蛋白、球蛋白等), 等等。由于生理上可接受的载体部分地由施用的特定组合物以及用于施用该组合物的特定方法决定, 因此存在本发明的药物组合物的多种多样的合适的制剂 (参见, 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, 1989)。

[0285] 本发明的组合物可以通过常规的、熟知的灭菌技术灭菌, 或者可以在无菌条件下产生。水性溶液可以包装使用或在无菌条件下过滤并冻干, 冻干制剂在施用前与无菌水性溶液组合。组合物可根据需要含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件, 诸如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等, 例如, 乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、单月桂酸失水山梨醇酯和三乙醇胺油酸酯。糖也可以被包括在内用于稳定组合物, 诸如冻干抗体组合物的稳定剂。

[0286] 剂型可以被制备用于向患者粘膜施用 (例如, 鼻、舌下、阴道、含服或直肠)、肠胃外施用 (例如, 皮下、静脉内、肌肉内或动脉内注射, 团注或输注)、口服或透皮施用。剂型的实例包括但不限于: 分散体、栓剂、软膏剂、泥敷剂 (cataplast, poultice)、糊剂、粉末、敷料、乳膏、硬膏剂 (plaster)、溶液、贴剂、气雾剂 (例如, 鼻喷雾剂或吸入剂)、凝胶; 适于向患者口服或粘膜施用的液体剂型, 包括混悬剂 (例如, 水性或非水性液体混悬剂、水包油乳剂或油包水液体乳剂)、溶液和酏剂; 适于向患者肠胃外施用的液体剂型; 和无菌固体 (例如, 结晶或无定形固体), 其可以被重构以提供适于向患者肠胃外施用的液体剂型。

[0287] 可注射的 (例如静脉内) 组合物可以包含悬浮在可接受的载体 (诸如水性载体) 中的抗体或抗体靶向组合物的溶液。可以使用各种水性载体中的任一种, 例如水、缓冲水、0.4% 盐水、0.9% 等渗盐水、0.3% 甘氨酸、5% 右旋糖等, 并且可以包含用于增强稳定性的糖蛋白, 诸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。通常, 将使用生理缓冲盐水 (135-150mM NaCl)。组合物可以含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件, 如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂, 例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、单月桂酸失水山梨醇酯、三乙醇胺油酸酯等。在一些实施方案中, 抗体靶向组合物可以配制在用于静脉施用的试剂盒中。

[0288] 适于肠胃外施用 (诸如, 例如通过关节内 (在关节中)、静脉内、肌肉内、肿瘤内、皮内、腹膜内和皮下途径) 的制剂包括水性和非水性、等渗无菌注射溶液, 其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质, 以及水性和非水性无菌悬浮液, 其可包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。注射溶液和悬浮液也可以从无菌粉末、颗粒和片剂来制备。在本发明的实践中, 组合物可以例如通过静脉内输注、表面 (topically)、腹膜内、膀胱内或鞘内施用。肠胃外施用和静脉内施用是优选的施用方法。靶向的组合物的制剂可以存在于单位剂量或多剂量的密封容器 (诸如安瓿和小瓶) 中。

[0289] 选择的靶向递送组合物单独地或与其他合适组分组合地可以制成经由吸入施用的气雾剂制剂 (“雾化”)。气雾剂制剂可以放置于加压的可接受的喷射剂中, 诸如二氯二氟甲烷、丙烷和氮气。

[0290] 药物制剂可以以单位剂型包装或制备。在这样的形式中, 制剂被细分为含有适当的活性组分的单位剂量, 例如根据治疗剂的剂量或抗体的浓度。单位剂型可以是包装的制剂, 包装含有离散量的制剂。如果需要, 则组合物还可以含有其他相容的治疗剂。

[0291] 抗体(或抗体靶向组合物)可以通过任何合适的途径(包括但不限于静脉内、皮下、肌肉内或腹膜内途径)通过注射或输注施用。药物组合物施用的实例包括将抗体以10mg/ml在用于注射的无菌等渗水性盐水溶液中储存于4℃,并在向患者施用前将其稀释在100ml或200ml的0.9%氯化钠中以用于注射。抗体以0.2mg/kg和10mg/kg之间的剂量通过静脉输注在1小时的过程中施用。在其他实施方案中,抗体通过静脉输注在15分钟和2小时之间的时间段内施用。在仍其他的实施方案中,施用程序是经由皮下团注。

[0292] 选择抗体的剂量以便为患者提供有效的治疗,并且抗体的剂量在少于0.1mg/kg体重至约25mg/kg体重的范围内,或者在每个患者1mg-2g的范围内。在一些情况下,剂量在1-100mg/kg或约50mg-8000mg/患者的范围内。根据抗体的药代动力学(例如,抗体在循环中的半衰期)和药效学响应(例如,抗体治疗效果的持续时间),可以以适当的频率重复剂量,该频率可以在每日一次至每三个月一次的范围内。在一些实施方案中,体内半衰期在约7天和约25天之间,并且抗体给药在每周一次和每三个月一次之间重复。

[0293] 施用可以是周期性的。根据施用途径,剂量可以例如每1天、3天、5天、7天、10天、14天、21天或28天或更长时间一次(例如,每2个、3个、4个或6个月一次)施用。在一些情况下,施用更频繁,例如每日2或3次。如本领域技术人员将认识到的,可以根据治疗进展和任何不良副作用来监测患者以调整施用的剂量和频率。

[0294] 因此,在一些实施方案中,另外的施用取决于患者的进展,例如在施用之间监测患者。例如,在第一次施用或一轮施用后,可以监测患者的肿瘤生长速率、复发(例如,在手术后患者的情况下)或一般疾病相关症状,诸如虚弱、疼痛、恶心等。

[0295] 在用于治疗癌症的治疗用途中,抗体靶向组合物(例如,包括治疗剂和/或诊断剂)可以以每日约0.001mg/kg至约1000mg/kg的初始剂量施用,并随时间调整。可以使用约0.01mg/kg至约500mg/kg、或约0.1mg/kg至约200mg/kg、或约1mg/kg至约100mg/kg或约10mg/kg至约50mg/kg的日剂量范围。剂量根据患者的需要、所治疗状况的严重程度和所采用的靶向组合物而变化。例如,剂量可以考虑在特定患者中诊断的癌症的类型和阶段根据经验确定。在本发明的情况下,向患者施用的剂量应足以随时间推移实现患者的有益治疗响应。如熟练从业者将认识到的,剂量的大小也将由特定患者中伴随特定靶向组合物施用的任何不良副作用的存在、性质和程度确定。

[0296] 以上公开内容总体上描述了本公开内容。通过参考以下特定实施例可以获得更完全的理解。这些实施例仅为了说明的目的而被描述,并不意图限制本申请的范围。当情况可能提示或提供方便时,还设想了形式的变化和等同物的替换。虽然在本文中已经采用了特定术语,但是这样的术语意图是描述性意义,而不是为了限制的目的。

[0297] 示例性实施方案

[0298] 1.一种抗体,所述抗体特异性结合LRP6,所述抗体包含轻链可变区和/或重链可变区,所述重链可变区包含互补决定区CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含互补决定区CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中所述CDR的氨基酸序列包含选自以下的序列或由选自以下的序列组成:抗LRP6抗体LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9的CDR序列集。

[0299] 2.根据实施方案1所述的抗体,其中所述CDR的氨基酸序列包含选自如以下列出的序列的序列或由选自如以下列出的序列的序列组成:

- [0300] CDR-H1选自由以下组成的组:LSYYI (SEQ ID NO:2)、ISYSSI
- [0301] (SEQ ID NO:25)、LYYSM (SEQ ID NO:4)、ISSYI (SEQ ID NO:5)和IYSYI (SEQ ID NO:26);
- [0302] CDR-H2选自由以下组成的组:SIYSSYGYTS (SEQ ID NO:6)、YISSYGYTY (SEQ ID NO:7)、SISPYGYTY (SEQ ID NO:8)、SIYSSYGYTY (SEQ ID NO:9)和SIYSSYSYTS (SEQ ID NO:27);
- [0303] CDR-H3选自由以下组成的组:TVRGSKKPYFSGWAM (SEQ ID NO:10)、AHYFPWAGAM (SEQ ID NO:11)、SSYFPWFSAM (SEQ ID NO:12)、YAGYYPWAYYGWPFSGL (SEQ ID NO:13);
- [0304] CDR-L1是SVSSA (SEQ ID NO:14);
- [0305] CDR-L2是SASSLYS (SEQ ID NO:15);和/或
- [0306] CDR-L3选自由以下组成的组:YYSPI (SEQ ID NO:16)、YSWGPF
- [0307] (SEQ ID NO:17)、YYFLI (SEQ ID NO:18)、AGSAPYHLI (SEQ ID NO:
- [0308] 19)和YYWPI (SEQ ID NO:20)。
- [0309] 3.根据实施方案2所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含:
- [0310] i)如表2中列出的重链氨基酸序列;
- [0311] ii)与如表2中列出的重链氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或
- [0312] iii)i)的保守取代的氨基酸序列,其中所述CDR序列是如表1中列出的CDR序列集。
- [0313] 4.根据实施方案2至3中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含:
- [0314] i)如表2中列出的轻链氨基酸序列,
- [0315] ii)与如表2中列出的轻链氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列,其中所述CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或
- [0316] iii)i)的保守取代的氨基酸序列,其中所述CDR序列是如表1中列出的CDR序列集。
- [0317] 5.根据实施方案1-4中任一项所述的抗体,其中所述CDR序列是选自表1中鉴定的抗体的全CDR序列集。
- [0318] 6.根据实施方案1至5中任一项所述的抗体,其中所述抗体与LRP5交叉反应。
- [0319] 7.根据实施方案1所述的抗体,其中所述CDR序列包含选自表1中鉴定的抗体的轻链CDR序列集或重链CDR序列集。
- [0320] 8.根据实施方案1至7中任一项所述的抗体,其中所述抗体特异性结合LRP6。
- [0321] 9.根据实施方案8所述的抗体,其中所述CDR序列是选自抗体LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9的抗体的CDR序列集。
- [0322] 10.根据实施方案1至9所述的抗体,所述抗体阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点的结合。
- [0323] 11.根据实施方案1至9所述的抗体,所述抗体阻断Wnt配体与LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。

- [0324] 12. 根据实施方案1至11中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
- [0325] 13. 根据实施方案1至12中任一项所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。
- [0326] 14. 根据实施方案1至13中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单链抗体。
- [0327] 15. 根据实施方案1至14中任一项所述的抗体,其中所述抗体是选自以下的抗体结合片段: Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv,其二聚体、纳米抗体、微型抗体、双抗体及多聚体。
- [0328] 16. 根据实施方案1至14中任一项所述的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。
- [0329] 17. 根据实施方案1至14中任一项所述的抗体,其中所述抗体是还与FZD受体结合的双特异性抗体。
- [0330] 18. 根据实施方案1至17中任一项所述的抗体,所述抗体包含非天然糖基化模式。
- [0331] 19. 根据实施方案1至17中任一项所述的抗体,所述抗体包含半胱氨酸取代或添加,例如在恒定区或框架区中。
- [0332] 20. 一种免疫缀合物,所述免疫缀合物包含实施方案1至17中任一项所述的抗体和可检测的标记物或细胞毒性剂。
- [0333] 21. 根据实施方案20所述的免疫缀合物,所述免疫缀合物包含选自以下的细胞毒性剂: 美登素生物碱、澳瑞他汀、多拉司他汀、tubulysin、念珠藻素、吡咯并苯二氮卓类(PBD)二聚体、吲哚并苯二氮卓类二聚体、 α -鹅膏蕈碱、trichothene、SN-38、倍癌霉素、CC1065、卡奇霉素、烯二炔抗生素、紫杉烷、多柔比星衍生物、蒽环类和它们的立体异构体、azanofide、电子等排体、类似物或衍生物。
- [0334] 22. 一种核酸分子,所述核酸分子编码实施方案1至17中任一项所述的抗体。
- [0335] 23. 根据实施方案22所述的核酸分子,其中所述CDR序列中的一种或更多种由表2中的核酸编码。
- [0336] 24. 根据实施方案22所述的核酸分子,其中所述抗体包含由核酸编码的重链可变区,所述核酸包含:
- [0337] i) 如表2中列出的重链核酸序列;
- [0338] ii) 与如表2中列出的重链核酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的核苷酸序列,其中所述CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或
- [0339] iii) i) 的密码子简并核酸序列,其中所述CDR序列是如表1中列出的CDR序列集。
- [0340] 25. 根据实施方案22所述的核酸分子,其中所述抗体包含由核酸编码的轻链可变区,所述核酸包含:
- [0341] i) 如表2中列出的轻链核酸序列,
- [0342] ii) 与如表2中列出的轻链核酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的核酸序列,其中所述CDR序列是如表1中列出的CDR序列集,或
- [0343] iii) i) 的密码子简并核酸序列,其中所述CDR序列是如表1中列出的CDR序列集。
- [0344] 26. 一种载体,所述载体包含与实施方案22至25中任一项所述的核酸可操作地连接的表达控制序列。
- [0345] 27. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含重组核酸分子,所述重组核酸分子包含与实

施方案22-26中任一项所述的核酸可操作地连接的表达控制序列。

[0346] 28. 根据实施方案27所述的宿主细胞,所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0347] 29. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含实施方案26所述的载体。

[0348] 30. 一种制备抗LRP6抗体的方法,所述方法包括培养实施方案27至29中任一项所述的宿主细胞。

[0349] 31. 一种组合物,所述组合物包含实施方案1至17中任一项或更多项所述的抗体、实施方案20至21所述的免疫缀合物、实施方案22至25所述的核酸分子、实施方案26所述的载体或实施方案29所述的宿主细胞,以及任选地合适的稀释剂。

[0350] 32. 根据实施方案31所述的组合物,其中所述组合物包含一种或更多种抗体或免疫缀合物,任选地其中所述组合物是药物组合物。

[0351] 33. 一种试剂盒,所述试剂盒包含实施方案1至17中任一项或更多项所述的抗体、实施方案20-21所述的免疫缀合物、实施方案22-25所述的核酸分子、实施方案26所述的载体或实施方案27-29所述的宿主细胞。

[0352] 34. 一种检测LRP6表达的方法,所述方法包括在允许形成抗体:细胞复合物的条件下,使包含一个或多个细胞的样品与一种或更多种实施方案1至21中任一项所述的抗体或免疫缀合物接触,并检测任何抗体复合物的存在。

[0353] 35. 根据实施方案34所述的方法,其中所述检测是通过免疫荧光。

[0354] 36. 根据实施方案34所述的方法,其中所述检测是通过流式细胞术。

[0355] 37. 根据实施方案34至36中任一项所述的方法,其中所述方法用于检测LRP4表达,并且所述抗体或免疫缀合物包含对应于选自LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9的抗体的CDR序列集。

[0356] 38. 一种抑制Wnt配体与LRP6受体结合、破坏Wnt信号传导途径、抑制Wnt诱导的转录活性、抑制散乱蛋白活化、促进 β -联蛋白破坏复合物的保持、促进 β -联蛋白积累或抑制细胞生长的方法,所述方法包括使表达LRP6受体的细胞与实施方案1至21中任一项所述的抗体或免疫缀合物接触。

[0357] 39. 根据实施方案38所述的方法,其中所述抗体或免疫缀合物阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点的结合。

[0358] 40. 根据实施方案38所述的方法,其中所述抗体或免疫缀合物阻断Wnt配体与LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。

[0359] 41. 根据实施方案38所述的方法,其中所述抗体或免疫缀合物包含对应于选自由LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9组成的组的抗体的CDR序列集。

[0360] 42. 一种治疗有相应需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含实施方案1至21中任一项所述的抗体或免疫缀合物。

[0361] 43. 根据实施方案42所述的方法,其中所述癌症选自结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、肾上腺皮质癌和成骨细胞瘤。

[0362] 44. 根据实施方案42所述的方法,其中所述癌症选自急性髓性白血病、前列腺癌、胶质母细胞瘤、膀胱癌和宫颈癌。

[0363] 45. 根据实施方案42所述的方法,所述方法包括向所述受试者施用实施方案1至21

中任一项所述的第一抗体或抗体缀合物和第二抗体或抗体缀合物,其中所述第一抗体或抗体缀合物阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点的结合,并且所述第二抗体或抗体缀合物阻断Wnt配体与LRP6的非Wnt3a结合位点的结合。

[0364] 46.根据实施方案45所述的方法,其中所述第一抗体或免疫缀合物包含选自抗体LRP6-A10或LRP6-B6的CDR序列集,并且所述第二抗体或免疫缀合物包含选自抗体LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3或LRP6-G9的CDR序列集。

[0365] 47.根据实施方案42所述的方法,其中所述抗体或免疫缀合物在至少一种测定中特异性结合LRP6,并在至少一种测定中抑制Wnt3a诱导的信号传导,任选地其中所述抗体或免疫缀合物是实施方案1至21中任一项所述的抗体或免疫缀合物。

[0366] 48.根据实施方案42所述的方法,其中所述抗体或免疫缀合物包含对应于选自由LRP6-A1、LRP6-A10、LRP6-B6、LRP6-E3、LRP6-G3和LRP6-G9组成的组的抗体的CDR序列集。

[0367] 49.一种增强与LRP6的Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性的方法,所述方法包括使表达LRP6的细胞与阻断Wnt配体与LRP6的非Wnt3a结合位点结合的抗体接触。

[0368] 50.一种增强与LRP6的非Wnt3a结合位点结合的Wnt配体的信号传导活性的方法,所述方法是通过使表达LRP6的细胞与阻断Wnt配体与LRP6的Wnt3a结合位点结合的抗体接触。

[0369] 51.根据实施方案49或50中任一项所述的方法,所述方法在体外进行。

[0370] 52.根据实施方案49或50中任一项所述的方法,所述方法在体内进行。

[0371] 以下非限制性实例是对本公开内容的说明:

实施例

[0372] 实施例1

[0373] 噬菌体展示抗体文库

[0374] 噬菌体展示抗体文库是用于产生治疗性抗体的强大技术^{17,18}。将 $>10^{10}$ 种独立抗体片段的高度复杂文库以外壳蛋白融合分子展示在噬菌体颗粒上,并进行筛选以分离识别感兴趣的抗原的抗体。本发明人已经建立了合成抗体文库,其中抗原结合位点完全由工程化序列构建。所得抗体使用优化的人类框架,并因此当用作潜在治疗剂时免疫原性最低。合成抗体高度稳定,并且它们的人类框架和抗原结合位点可以被定制以优化亲和力、特异性和效力。

[0375] 抗LRP6抗体的表征和优化

[0376] 实施例2

[0377] 使用固定化的重组LRP6-ECD(细胞外结构域),从实施例1中描述的Fab噬菌体文库鉴定新的合成抗LRP6抗体。通过ELISA筛选来自第4轮的Fab-噬菌体克隆的结合,并且阳性结合物的CDR的氨基酸序列在图1A中呈现。结合物的可变区(重链和轻链)的完整的DNA和氨基酸序列在以上说明书中呈现。通过竞争性ELISA进行的表位作图揭示抗体与LRP6的ECD上的两种独特表位结合。LRP6-A1、LRP6-G3和LRP6-G9与类似的表位结合,而LRP6-A10和LRP6-B6共享类似的表位。

[0378] 纯化全长IgG1并进行单点ELISA以确定抗体的特异性。如图1B中示出的,6种LRP6抗体中有5种与重组人类LRP6-Fc嵌合体结合。感兴趣的是,LRP6-A10和LRP6-B6抗体与重组

小鼠LRP6His嵌合体结合得同样好,而LRP6-A1、LRP6-G3和LRP6-G9显示出部分结合。此外,没有LRP6抗体与重组小鼠LRP5-His嵌合体结合,表明对LRP6的特异性。LRP6-E3抗体未能与任何重组蛋白结合,并仅用作阴性对照。多点竞争性ELISA用于确定抗体对重组抗原的相对亲和力。IC₅₀通过非线性回归分析确定,并总结在下表3中。完整的剂量响应曲线和非线性回归图在图8中呈现。

[0379] 表3报告了通过竞争性ELISA确定的LRP6抗体的IC₅₀。重组人类LRP6-Fc嵌合体浓度的对数(x轴)相对于抗体的OD450读数(y轴)作图。IC₅₀通过非线性回归分析确定。

[0380] 表3

[0381]	IgG1抗体	IC ₅₀ (nM)
	LRP6-A1	9.58
	LRP6-A10	6.29
	LRP6-B6	15.28
	LRP6-G3	10.23
	LRP6-G9	6.03

[0382] 全细胞裂解物的蛋白印迹分析显示LRP6在NSCLC细胞系H23和三阴性乳腺癌细胞系MDAMB231中高表达。(三阴性乳腺癌细胞的雌激素受体、孕酮受体和过量Her2蛋白检测为阴性。)LRP6也显示在乳腺癌细胞系T47D中以低水平表达(数据未示出)。如通过FACS分析评估的,LRP6IgG1抗体标记了H23(图2)、MDAMB231(图9)和T47D(图9)细胞的表面,并表明LRP6抗体可以与这些细胞系表面表达的全长受体结合。如以上提到的,Wnt信号传导启动了主要调节 β -联蛋白的稳定性和功能的典型途径。

[0383] 在Wnt刺激后,胞质溶胶和细胞核中的 β -联蛋白水平升高,导致TCF/LEF(转录因子)介导的转录增加。TOPflash报告物测定是广泛用于评估 β -联蛋白体外活性的工具。该载体由几个驱动萤火虫萤光素酶报告基因表达的TCF/LEF结合位点组成。为了评估LRP6抗体在调节Wnt典型途径中的功能活性,产生了几种表达该报告物的癌细胞系。

[0384] 如图3A中示出的,在用阴性对照IgG1(抗MBP)预处理的MDAMB231细胞中,与用对照条件培养基(ConCM)处理相比,表达Wnt3a的条件培养基(Wnt3aCM)诱导萤光素酶报告物活性的120倍增加。LRP6-A10和LRP6-B6抗体显著抑制Wnt3aCM诱导的报告物活性。相反,LRP6-G3和LRP6-G9抗体显著增强Wnt3aCM诱导的报告物活性。在乳腺癌细胞系T47D(图3B)和骨肉瘤细胞系U20S(图3C)中观察到类似的结果。在U20S细胞系中,ConCM和Wnt3aCM诱导的报告物活性被LRP6-A10和LRP6-B6抗体抑制,而LRP6-G3和LRP6-G9抗体增强报告物活性(与抗MBP(麦芽糖结合蛋白)相比)。该观察结果表明,U20S细胞在基础状态中表达可以调节TCF/LEF介导的转录活性的内源性Wnt3a。

[0385] 结构和诱变研究揭示,Wnt3a与不同于其余Wnt配体的结合位点的独特结构域结合。我们的结果表明,LRP6-A10和LRP6-B6抗体可以与Wnt3a结合位点结合,从而阻断响应于Wnt3aCM的TCF/LEF介导的转录。相比之下,LRP6-G3和LRP6-G9(或许还有LRP6-A1)抗体可能与其他非Wnt3a结合位点结合。为了解决这一假设,我们在NSCLC细胞系H23中评估了报告物活性。先前的研究显示,Wnt2主要驱动基础性TCF/LEF介导的转录活性,并且这些细胞不表达Wnt3a¹⁹。如预期的,LRP6-A10和LRP6-B6抗体抑制Wnt3aCM诱导的报告物活性,而LRP6-A1、LRP6-G3和LRP6-G9抗体增强Wnt3aCM诱导的报告物活性(与MBP相比;图4A)。感兴趣的是,

LRP6-A10和LRP6-B6抗体增强了基础(ConCM诱导的)报告物活性,而LRP6-A1、LRP6-G3和LRP6-G9抗体抑制了基础(ConCM诱导的)报告物活性(与MBP相比)。该观察结果与我们之前的假设相关,即LRP6-A10和LRP6-B6抗体可以与Wnt3a结合位点结合,而LRP6-A1、LRP6-G3和LRP6-G9抗体可能与其他非Wnt3a结合位点结合。为了进一步支持该观察结果,我们使用稳定表达萤光素酶报告基因以及四环素驱动的Wnt1基因的HEK293细胞系。如图4B中示出的,在用重组Wnt3a刺激后LRP6-A10抗体显著抑制报告物活性,而在Wnt1刺激后没有作用。相反,在用Wnt1刺激后LRP6-G3抗体显著抑制报告物活性,而在用重组Wnt3a刺激后没有作用。

[0386] 目前为止,我们的观察结果表明LRP6-A10和LRP6-G3抗体对Wnt3aCM诱导的报告物活性具有最强的作用。为了确定抗体的作用是否与Wnt3a有关而与条件培养基中存在的任何其他组分无关,我们在乳腺癌细胞系中测量了响应于重组Wnt3a刺激的报告物活性。与我们先前的观察结果一致,在用重组Wnt3a刺激后LRP6-A10抗体显著抑制报告物活性,而LRP6-G3增强重组Wnt3a刺激的报告物活性(图5)。通过竞争性ELISA确定的LRP6-A10抗体的计算的 IC_{50} 为6.29nM(表3)。因此,我们检查了我们是否可以使用TOPflash报告物测定来计算LRP6-A10抗体的功能性 IC_{50} 。在MDAM8231、U2OS和H23癌细胞中,LRP6-A10抗体以剂量依赖性方式抑制Wnt3aCM刺激的报告物活性(图6A)。感兴趣的是,在MDAM8231细胞中,LRP6-A10 Fab还以剂量依赖性方式抑制Wnt3aCM刺激的报告物活性(图6B)。功能性 IC_{50} 通过非线性回归分析确定,并在图6C中呈现。我们的结果显示,LRP6-A10抗体(IgG1和Fab两者)展示出大于由竞争性ELISA确定的 IC_{50} 的功能性 IC_{50} ($<0.3nM$)。

[0387] 通过蛋白印迹分析评估LRP6-A10和LRP6-G3抗体对Wnt信号传导近端事件的作用(图7A)。用LRP6-A10或LRP6-G3抗体处理的H23细胞显著抑制ConCM诱导的LRP6磷酸化。相反,只有LRP6-A10抗体降低了Wnt3aCM诱导的LRP6磷酸化和总LRP6蛋白。从用LRP6-A10和LRP6-G3抗体处理然后用条件培养基刺激的H23细胞分离的膜级分中观察到对LRP6磷酸化的类似作用(图7B)。LRP6-G3抗体显著降低Wnt3aCM刺激的细胞中的Axin1蛋白水平。由于Axin1是调节 β -联蛋白的“游离”库水平的破坏复合物的组分,因此在使用LRP6-G3抗体处理然后用Wnt3aCM刺激之后Axin1的表达减弱可以解释为何该抗体有效地增强Wnt3aCM诱导的报告物活性(图4和图5)。

[0388] 为了更好地理解抗体对 β -联蛋白水平的作用,用LRP6-A10和LRP6-G3抗体处理然后用条件培养基刺激的H23细胞的胞质级分被分离。如图7B中示出的,LRP6-A10抗体分别显著上调和下调ConCM和Wnt3aCM处理的细胞中的 β -联蛋白水平。类似地,LRP6-G3抗体分别轻微降低和增加ConCM和Wnt3aCM处理的细胞中的 β -联蛋白水平。

[0389] NSCLC细胞系H23用作探索LRP6抗体共处理对TOPflash报告物活性的作用的优秀系统。我们先前的结果显示LRP6-A10抗体分别增强和抑制ConCM诱导的报告物活性和Wnt3aCM诱导的报告物活性。相反,LRP6-G3抗体分别抑制和增强ConCM诱导的报告物活性和Wnt3aCM诱导的报告物活性。如图8中示出的,在存在LRP6-G3抗体的情况下,LRP6-A10抗体不能够增强ConCM诱导的报告物活性。类似地,在存在LRP6-A10抗体的情况下,LRP6-G3抗体不能够增强Wnt3aCM诱导的报告物活性。观察结果表明LRP6-A10和LRP6-G3抗体共处理可以对Wnt刺激的TCF/LEF介导的转录具有有效的抑制作用。因此,通过利用文库设计策略的进步,我们能够发现新的LRP6抗体,其能够对 β -联蛋白信号传导相关的近端和远端事件发挥拮抗活性和增强活性两者。这些活性还取决于Wnt配体和LRP6之间的不同相互作用。我们正

在积极研究这些抗体在体外和体内的治疗潜力。

[0390] 缩写:

[0391]	缩写	完整术语
	APC	腺瘤性结肠息肉
	CDR	互补决定区
	CK1	酪蛋白激酶1
	Dsh/Dvl	散乱蛋白 (dishevelled)
	ECD	细胞外结构域
	ELISA	酶联免疫吸附测定
	Fab	抗原结合片段
	FACS	荧光活化细胞分选
	Fc	可结晶区片段
	GSK3b	糖原合酶激酶3 β
	IC ₅₀	半最大抑制浓度
	IgG1	免疫球蛋白G1
	LRP	低密度脂蛋白受体相关蛋白
	OD	光密度
	NSCLC	非小细胞肺癌

[0392] 1.Saito-Diaz,K.et al.The way Wnt works:components and mechanism.Growth Factors Chur Switz.31,1-31(2013) .

[0393] 2.Clevers,H.&Nusse,R.Wnt/beta-catenin signaling and disease.Cell 149, 1192-1205(2012) .

[0394] 3.Anastas,J.N.&Moon,R.T.WNT signaling pathways as therapeutic targets in cancer.Nat. • Rev.Cancer 13,11-26(2012) .

[0395] 4.Baron,R.&Kneissel,M.WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments.Nat.Med.19,179-192(2013) .

[0396] 5.Kim,W.,Kim,M.&Jho,E.Wnt/beta-catenin signaling:from plasma membrane to nucleus.,Biochem.J.450,9-21(2013) .

[0397] 6.Chen,S.et al.Structural and Functional Studies of LRP6 Ectodomain Reveal a Platform for Wnt Signaling.Dev.Cell 21,848-861(2011) .

[0398] 7.MacDonald,B.T.&He,X.Frizzled and LRP5/6Receptors for Wnt/beta-Catenin Signaling.Cold Spring Harb.Perspect.Biol.4,a007880-a007880(2012) .

[0399] 8.Niehrs,C.&Shen,J.Regulation of LRP6 phosphorylation.Cell.Mol.Life Sci.CMLS 67,2551-2562(2010) .

[0400] 9.Williams,B.O.&Insogna,K.L.Where Wnts Went:The Exploding Field of LRP5 and LRP6Signaling in Bone.J.Bone Miner.Res.24,171-178(2009) .

[0401] 10.Bafico,A,Liu,G.,Goldin,L.,Harris,V.&Aaronson,S.An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells.Cancer Cell 6,497-506(2004) .

[0402] 11.Liu,C.-C.,Prior,J.,Piwnica-Worms,D.&Bu,G.LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy.Proc.Natl.Acad.Sci.107,5136-5141(2010).

[0403] 12.Li,Y.&Bu,G.LRP5/6in Wnt signaling and tumorigenesis.Future Oneel.Lend.Engl.1,673-681(2005).

[0404] 13.MacDonald,B.T.,Semenov,M.V.,Huang,H.&He,X.Dissecting Molecular Differences between Wnt Coreceptors LRP5 and LRP6.PLoS ONE 6,e23537(2011).

[0405] 14.Mi,K.&Johnson,G.V.W.Role of the intracellular domains of LRP5 and LRP6 in activating the Wnt canonical pathway.J.Cell.Biochem.95,328-338(2005).

[0406] 15.Ettenberg,S.A et al.Inhibition of tumorigenesis driven by different Wnt proteins requires blockade of distinct ligand-binding regions by LRP6 antibodies.Proc.Natl.Acad.Sci.107,15473-15478(2010).

[0407] 16.Gong,Y.et al.Wnt Isoform-Specific Interactions with Coreceptor Specify Inhibition or Potentiation of Signaling by LRP6 Antibodies.PLoS ONE 5,e12682(2010).

[0408] 17.Lee,C.V.et al.High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold.J.Mol.Biol.340,1073-1093(2004).

[0409] 18.Sidhu,S.S.&Fellouse,F.A Synthetic therapeutic antibodies.Nat.Chem.Biol.2,682-688(2006).

[0410] 19.Akiri,G.et al.Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma.Oncogene 28,2163-2172(2009).

[0411] 如本文所使用的,除非另外指定,否则以下含义适用。词语“可以”用于允许性的含义(即,意指有可能),而非强制性的含义(即,意指必须)。词语“包括/包含(include)”、“包括/包含(including)”和“包括/包含(includes)”等意指包括/包含但不限于。单数形式“一(a)”、“一(a)”和“该(the)”包括复数指示物。因此,例如,提及“要素(an element)”包括两个或更多个要素的组合,尽管对于一个或更多个要素使用了其他术语和措辞,诸如“一个/种或更多个/种(one or more)”。措辞“至少一个/种(at least one)”包括“一个/种或更多个/种”、“一个/种或多于一个/种(one or a plurality)”和“多于一个/种(a plurality)”。除非另外指明,否则术语“或”是非排他性的,即,涵盖“和”和“或”两者。在修饰语和序列之间的术语“.....中的任一个”意指修饰语修饰序列中的每一个成员。因此,例如,措辞“至少1、2或3中的任一个”意指“至少1、至少2或至少3”。术语“主要由.....组成”是指包含所列举的要素和不实质上影响所要求保护的组合的基本特征和新颖特征的其他要素。

[0412] 应当理解,本说明书和附图并不意图将本发明限制于所公开的特定形式,而是相反,意图覆盖落入由所附权利要求书限定的本发明的精神和范围内的所有修改、等同形式和替代形式。根据本说明书,本发明的各方面的其他修改和替代实施方案对于本领域技术人员将是明显的。因此,本说明书和附图应被解释为仅是说明性的,并且是为了教导本领域

技术人员进行本发明的一般方式的目的。应理解,本文示出和描述的本发明的形式应被认为是实施方案的实例。本文说明和描述的要素和物质可以被替换,组成部分(part)和过程可以颠倒或省略,并且本发明的某些特征可以被独立使用,所有这些对了解本发明说明书的益处的本领域技术人员来说都将是明显的。在不脱离如所附权利要求书描述的本发明的精神和范围的情况下可以对本文描述的要素进行改变。本文使用的标题仅为了组织的目的,并不意味着用来限制本说明书的范围。

[0413] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文,其程度如同每一个单独的出版物、专利或专利申请被具体和单独地指明通过引用并入。

克隆ID	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	表位组
LRP6 - A1	SVSSA	SASSLYS	YYWPI	LSYYYI	SIYSSYGYTS	TVRGSKKPYFSGWAM	1
LRP6 - A10	SVSSA	SASSLYS	YSWGPF	ISYSSI	YISSYYGYTY	AHYFPWAGAM	2
LRP6 - B6	SVSSA	SASSLYS	YYFLI	ISYSSI	SISPYGYTY	SSYFPWFSAM	2
LRP6 - E3	SVSSA	SASSLYS	AGSAPYHLI	LYYYSM	SIYSSYGYTY	YAGYYYYPWAYYGWPFSGL	1
LRP6 - G3	SVSSA	SASSLYS	YYWPI	ISSYYI	SIYSSYGYTS	TVRGSKKPYFSGWAM	1
LRP6 - G9	SVSSA	SASSLYS	YYWPI	IYSYI	SIYSSYSYTS	TVRGSKKPYFSGWAM	1

图1A

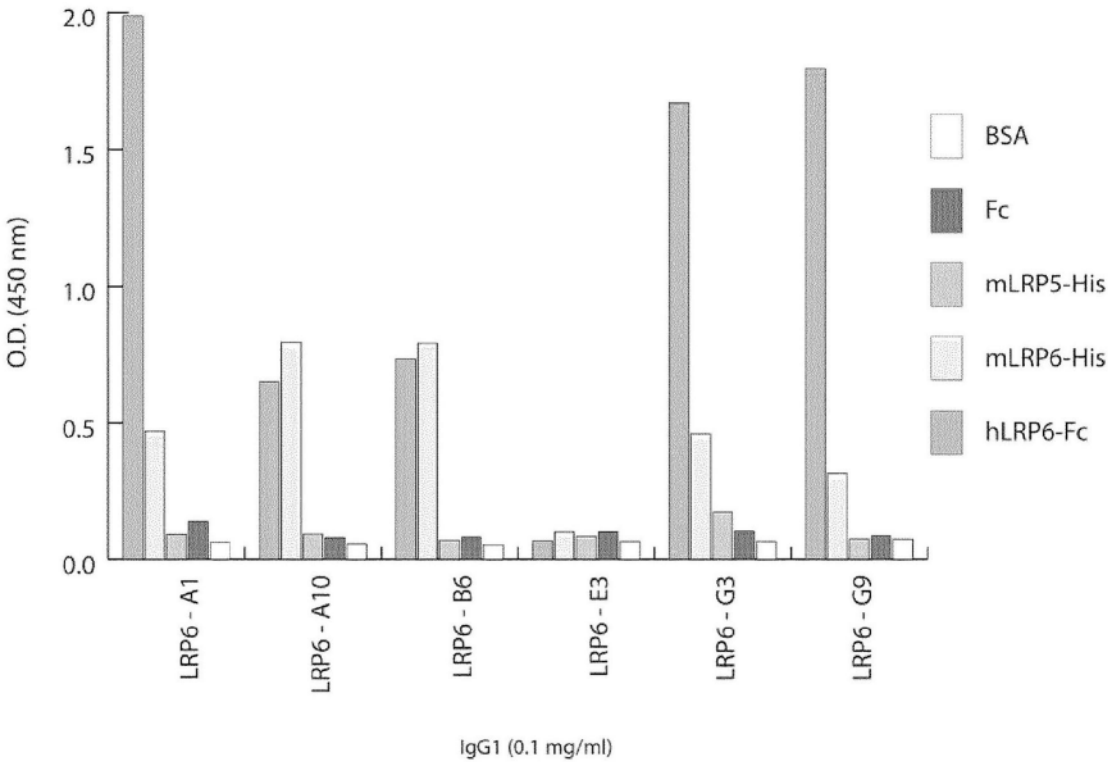


图1B

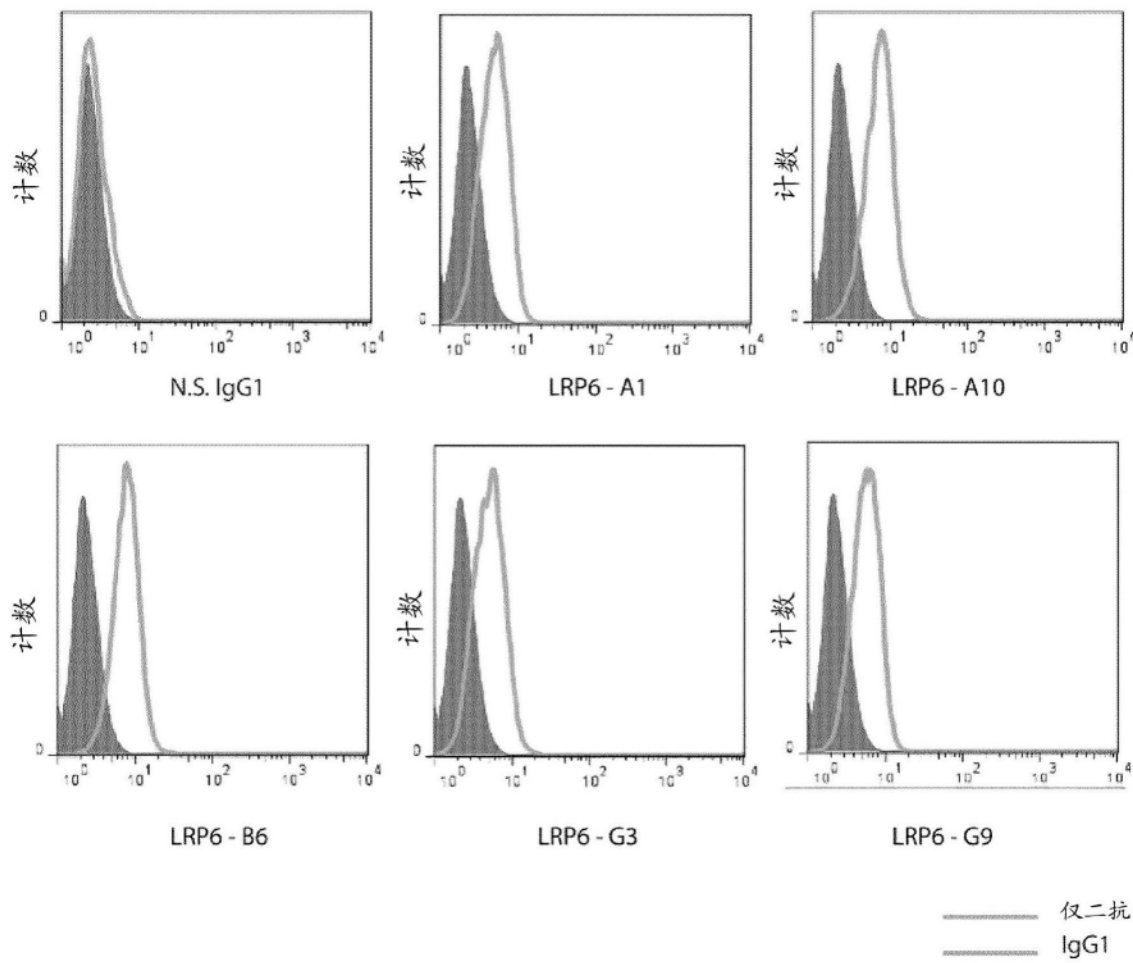


图2

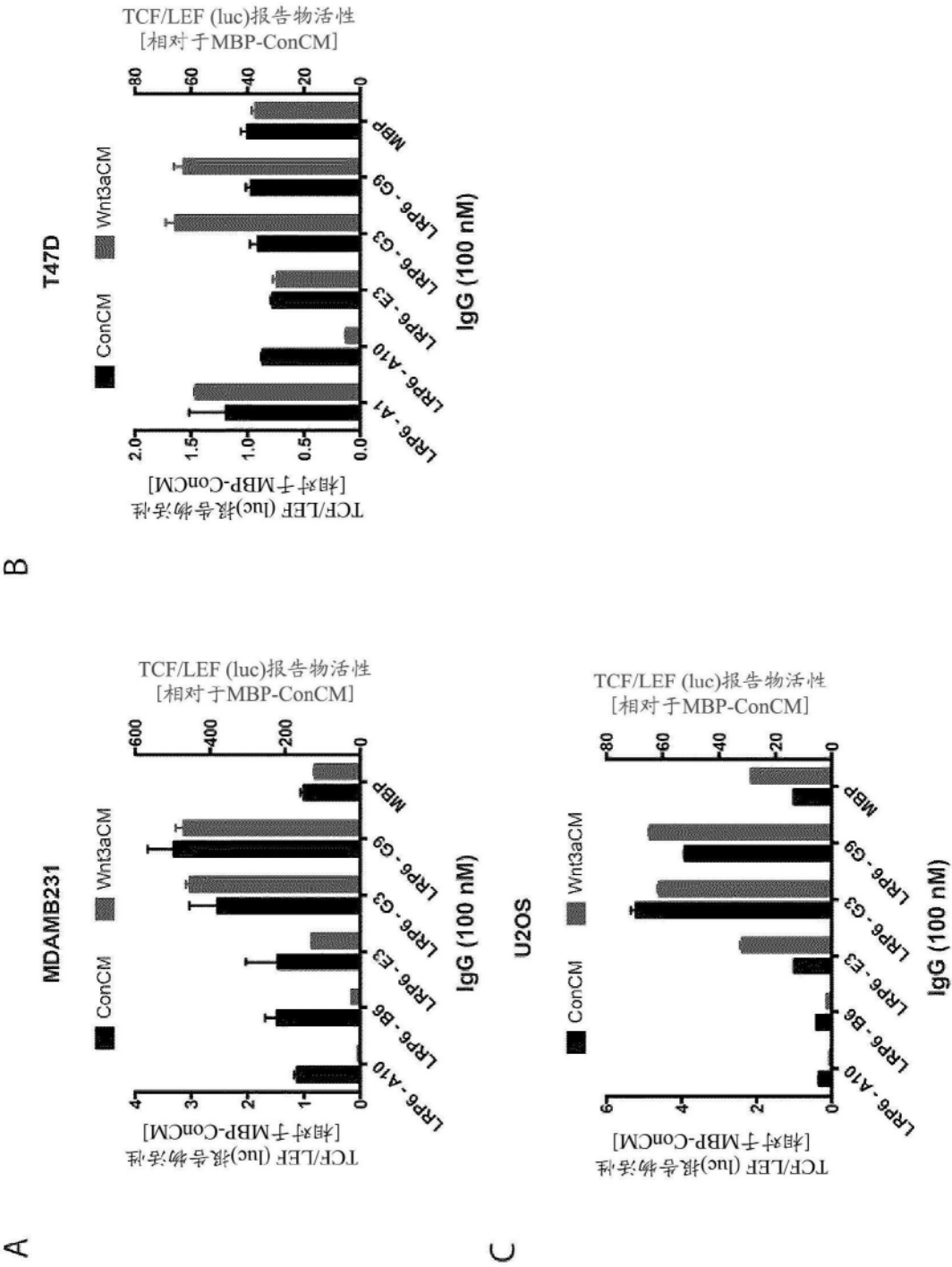


图3

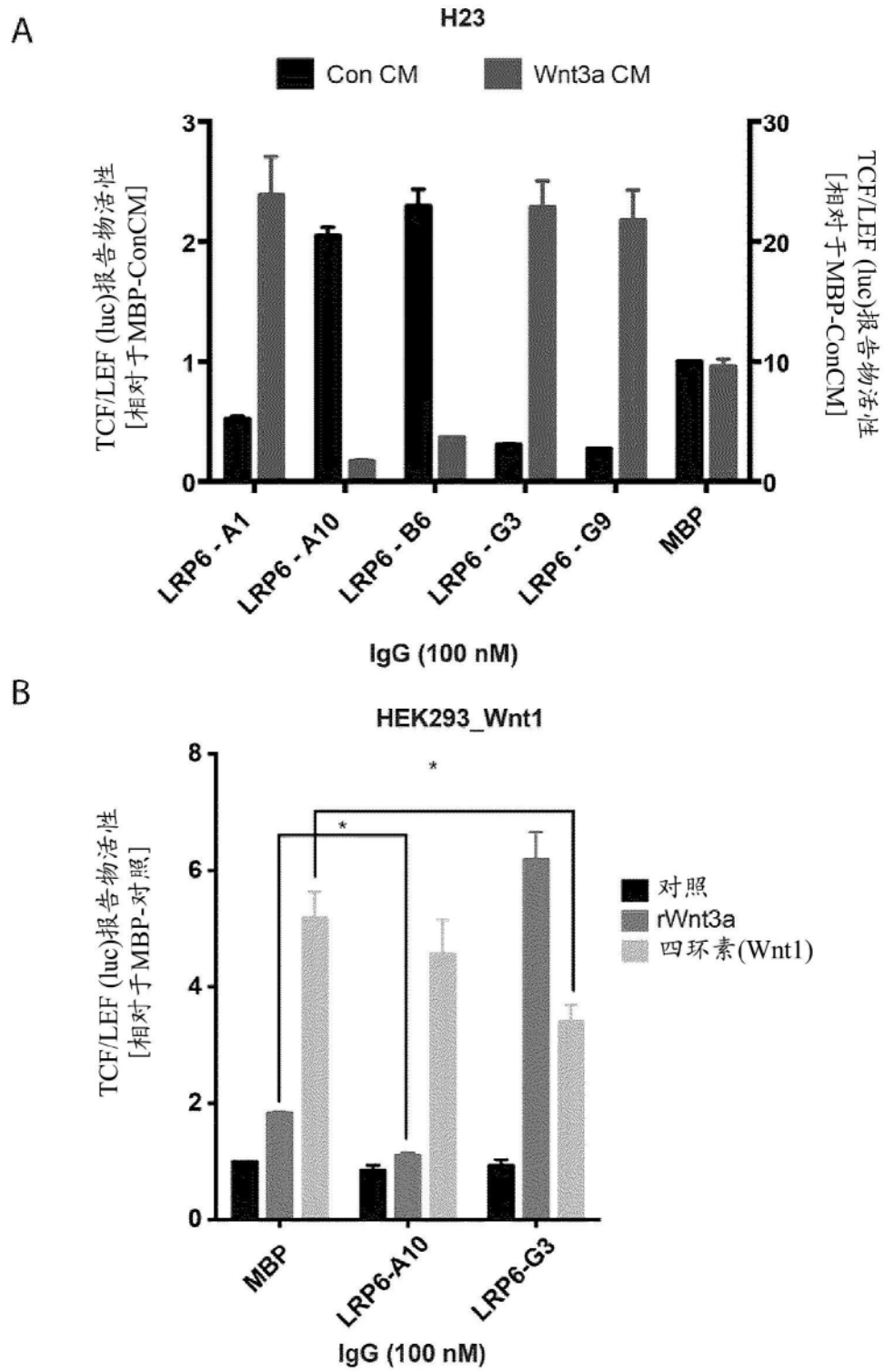


图4

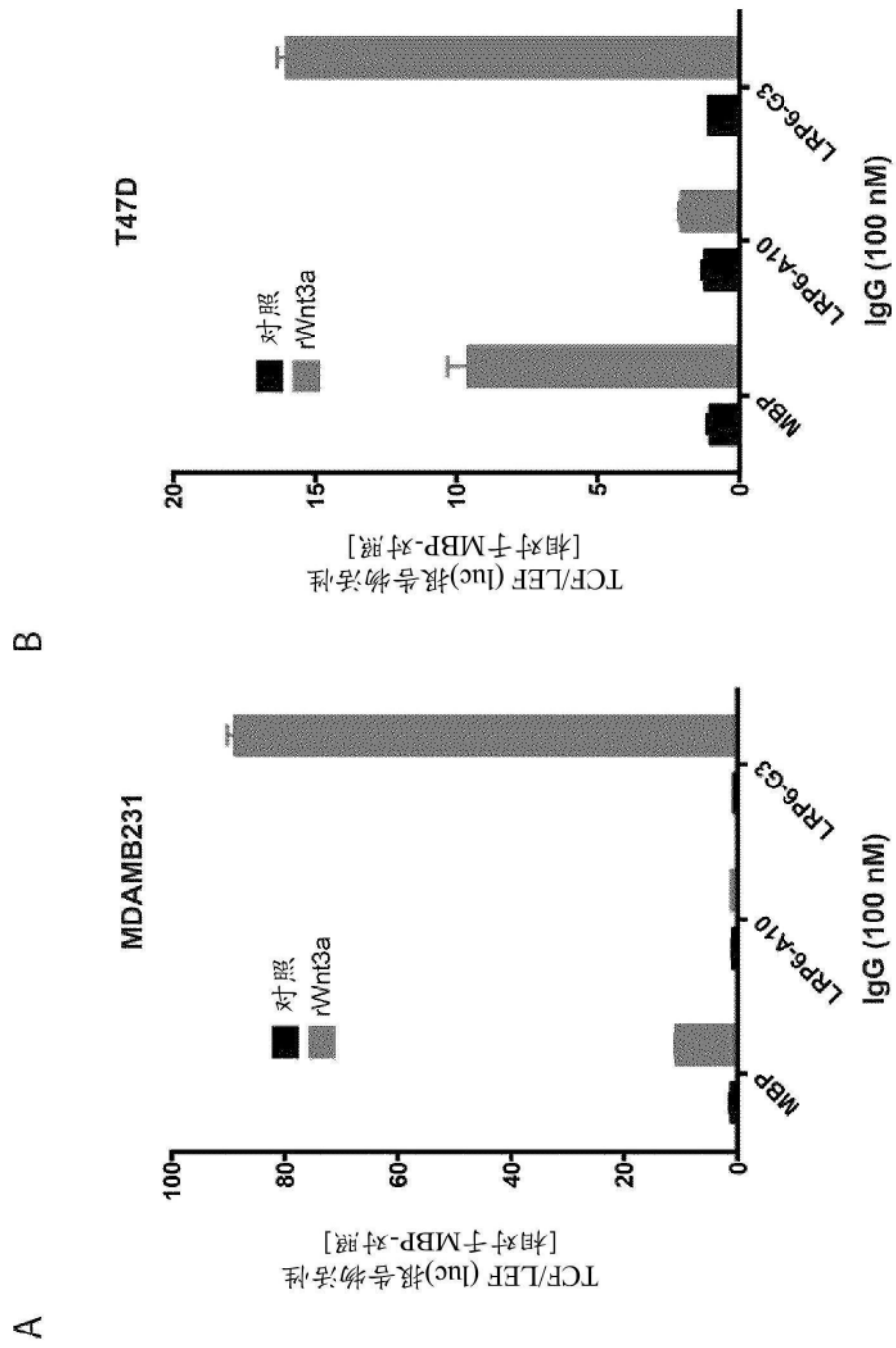


图5

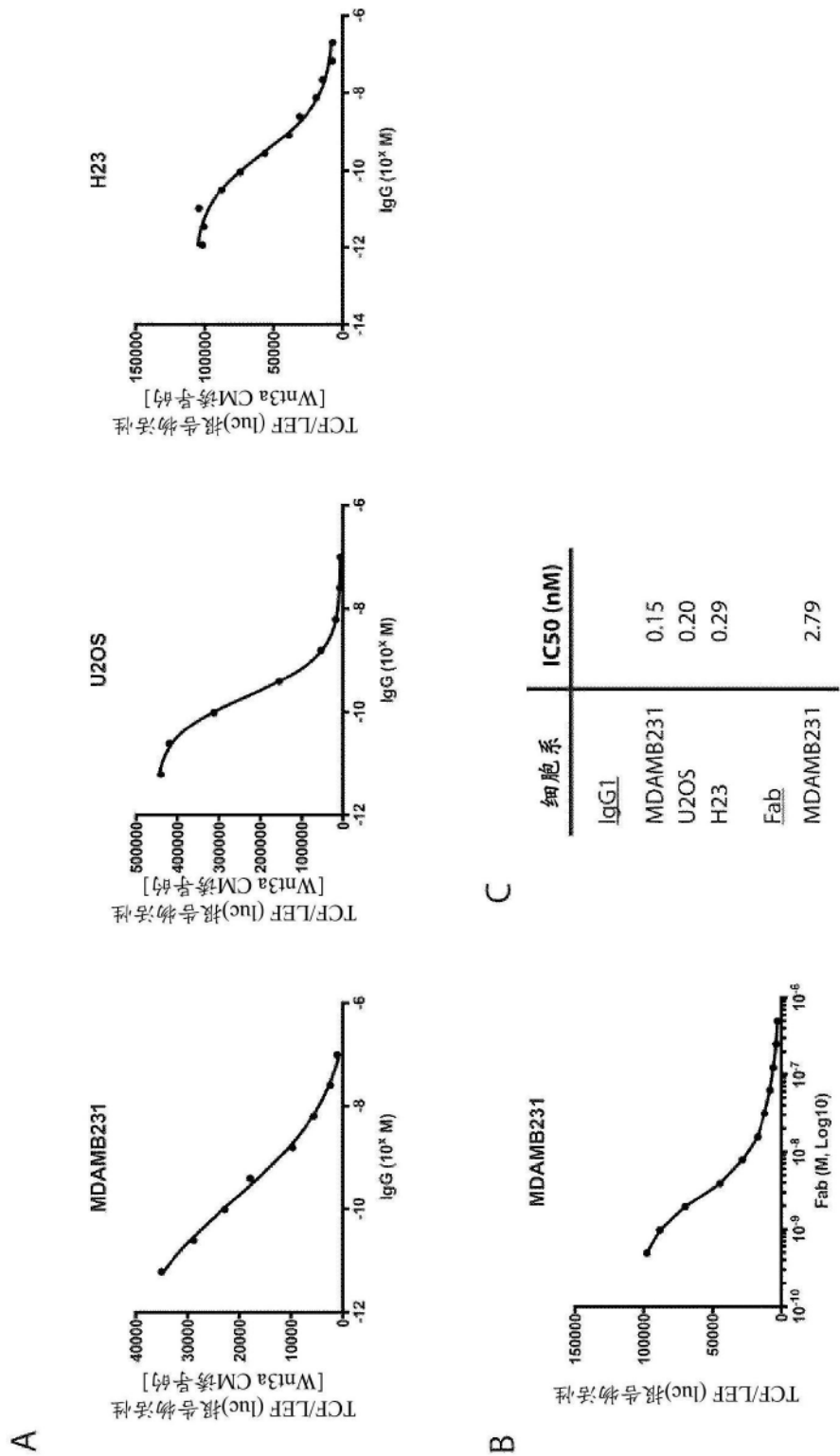
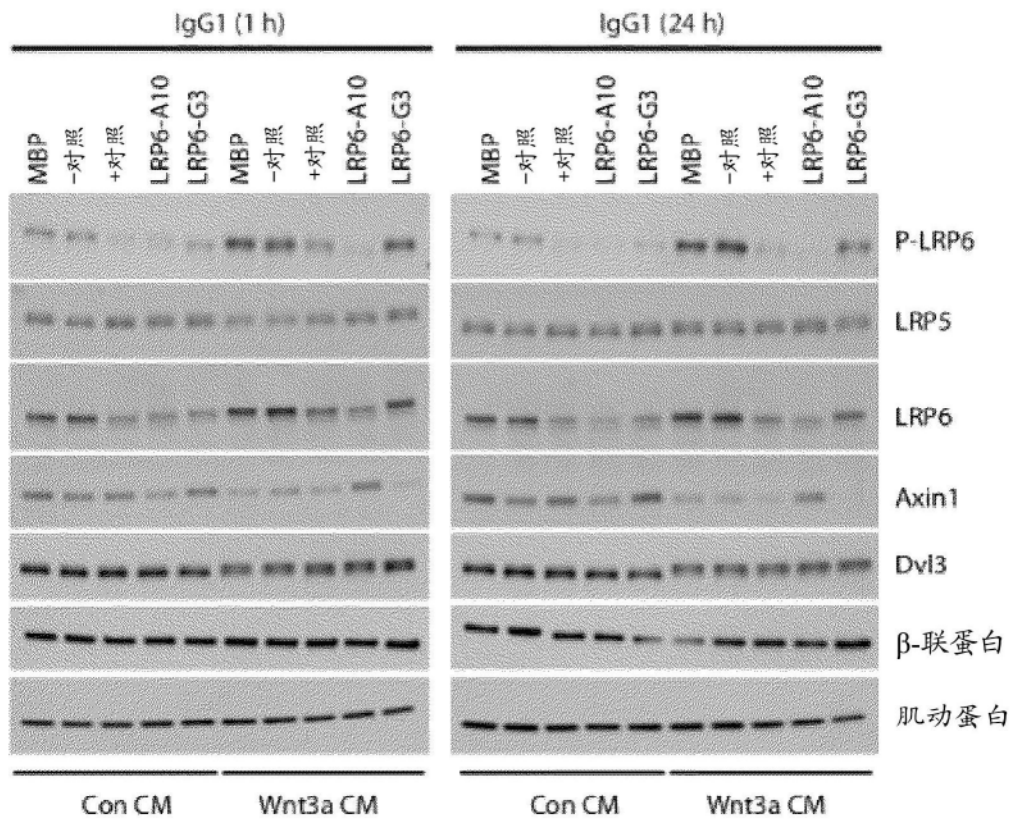


图6

A



B

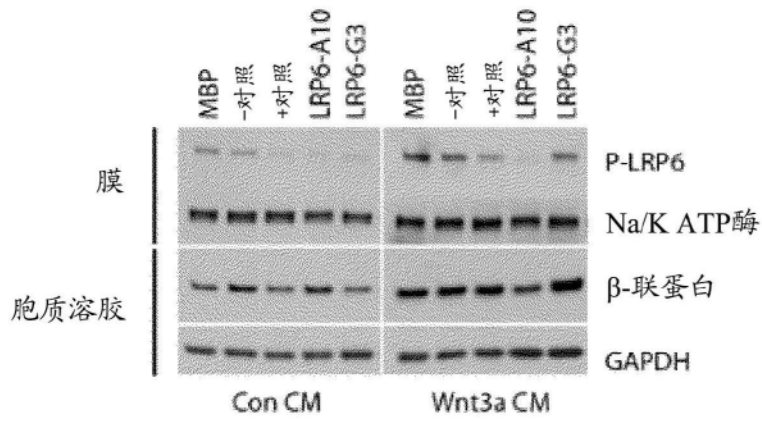


图7

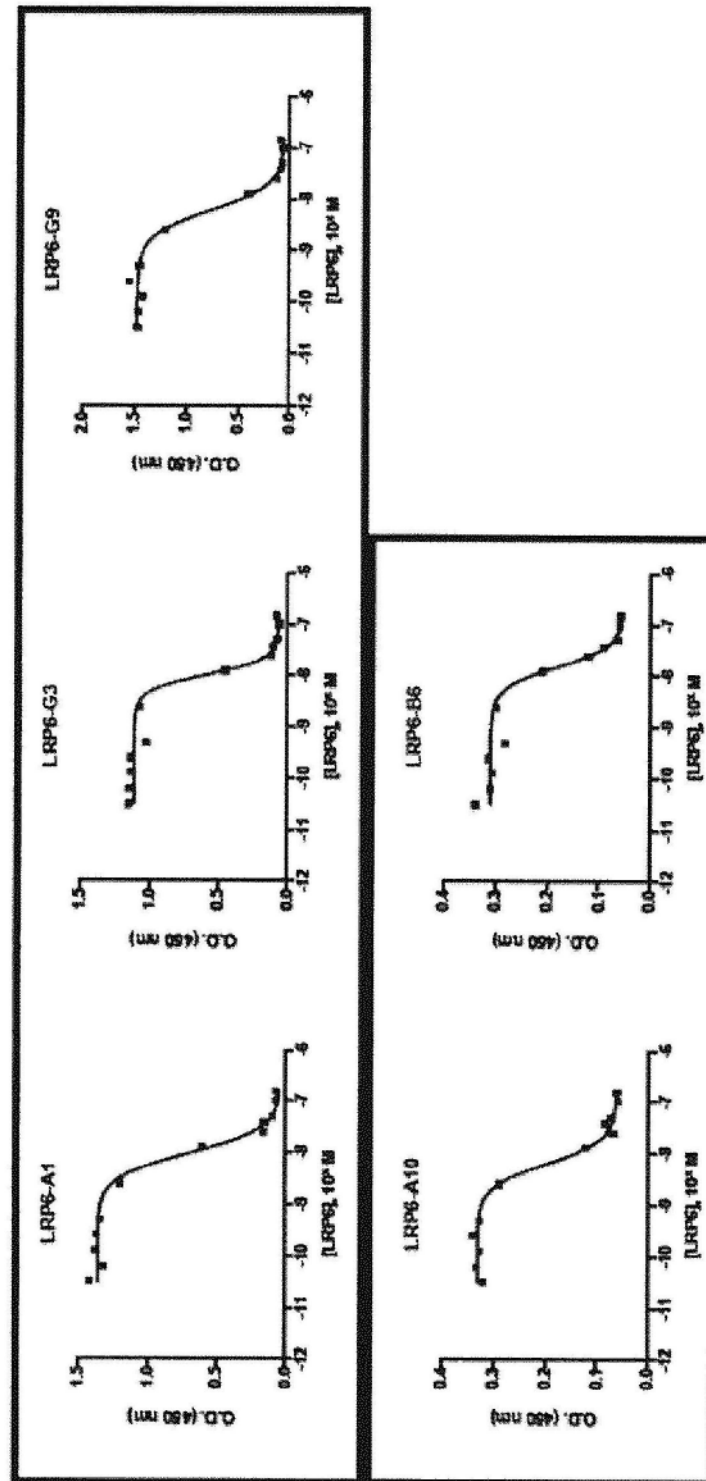


图8

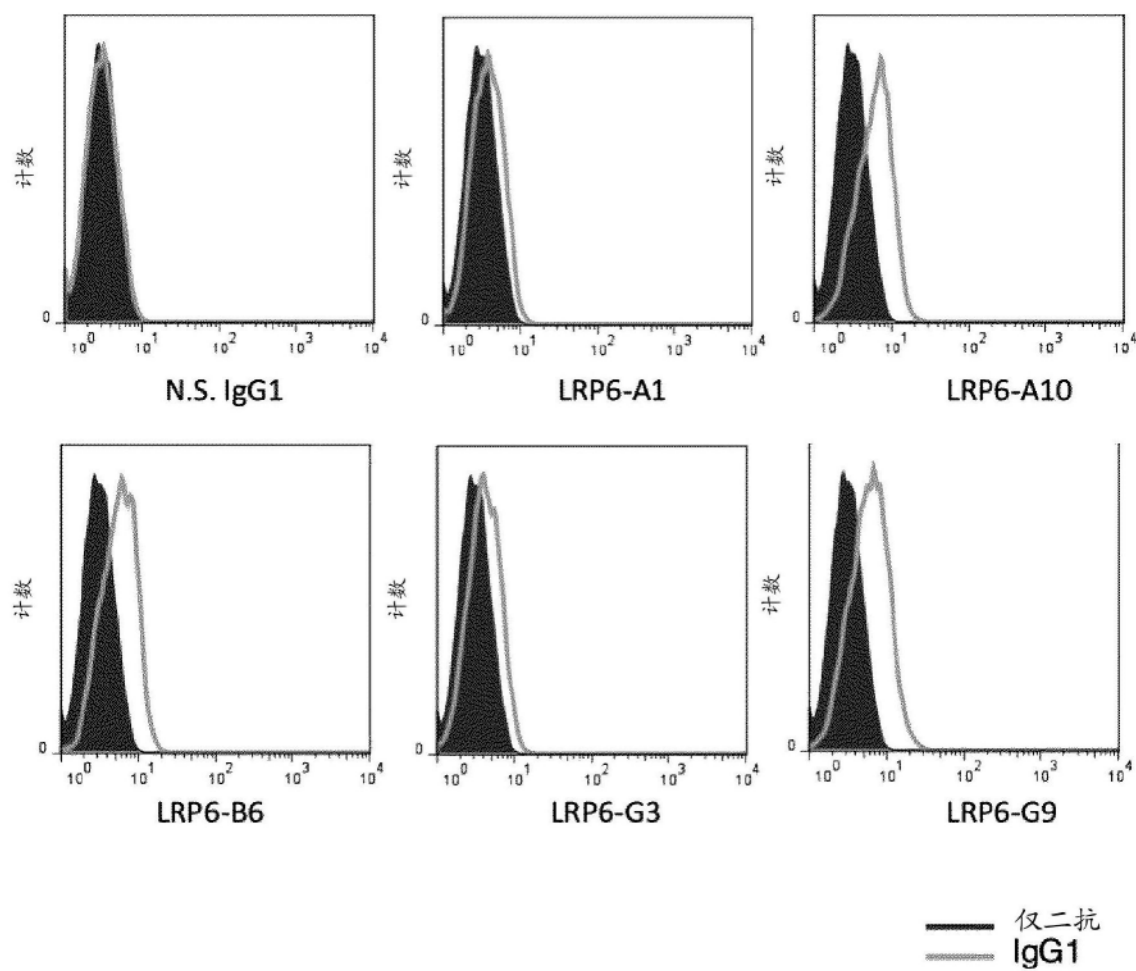


图9

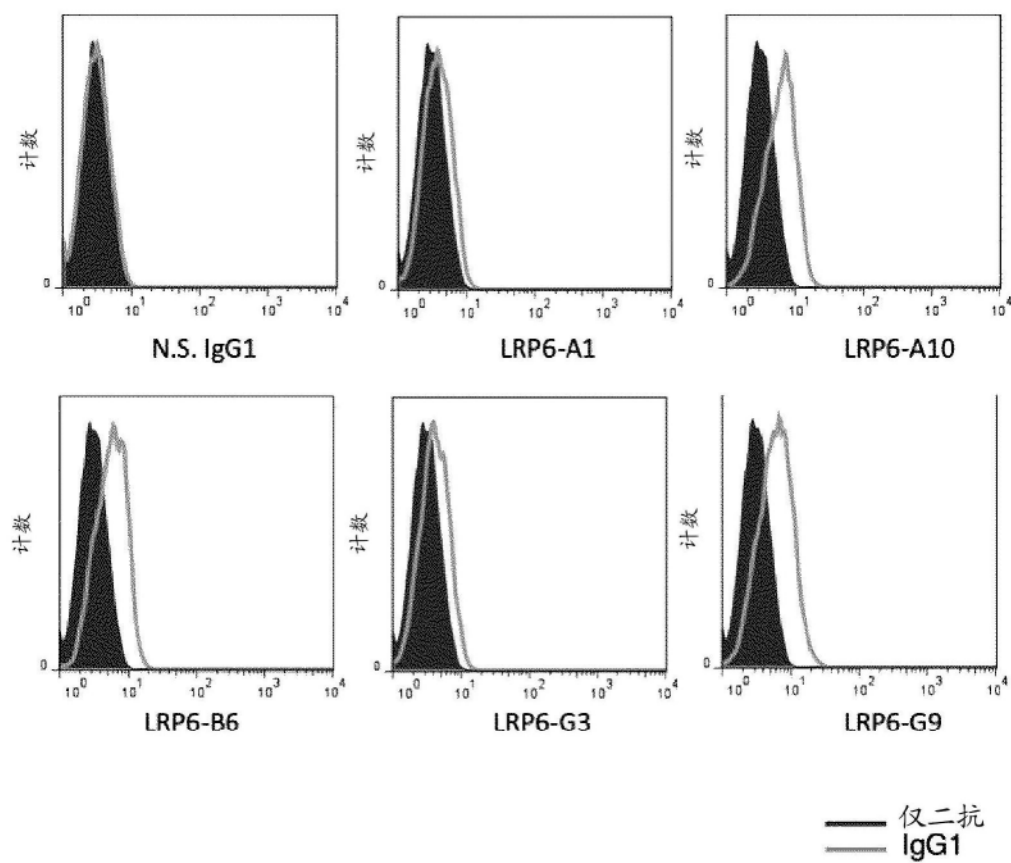


图10

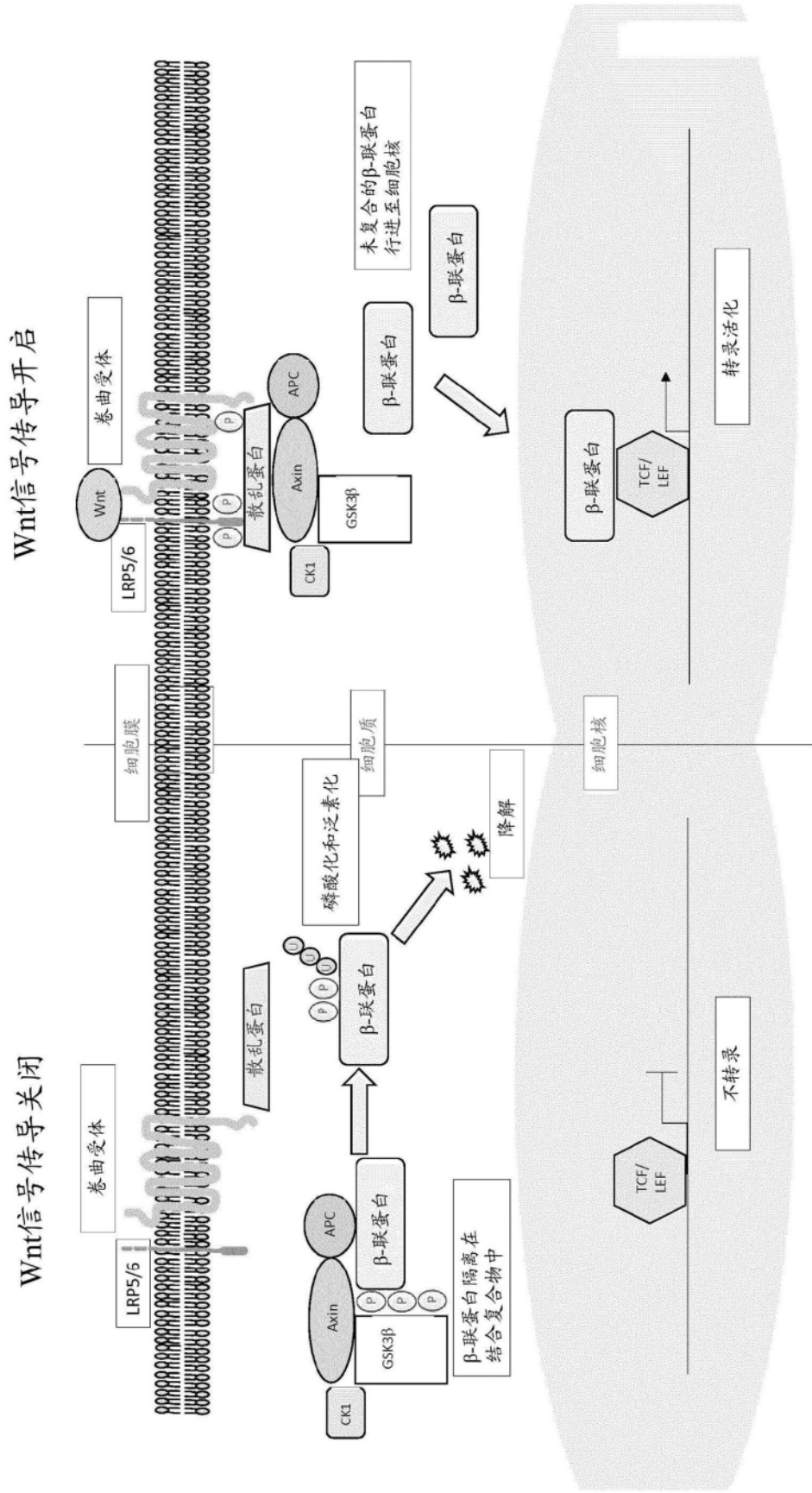


图11