



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103298490 B

(45)授权公告日 2017.04.26

(21)申请号 201180056452.6

(22)申请日 2011.11.22

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103298490 A

(43)申请公布日 2013.09.11

(30)优先权数据

61/416,927 2010.11.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.05.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/061785 2011.11.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/071381 EN 2012.05.31

(73)专利权人 莱克康制药公司

地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 小罗伯特·约瑟夫·布罗米奇

冯晓 洪锡柱 格雷戈里·兰德斯

刘杰夫 戴维·乔治·波特

戴维·里德·鲍威尔

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张国梁

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

(56)对比文件

Torisy Y等.Human homolog of NOTUM,
overexpressed in hepatocellular
carcinoma, is regulated transcriptionally
by β -catenin/TCF.《Cancer Science》.2008,第
99卷(第6期),

审查员 张艳青

权利要求书4页 说明书63页 附图15页

(54)发明名称

结合背板胶质乙酰酯酶的抗体

(57)摘要

描述了中和背板胶质乙酰酯酶的抗体,以及
包含所述抗体的组合物和使用其治疗影响骨的
疾病和病症的方法。

1. 一种结合人背板胶质乙酰酯酶 (NOTUM) 并中和NOTUM的至少一种活性的单克隆抗体, 其中所述抗体降低了体外8-辛酰氧基苾-1,3,6-三磺酸三钠 (OPTS) 测定中的NOTUM活性, 和降低了体外Wnt信号测定中的NOTUM活性, 其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

a) 所述重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:90的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:18的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:91的CDR3, 和其中所述轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:92的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:93的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:22的CDR3; 或

b) 所述重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:17的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:18的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:19的CDR3, 和所述轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:20的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:21的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:22的CDR3; 或

c) 所述重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:90的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:26的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:27的CDR3, 和所述轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:92的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:93的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:30的CDR3; 或

d) 所述重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:25的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:26的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:27的CDR3, 和所述轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:28的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:29的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:30的CDR3; 或

e) 所述重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:90的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:34的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:91的CDR3, 和所述轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:92的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:93的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:38的CDR3; 或

f) 所述重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:33的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:34的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:35的CDR3, 和所述轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:36的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:37的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:38的CDR3; 或

g) 所述重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:41的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:42的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:43的CDR3, 和所述轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:44的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:45的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:46的CDR3; 或

h) 所述重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:57的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:58的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:59的CDR3, 和所述轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:60的CDR1, 氨基酸序列为SEQ ID NO:61的CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:62的CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体与选自小鼠NOTUM、豚鼠NOTUM、食蟹猴NOTUM和恒河猴NOTUM的NOTUM结合。

3. 根据权利要求1-2任一项所述的抗体, 其中向受试者施用后所述抗体使体内血清

PINP水平升高,使体内骨矿物质密度升高,使体内股骨中段皮质厚度增大,使体内股骨中段骨面积增大,使体内肱骨中段皮质厚度增大,使体内内皮质骨形成增多,使体内LV5椎体中皮质骨体积的比例增大,和/或使体内股骨颈骨体积与股骨颈总体积的比例增大。

4. 根据权利要求1-2任一项所述的抗体,其中所述抗体与SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的多肽结合, K_D 小于50nM。

5. 根据权利要求4所述的抗体,其中所述 K_D 小于20nM。

6. 根据权利要求5所述的抗体,其中所述 K_D 小于10nM。

7. 根据权利要求1-2任一项所述的抗体,其中所述抗体具有至少一种选自以下的结合特征:

a) 与SEQ ID NO:83的氨基酸序列组成的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对SEQ ID NO:84的氨基酸序列组成的多肽的结合亲和力强至少5倍;

b) 与SEQ ID NO:85的氨基酸序列组成的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对SEQ ID NO:86的氨基酸序列组成的多肽的结合亲和力强至少5倍;

c) 与SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对SEQ ID NO:94的氨基酸序列组成的多肽的结合亲和力强至少5倍;

d) 与SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对SEQ ID NO:99的氨基酸序列组成的多肽的结合亲和力强至少5倍;

e) 与SEQ ID NO:95的氨基酸序列组成的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的多肽的结合亲和力强至少5倍;

f) 与包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的重链可变区和SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;

g) 与包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的重链可变区和SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;

h) 与包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的重链可变区和SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;

i) 与包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成的重链可变区和SEQ ID NO:32的氨基酸序列组成的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;

j) 与包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列组成的重链可变区和SEQ ID NO:40的氨基酸序列组成的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;

k) 与包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列组成的重链可变区和SEQ ID NO:48的氨基酸序列组成的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;和

l) 与包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列组成的重链可变区和SEQ ID NO:56的氨基酸序列组成的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM。

8. 根据权利要求1-2任一项所述的抗体,其中所述抗体选自小鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。

9. 根据权利要求1所述的抗体,其中:

a) 所述重链可变区由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成;或

b) 所述重链可变区由SEQ ID NO:71的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID

NO:73的氨基酸序列组成;或

c) 所述重链由SEQ ID NO:72的氨基酸序列组成并且所述轻链由SEQ ID NO:74的氨基酸序列组成;或

d) 所述重链可变区由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成;或

e) 所述重链可变区由SEQ ID NO:75的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:77的氨基酸序列组成;或

f) 所述重链由SEQ ID NO:76的氨基酸序列组成并且所述轻链由SEQ ID NO:78的氨基酸序列组成;或

g) 所述重链可变区由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:32的氨基酸序列组成;或

h) 所述重链可变区由SEQ ID NO:79的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:81的氨基酸序列组成;或

i) 所述重链由SEQ ID NO:80的氨基酸序列组成并且所述轻链由SEQ ID NO:82的氨基酸序列组成;或

j) 所述重链可变区由SEQ ID NO:39的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:40的氨基酸序列组成;或

k) 所述重链可变区由SEQ ID NO:67的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成;或

l) 所述重链由SEQ ID NO:68的氨基酸序列组成并且所述轻链由SEQ ID NO:70的氨基酸序列组成;或

m) 所述重链可变区由SEQ ID NO:55的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:56的氨基酸序列组成;或

n) 所述重链可变区由SEQ ID NO:63的氨基酸序列组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:65的氨基酸序列组成;或

o) 所述重链由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成并且所述轻链由SEQ ID NO:66的氨基酸序列组成。

10. 一种药物组合物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的抗体。

11. 一种多核苷酸序列,其编码根据权利要求1-9中任一项所述的抗体的重链和/或轻链。

12. 核酸分子,其中所述核酸分子包含编码根据权利要求1-9中任一项所述抗体的所述重链的第一多核苷酸序列和编码根据权利要求1-9中任一项所述抗体的所述轻链的第二多核苷酸序列。

13. 根据权利要求12所述的核酸分子,其中所述核酸分子为载体。

14. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求11所述的多核苷酸序列或根据权利要求12或13所述的核酸分子。

15. 根据权利要求14所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞包含编码重链的多核苷酸序列的第一核酸分子和含编码轻链的多核苷酸序列的第二核酸分子。

16. 根据权利要求14所述的宿主细胞,其中所述核酸分子包含编码所述重链的第一多

核苷酸序列和编码所述轻链的第二多核苷酸序列。

17. 一种生成根据权利要求1-9中任一项所述的抗体的方法, 包括在足以表达所述抗体的条件下培养权利要求15或权利要求16的宿主细胞。

18. 有效量的权利要求1-9任一项的抗体在制备用于刺激患者的内皮质骨形成的药物中的应用。

19. 有效量的权利要求1-9任一项的抗体在制备用于治疗、管理或预防特征在于患者体内骨质流失的疾病或病症的药物中的应用。

20. 根据权利要求19所述的应用, 其中所述疾病或病症为骨质疏松。

21. 一种单一单位剂型, 其包含权利要求10的药物组合物。

结合背板胶质乙酰酯酶的抗体

[0001] 本申请要求2010年11月24日提交的美国临时申请No.61/416,927的权益,其通过引用整体并入本文用于任何目的。

1. 技术领域

[0002] 本发明涉及背板胶质乙酰酯酶的抗体抑制剂,包含所述抗体抑制剂的组合物及其使用方法。

2. 发明背景

[0004] 骨健康取决于形成骨的成骨细胞和骨再吸收的破骨细胞的协调活性。“骨转换影响这些同化和异化细胞功能之间的平衡并确保成熟骨骼在受损时可自身修复并且通过将矿物质例如钙和磷释放至循环中维持其内分泌功能。”Allen, J.G等, *J. Med. Chem.*, 53 (2010年6月10日), 第4332-4353、4332页。许多疾病状态改变了这种平衡,导致骨量增加或减少或骨质量变化。将骨矿物质密度的逐渐流失称为骨质减少;严重的骨质流失称为骨质疏松。同上。

[0005] 目前治疗和预防骨质疏松的护理标准利用二磷酸盐类口服小分子抗骨吸收剂。同上4333页。唑来膦酸、雷洛昔芬 (raloxifene)、钙和维生素D补充剂也常用于骨质疏松治疗。同上。虽然抗骨吸收剂可帮助防止骨质流失,但是同化剂“能够更大程度地增加骨量……并且还具有提高骨质量和增加骨强度的能力。”Guo, H.等, *J. Med. Chem.*, 53 (2010年2月25日), 第1819-1829、1819页。在美国,人PTH是唯一经FDA批准的同化剂。同上;Allen, 第4333页。“由于少量同化剂可用于骨质疏松治疗,所以迫切需要研发无毒、有成本效益且易于施用的小分子化合物来治疗这种疾病。”Guo, 第1819页。

[0006] “尽管与抗骨吸收疗法相比,研发刺激骨形成的药理学试剂不很先进,但是已知促进成骨细胞功能的几个途径。”Allen, 第4338页。这些途径包括骨形态发生蛋白、转化生长因子 β 、甲状旁腺激素、胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子和无翼型MMTV整合位点(WNT)信号。同上。Guo和同事最近报道了关于这些途径中第一种的结果。Guo, 见上文。具体而言,他们报道某些经取代的苯并噻吩和苯并呋喃化合物增强小鼠和大鼠体内的骨形态发生蛋白2表达。据报道,这两种化合物刺激体内骨形成和小梁连接性恢复。同上,第1819页。

[0007] 这些途径中的另一种是牵连于多个发育和再生过程的WNT途径。Allen, 第4340页。然而,所述途径复杂并且很多关于它及其组分如何影响骨的信息仍不清楚。例如,已经证实,其突变与人体内骨质增加相关的LRP-5和通过其发生规范WNT信号的 β -连环蛋白(β -catenin),“可能不通过WNT信号与骨量控制直接相关联。”同上。

[0008] 最近对基因表达数据的分析已使得鉴定了WNT信号的新靶标。见例如Torisu, Y.等 *Cancer Sci.*, 99 (6):1139-1146 (2008)。一个这样的靶标为背板胶质乙酰酯酶,也称为NOTUM和LOC174111。

3. 发明概述

[0010] 在一些实施方案中,提供了一种结合人背板胶质乙酰酯酶(NOTUM)并中和NOTUM的至少一种活性的单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗体与选自小鼠NOTUM、豚鼠NOTUM、

食蟹猴NOTUM和恒河猴NOTUM的NOTUM结合。在一些实施方案中,所述抗体具有选自降低体外8-辛酰氧基苊-1,3,6-三磷酸三钠(OPTS)测定中的NOTUM活性,和降低体外Wnt信号测定中的NOTUM活性的至少一种活性。在一些实施方案中,所述抗体具有至少一种选自以下的活性:使体内血清PINP水平升高,使体内骨矿物质密度升高,使体内股骨中段皮质厚度增大,使体内股骨中段骨面积增大,使体内 肱骨中段皮质厚度增大,使体内内皮质骨形成增多,使体内LV5椎体中皮质骨体积的比例增大,和使体内股骨颈骨体积与股骨颈总体积的比例增大。在一些实施方案中,结合NOTUM的抗体与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽结合, K_D 小于50nM、小于20nM或小于10nM。

[0011] 在一些实施方案中,所述抗体具有至少一种选自以下的结合特征:a)与具有SEQ ID NO:83的氨基酸序列的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对具有SEQ ID NO:84的氨基酸序列的多肽的结合亲和力强至少5倍;b)与具有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对具有SEQ ID NO:86的氨基酸序列的多肽的结合亲和力强至少5倍;c)与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对具有SEQ ID NO:94的氨基酸序列的多肽的结合亲和力强至少5倍;d)与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的多肽的结合亲和力强至少5倍;e)与具有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的多肽结合,结合亲和力比所述抗体对具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽的结合亲和力强至少5倍;f)与包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;g)与包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;h)与包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;i)与包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;j)与包含具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;k)与包含具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM;和l)与包含具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的轻链可变区的抗体竞争结合NOTUM。

[0012] 在一些实施方案中,所述抗体选自小鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。

[0013] 在一些实施方案中,结合NOTUM的抗体包含重链和轻链,其中所述重链包含至少一个选自以下的CDR:a)包含选自SEQ ID NO:9、17、25、33、41、49和90的氨基酸序列的CDR1;b)包含选自SEQ ID NO:10、18、26、34、42和50的氨基酸序列的CDR2;和c)包含选自SEQ ID NO:11、19、27、35、43、51和91的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,所述重链包含含CDR1、CDR2和CDR3的集合,其中所述集合选自:a)包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3的集合;b)包含具有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的CDR3的集合;c)包含具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3的集合;d)包含具有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3的集合;e)包含具有SEQ ID NO:25的氨基酸

序列的CDR1、具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3的集合；f) 包含具有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的CDR3的集合；g) 包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3的集合；h) 包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDR3的集合；i) 包含具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR3的集合；和j) 包含具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDR3的集合。在一些实施方案中，所述重链包含选自SEQ ID NO:7、15、23、31、39、47、63、67、71、75和79的氨基酸序列的重链可变区。

[0014] 在一些实施方案中，结合NOTUM的抗体包含重链和轻链，其中所述轻链包含至少一个选自以下的CDR：a) 包含选自SEQ ID NO:12、20、28、36、44、52和92的氨基酸序列的CDR1；b) 包含选自SEQ ID NO:13、21、29、37、45、53、61和93的氨基酸序列的CDR2；和c) 包含选自SEQ ID NO:14、22、30、38、46、54和62的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中，所述轻链包含含CDR1、CDR2和CDR3的集合，其中所述集合选自：a) 包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3的集合；b) 包含具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3的集合；c) 包含具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3的集合；d) 包含具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR3的集合；e) 包含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR3的集合；f) 包含具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3的集合；g) 包含具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3的集合；h) 包含具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDR3的集合；i) 包含具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR3的集合；和j) 包含具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDR3的集合。在一些实施方案中，所述轻链包含选自SEQ ID NO:8、16、24、32、40、48、56、65、69、73、77和81的氨基酸序列的轻链可变区。

[0015] 在一些实施方案中，结合NOTUM的抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：a) 所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1，具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3，并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR1，具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3；或b) 所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR1，具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的CDR3，

并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3;或c)所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3,并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3;或d)所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3,并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR3;或e)所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3,并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR3;或f)所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的CDR3,并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3;或g)所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3,并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3;或h)所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDR3,并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDR3;或i)所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR3,并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR3;或j)所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDR3,并且其中所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDR3。

[0016] 在一些实施方案中,结合NOTUM的抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中:a)所述重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;或b)所述重链可变区包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;或c)所述重链可变区包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;或d)所述重链可变区包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;或e)所述重链可变区包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;或f)所述重链可变区包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列;或g)所述重链可变区包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列;或h)所述重链可变区包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列并

且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;或i)所述重链可变区包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列;或j)所述重链可变区包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列;或k)所述重链可变区包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;或l)所述重链可变区包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;或m)所述重链可变区包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列;或n)所述重链可变区包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列;或o)所述重链可变区包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;或p)所述重链可变区包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;或q)所述重链可变区包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,提供了一种核酸分子,其包含编码结合NOTUM并中和NOTUM的至少一种活性的抗体的重链或轻链的多核苷酸序列。在一些实施方案中,所述核酸分子包含编码所述重链的第一多核苷酸序列和编码所述轻链的第二多核苷酸序列。在一些实施方案中,所述核酸分子为载体。在一些实施方案中,提供了一种包含核酸分子的宿主细胞,所述核酸分子包含编码结合NOTUM并中和NOTUM的至少一种活性的抗体的重链或轻链的多核苷酸序列。在一些实施方案中,提供了一种包含核酸分子的宿主细胞,所述核酸分子包含编码重链的第一多核苷酸序列和编码轻链的第二多核苷酸序列。在一些实施方案中,宿主细胞包含含编码重链的多核苷酸序列的第一核酸分子和含编码轻链的多核苷酸序列的第二核酸分子。在一些实施方案中,提供了生成结合NOTUM并中和NOTUM的至少一种活性的抗体的方法,包括在足以表达所述抗体的条件下培养宿主细胞。

[0018] 在一些实施方案中,提供了一种包含结合NOTUM并中和NOTUM的至少一种活性的抗体的药物组合物。在一些实施方案中,提供了一种刺激患者体内内皮质骨形成的方法,包括施用有效量的所述药物组合物。在一些实施方案中,提供了一种治疗、管理或预防特征在于患者体内骨质流失的疾病或病症的方法,包括施用有效量的所述药物组合物。在一些实施方案中,所述疾病或病症为骨质疏松。在一些实施方案中,提供了一种包含所述药物组合物的单一单位剂型。

[0019] 4.附图简述

[0020] 图1提供了NOTUM纯合子敲除小鼠(“HOM”)及其野生型同窝小鼠(“WT”)体内不同骨部位的皮质厚度之间差异的图示。

[0021] 图2提供了在NOTUM纯合子和杂合子(“HET”)敲除小鼠体内观察到的皮质骨厚度与其野生型同窝小鼠相比增加的图示。

[0022] 图3提供了由对雄性NOTUM纯合子和杂合子敲除小鼠及其野生型同窝小鼠进行的股骨断裂强度和脊柱压缩试验获得的结果的图示。

[0023] 图4提供了由对雌性NOTUM纯合子和杂合子敲除小鼠及其野生型同窝小鼠进行的股骨断裂强度和脊柱压缩试验获得的结果的图示。

[0024] 图5提供了某些人/小鼠嵌合蛋白的图示,并指出了Bin1中似乎牵涉于结合NOTUM中和抗体的区域,如实施例6.7所述。

[0025] 图6提供了如实施例6.9.1所述,MAb2.1029或MAb2.78施用8周后在小鼠体内获得的股骨中段皮质厚度测量的图示。

[0026] 图7提供了如实施例6.9.2所述,不同剂量的MAb2.1029施用4周后在小鼠体内获得的股骨中段皮质厚度测量的图示。

[0027] 图8提供了如实施例6.9.3所述,不同剂量的MAb2.78b施用4周后在小鼠体内获得的股骨中段皮质厚度测量的图示。图8A示出了3mg/kg、10mg/kg和30mg/kg剂量的MAb2.78b。图8B示出了0.3mg/kg、1mg/kg和3mg/kg剂量的MAb2.78b。

[0028] 图9提供了如实施例6.9.4所述,用和未用唑来膦酸盐预处理,MAb2.78b施用4周后在小鼠体内获得的股骨中段皮质厚度测量(A)和血清PINP水平(B)的图示。

[0029] 图10提供了如实施例6.9.5所述,MAb2.78a施用4周后在小鼠体内获得的股骨中段皮质厚度测量的图示。

[0030] 图11提供了如实施例6.9.6所述,MAb2.78a施用12周后在小鼠体内获得的股骨中段皮质厚度测量(A)和肱骨中段皮质厚度测量(B)的图示。

[0031] 图12提供了如实施例6.9.6所述,MAb2.78a施用24周后在小鼠体内获得的股骨中段皮质厚度测量(A)、肱骨中段皮质厚度测量(B)和第九肋皮质厚度(C)的图示。

[0032] 图13提供了如实施例6.10.3所述,施用了NOTUM中和抗体2.78b或对照抗体的假手术和去卵巢小鼠体内股骨中段皮质厚度(A)和股骨中段矿化骨面积(B)的图示。

[0033] 图14提供了如实施例6.10.3所述,施用了NOTUM中和抗体2.78b或对照抗体的假手术和去卵巢小鼠体内LV5椎体中骨体积与总体积的比例(A)、LV5椎体中皮质骨体积与总体积的比例(B)和LV5椎体中小梁骨体积与总体积的比例(C)。

[0034] 图15提供了如实施例6.10.3所述,施用了NOTUM中和抗体2.78b或对照抗体的假手术和去卵巢小鼠体内股骨颈骨体积与总体积的比例的图示。

[0035] 图16提供了如实施例6.10.4所述,施用了NOTUM中和抗体2.78b或对照抗体的假手术和去卵巢小鼠体内标记了钙黄绿素(calcein)、茜素(alizarin)和四环素(tetracycline)的股骨中段横截面的内皮质表面百分比的图示。

[0036] 图17提供了如实施例6.10.4所述,施用了NOTUM中和抗体2.78b或对照抗体的假手术和去卵巢小鼠体内矿化沉积速率(A)和体积所指的骨形成率(B)。

[0037] 5.发明详述

[0038] 本发明部分基于发现抑制NOTUM可影响内皮质骨形成。本发明的特殊方面基于对缺乏功能NOTUM基因的小鼠(“敲除小鼠”)的研究,抑制NOTUM的抗体的研发和此类抗体可用于刺激小鼠和大鼠体内的皮质骨形成的发现。

[0039] 本文使用的章节标题仅仅是为了组织目的而不得解释为限制所述主题。本申请引用的所有文件或文件的一部分,包括专利、专利申请、论文、书籍和论述据此明确通过引用整体并入用于任何目的。如果一个或多个并入的文献和类似材料定义的术语同本申请中术语的定义矛盾,以本申请为准。

[0040] 5.1.定义

[0041] 如本文所使用,术语“抗体”指完整抗体或与完整抗体竞争抗原结合的抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、双链抗体和保持完整抗体可变区的至少一部分的其它抗体片段。见,例如,Hudson等(2003) Nat. Med. 9:129-134。在一些实施

方案中,通过酶或化学切割完整抗体生成抗体片段。在一些实施方案中,通过重组DNA技术生成抗体片段。

[0042] 术语“抗原结合位点”指抗体能够特异性结合抗原的部分。在一些实施方案中,由一个或多个抗体可变区提供抗原结合位点。

[0043] 术语“结合亲和力”指对抗体与抗原结合的强度的定性或定量测定。在一些实施方案中,结合亲和力是抗体对抗原的解离常数(K_D)。在一些实施方案中,定性测定抗体对抗原的结合亲和力,例如相对于不同抗体对抗原的结合亲和力,或相对于相同抗体对不同抗原(例如其氨基酸序列中有一处或多处变化的抗原)的结合亲和力。例如,当抗体对第一抗原的 K_D 小于抗体对第二抗原的 K_D 时,认为抗体对第一抗原的结合亲和力比它对第二抗原的亲和力“更强”。在一些实施方案中,当抗体对第一抗原的 K_D 比抗体对第二抗原的 K_D 小至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少5倍或至少10倍时,认为抗体对第一抗原的结合亲和力“更强”。相反,例如当抗体对第一抗原的 K_D 大于抗体对第二抗原的 K_D 时,认为抗体对第一抗原的结合亲和力比它对第二抗原的亲和力“更弱”。在一些实施方案中,当抗体对第一抗原的 K_D 比抗体对第二抗原的 K_D 大至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少5倍或至少10倍时,认为抗体对第一抗原的结合亲和力“更弱”。

[0044] “嵌合”抗体指由来自至少两个不同来源的组分构成的抗体。在一些实施方案中,嵌合抗体包含源自第一物种,与另一分子(例如源自第二物种的抗体部分)融合的抗体部分。在一些此类实施方案中,嵌合抗体包含源自非人类动物,与源自人类的抗体部分融合的抗体部分。在一些此类实施方案中,嵌合抗体包含源自非人类动物,与源自人类的抗体的恒定区融合的抗体的整个或一部分可变区。

[0045] 术语“表位”指能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合的任何多肽决定簇。在一些实施方案中,表位是抗体特异性结合的抗原区域。在一些实施方案中,表位可包括化学活性表面类的分子,例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基。在一些实施方案中,表位可具有特定三维结构特征(例如,“构象”表位)和/或特定电荷特征。

[0046] 如果特殊抗体与两个表位特异性结合,则将一个表位定义为与另一表位“相同”。在一些实施方案中,具有不同一级氨基酸序列的多肽可包含相同的表位。据称如果不同抗体竞争与该表位特异性结合,则它们与相同表位结合。

[0047] 参考多肽的“片段”指来自参考多肽的任一部分的相邻段氨基酸。片段可具有小于参考多肽长度的任何长度。在一些实施方案中,片段为来自具有特殊活性或含有特殊表位的参考多肽的任一部分的相邻段氨基酸。

[0048] 术语“人抗体”指含有人抗体序列而不含来自非人类动物的抗体序列的单克隆抗体。在一些实施方案中,人抗体可含有在天然抗体中不存在的合成序列。术语不受制备抗体的方式限制。例如,在各个实施方案中,在转基因小鼠体内,通过噬菌体展示、人B-淋巴细胞或重组法制备人抗体。

[0049] “人源化”抗体指已经修饰,以致其更加严密地匹配(氨基酸序列)人抗体的非人抗体。因此人源化抗体是一类嵌合抗体。在一些实施方案中,修饰了非人抗体可变区的抗原结合残基外面的氨基酸残基。在一些实施方案中,通过用来自具有所需抗原结合特异性的另一抗体(例如非人抗体)的一个或多个CDR的全部或部分置换人抗体的一个或多个互补决定区(CDR)的全部或部分构建人源化抗体。在一些实施方案中,人源化抗体包含其中全部

或大体上全部CDR与非人抗体的CDR相对应并且全部或大体上全部骨架区(FR)与人抗体的FR相对应的可变区。在一些实施方案中,在人源化抗体中,例如通过亲和力成熟过程改变了非人抗体的一个或多个CDR内的一个或多个氨基酸。在本领域中已知亲和力成熟的示例性方法。在一些此类实施方案中,人源化抗体进一步包含人抗体的恒定区(Fc)。

[0050] 除非另外说明,术语“包括(include)”具有与“包括但不限于”相同的含义,术语“包括(includes)”具有与“包括但不限于”相同的含义,并且术语“包括(including)”具有与“包括但不限于”相同的含义。类似地,术语“例如”具有与“例如但不限于”相同的含义。

[0051] 除非另外说明,术语“管理(manage)”、“管理(managing)”和“管理(management)”涵盖防止已经患有疾病或病症的患者指定疾病或病症复发,和/或延长已经患有疾病或病症的患者保持缓解的时间。所述术语涵盖调节所述疾病或病症的阈值、发展和/或持续时间,或改变患者对疾病或病症响应的方式。

[0052] 术语“单克隆抗体”指来自与相同表位特异性结合的大体同种抗体种群的抗体。在一些实施方案中,杂交瘤分泌单克隆抗体。在一些此类实施方案中,根据本领域技术人员已知的相同方法生成杂交瘤。见,例如,Kohler和Milstein (1975) *Nature* 256:495-499。在一些实施方案中,使用重组DNA方法生成单克隆抗体(见,例如,美国专利No.4,816,567)。在一些实施方案中,单克隆抗体指从噬菌体展示库分离的抗体片段。见,例如,Clackson等(1991) *Nature* 352:624-628,和Marks等(1991) *J.Mol.Biol.* 222:581-597。各种其它单克隆抗体生成技术,见,(例如,Harlow和Lane (1988) *Antibodies:A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0053] 术语“中和抗体”或“中和的抗体”指降低包含抗体特异性结合的表位的多肽的至少一种活性的抗体。在一些实施方案中,中和抗体降低了体外和/或体内多肽的活性。

[0054] 除非另外说明,否则术语“NOTUM”指具有来自任何脊椎动物或哺乳动物来源,包括人、牛、鸡、啮齿动物、小鼠、大鼠、猪、绵羊、灵长类动物、猴子和豚鼠的氨基酸序列的背板胶质乙酰酯酶。术语还指维持了天然NOTUM的至少一种体内或体外活性的天然NOTUM的片段和变体。术语涵盖未加工的全长前体形式的NOTUM以及由翻译后切割信号肽和其它形式的蛋白酶加工产生的成熟形式。在一些实施方案中,未加工的全长人NOTUM具有SEQ ID NO:1中示出的氨基酸序列。在一些实施方案中,未加工的全长小鼠NOTUM具有SEQ ID NO:2中示出的氨基酸序列。

[0055] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可交换用于指氨基酸残基的聚合物。术语适用于含自然存在的氨基酸的氨基酸聚合物以及其中一个或多个氨基酸残基为相应自然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物。氨基酸聚合物可具有任何长度。术语“天然多肽”指自然存在的多肽。

[0056] 除非另外说明,术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”考虑了在患者开始患指定疾病或病症之前产生的抑制或降低所述疾病或病症的严重程度的作用。换言之,术语涵盖预防。

[0057] 除非另外说明,化合物的“预防有效量”是足以预防疾病或病状,或与所述疾病或病状相关的一种或多种症状,或防止其复发的量。化合物的“预防有效量”指单独或其它试剂组合的治疗剂,在疾病预防中提供预防利益的量。术语“预防有效量”可涵盖改善整体预防或增强另一种预防剂的预防功效的量。

[0058] 当优先识别蛋白质和/或大分子的复合混合物中的抗原时,抗体“特异性结合”抗原。在一些实施方案中,抗体包含与特殊表位特异性结合的抗原结合位点。在一些此类实施方案中,抗体能够结合不同抗原,只要不同抗原包含所述特殊表位。在一些情况下,例如,来自不同物种的同源蛋白质可包含相同表位。在一些实施方案中,当解离常数(K_d) $\leq 1\mu\text{M}$ 时,在一些实施方案中,当解离常数 $\leq 100\text{nM}$ 时,和在一些实施方案中,当解离常数 $\leq 10\text{nM}$ 时,称抗体特异性结合抗原。

[0059] 术语“受试者”和“患者”包括人和动物。在一些实施方案中,受试者或患者为哺乳动物。在一些此类实施方案中,受试者或患者为人。

[0060] 除非另外说明,否则化合物的“治疗有效量”是足以在疾病或病状的治疗或管理中提供治疗利益,或延迟或将与所述疾病或病状相关的一种或多种症状减到最低程度的量。化合物的“治疗有效量”指单独或与其它疗法组合的治疗剂,在所述疾病或病状的治疗或管理中提供了治疗利益的量。术语“治疗有效量”可涵盖改善整体疗法,减少或避免疾病或病状的症状或病因,或增强另一种治疗剂的治疗功效的量。

[0061] 除非另外说明,否则术语“治疗(treat)”、治疗(treating)”和治疗(treatment)”考虑了在患者患指定疾病或病症同时产生的降低所述疾病或病症的严重程度,或阻碍或减缓所述疾病或病症的进展的作用。

[0062] 5.2. 抗体

[0063] 5.2.1. 示例性抗体结构

[0064] 天然抗体通常具有四聚体结构。四聚物通常包含两对相同的多肽链,每一对具有一条轻链(在一些实施方案中,约25kDa)和一条重链(在一些实施方案中,约50-70kDa)。在天然抗体中,重链包含1个可变区VH和3个恒定区CH1、CH2和CH3。VH结构域在重链的氨基末端,而CH3结构域在羧基末端。在天然抗体中,轻链包含1个可变区VL和1个恒定区CL。轻链的可变区在轻链的氨基末端。在天然抗体中,每个轻/重链对的可变区通常形成抗原结合位点。恒定区通常负责效应子功能。

[0065] 通常将天然人轻链分类为 κ 和 λ 轻链。通常将天然人重链分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG具有亚类,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgM具有亚类,包括IgM1和IgM2。IgA具有亚类,包括IgA1和IgA2。在天然人轻链和重链中,可变区和恒定区通常通过约12个或更多个氨基酸的“J”区域连接,重链还包括约10个或更多个氨基酸的“D”区域。见,例如,Fundamental Immunology (1989) Ch.7 (Paul, W. 编辑,第2版Raven Press, N.Y.)。

[0066] 在天然抗体中,可变区通常展现出相同通用结构,其中相对保守的骨架区(FR)通过3个也称为互补决定区(CDR)的高变区连接。来自每一对的两条链的CDR通常与骨架区对齐,其可能使得能够与特定表位结合。从N端到C端,轻链和重链可变区通常包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链上的CDR称为H1、H2和H3,而轻链上的CDR称为L1、L2和L3。通常,CDR3是抗原结合位点内分子多样性的最大来源。例如,在某些情况下,H3可短至2个氨基酸残基或大于26个。通常根据Kabat等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Publication No. 91-3242, 第1-3卷, Bethesda, MD); Chothia, C. 和 Lesk, A. M. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; 或 Chothia, C. 等 Nature 342: 878-883 (1989) 的定义为每个结构域分配氨基酸。在本申请中,除

非另外说明,否则术语“CDR”指来自轻链或重链的CDR。

[0067] “Fab”片段包含一条轻链和一条重链的CH1和可变区。Fab分子的重链不可与另一个重链分子形成二硫键。“Fab’”片段包含一条轻链和包含在CH1和CH2结构域之间延伸的另外恒定区的重链。可在Fab’片段的2条重链之间形成链间二硫键以形成“F(ab’)₂”分子。

[0068] “Fv”片段包含来自重链和轻链的可变区,但是缺乏恒定区。单链Fv(scFv)片段包含通过挠性连接子连接形成具有抗原结合区的多肽单链的重链和轻链可变区。在W088/01649和美国专利No.4,946,778和5,260,203中详细讨论了示例性单链抗体。在某些情况下,单一可变区(即,重链可变区或轻链可变区)可具有识别并结合抗原的能力。

[0069] 如本文所使用,术语“重链”指包含单独或与轻链组合的足够重链可变区序列以赋予抗原特异性的多肽。

[0070] 如本文所使用,术语“轻链”指包含单独或与重链组合的足够轻链可变区序列以赋予抗原特异性的多肽。

[0071] 5.2.2. 示例性抗体

[0072] 在一些实施方案中,提供了与NOTUM特异性结合的单克隆抗体。在一些此类实施方案中,单克隆抗体为降低体内和/或体外NOTUM的至少一种活性的中和抗体。

[0073] 在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体降低了体外8-辛酰氧基苊-1,3,6-三磺酸钠(OPTS)测定中的NOTUM活性。在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体降低了体外Wnt信号测定中的NOTUM活性。

[0074] 在一些实施方案中,当向受试者施用足够量和足够持续时间,抗NOTUM的中和抗体使体内血清PINP水平升高。本文讨论了施用足够量足够持续时间的示例性剂量和给药方案。在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体使骨矿物质密度升高。在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体使体内股骨中段皮质厚度增大。在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体使体内股骨中段骨面积增大。在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体使体内肱骨中段皮质厚度增大。在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体使体内内皮质骨形成增多。在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体使体内LV5椎体中皮质骨体积的比例增大。用“LV5椎体中皮质骨体积的比例”指LV5椎体的皮质骨体积与总体积的比例。在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体使体内股骨颈骨体积与股骨颈总体积的比例增大。

[0075] 在一些实施方案中,提供了与小鼠NOTUM特异性结合的中和抗体。在一些实施方案中,提供了与人NOTUM特异性结合的中和抗体。在一些实施方案中,提供了与人NOTUM的Q47到M177的区域结合的中和抗体。在一些实施方案中,提供了依赖于人NOTUM的Q47到M177的区域进行结合的中和抗体。在一些实施方案中,提供了与来自不同物种的NOTUM的相同区域特异性结合的中和抗体(即,证明交叉反应性的抗体)。在一些实施方案中,提供了与人NOTUM和来自至少一个选自以下的物种的NOTUM结合的中和抗体:小鼠、大鼠、豚鼠、食蟹猴、狨猴和恒河猴。在一些此类实施方案中,所述抗体与非人灵长类动物NOTUM和人NOTUM特异性结合。在一些实施方案中,所述抗体与小鼠NOTUM和人NOTUM特异性结合。

[0076] 在一些实施方案中,提供了与人NOTUM的Q47到M177的区域结合的中和抗体。在一些实施方案中,提供了依赖于人NOTUM的Q47到M177的区域进行结合的中和抗体。在一些实施方案中,提供了与人-小鼠嵌合NOTUM(SEQ ID NO:83)结合的NOTUM中和抗体,亲和力比小鼠-人嵌合NOTUM(SEQ ID NO:84)的亲和力强至少5倍、至少10倍或至少20倍。在一些实施

方案中,提供了与人-小鼠-人嵌合NOTUM (SEQ ID NO:85) 结合的NOTUM中和抗体,亲和力比小鼠-人-小鼠嵌合NOTUM (SEQ ID NO:86) 的亲和力强至少5倍、至少10倍或至少20倍。在一些实施方案中,提供了与人NOTUM (SEQ ID NO:1) 结合的NOTUM中和抗体,亲和力比NOTUM D141S (SEQ ID NO:94) 的亲和力强至少5倍、至少10倍或至少20倍。在一些实施方案中,提供了与小鼠NOTUM (SEQ ID NO:95) 结合的NOTUM中和抗体,亲和力比小鼠NOTUM (SEQ ID NO: 2) 的亲和力强至少5倍、至少10倍或至少20倍。在一些实施方案中,提供了与人NOTUM (SEQ ID NO:1) 结合的NOTUM中和抗体,亲和力比人NOTUM R144A/R145A (SEQ ID NO:99) 的亲和力强至少5倍、至少10倍或至少20倍。

[0077] 在一些实施方案中,抗NOTUM的中和抗体与人NOTUM (SEQ ID NO:1) 结合,如实施例6.8中所述测定,亲和力(K_D) 小于100nM、小于50nM、小于40nM、小于30nM、小于25nM、小于20nM、小于15nM、小于10nM、小于5nM、小于3nM或小于2nM。在一些实施方案中,如实施例6.4.1中所述测定,抗NOTUM的中和抗体在OPTS测定中的 IC_{50} 小于100nM、小于75nM、小于50nM、小于40nM、小于30nM、小于25nM、小于20nM、小于15nM或小于10nM。在一些实施方案中,如实施例6.4.2中所述测定,抗NOTUM的中和抗体在Wnt信号测定中的 IC_{50} 小于100nM、小于75nM、小于50nM、小于40nM、小于30nM、小于25nM、小于20nM、小于15nM或小于10nM。在一些实施方案中,所述 IC_{50} 是对于人NOTUM而言。在一些实施方案中,所述 IC_{50} 是对于小鼠NOTUM而言。

[0078] 在一些实施方案中,中和抗体为非人单克隆抗体。在一些此类实施方案中,中和抗体为啮齿动物单克隆抗体。在一些此类实施方案中,中和抗体为小鼠单克隆抗体。在一些实施方案中,中和抗体为嵌合单克隆抗体。在一些实施方案中,中和抗体为人源化单克隆抗体。在一些实施方案中,中和抗体为人单克隆抗体。在一些实施方案中,嵌合、人源化和/或人单克隆抗体在人类中用作治疗性抗体。

[0079] 在一些实施方案中,中和抗体为抗体片段。示例性抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fv、scFv、Fd、双链抗体等。

[0080] 非限制示例性NOTUM中和抗体包括MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78。MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的每一种中和NOTUM的至少一种活性。进一步地,至少MAb1.802、1.815、1.846和2.78依赖于人NOTUM的界限为氨基酸Q47-M177的区域的至少一部分与NOTUM结合。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体与选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的至少一种抗体竞争结合NOTUM。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体结合与选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的至少一种抗体结合的表位至少部分重叠的NOTUM表位。另外,在一些实施方案中,预计与选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的至少一种抗体竞争结合NOTUM的抗体为NOTUM中和抗体。以下第7节中示出了MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的CDR和可变区的序列。

[0081] 在一些实施方案中,提供了与MAb1.731结合的相同表位结合的NOTUM中和抗体。在一些实施方案中,提供了与MAb1.802结合的相同表位结合的NOTUM中和抗体。在一些实施方案中,提供了与MAb1.815结合的相同表位结合的NOTUM中和抗体。在一些实施方案中,提供了与MAb1.846结合的相同表位结合的NOTUM中和抗体。在一些实施方案中,提供了与MAb2.1029结合的相同表位结合的NOTUM中和抗体。在一些实施方案中,提供了与MAb2.55结

合的相同表位结合的NOTUM中和抗体。在一些实施方案中,提供了与MAb2.78结合的相同表位结合的NOTUM中和抗体。

[0082] 在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含选自SEQ ID NO:7、15、23、31、39和47的重链可变区。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含选自SEQ ID NO:8、16、24、32、40和48的轻链可变区。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的轻链可变区。

[0083] 在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含选自SEQ ID NO:9、17、25、33、41、49和90的重链CDR1。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含选自SEQ ID NO:10、18、26、34、42和50的重链CDR2。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含选自SEQ ID NO:11、19、27、35、43、51和91的重链CDR3。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有选自SEQ ID NO:17和90的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2和具有选自SEQ ID NO:19和91的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有选自SEQ ID NO:25和90的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有选自SEQ ID NO:33和90的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2和具有选自SEQ ID NO:35和91的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDR3的重链。在一些实施方案中,SEQ ID NO:90中的X₁选自Y和F。在一些实施方案中,SEQ ID NO:91中的X₂选自H和N。

[0084] 在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含选自SEQ ID NO:12、20、28、36、44、52、60和92的轻链CDR1。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含选自SEQ ID NO:13、21、29、37、45、53、61和93的轻链CDR2。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含选自SEQ ID NO:14、22、30、38、46、54和62的轻链CDR3。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有选自SEQ ID NO:20和92的氨基酸序列的CDR1,具有选自SEQ ID NO:21和93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有选自SEQ ID NO:28和92的氨基酸序列的CDR1,具有选自SEQ ID NO:29和93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有选自SEQ ID NO:36和92的氨基酸序列的CDR1,具有选自SEQ ID NO:37和93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,SEQ ID NO:92中的X₃选自I和S;SEQ ID NO:92中的X₄选自T和E;并且SEQ ID NO:92中的X₅选自M和I。在一些实施方案中,SEQ ID NO:93中的X₆选自D和N。

[0085] 在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3的重链;和含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有选自SEQ ID NO:17和90的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2和具有选自SEQ ID NO:19和91的氨基酸序列的CDR3的重链;和含具有选自SEQ ID NO:20和92的氨基酸序列的CDR1,具有选自SEQ ID NO:21和93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3的重链;和含具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有选自SEQ ID NO:25和90的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3的重链;和含

具有选自SEQ ID NO:28和92的氨基酸序列的CDR1,具有选自SEQ ID NO:29和93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3的重链;和含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有选自SEQ ID NO:33和90的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2和具有选自SEQ ID NO:35和91的氨基酸序列的CDR3的重链;和含具有选自SEQ ID NO:36和92的氨基酸序列的CDR1,具有选自SEQ ID NO:37和93的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3的重链;和含具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDR3的重链;和含具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR3的重链;和含具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDR3的重链;和含具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的CDR1,具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的CDR3的轻链。在一些实施方案中,SEQ ID NO:90中的X₁选自Y和F。在一些实施方案中,SEQ ID NO:91中的X₂选自H和N。在一些实施方案中,SEQ ID NO:92中的X₃选自I和S;SEQ ID NO:92中的X₄选自T和E;并且SEQ ID NO:92中的X₅选自M和I。在一些实施方案中,SEQ ID NO:93中的X₆选自D和N。

[0086] 在一些实施方案中,提供了特异性结合人NOTUM的NOTUM中和抗体。在一些实施方案中,提供了特异性结合来自不同物种的NOTUM中的相同表位的NOTUM中和抗体(即,证明交叉反应性的抗体)。在一些实施方案中,提供了特异性结合人NOTUM并且还特异性结合选自小鼠、大鼠、豚鼠、食蟹猴、狨猴和恒河猴的至少一种NOTUM的NOTUM中和抗体。在一些实施方案中,提供了特异性结合人NOTUM和来自至少一种非人灵长类动物的NOTUM的NOTUM中和抗体。在一些实施方案中,提供了特异性结合人NOTUM和小鼠NOTUM的NOTUM中和抗体。

[0087] 5.2.2.1.嵌合和人源化单克隆抗体

[0088] 在一些实施方案中,嵌合化非人抗体。在一些实施方案中,嵌合化特异性结合人NOTUM的小鼠单克隆抗体。例如,在Morrison等(1984) *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA*81:6851-6855;Neuberger等(1984) *Nature*312:604-608;Takeda等(1985) *Nature*314:452-454;和美国专利No.6,075,181和5,877,397中提供了制备嵌合抗体的某些示例性方法。

[0089] 在一些实施方案中,“人源化”非人抗体。在一些实施方案中,人源化特异性结合人NOTUM的小鼠单克隆抗体。在一些实施方案中,人源化对小鼠NOTUM产生的,但与人NOTUM特

异性结合(即,交叉反应)的小鼠单克隆抗体。在一些实施方案中,当施用给人时,人源化抗体保持其结合特异性并且免疫原性降低(例如,人抗小鼠抗体(HAMA)应答降低)。在一些实施方案中,通过如以下详细描述,包括CDR移植和人体工程学的方法完成人源化。

[0090] 在人源化抗体的一些实施方案中,将来自具有所需结合特异性的抗体(即,“供体”抗体)的轻链和重链可变区的一个或多个互补决定区(CDR)移植到“受体”抗体中的人骨架区(FR)上。例如,在美国专利No.6,180,370、5,693,762、5,693,761、5,585,089和5,530,101;Queen等(1989) *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033中描述了示例性CDR移植。在一些实施方案中,将来自轻链和重链可变区的一个或多个CDR移植到受体抗体中的共有人FR上。为产生共有人FR,在一些实施方案中,比对来自若干人重链或轻链氨基酸序列的FR以鉴定共有氨基酸序列。

[0091] 在一些实施方案中,用来自供体抗体的FR氨基酸置换受体抗体中的某些FR氨基酸。在某些实施方案中,来自供体抗体的FR氨基酸是有助于供体抗体对靶抗原的亲合力的氨基酸。见,例如,在美国专利No.6,180,370、5,693,762、5,693,761、5,585,089和5,530,101;Queen等(1989) *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033中。在一些实施方案中,使用计算机程序模拟供体和/或受体抗体以鉴定有可能牵涉结合抗原和/或有助于抗原结合位点的结构的残基,从而帮助选择供体抗体中待置换的残基,例如FR残基。

[0092] 在一些实施方案中,将来自供体抗体的CDR移植到包含人恒定区的受体抗体上。在一些此类实施方案中,还将FR移植到受体上。在一些实施方案中,来自供体抗体的CDR源自单链Fv抗体。在一些实施方案中,来自供体抗体的FR源自单链Fv抗体。在一些实施方案中,进一步修饰(例如,通过氨基酸取代、缺失或插入)人源化抗体中移植的CDR以增强人源化抗体对靶抗原的亲合力。在一些实施方案中,进一步修饰(例如,通过氨基酸取代、缺失或插入)人源化抗体中移植的FR以增强人源化抗体对靶抗原的亲合力。

[0093] 在一些实施方案中,可使用“人体工程学”方法人源化非人抗体。见,例如,美国专利No.5,766,886和5,869,619。在人体工程学的一些实施方案中,关于抗体可变结构域结构的信息(例如,由晶体结构和/或分子模型获得的信息)用于评估可变区中指定氨基酸残基(a)牵涉抗原结合,(b)暴露于抗体表面(即,易接近溶剂),或(c)埋在抗体可变区中(即,牵涉维持可变区的结构)的可能性。此外,在一些实施方案中,生成人可变区共有序列以鉴定人可变区中的保守残基。在一些实施方案中,所述信息提供了关于是否应取代非人抗体可变区中的氨基酸残基的指导。

[0094] 在一些实施方案中,人源化NOTUM中和抗体包含含选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的抗体的CDR1、CDR2和CDR3中至少一个的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的抗体的CDR1、CDR2和CDR3的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的抗体的CDR1、CDR2和CDR3中至少一个的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的抗体的CDR1、CDR2和CDR3的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含来自选自MAb 1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55和2.78的抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3和轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0095] 在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含选自SEQ ID NO:63、67、71、75和79的氨

氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含选自SEQ ID NO:64、68、72、76和80的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含选自SEQ ID NO:65、69、73、77和81的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含选自SEQ ID NO:66、70、74、78和82的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,NOTUM中和抗体包含含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链和含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的轻链。

[0096] 5.2.2.2. 抗体同种型

[0097] 在一些实施方案中,抗NOTUM的抗体具有选自IgM、IgD、IgG、IgA和IgE的任何同种型。在一些实施方案中,抗NOTUM的抗体具有IgG同种型。在某些此类实施方案中,抗体具有亚类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方案中,抗NOTUM的抗体具有IgM同种型。在某些此类实施方案中,抗体具有亚类IgM1或IgM2。在一些实施方案中,抗NOTUM的抗体具有IgA同种型。在某些此类实施方案中,抗体具有亚类IgA1或IgA2。抗NOTUM的抗体可包含(例如)人或小鼠来源的 λ 或 κ 轻链恒定区。在一些实施方案中,抗NOTUM的抗体包含人 κ 轻链恒定区和人IgG1、IgG2或IgG4重链恒定区。在一些实施方案中,抗NOTUM的抗体包含小鼠 κ 轻链和小鼠IgG1或IgG2重链。

[0098] 5.2.2.3. 经修饰抗体

[0099] 在一些实施方案中,修饰抗体以改变其一种或多种性质。在一些实施方案中,经修饰抗体可能比未修饰抗体具有优势,例如稳定性增强、循环时间增加,或免疫原性降低(见,例如,美国专利No.4,179,337)。在一些实施方案中,通过使其与非蛋白质部分连接修饰抗体。在一些实施方案中,通过改变抗体的糖基化状态,例如通过改变抗体上碳水化合物链的数量、类型、连接和/或位置修饰抗体。在一些实施方案中,改变抗体以致其未糖基化。

[0100] 在一些实施方案中,使一个或多个化学部分与抗体的氨基酸骨架和/或碳水化合物残基。本领域的技术人员已知使化学部分与抗体连接的某些示例性方法。此类方法包括但不限于酰化反应或烷基化反应。见,例如,EP0401384;Malik等(1992),*Exp. Hematol.*, 20: 1028-1035;Francis(1992)*Focus on Growth Factors* 3(2):4-10,由Mediscript, Mountain Court, Friern Barnet Lane, London N200LD, UK出版;EP0154316;EP0401384;W092/16221;W095/34326;W095/13312;W096/11953;W096/19459和W096/19459。在一些实施方案中,任何这些反应用于生成在其氨基末端经化学修饰的抗体。

[0101] 在一些实施方案中,使抗体与可检测标记连接,例如酶、荧光、同位素或亲和标记。在某些实施方案中,可检测标记允许检测或分离抗体。在一些实施方案中,可检测标记允许检测抗体结合的抗原。

[0102] 在一些实施方案中,通过使其与一种或多种聚合物连接修饰抗体。在一些实施方案中,使抗体与一种或多种水溶性聚合物连接。在某些此类实施方案中,与水溶性聚合物的连接降低了抗体在水环境,例如生理环境中沉淀的可能性。在一些实施方案中,使治疗性抗体与水溶性聚合物连接。在一些实施方案中,本领域的技术人员可基于包括在患者的治疗中是否会使用聚合物/抗体缀合物的考虑并且,如果是这样,基于抗体的药理学性质(例如,半衰期、剂量、活性、抗原性和/或其它因素)选择适合的水溶性聚合物。

[0103] 某些示例性临床上可接受的水溶性聚合物包括但不限于聚乙二醇(PEG);聚乙二醇丙醛;乙二醇/丙二醇共聚物;单甲氧基-聚乙二醇;羧甲基纤维素;葡聚糖;聚乙烯醇(PVA);聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环;聚-1,3,6-三噁烷;乙烯/马来酸酐共聚物;聚- β -氨基酸(均聚物或无规共聚物);聚(n-乙基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物(PPG)和其它聚环氧烷烃;聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物;聚氧乙基化多元醇(POG)(例如,丙三醇)和其它聚氧乙基化多元醇;聚氧乙基化山梨糖醇、聚氧乙基化葡萄糖、结缔酸或其它碳水化合物聚合物;和聚蔗糖(Ficoll)、葡聚糖或其混合物。某些示例性PEG包括但不限于本领域已知在抗体修饰中有用的某些形式,例如单-(C₁-C₁₀)烷氧基-或芳氧基-PEG。在一些实施方案中,PEG丙醛由于其在水中稳定,在生产上可能有优势。

[0104] 在一些实施方案中,水溶性聚合物具有任何分子量。在一些实施方案中,水溶性聚合物是分支或不分支的。在一些实施方案中,水溶性聚合物的平均分子量为约2kDa至约100kDa,包括所述范围端点之间的所有值。在一些实施方案中,水溶性聚合物的平均分子量为约5kDa至约40kDa。在一些实施方案中,水溶性聚合物的平均分子量为约10kDa至约35kDa。在一些实施方案中,水溶性聚合物的平均分子量为约15kDa至约30kDa。

[0105] 在一些实施方案中,使抗体与聚乙二醇连接(PEG;即,“聚乙二醇化”抗体)。在各个实施方案中,PEG在哺乳动物体内的毒性低。见Carpenter等(1971) *Toxicol.Appl.Pharmacol.*,18:35-40。尤其,在美国批准将腺苷脱氨酶的PEG加成物用于人类治疗严重的联合免疫缺陷综合征。在各个实施方案中,PEG可降低抗体的免疫原性。例如,在一些实施方案中,PEG与具有非人序列的抗体的连接可降低施用给人时所述抗体的抗原性。

[0106] 在一些实施方案中,使聚合物与抗体中一个或多个活性氨基酸残基连接。某些示例性活性氨基酸残基包括但不限于氨基端氨基酸的 α -氨基、赖氨酸侧链的 ϵ -氨基、半胱氨酸侧链的巯基、天冬氨酰和谷氨酰基侧链的羧基、羧基端氨基酸的 α -羧基、酪氨酸侧链和与某些天冬酰胺、丝氨酸和苏氨酸残基连接的活化糖基链。本领域的技术人员已知适合与蛋白质直接反应的PEG的某些示例性活化形式(“PEG试剂”)。例如,在一些实施方案中,适合与氨基连接的PEG试剂包括但不限于PEG的活性羧酸酯或碳酸盐衍生物,例如,其中离去基团为N-羟基琥珀酰亚胺、对硝基苯酚、咪唑或1-羟基-2-硝基苯-4-磺酸酯的PEG活性羧酸酯或碳酸盐衍生物。在一些实施方案中,含马来酰亚胺基或卤代乙酰基的PEG试剂用于修饰巯基。在一些实施方案中,含氨基、胍和/或酰胍基团的PEG试剂可用于和通过高碘酸盐氧化蛋白质中的碳水化合物基团生成的醛反应。

[0107] 在一些实施方案中,水溶性聚合物具有至少一个活性基团。在一些实施方案中,通过使水溶性聚合物与活化基团反应生成水溶性聚合物(例如PEG)的活化衍生物。在一些实施方案中,活化基团可为单官能、双官能或多官能。可用于使水溶性聚合物与一种或多种抗体连接的某些示例性活化基团包括但不限于以下基团:砒(例如,氯砒、乙烯砒和二乙烯砒)、马来酰亚胺、巯基、硫醇、三氟甲磺酸、三氟乙磺酸、氮丙啶、环氧乙烷和5-吡啶基。在一些实施方案中,PEG衍生物通常在pH约11或更低的水环境中对水解稳定时间更长。在一些实施方案中,与另一分子(例如抗体)连接的PEG衍生物赋予所述分子水解稳定性。某些示例性同型双功能PEG衍生物包括但不限于PEG-二-氯砒和PEG-二-乙烯砒(见W095/13312)。

[0108] 5.2.3.制备单克隆抗体的某些方法

[0109] 5.2.3.1.某些杂交瘤方法

[0110] 在一些实施方案中,通过标准技术生成单克隆抗体。在一些实施方案中,通过基于杂交瘤的方法生成单克隆抗体。本领域的技术人员已知某些此类方法。见,例如,Kohler等(1975) Nature256:495-497;Harlow和Lane (1988) Antibodies:A Laboratory Manual第6章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。在某些此类实施方案中,用免疫原使适合动物,例如小鼠、大鼠、仓鼠、猴子或其它哺乳动物免疫以产生抗体分泌细胞。在一些实施方案中,抗体分泌细胞为B细胞,例如淋巴细胞或脾细胞。在一些实施方案中,在体外使淋巴细胞(例如,人淋巴细胞)免疫以产生抗体分泌细胞。见,例如,Borreback等(1988) Proc.Nat'l Acad.Sci.USA85:3995-3999。

[0111] 在一些实施方案中,使抗体分泌细胞与“永生化”细胞系,例如髓型细胞系融合,以产生杂交瘤细胞。在一些实施方案中,例如通过ELISA鉴定了生成所需抗体的杂交瘤细胞。在一些实施方案中,然后可使用标准方法亚克隆并培养此类细胞。在一些实施方案中,也可使此类细胞在适合动物宿主体内作为腹水瘤生长。在一些实施方案中,使用标准分离法,例如亲和色谱法,从杂交瘤培养基、血清或腹水分离出单克隆抗体。例如,在Harlow和Lane (1988) Antibodies:A Laboratory Manual第8章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)中提供了根据某些实施方案生成杂交瘤并纯化单克隆抗体的指导。

[0112] 在一些实施方案中,通过用免疫原使基因改变的小鼠免疫生成小鼠单克隆抗体。在某些此类实施方案中,所述小鼠为部分或完全缺乏NOTUM功能的NOTUM缺陷型小鼠。在某些此类实施方案中,所述小鼠为缺乏整个或部分编码NOTUM的基因的“敲除”小鼠。在一些实施方案中,用小鼠NOTUM使此类敲除小鼠免疫。在一些实施方案中,用人NOTUM使此类敲除小鼠免疫。

[0113] 在一些实施方案中,在能够生成抗体的转基因动物(例如,小鼠)体内产生人单克隆抗体。见,例如,美国专利No.6,075,181A和6,114,598A;和W098/24893A2。例如,在一些实施方案中,将免疫球蛋白基因引入(例如,使用酵母人工染色体、人类染色体片段或种系整合)其中内源Ig基因已经灭活的小鼠体内。见,例如,Jakobovits等(1993) Nature362:255-258;Tomizuka等(2000) Proc.Nat'l Acad.Sci.USA97:722-727;和Mendez等(1997) Nat.Genet.15:146-156(描述了转基因小鼠的XenoMouse II[®]系)。

[0114] 在一些实施方案中,用免疫原使此类转基因小鼠免疫。在某些此类实施方案中,从表达抗体的小鼠获得淋巴细胞(例如B细胞)。在某些此类实施方案中,使此类回收细胞与“永生化”细胞系,例如髓型细胞系融合,以生成杂交瘤细胞。在某些此类实施方案中,筛选

并选择杂交瘤细胞以鉴定生成对目标抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞。例如,在Jakobovits等(1993)Nature362:255-258;Jakobovits(1995)Curr.Opin.Biotechnol.6:561-566;Lonberg等(1995)Int'l Rev.Immunol.13:65-93;Fishwild等(1996)Nat.Biotechnol.14:845-851;Mendez等(1997)Nat.Genet.15:146-156;Green(1999)J.Immunol.Methods231:11-23;Tomizuka等(2000)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA97:722-727中描述了适合生成单克隆抗体的某些示例性方法和转基因小鼠;并且在Little等(2000)Immunol.Today21:364-370;和W098/24893中有评论。在一些实施方案中,抗NOTUM的人单克隆抗体适合用作治疗性抗体。见以下的V.G.部分。

[0115] 5.2.3.2.某些基于展示的方法

[0116] 在一些实施方案中,使用基于展示的方法,例如以下描述的任一种方法,生成单克隆抗体。

[0117] 在一些实施方案中,使用噬菌体展示技术生成单克隆抗体。本领域技术人员已知各种抗体噬菌体展示方法并且(例如)在Hoogenboom,Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications,来自Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display:Methods and Protocols(2002) 178:1-37(O'Brien和Aitken编辑,Human Press,Totowa,NJ)中有描述。例如,在一些实施方案中,使抗体库在丝状噬菌体,例如非切割丝状噬菌体fd或M13的表面展示。在一些实施方案中,所述抗体为具有工程化分子间二硫键以稳定VH-VL对的抗体片段(例如scFv、Fab、Fv)和双链抗体。在一些实施方案中,然后可选择具有所需结合特异性的抗体。以下更详细地描述了抗体噬菌体展示方法的非限制示例性实施方案。

[0118] 在一些实施方案中,可使用本领域技术人员已知的某些方法制备抗体噬菌体展示库。见例如Hoogenboom,Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications,来自Methods in Molecular Biology:Antibody Phage Display:Methods and Protocols(2002) 178:1-37(O'Brien和Aitken编辑,Human Press,Totowa,NJ)。在一些实施方案中,通过PCR扩增源自抗体分泌细胞mRNA的基因组DNA或cDNA制备可变基因谱系。例如,在一些实施方案中,由B细胞的mRNA制备cDNA。在一些实施方案中,例如通过PCR扩增编码重链和轻链可变区的cDNA。

[0119] 在一些实施方案中,将重链cDNA和轻链cDNA克隆至适合载体中。在一些实施方案中,在克隆过程中随机组合重链cDNA和轻链cDNA,从而导致编码不同scFv或Fab的cDNA库组装。在一些实施方案中,在克隆至适合载体之前连接重链cDNA和轻链cDNA。在一些实施方案中,通过分步克隆至适合载体中连接重链cDNA和轻链cDNA。

[0120] 在一些实施方案中,将cDNA克隆至噬菌体展示载体,例如噬菌粒载体中。本领域的技术人员已知某些示例性噬菌粒载体,例如pCES1。在一些实施方案中,在相同载体上存在编码重链和轻链的cDNA。例如,在一些实施方案中,在具有编码小噬菌体外壳蛋白pIII的整个基因III或一部分的框架中克隆编码scFv的cDNA。在某些此类实施方案中,噬菌粒指导scFv-pIII融合蛋白在噬菌体表面表达。可选地,在一些实施方案中,在具有整个基因III或一部分的框架中克隆编码重链(或轻链)的cDNA,并且在相同载体中信号序列的下游克隆编码轻链(或重链)的cDNA。信号序列指导轻链(或重链)表达进入宿主细胞的外周胞质,其中重链和轻链组装成Fab片段。可选地,在一些实施方案中,编码重链的cDNA和编码轻链的

cDNA存在于单独载体上。在某些此类实施方案中,单独克隆重链和轻链cDNA,一个克隆至噬菌粒中而另一个克隆至噬菌体载体中,两者均含在宿主细胞中体内重组的信号。

[0121] 在一些实施方案中,将重组噬菌粒或噬菌体载体引入适合细菌宿主,例如大肠杆菌(*E.coli.*)中。在使用噬菌粒的一些实施方案中,用辅助噬菌体感染宿主以供给噬菌体结构蛋白,从而使携带抗体-pIII融合蛋白的噬菌体颗粒在噬菌体表面上表达。

[0122] 在一些实施方案中,使用体外重排的可变基因谱系构建“合成”抗体库。例如,在一些实施方案中,使用PCR随机组合编码重链或轻链的单独基因片段(分别为V-D-J或V-J)。在一些实施方案中,例如通过易错PCR可向CDR和(可能)FR中引入另外的序列多样性。在某些此类实施方案中,可向CDR3,例如重链的H3中引入另外的序列多样性。

[0123] 在一些实施方案中,如上所述使用来自未免疫动物的核酸构建“天然”或“通用”噬菌体展示库。在某些此类实施方案中,未免疫动物为人。在某些实施方案中,如上所述使用来自免疫动物的核酸构建“免疫”噬菌体展示库。在某些实施方案中,免疫动物为人、大鼠、小鼠、仓鼠或猴子。在某些此类实施方案中,用以下所述任何免疫原使动物免疫。

[0124] 某些示例性通用抗体噬菌体展示库可从商业来源获得。某些示例性库包括但不限于来自MorphoSys AG (Martinstreid/Munich, Germany)的HuCAL[®]系列库;来自Crucell (Leiden, the Netherlands)使用MAbstract[®]技术的库;来自BioInvent (Lund, Sweden)的n-CoDeR[™] Fab库;和可从Cambridge Antibody Technology (Cambridge, UK)获得的库。

[0125] 在一些实施方案中,通过连续淘选步骤实现从噬菌体展示库选择具有所需结合特异性的抗体。在淘选的一些实施方案中,向抗原暴露库噬菌体制剂。在某些此类实施方案中,洗涤噬菌体-抗原复合物,并丢弃未结合的噬菌体。在某些此类实施方案中,回收结合的噬菌体并随后通过感染大肠杆菌扩增。在某些此类实施方案中,可通过挑选单个斑块克隆生成单克隆抗体的噬菌体。在某些实施方案中,重复以上过程。

[0126] 在一些实施方案中,用于淘选的抗原是以下所述任何免疫原。在某些实施方案中,将抗原固定在固体载体上以允许通过亲和色谱法纯化结合抗原的噬菌体。在某些实施方案中,生物素化所述抗原,从而允许使用涂有链霉亲和素的磁珠将结合噬菌体与未结合噬菌体分开。在某些实施方案中,可将抗原固定在细胞上(以直接淘选)、组织冷冻切片中或膜(例如,尼龙或硝酸纤维素膜)上。本领域的技术人员可常规性决定某些淘选方法的其它变化。

[0127] 在一些实施方案中,使用酵母展示系统生成单克隆抗体。在某些此类系统中,使抗体表达为与整个或部分酵母AGA2蛋白的融合蛋白,所述融合蛋白变得在酵母细胞壁的表面展示。在某些此类实施方案中,然后可通过使细胞暴露于荧光标记抗原鉴定表达具有所需结合特异性的抗体的酵母细胞。在某些此类实施方案中,然后可通过流式细胞术分离结合抗原的酵母细胞。见,例如,Boder等(1997) *Nat. Biotechnol.* 15:553-557。

[0128] 5.2.3.3.某些亲和力成熟方法

[0129] 在一些实施方案中,通过使抗体进行体外亲和力成熟(或“定向进化”)增强抗体对特殊抗原的亲和力。在体内,天然抗体通过体细胞高频突变、随后选择进行亲和力成熟。一些体外方法模拟体内过程,从而允许生成亲和力等于或超过天然抗体亲和力的抗体。

[0130] 在亲和力成熟的一些实施方案中,向编码具有所需结合特异性的抗体的可变区的核酸序列引入突变。见,例如,Hudson等(2003) *Nat. Med.* 9:129-134;Brekke等(2002)

Nat.Reviews2:52-62。在一些实施方案中,向重链、轻链或二者的可变区中引入突变。在一些实施方案中,向一个或多个CDR引入突变。在某些此类实施方案中,向H3、L3或二者中引入突变。在一些实施方案中,向一个或多个FR引入突变。在一些实施方案中,例如在噬菌体、核糖体或酵母展示库中创建突变库,以致可通过标准筛选方法鉴定亲和力增强的抗体。见,例如,Boder等(2000)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA97:10701-10705;Foote等(2000)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA97:10679-10681;Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications,来自Methods in Molecular Biology:Antibody Phage Display:Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien和Aitken编辑,Human Press,Totowa,NJ);和Hanes等(1998)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA95:14130-14135。

[0131] 在一些实施方案中,通过基于关于抗体结构,例如抗原结合位点的信息的定点诱变引入突变。在一些实施方案中,使用CDR的组合诱变引入突变。在一些实施方案中,例如使用大肠杆菌突变细胞、同源基因重排或易错PCR随机诱变整个或部分可变区编码序列。在一些实施方案中,使用“DNA改组”引入突变。见,例如,Cramer等(1996)Nat.Med.2:100-102;Fermer等(2004)Tumor Biol.25:7-13。

[0132] 在一些实施方案中,使用“链改组”生成亲和力增强的抗体。在链改组的一些实施方案中,用轻链谱系置换其中一条链,例如轻链,而不改变另一条链,例如重链,从而提供特异性。在某些此类实施方案中,创建链改组抗体库,其中未改变重链与来自所述轻链谱系的每条轻链联合表达。在一些实施方案中,然后可筛选此类库中亲和力增强的抗体。在一些实施方案中,依次置换重链和轻链。在一些实施方案中,仅置换重链和/或轻链的可变区。在一些实施方案中,仅置换重链和/或轻链的可变区的一部分,例如CDR。见,例如,Hudson等(2003)Nat.Med.9:129-134;Brekke等(2002)Nat.Reviews2:52-62;Kang等(1991)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA88:11120-11123;Marks等(1992)Biotechnol.10:779-83。

[0133] 在一些实施方案中,使特异性结合人NOTUM的小鼠单克隆抗体(包括对小鼠NOTUM产生的,但是与人NOTUM特异性结合(即交叉反应)的小鼠单克隆抗体)进行依次链改组。在一些实施方案中,例如,使指定小鼠单克隆抗体的重链与新的人轻链谱系组合,并选择具有所需亲和力的抗体。在某些此类实施方案中,然后使所选抗体的轻链与新的人重链谱系组合,并选择具有所需亲和力的抗体。因此,在一些实施方案中,选择具有所需抗原结合特异性和亲和力的人抗体。

[0134] 可选地,在一些实施方案中,使指定小鼠单克隆抗体的重链与新的人轻链谱系组合,并从这第一轮改组中选择具有所需亲和力的抗体。在一些实施方案中,使原小鼠单克隆抗体的轻链与新的人重链谱系组合,并从这第二轮改组中选择具有所需亲和力的抗体。在一些实施方案中,然后使来自第一轮改组中所选抗体的人轻链与来自第二轮改组中所选抗体的人重链组合。因此,在一些实施方案中,选择具有所需抗原结合特异性和亲和力的人抗体。

[0135] 在一些实施方案中,使用“核糖体展示”方法使抗体选择与亲和力成熟交替。在核糖体展示方法的一些实施方案中,通过在选择步骤之间进行RT-PCR扩增抗体编码核酸。因此,在一些实施方案中,可使用易错聚合酶向核酸中引入突变。在Hanes等(1998)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA95:14130-14135中详细描述了此类方法的非限制实例。

[0136] 5.2.3.4.某些重组方法

[0137] 在一些实施方案中,通过重组技术生成单克隆抗体。见,例如,美国专利No.4,816,567。在某些此类实施方案中,在适合宿主细胞中克隆并表达编码单克隆抗体链的核酸。例如,在一些实施方案中,可使用标准方法由表达所需抗体的细胞,例如成熟B细胞或杂交瘤细胞制备RNA。在一些实施方案中,然后可使用标准方法用RNA制备cDNA。在一些实施方案中,例如使用特异性寡核苷酸引物通过PCR扩增编码重链或轻链多肽的cDNA。在一些实施方案中,将cDNA克隆至适合表达载体中。在一些实施方案中,然后将表达载体转化或转染至适合宿主细胞,例如未内源性生成抗体的宿主细胞中。某些示例性宿主细胞包括但不限于大肠杆菌、COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和骨髓瘤细胞。在其中重链和轻链在相同宿主中共同表达的一些实施方案中,可分离重构抗体。

[0138] 在一些实施方案中,可修饰编码重链或轻链的cDNA。例如,在一些实施方案中,可用人重链或轻链的恒定区置换小鼠重链或轻链的恒定区。用这种方式,在一些实施方案中,可生成具有人抗体恒定区,但是保持小鼠抗体的结合特异性的嵌合抗体。

[0139] 在一些实施方案中,核酸分子包含编码NOTUM中和抗体的重链或轻链的多核苷酸序列。在一些实施方案中,单个核酸分子包含编码NOTUM中和抗体的重链的第一多核苷酸序列和编码NOTUM中和抗体的轻链的第二多核苷酸序列。在一些实施方案中,例如,当抗体为单链Fv(scFv)时,重链的编码序列和轻链的编码序列是连续编码序列的一部分,以致表达包含所述抗体的重链和轻链的单个多肽。在一些实施方案中,编码重链和轻链的单个核酸分子能够表达两条呈单独多肽的链。在一些此类实施方案中,每条链均受单独启动子的控制。本领域的技术人员可根据预期用途选择NOTUM中和抗体的重链和轻链的适合构型和适合控制元件。

[0140] 在一些实施方案中,所述核酸为载体,例如适合在特殊宿主细胞中表达重链和/或轻链的表达载体。本领域的技术人员可根据待用于表达的宿主细胞选择一种或多种适合表达载体。本领域已知此类示例性载体。

[0141] 在一些实施方案中,核酸分子包含编码选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、2.78和此类MAb的人源化形式的NOTUM中和抗体的重链的多核苷酸序列。在一些此类实施方案中,核酸分子包含选自SEQ ID NO:101、103、105、107、109、111、112、115、116、119、120、123、124、127和128的多核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸分子包含编码选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、2.78和此类MAb的人源化形式的NOTUM中和抗体的轻链的多核苷酸序列。在一些此类实施方案中,核酸分子包含选自SEQ ID NO:102、104、106、108、110、113、114、117、118、121、122、125、126、129和130的多核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸分子包含编码选自MAb1.731、1.802、1.815、1.846、2.1029、2.55、2.78和此类MAb的人源化形式的NOTUM中和抗体的重链的第一多核苷酸序列和编码其轻链的第二多核苷酸序列。

[0142] 在一些实施方案中,可在某些细胞系中表达重组抗体。在一些实施方案中,编码特殊抗体的序列可用于转化适合哺乳动物宿主细胞。根据某些实施方案,可通过将多核苷酸引入宿主细胞的任何已知方法进行转化。某些示例性方法包括但不限于将多核苷酸包装在病毒(或病毒载体)中,并且用病毒(或载体)转导宿主细胞和使用本领域已知的某些转染方法,如美国专利No.4,399,216、4,912,040、4,740,461和4,959,455例证。在一些实施方案中,所用转化方法可取决于待转化的宿主。将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的某些示例

性方法在本领域中已知并且包括但不限于葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、凝聚胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多肽封装在脂质体中和将DNA直接显微注射至细胞核中。

[0143] 可用作表达宿主的某些示例性哺乳动物细胞系在本领域中已知并且包括但不限于许多可从美国模式培养物保藏所 (ATCC) 获得的永生化细胞系, 包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、海拉 (HeLa) 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、猴肾细胞 (COS)、人肝细胞癌细胞 (例如, Hep G2) 和许多其它细胞系。在一些实施方案中, 可通过确定哪些细胞系生成高水平的特异性结合NOTUM的抗体选择细胞系。

[0144] 5.3. 治疗方法

[0145] 本发明涵盖一种刺激患者的内皮质骨形成的方法, 所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明抗体。本发明还涵盖一种使皮质骨厚度增加的方法, 所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明抗体。

[0146] 本发明涵盖一种治疗、管理或预防与骨质流失相关的疾病或病症的方法, 所述方法包括向有需要的患者施用治疗或预防有效量的本发明抗体。疾病和病症的实例包括骨质疏松 (例如, 绝经后骨质疏松、类固醇或糖皮质激素诱导的骨质疏松、男性骨质疏松和特发性骨质疏松)、骨质减少和佩吉特病 (Paget's disease)。

[0147] 本发明还涵盖了一种治疗、管理或预防骨折的方法, 所述方法包括向有需要的患者施用治疗或预防有效量的本发明抗体。特定骨折与转移性骨病相关, 即已转移至骨的癌症。可转移至骨的癌症的实例包括前列腺癌、乳腺癌、肺癌、甲状腺癌和肾癌。

[0148] 本发明还涵盖了一种治疗、管理或预防与疾病或病症相关或由疾病或病症引起的骨质流失, 所述方法包括向有需要的患者施用治疗或预防有效量的本发明抗体。疾病和病症的实例包括乳糜泻、克罗恩病 (Crohn's Disease)、库兴综合征 (Cushing's syndrome)、甲状旁腺机能亢进、炎症性肠病和溃疡性结肠炎。

[0149] 可受益于本发明方法的非限制示例性患者包括55岁或以上的男女、绝经后的妇女和患有肾功能不全的患者。

[0150] 本发明的抗体与已知对治疗、管理或预防影响骨的疾病或病症有用的其它药物联合施用 (例如, 同时或在不同时间)。实例包括: 雄激素受体调节剂; 二膦酸盐; 降钙素; 钙感受体拮抗剂; RANKL抗体、组织蛋白酶K抑制剂; 雌激素和雌激素受体调节剂; 整联蛋白粘合剂、抗体和受体拮抗剂; 甲状旁腺激素 (PTH) 及其类似物和模拟物; 和维生素D和合成维生素D类似物。

[0151] 雄激素受体调节剂的实例包括非那雄胺 (finasteride) 和其它5 α -还原酶抑制剂、尼鲁米特 (nilutamide)、氟他胺 (flutamide)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、利阿唑 (liarozole) 和醋酸阿比特龙 (abiraterone acetate)。

[0152] 二膦酸盐的实例包括阿仑膦酸盐 (alendronate)、英卡膦酸盐 (cimadronate)、氯膦酸盐 (clodronate)、依替膦酸盐 (etidronate)、伊班膦酸盐 (ibandronate)、伊卡膦酸盐 (incadronate)、米诺膦酸盐 (minodronate)、奈立膦酸盐 (neridronate)、奥帕膦酸盐 (olpadronate)、帕米膦酸盐 (pamidronate)、吡膦酸盐 (piridronate)、利塞膦酸盐 (risedronate)、替鲁膦酸盐 (tiludronate) 和唑来膦酸盐 (zoledronate) 及其药学上可接受的盐和酯。

[0153] 组织蛋白酶K抑制剂的实例包括VEL-0230、AAE581 (巴利卡替 (balicatib))、

MV061194、SB-462795 (瑞拉卡替 (relacatib))、MK-0822 (奥 达卡替 (odanacatib)) 和 MK-1256。

[0154] 雌激素和雌激素受体调节剂的实例包括自然存在的雌激素 (例如, 7-雌二醇、雌酮和雌三醇)、结合雌激素 (例如, 结合马雌激素)、口服避孕药、磺化雌激素、孕激素、雌二醇、屈洛昔芬 (droloxifene)、雷洛昔芬、拉索昔芬 (lasofoxifene)、TSE-424、他莫昔芬 (tamoxifen)、艾多昔芬 (idoxifene)、LY353381、LY117081、托瑞米芬 (toremifene)、氟维司群 (fulvestrant)、4-[7-(2,2-二甲基-1-氧代丙氧基-4-甲基-2-[4-[2-(1-哌啶基) 乙氧基] 苯基]-2H-1-苯并吡喃-3-基]-苯基-2,2-二甲基丙酸酯、4,4'-二羟基二苯甲酮-2,4-二硝基苯-胺和 SH646。

[0155] 整联蛋白粘合剂、抗体和受体拮抗剂的实例包括整合素拮抗剂 (vitaxin) (MEDI-522)、西仑吉肽 (cilengitide) 和 L-000845704。

[0156] 5.4. 药物制剂

[0157] 本发明涵盖包含本发明的一种或多种抗体和任选一种或多种其它药物, 例如上述药物的药物组合物。

[0158] 在一些实施方案中, NOTUM 中和抗体可用作治疗性抗体。待用作治疗性抗体的示例性 NOTUM 中和抗体包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。本领域的技术人员熟悉抗体作为治疗剂的用途。

[0159] 在一些实施方案中, 提供了包含有效量的 NOTUM 抗体和药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂的药物组合物。在一些实施方案中, 提供了包含有效量的 NOTUM 抗体和有效量的至少一种另外的治疗剂, 连同药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂的药物组合物。在一些实施方案中, 至少一种另外的治疗剂选自上述治疗剂。

[0160] 在一些实施方案中, 在所用剂量和浓度下, 药物组合物的配制材料对受体无毒。

[0161] 在一些实施方案中, 药物组合物包含改变、维持或保持 (例如) 所述组合物的 pH、渗透压、粘度、清澈度、颜色、等渗性、气味、无菌度、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透率。在一些实施方案中, 适合配制材料包括但不限于氨基酸 (例如, 甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸和赖氨酸); 抗菌剂; 抗氧化剂 (例如, 抗坏血酸、亚硫酸钠和亚硫酸氢钠); 缓冲液 (例如, 硼酸盐、重碳酸盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐和其它有机酸); 填充剂 (例如, 甘露糖醇和甘氨酸); 螯合剂 (例如, 乙二胺四乙酸 (EDTA)); 络合剂 (例如, 咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精和羟丙基- β -环糊精); 填料; 单糖、二糖和其它碳水化合物 (例如, 葡萄糖、甘露糖和糊精); 蛋白质 (例如, 血清白蛋白、明胶和免疫球蛋白); 着色剂、调味剂和稀释剂; 乳化剂; 亲水聚合物 (例如, 聚乙烯吡咯烷酮); 低分子量多肽; 成盐反离子 (例如, 钠); 防腐剂 (例如, 苯扎氯胺、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、洗必泰、山梨酸和过氧化氢); 溶剂 (例如, 甘油、丙二醇和聚乙二醇); 糖醇 (例如, 甘露糖醇和山梨糖醇); 助悬剂; 表面活性剂或润湿剂 (例如, pluronics、PEG、山梨醇酐酯、聚山梨醇酯 (例如, 聚山梨醇酯 20 和聚山梨醇酯 80)、三硝基甲苯、氨基丁三醇、卵磷脂、胆固醇和泰洛沙泊 (tyloxapal)); 稳定性增强剂 (例如, 蔗糖和山梨糖醇); 张力增强剂 (例如, 碱金属卤化物 (例如, 氯化钠或氯化钾)、甘露糖醇和山梨糖醇); 递送媒介物; 稀释剂; 赋形剂和药物佐剂。 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, A.R.Gennaro编辑, Mack Publishing

Company (1990)。

[0162] 在一些实施方案中,NOTUM抗体或其它治疗分子与半衰期延长媒介物连接。非限制性示例性半衰期延长媒介物包括本领域已知的半衰期延长媒介物。此类媒介物包括但不限于Fc结构域、聚乙二醇和葡聚糖。例如,在公开的PCT申请No.W099/25044中描述了此类示例性媒介物。

[0163] 在一些实施方案中,将由本领域的技术人员根据(例如)预期施用途、递送形式和所需剂量决定最佳药物组合物。见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,同上。在一些实施方案中,此类组合物可影响中和抗体的物理状态、稳定性、体内释放速率或体内清除速率。

[0164] 在一些实施方案中,药物组合物中的主要媒介物或载体实际上含水或无水。例如,在一些实施方案中,适合媒介物或载体可为注射用水、生理盐水或人工脑脊液,很可能补充了在供肠胃外施用的组合物中常见的其它物质。示例性媒介物包括但不限于中性缓冲盐水和混合了血清白蛋白的盐水。在一些实施方案中,药物组合物包含约pH7.0-8.5的Tris缓冲液或约pH4.0-5.5的醋酸盐缓冲液,其可进一步包括山梨糖醇或其适合代用品。在一些实施方案中,可通过使选择的具有所需纯度的组合物与任选配制试剂混合(Remington's Pharmaceutical Sciences,同上)制备成冻干饼状或水溶液形式的包含NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)的组合物用于储存。在一些实施方案中,可使用适当赋形剂,例如蔗糖将包含NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)的组合物配制成冻干产物。

[0165] 在一些实施方案中,选择药物组合物供肠胃外递送。在一些实施方案中,选择药物组合物供吸入或通过消化道递送,例如口服。制备药学上可接受的组合物的各种技术在本领域技术人员的技术范围内。

[0166] 在一些实施方案中,配制组分以施用部位可接受的浓度存在。在一些实施方案中,使用缓冲液将组合物维持在生理pH或稍微更低的pH下,通常在约5至约8的pH范围内。

[0167] 在一些实施方案中,当考虑肠胃外施用,药物组合物在药学上可接受的媒介物中可呈无热原、肠胃外可接受的水溶液形式,其包含所需NOTUM抗体(有或无另外的治疗剂)。在一些实施方案中,供肠胃外注射的媒介物为无菌蒸馏水,在其中将NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)配制成无菌等渗溶液,妥善保存。在一些实施方案中,制备可牵涉与可提供产物(然后可通过贮库型注射递送)的控释或缓释的试剂,例如注射用微球、生物易蚀颗粒、聚合化合物(例如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠或脂质体一起配制所需分子。在一些实施方案中,也可使用透明质酸,并且可具有促进在循环中持续的作用。在一些实施方案中,可使用可植入药物递送装置引入所需分子。

[0168] 在一些实施方案中,可配制药物组合物用于吸入。在一些实施方案中,可将NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)配制呈供吸入的干粉。在一些实施方案中,可与推进剂一起配制包含NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)的吸入溶液用于气溶胶递送。在一些实施方案中,可雾化溶液。

[0169] 在一些实施方案中,可口服施用制剂。在一些实施方案中,以这种方式施用的NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)与或不与在固体剂型,例如片剂和胶囊的配混中通常使用的载体一起配制。在一些实施方案中,可将胶囊设计为在胃肠道中当生物利用率最大化而系统前降解最小化时释放制剂的活性部分。在一些实施方案中,可包括至少一

种另外的试剂以促进吸收NOTUM抗体(有或无任何另外的治疗剂)。在一些实施方案中,也可采用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、助悬剂、片剂崩解剂和/或粘合剂。

[0170] 在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的与适合生产片剂的无毒赋形剂混合的NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)。在一些实施方案中,通过将片剂溶于无菌水或另一种适当媒介物中,制备呈单位剂型的溶液。示例性赋形剂包括但不限于惰性稀释剂(例如,碳酸钙、碳酸钠、碳酸氢钠、乳糖和磷酸钙);粘合剂(例如,淀粉、明胶和阿拉伯胶);和润滑剂(例如,硬脂酸镁、硬脂酸和滑石)。

[0171] 对于本领域的技术人员,另外的药物组合物将显而易见,包括在持续或控制递送制剂中包含NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)。示例性持续或控制递送制剂包括但不限于脂质体载体、生物易蚀微粒、多孔珠和贮库型注射剂。本领域的技术人员已知制备制剂的各种技术。在一些实施方案中,缓释制剂可包括呈成形物品形式的半渗透聚合物基质,例如膜或微胶囊。示例性缓释基质包括但不限于聚酯、水凝胶、聚交酯(见,例如,美国专利No.3,773,919和EP058,481)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ 乙酯(见,例如,Sidman等(1983) *Biopolymers* 22:547-556)、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(见,例如,Langer等(1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277和Langer(1982) *Chem. Tech.* 12:98-105)、乙烯醋酸乙烯酯(Langer等,同上)和聚-D(-)-3-羟丁酸(EP133,988)。在一些实施方案中,缓释组合物可包括脂质体,在一些实施方案中可通过本领域中已知的几种方法的任一种制备脂质体。见,例如,Eppstein等(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692; EP036,676; EP088,046; 和EP143,949。

[0172] 在一些实施方案中,待用于体内施用的药物组合物通常是无菌的。在一些实施方案中,这可通过无菌滤膜过滤实现。在使组合物冻干的一些实施方案中,可在冻干和重构之前或之后使用这种方法进行灭菌。在一些实施方案中,供肠胃外施用的组合物可呈冻干形式或溶液储存。在一些实施方案中,通常将肠胃外组合物置于具有无菌入口孔的容器中,例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉注射溶液袋或小瓶。

[0173] 在一些实施方案中,一旦配制了药物组合物,就可将其作为溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体或作为脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。在一些实施方案中,可将此类制剂储存为随时可用的形式或在施用之前重构的形式(例如,冻干)。

[0174] 在一些实施方案中,提供了产生单剂量施用单元的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒可各自装有干燥蛋白质的第一容器和有含水制剂的第二容器。在一些实施方案中,包括装有单室或多室预填充注射器(例如,液体注射器和冻干注射器)的试剂盒。

[0175] 在一些实施方案中,待在治疗上采用的包含NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)的药物组合物的有效量将取决于(例如)治疗背景和目的。本领域的技术人员将认识到,根据一些实施方案,用于治疗适当剂量水平因此将部分根据递送的分子、对其使用NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)的适应症、施用途径和患者的大小(体重、体表或器官大小)和/或状况(年龄和健康状况)改变。在一些实施方案中,临床医师可滴定剂量并修改施用途径以获得最佳疗效。在一些实施方案中,根据以上提到的因素,典型剂量范围可从约0.1 μ g/kg患者体重至约100mg/kg或更高。在一些实施方案中,剂量范围可从0.1 μ g/kg至约100mg/kg; 1 μ g/kg至约100mg/kg; 或5 μ g/kg至约100mg/kg,包括前述任何端点之间的所有值(包括分数)。在一些实施方案中,剂量介于约1mg/kg体重与60mg/kg体重之间。在一

些实施方案中,剂量为约1mg/kg体重、约3mg/kg体重、约5mg/kg体重、约10mg/kg体重、约20mg/kg体重、约30mg/kg体重、约40mg/kg体重、约50mg/kg体重或约60mg/kg体重。

[0176] 在一些实施方案中,基于相同抗体在另一物种,例如小鼠、狗、猴子等中的有效剂量,确定抗NOTUM的中和抗体的人体剂量。在一些实施方案中,使用“Guidance for Industry:Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers,”U.S.Department of Health and Human Services,Food and Drug Administration,and Center for Drug Evaluation and Research (CDER),2005年7月(Pharmacology and Toxicology)确定抗NOTUM的中和抗体的人体剂量。

[0177] 在一些实施方案中,可由本领域的技术人员(例如)基于动物研究确定适合剂量。

[0178] 在各个实施方案中,向患者施用抗NOTUM的中和抗体每周2次、每周1次、每2周1次、每月1次、每隔一个月1次或甚至更低频率。

[0179] 在一些实施方案中,给药频率将考虑到所用制剂中NOTUM抗体和(若适用)任何另外的治疗剂的药代动力学参数。在一些实施方案中,临床医师将施用组合物直至达到获得所需效果的剂量。在一些实施方案中,因此组合物可作为单次剂量,或随时间推移作为两次或更多次剂量(可能含有或不含相同量的所需分子),或作为连续输注通过植入装置或导管施用。在一些实施方案中,适当剂量的进一步细化通常由本领域的技术人员进行并且在他们通常进行的工作范围内。在一些实施方案中,可通过使用适当剂量-反应数据确定适当剂量。在一些实施方案中,患者接受一个剂量的包含NOTUM抗体的药物组合物。在一些实施方案中,患者每天接受1、2、3或4个剂量的包含NOTUM抗体的药物组合物。在一些实施方案中,患者每周接受1、2、3、4、5或6个剂量的包含NOTUM抗体的药物组合物。在一些实施方案中,患者每月接受1、2、3或4个剂量的包含NOTUM抗体的药物组合物。

[0180] 在一些实施方案中,药物组合物的施用途径与已知方法一致,例如口服、通过皮下、静脉内、腹膜内、大脑内(实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门静脉内或病灶内途径注射;通过缓释系统或通过植入装置注射。在一些实施方案中,可通过快速注射或连续地通过输注或用植入装置施用组合物。

[0181] 在一些实施方案中,可通过植入上面已经吸附或封装了所需分子的膜、海绵或另一种适当材料局部施用组合物。在使用植入装置的一些实施方案中,可将所述装置植入任何适合组织或器官中,并且可通过扩散、定时释放团注剂(bolus)或连续施用递送所需分子。

[0182] 在一些实施方案中,通过使用例如本文所述的方法,植入已经基因工程化来表达并分泌多肽的某些细胞,从而递送NOTUM抗体(有或无至少一种另外的治疗剂)。在一些实施方案中,此类细胞可为动物或人类细胞,并且可为自体同源、异源或异种。在一些实施方案中,可永生生化所需细胞。在一些实施方案中,为了减少免疫反应的机会,可封装细胞以免周围组织浸润。在一些实施方案中,封装材料通常为允许蛋白质产物释放,但防止患者免疫系统或来自周围组织的其它有害因子破坏细胞的生物相容、半渗透性聚合物外壳或膜。

6实施例

[0183] 6.1.敲除小鼠

[0184] 使用来自突变鼠ES细胞克隆OMNIBANK收藏中心的相应突变胚胎干(ES)细胞克隆生成在人NOTUM基因的鼠直系同源物中基因工程化突变的纯合小鼠(通常见,美国专利No.6,080,576)。简言之,将在鼠NOTUM基因座中含诱变病毒插入的ES细胞克隆显微注射至胚泡中,依次将胚泡植入假孕雌性宿主中并使其足月。随后使所得嵌合后代繁殖为6只C57黑色雌性小鼠并检查后代敲除NOTUM等位基因的种系传播。随后繁殖突变NOTUM等位基因的杂合动物以产生1:2:1适当比例的突变NOTUM等位基因的纯合后代、突变NOTUM等位基因的杂合后代或野生型后代。

[0185] 连同NOTUM基因破坏的杂合(+/-)小鼠和野生型(+/+)同窝小鼠一起研究NOTUM基因破坏的纯合(-/-)小鼠。这项分析期间,使用设计用于评估哺乳动物受试者体内主要器官系统的功能的医学诊断程序集成套件使小鼠进行医学检查。通过连同杂合(+/-)和野生型(+/+)同窝小鼠研究所述数量的纯合(-/-)“敲除”小鼠,获得更可靠且可重复的数据。

[0186] 如图1所示,NOTUM基因纯合性破坏的雄性小鼠(“homs”)与其16周龄的野生型同窝小鼠相比,在不同骨部位表现出更大的皮质厚度(两组小鼠的数量N=10)。通过microCT(Scanco μ CT40)测量的这些差异为:股骨中段28% ($p<0.001$);肱骨中段19% ($p<0.001$);胫骨中段17% ($p<0.001$);和胫骨腓骨结11% ($p<0.001$)。如图2所示,16周龄时,NOTUM突变的杂合小鼠(“hets”)的股骨中段皮质骨厚度也大于其野生型同窝小鼠:与野生型同窝小鼠(N=23)相比,雄性 hets (N=50)表现出增大6% ($p=0.007$);并且与野生型同窝小鼠(N=22)相比,雌性hets (N=57)表现出增大9% ($p<0.001$)。

[0187] 图3和4中反映了NOTUM动物中观察到的骨形成重新分布的实际表现,其示出了使用标准4点弯曲试验进行的股骨断裂强度试验(由SkeleTech进行,现今由Ricerca Biosciences进行)的结果。如提供了由16周龄雄性小鼠获得的结果的图3所示,hets (N=20)与其野生型同窝小鼠(N=23)相比,表现出股骨断裂强度增强5% ($p=0.54$),而homs (N=17)表现出增强28% ($p<0.001$)。另一方面,与野生型对照相比,NOTUM homs和hets的脊柱压缩试验均未显示出最大脊柱压缩负载显著降低。对16周龄的雌性小鼠获得相似结果。如图4所示,hets (N=20)与其野生型同窝小鼠(N=21)相比,表现出股骨断裂强度增强12% ($p=0.04$),而homs (N=18)表现出增强28% ($p<0.001$)。对这些和其它数据的分析显示皮质厚度与股骨断裂强度之间密切相关。

[0188] 6.2.生成和纯化重组NOTUM蛋白

[0189] 将各自具有C端6XHis表位标签的人、非催化活性人(S232A)、小鼠、非催化活性小鼠(S239A)、大鼠、豚鼠、食蟹猴和恒河猴NOTUM的全长编码序列亚克隆至表达载体pIRESpuro2(Clontech)中。可使用表达构建体通过瞬时转染生成含分泌的NOTUM蛋白的条件培养基,或建立转染子以生成更大量的(例如)用于NOTUM蛋白的后续纯化条件培养基。

[0190] 使用Lipofectamine2000(Invitrogen)转染HEK293F细胞并且在摇瓶中的Freestyle293表达培养基(Invitrogen)中悬浮培养生长。对于瞬时转染,在转染4天后收获条件培养基,无菌过滤并储存在4℃下。为了生成稳定表达NOTUM蛋白的细胞系,在嘌呤霉素的存在下选择表达质粒进行基因组整合。

[0191] 通过细胞溶解产物和/或条件培养基的蛋白质印迹,使用抗His抗体确认NOTUM蛋白的表达和分泌。通过有限稀释法亚克隆生成 NOTUM的散装稳定转染子使得能够通过相对高水平下通过表达NOTUM的单独克隆的抗His蛋白质印迹鉴定。

[0192] 为生成10-20mg规模的纯化小鼠和人NOTUM蛋白,使表达小鼠或人NOTUM的克隆HEK293F细胞系在悬浮培养中扩展至体积为3L。当该体积下的细胞密度达到 1×10^6 个活细胞/ml,通过离心粒化细胞并重新悬浮于新鲜的Freestyle293表达培养基中并且不做另外的培养基变化,再保持培养96h。96h后,收获培养物,通过离心粒化细胞,并且无菌过滤条件培养基并储存在4℃下用于后续加工。

[0193] 纯化之前立即将含NOTUM的条件培养基从3L浓缩至1L,然后使用标称截留分子量为10kDa的膜,通过切向流过滤将缓冲液更换为镍固定化金属亲和色谱(IMAC)缓冲液(20mM Tris-HCl、10mM咪唑、0.5M NaCl, pH7.4)。然后将经浓缩、缓冲液更换的条件培养基涂在平衡、镍带电、金属螯合柱上。使用咪唑浓度梯度洗涤并洗脱结合的蛋白质。混合含纯NOTUM蛋白质的洗脱成分并用磷酸盐缓冲盐水透析以去除洗脱缓冲液。等分经纯化、透析的蛋白质并于-80℃下冷冻。

[0194] 对于每批蛋白质,使用一个等分试样通过二喹啉甲酸(BCA)测定(Thermo Scientific, Rockford, IL)测定蛋白质浓度,通过SDS PAGE,接着进行考马斯或银染色测定纯度,在无细胞OPTS酶学测定(以下实施例6.4.1中有描述)和基于细胞的Wnt信号测定(以下实施例6.4.2中有描述)测定活性,并且通过鲎变形细胞溶解物(LAL)测定(Lonza, Basel, Switzerland)测定内毒素浓度。

[0195] 6.3.生成NOTUM小鼠单克隆抗体

[0196] 在两次单独免疫活动中,对纯化重组人和小鼠NOTUM蛋白产生抗体。

[0197] 在活动1中,用如下的人NOTUM蛋白使NOTUM基因中插入 基因陷阱并因此缺乏内源NOTUM蛋白的纯合小鼠。在腹腔内注射的完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant)中用20μg人NOTUM蛋白使小鼠致敏。每2-3周在腹腔内注射的非完全弗氏佐剂中用20μg人NOTUM蛋白使小鼠加强免疫。通过ELISA测定,对人NOTUM表现出稳健血清滴度的小鼠接受于静脉内(i.v.)注射的PBS中最后加强10μg人NOTUM蛋白。

[0198] 在活动2中,经由后足垫用10μg于具有CpG DNA的TiterMax佐剂中的小鼠NOTUM蛋白初始免疫使NOTUM基因中插入基因陷阱的纯合小鼠免疫,接着间隔3或4天用10μg于具有CpG DNA的明矾佐剂中的小鼠NOTUM蛋白加强免疫10次。用10μg于PBS中的小鼠NOTUM蛋白在足垫最后加强免疫后,从高滴度小鼠体内收获腹股沟和膝后弯淋巴结。

[0199] 最后加强免疫4天后从经静脉内加强免疫的小鼠收获脾脏或从经足垫免疫的小鼠收获淋巴结并切碎和染色以获得细胞悬浮液。溶解红血球并通过使用涂有对非B细胞群有特异性的抗体的磁珠进行阴性选择富集细胞悬浮液的B细胞。通过富集B细胞与小鼠NS1骨髓瘤细胞的电细胞融合生成杂交瘤并接种至含次黄嘌呤和氨基蝶呤的杂交瘤培养基中的96孔板中以选择活B细胞/骨髓瘤细胞杂交瘤。

[0200] 通过用ELISA形式的被动吸附NOTUM蛋白测定杂交瘤条件培养基的免疫反应性,筛选杂交瘤用于生成NOTUM特异性抗体。从两次免疫活动中发现成百个分泌对小鼠和/或人NOTUM有特异性的抗体的杂交瘤。

[0201] 6.4. NOTUM中和测定

[0202] 6.4.1. OPTS测定

[0203] 在OPTS测定中,使用8-辛酰氧基苊-1,3,6-三磺酸三钠(OPTS)(一种用于酯酶和脂肪酶的荧光测定的水溶性酶底物)测量NOTUM活性。酶切割OPTS中的酯键产生荧光产物。

[0204] 发现杂交瘤条件培养基通常干扰OPTS测定,可能是因为从死细胞释放也可切割OPTS的水解酶。为此,生成另外的杂交瘤条件培养基用于通过ELISA测定最初显示出结合活性水平最高的细胞系并且使用蛋白质A珠通过亲和色谱法以96孔形式纯化抗体。然后在OPTS测定中,在4倍稀释下测试这些纯化抗体,无需预先定量。

[0205] 于384孔板中测试抗体,一式四份。将12.5 μ l含125ng于4 $\times$ 反应缓冲液(20mM CaCl₂、2mM MgCl₂、50mM Tris-HCl, pH7.4)中的纯化NOTUM添加到12.5 μ l纯化抗体中。混合后,在室温下孵育抗体和NOTUM 20min,接着添加25 μ l于50mM Tris-HCl (pH7.4)中的1.25 μ M OPTS (Sigma, 目录编号#74875)。混合后,在通过添加25 μ l的3% SDS终止之前,使酶反应在室温下进行10min。用485nm激发波长和535nm发射波长在Envision酶标仪上读取板以量化切割产物的量。

[0206] 从活动1筛选1,135个人NOTUM免疫反应性杂交瘤产生对人NOTUM显示出高于70%抑制的3种抗体。选择这3种抗体连同在OPTS测定中表现出一定程度中和作用的另外5种杂交瘤用于通过有限稀释法亚克隆并且通过使用50ml条件培养基进行蛋白质A亲和色谱法由克隆杂交瘤小规模生产纯化抗体。

[0207] OPTS测定筛选从活动2鉴定的1,056个小鼠NOTUM免疫反应性杂交瘤产生对小鼠NOTUM显示出高于50%抑制的6种抗体。选择这6种抗体连同在OPTS测定中表现出一定程度中和作用的另外6种杂交瘤用于通过有限稀释法亚克隆并且通过使用50ml条件培养基进行蛋白质A亲和色谱法由克隆杂交瘤小规模生产纯化抗体。

[0208] 6.4.2. Wnt信号测定

[0209] NOTUM可用作Wnt信号的负调节因子。在使用CellSensor[®]技术和如以下制备的条件培养基的Wnt信号测定中,测定了抗体中和活性,通过对Wnt信号的影响测定。将pcDNA3.1 (+)载体中含有人NOTUM的质粒转染至HEK293细胞中并且通过在400 μ g/mL的G418存在下生长,选择克隆。来自这些细胞的条件培养基用于测定。从ATCC购买过表达并向条件培养基中分泌Wnt3a的L细胞。

[0210] 测定方法如下。使CellSensor[®] LEF/TCF-blaFreeStyle[™] 293F细胞 (Invitrogen) 在具有10% 透析FBS、5 μ g/ml 杀稻瘟菌素 (Blasticidin) (Invitrogen, R210-01)、0.1mM NEAA、25mM HEPES和1 $\times$ GPS的DMEM中的15-cm板中生长至接近融合。首先用PBS洗涤,接着添加5mL胰蛋白酶并且在室温下孵育板2min使细胞受胰蛋白酶作用。然后每张15cm板添加总计10mL的测定培养基 (Opti-MEM, 加上0.5% 透析FBS、0.1mM NEAA、1mM 丙酮酸钠、10mM HEPES、1 $\times$ GPS)。对细胞计数并按50,000个细胞/mL悬浮。按每个孔10000个细胞/20 μ L的密度将细胞接种至Biocoat 384孔板 (Fisher, 目录编号#356663)。在37 $^{\circ}$ C下孵育细胞3h后,每个孔添加10 μ L于测定培养基中的30mM LiCl,接着在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天,在室温下于96孔板中,于总体积45 μ L的测定培养基中共同孵育15 μ L抗体和15 μ L纯化NOTUM (均在测定培养基中) 30min。NOTUM用于先前所述的浓度以在所述测定中产生50%抑制,通常为25nM。孵育30min后,将15 μ L未稀释的L-Wnt3a条件培养基添加到45 μ L抗体/NOTUM混合物中,并将10 μ L所得混合物添加到装有CellSensor[®]细胞的384孔板的孔中,一式四份。对照包括没有任何细胞的孔,没有NOTUM的孔和没有L-Wnt3a条件培养基的孔。在37 $^{\circ}$ C下孵育测定板5h以实现Wnt介导的 β -内酰胺酶上调,然后向每个孔添加8 μ L LiveBLazer[™]-FRET B/G底物 (CCF4-AM, Invitrogen) 并且在室温下黑暗孵育所述板3h。然后使用400nm激发波长以及460nm和535nm

发射波长在Envision酶标仪上读取板。

[0211] 6.5.表征NOTUM中和抗体

[0212] 通过ELISA表征从克隆杂交瘤纯化的抗体的物种交叉反应性,通过蛋白质印迹表征其识别还原、变性NOTUM蛋白的能力,并且表征其在以上实施例6.4中均有描述的无细胞OPTS测定和基于细胞的Wnt信号测定中的中和潜能。

[0213] 对来自活动1的单克隆抗体的功能性测试揭示,在OPTS和Wnt信号测定中,3种抗体1.802、1.815、1.846中和人NOTUM, IC_{50} 在1-10nM的范围内。这些抗体对小鼠NOTUM的活性没有任何影响并且经ELISA证实结合人NOTUM,而非小鼠NOTUM。此外,这些抗体在NOTUM蛋白被动吸附至测定板上时仅较弱地识别人NOTUM而对展示的抗His人NOTUM蛋白更敏感。

[0214] 表1示出了对来自活动1的某些抗体的各种表征实验的结果。使用以下实施例6.6中描述的方法产生“Bin”栏的数据。

[0215] 表1:对人NOTUM产生的某些抗体的表征

抗体	同种型	Bin	OPTS IC_{50} (nM; 人NOTUM)	Wnt 信号 IC_{50} (nM; 人NOTUM)	OPTS IC_{50} (nM; 小鼠NOTUM)	Wnt 信号 IC_{50} (nM; 小鼠NOTUM)	小鼠NOTUM 结合	蛋白质印迹结合
1.802	IgG1	1	6.44	5.71	无抑制	无抑制	否	否
1.815	IgG1	1	7.62	6.88	无抑制	未测定	否	否
1.846	IgG2b	1	10.07	1.70	无抑制	未测定	否	否
1.731	IgG1	3	>166.67	15.52	196.74	无抑制	是	是
1.655	IgG1	3	>166.67	未测定	>166.67	未测定	未测定	是
1.168	IgG2a	4	56.61	无抑制	无抑制	未测定	是	是
1.712	IgG2a	2	125.36	58.49	无抑制	未测定	是	是
1.807	IgG2a	2	未测定	无抑制	无抑制	未测定	是	是

[0217] 对来自活动2的单克隆抗体的功能性测试揭示了令人感兴趣的活性。具体而言,在OPTS和Wnt信号测定中MAb2.78中和小鼠和人NOTUM, IC_{50} 在3-50nM的范围内,而在OPTS测定中MAb2.1029中和小鼠和人NOTUM, IC_{50} 在5-30nM的范围内,但是在Wnt信号测定中仅中和人NOTUM, IC_{50} 为14nM。这后一种观察归因于,重组小鼠和人NOTUM蛋白质的量存在一些差异。蛋白质之间一个已知的差异是,重组小鼠NOTUM作为多聚体/聚集物存在的程度比重组人NOTUM高得多。通过蛋白质印迹测定,2.78和2.1029均不识别还原、变性NOTUM蛋白并且实质上对抗His展示NOTUM比对被动吸附NOTUM更具免疫反应性。

[0218] 表2示出了对来自活动2的某些抗体的各种表征实验的结果。使用以下实施例6.6中描述的方法产生“Bin”栏的数据。

[0219] 表2:对小鼠NOTUM产生的某些抗体的表征

[0220]

抗体	同种 型	Bin	OPTS IC ₅₀ (nM; 小 鼠 NOTUM)	Wnt 信号 IC ₅₀ (nM; 小鼠 NOTUM)	OPTS IC ₅₀ (nM; 人 NOTUM)	Wnt 信号 IC ₅₀ (nM; 人 NOTUM)	人 NOTUM 结合	蛋白 质印 迹结 合
2.78	IgG2b	2	35.65	3.75	15.49	45.94	是	否
2.1029	IgG2a	3	29.19	无抑制	5.77	14.02	是	否
2.816	IgG2a	3	31.70	无抑制	无抑制	39.11	是	否
2.856	IgG2b	3	37.70	无抑制	无抑制	无抑制	是	否
2.1001	IgG2b	3	>166.67	无抑制	无抑制	无抑制	否	是
2.55	IgG2a	1	26.13	无抑制	无抑制	无抑制	是	是
2.1002	IgG2a	1	42.39	无抑制	无抑制	无抑制	是	是
2.497	IgG2a	1	54.95	无抑制	无抑制	无抑制	是	是
2.341	IgG2a	1	56.95	无抑制	无抑制	无抑制	是	是
2.236	IgG2a	1	64.54	无抑制	无抑制	无抑制	是	是
2.688	IgG2a	4	无抑制	无抑制	12.84 [‡]	无抑制	是	否
2.1006	IgG2a	5	>166.67	无抑制	>166.67 [‡]	无抑制	是	是

[0221] [‡]最大限度抑制≈50%。

[0222] 6.6. 使用NOTUM中和抗体进行结合竞争研究

[0223] 评估来自免疫活动的抗体干扰其它抗体在表位分级测定中与NOTUM蛋白结合的能力。使用抗His捕获NOTUM蛋白以ELISA形式进行这项测定。用过量未标记的NOTUM特异性抗体(‘阻断’抗体)孵育捕获NOTUM蛋白,接着添加生物素化NOTUM特异性抗体(‘探针’抗体)。使用与链霉亲和素偶联的HRP测量探针抗体的结合。如果两种抗体竞争在相同表位空间中结合或者如果阻断抗体(例如)通过变构干扰影响探针抗体结合的能力,则不产生信号。如果两种抗体不相互干扰,则生成与在无阻断抗体时测试的生物素化抗体相似的信号。以互反矩阵形式测试抗体。通常,不管二者中哪一个为阻断抗体和哪一个为探针抗体,一对抗体都将显示出相同的干扰水平。将表现出相似性质的抗体分配至相同表位‘bin’。

[0224] 使用这种方法证实,MAb1.802、1.815、1.846、2.78和2.1029全部相互干扰与人NOTUM的结合,而它们不干扰几种其它不太有效的中和剂或非中和剂的结合。

[0225] 6.7. NOTUM中和抗体的表位作图

[0226] 为了绘制牵涉于人NOTUM特异性MAb1.802、1.815和1.846的结合的氨基酸图谱,通过在HEK293F瞬时转染编码具有人和小鼠混合序列的NOTUM开放阅读框的表达构建体生成人/小鼠嵌合NOTUM蛋白。通过用抗His抗体进行蛋白质印迹法和通过OPTS测定,证实来自这些转染的条件培养基含有功能性NOTUM嵌合体。

[0227] 图5示出了该实验中使用的入/小鼠嵌合NOTUM蛋白的示意图。第7节(序列表)中示出了那些蛋白质的序列。条件培养基以ELISA形式使用以测定抗体特异性。基于人特异性MAb丧失与特殊嵌合体的结合,确定MAb1.802、1.815和1.846(全部为“Bin1”抗体)依赖于Q47和M177之间的人NOTUM氨基酸进行结合。见图5。在该区域中,小鼠和人NOTUM有5个位置不同(R115K、D141S、R150K、R154H和Y171H,基于人序列编号)。通过瞬时转染表达在这5个位置的每一个有小鼠氨基酸的人NOTUM的构建体产生人NOTUM点突变体并且在OPTS测定中证

实点突变体全部有功能性。通过ELISA,MAb1.802、1.815和1.846结合除人NOTUM D141S外的所有点突变体,表明该氨基酸对于其和人NOTUM的结合很重要。通过瞬时转染生成具有互反点突变的小鼠NOTUM,小鼠NOTUM S148D,证实在OPTS测定中有活性,并且证实支持结合人NOTUM特异性MAb。因此,MAb1.802、1.815和1.846的物种特异性似乎取决于人NOTUM中位置141处的氨基酸,这是天然人NOTUM蛋白中的天冬氨酸。

[0228] 嵌合体方法不可用于绘制牵涉于MAb2.78或2.1029的结合的氨基酸图谱,因为MAb2.78或2.1029与人和小鼠NOTUM交叉反应。基于MAb1.802、1.815、1.846、2.78和2.1029相互干扰结合的发现,对人D141附近的带电氨基酸残基进行丙氨酸扫描诱变。构建5种人NOTUM突变体,每一种均具有一对带电残基突变为丙氨酸:人NOTUM N132A/R133A (SEQ ID NO:96);人NOTUM E134A/N135A (SEQ ID NO:97);人NOTUM D137A/R139A (SEQ ID NO:98);人NOTUM R144A/R145A (SEQ ID NO:99);和人NOTUM R150A/D151A (SEQ ID NO:100)。瞬时转染后5种人突变体全部有效表达并分泌。5种突变体中有4种在OPTS测定中表现出显著活性,而第5种(人NOTUM D137A/R139A)显示出很少或没有活性。以ELISA形式,用至少一些活动1和活动2MAb检测所有这5种突变体。MAb2.78不能结合人NOTUM D137A/R139A和人NOTUM R144A/R145A,而MAb1.802、1.815和1.846仅仅不能结合NOTUM R144A/R145A。MAb2.1029对5种丙氨酸突变体全部有免疫反应性。

[0229] 6.8. NOTUM中和抗体的结合亲和力

[0230] 使用Biacore3000测定了某些抗NOTUM MAb的结合亲和力。为了获得与多聚体小鼠NOTUM蛋白结合的有意义的亲和力值,通过用无花果蛋白酶(Ficin)消化完整IgG,接着通过蛋白质A亲和色谱法去除未消化的IgG和Fc片段生成抗体FAb片段。FAb和完整IgG与人NOTUM结合的亲和力值相当,并且其亲和力值在单位数至低双位数nM范围内,如表3所示。

[0231] 表3:对人和小鼠NOTUM产生的某些抗体的结合亲和力

对人 NOTUM 的亲和力			
抗体或片段	K_D (nM)	$K_{\text{结合}}(M^{-1} \text{秒}^{-1})$	$k_{\text{解离}}(M^{-1} \text{秒}^{-1})$
1.802 IgG	1.42	2.57×10^5	3.65×10^{-4}
1.802 Fab	0.91	8.99×10^5	8.20×10^{-4}
2.78 IgG	17.6	4.79×10^4	8.41×10^{-4}
2.78 Fab	15.4	8.77×10^4	1.36×10^{-3}
2.1029 IgG	5.99	1.51×10^5	9.08×10^{-4}
对小鼠 NOTUM 的亲和力			
抗体或片段	K_D (nM)	$K_{\text{结合}}(M^{-1} \text{秒}^{-1})$	$k_{\text{解离}}(M^{-1} \text{秒}^{-1})$
1.802 Fab	未观察到结合		
2.78 Fab	4.99	3.91×10^4	1.95×10^{-4}

[0233] 6.9. 向小鼠施用NOTUM中和抗体

[0234] 6.9.1. 每周一次施用NOTUM中和抗体,持续8周

[0235] 通过每周一次腹腔内注射30mg/kg,为8周龄雄性F1杂交(129×C57)小鼠施用NOTUM中和抗体2.1029或2.78b或对照抗体,持续8周。每组有12只小鼠。研究结束时,处死小鼠。在验尸后通过microCT,使用Scanco μ CT40测定骨量和结构,阈值为240,积分时间为

200ms而X-射线管电压为55keV。

[0236] 如图6所示,与对照抗体相比,施用NOTUM中和抗体2.1029使股骨中段皮质厚度增加12% ($P<0.001$),而施用NOTUM中和抗体2.78b增加16% ($P<0.001$)。

[0237] 6.9.2.每周一次施用NOTUM中和抗体2.1029,持续4周

[0238] 通过每周一次腹腔内注射3mg/kg、10mg/kg或30mg/kg,为8周龄雄性F1杂交(129×C57)小鼠施用NOTUM中和抗体2.1029,持续4周。每组有10只小鼠。研究结束时,处死小鼠。在验尸后通过microCT,使用Scanco μ CT40测定骨量和结构,阈值为240,积分时间为200ms而X-射线管电压为55keV。

[0239] 如图7所示,相对于施用对照抗体,施用30mg/kg NOTUM中和抗体2.1029使股骨中段皮质厚度增加5% ($P=0.12$)。

[0240] 6.9.3.每周一次施用NOTUM中和抗体2.78b,持续4周

[0241] 通过每周一次腹腔内注射3mg/kg、10mg/kg或30mg/kg,为8周龄雄性F1杂交(129×C57)小鼠施用NOTUM中和抗体2.78b,持续4周。在第一次实验中每组有10只小鼠。在第二次实验中,通过每周一次腹腔内注射0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg施用NOTUM中和抗体2.78b,持续4周。在第二次实验中每组有12只小鼠。研究结束时,处死小鼠。在验尸后通过microCT,使用Scanco μ CT40测定骨量和结构,阈值为240,积分时间为200ms而X-射线管电压为55keV。

[0242] 如图8A所示,在第一次实验中,相对于施用对照抗体,施用3mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的NOTUM中和抗体2.78b分别使股骨中段皮质厚度增加13% ($P<0.001$)、17% ($P<0.001$) 和16% ($P<0.001$)。如图8B所示,在第二次实验中,相对于施用对照抗体,施用0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg的NOTUM中和抗体2.78b分别使股骨中段皮质厚度增加3% ($P=0.46$)、7% ($P=0.01$) 和10% ($P<0.001$)。

[0243] 6.9.4.用唑来膦酸盐预处理,每周一次施用NOTUM中和抗体2.78b,持续4周

[0244] 通过腹腔内注射为28周龄雄性F1杂交小鼠(129×C57)施用单剂量50 μ g/kg唑来膦酸盐。所述剂量的唑来膦酸盐后4周,通过每周一次腹腔内注射为小鼠施用10mg/kg NOTUM中和抗体2.78b,持续4周。研究结束时,处死小鼠。每组有11或12只小鼠。在验尸后通过microCT,使用Scanco μ CT40测定骨量和结构,阈值为240,积分时间为200ms而X-射线管电压为55keV。另外,在第一个剂量的Mab2.78b7天后使用商用ELISA测定(Immunodiagnostic Systems, Scottsdale, AZ)测量为骨形成标记的PINP的血清水平。

[0245] 如图9A所示,相对于施用了盐水和对照抗体的小鼠,在施用了唑来膦酸盐和对照抗体的小鼠体内,股骨中段皮质厚度增加10 μ m或4% ($P=0.31$)。相对于施用了盐水和对照抗体的小鼠,在未经唑来膦酸盐预处理的情况下,施用了NOTUM中和抗体2.78b的小鼠体内,股骨中段皮质厚度增加23 μ m或9% ($P<0.001$),并且相对于施用了唑来膦酸盐和对照抗体的小鼠,在经唑来膦酸盐预处理的情况下,施用了NOTUM中和抗体2.78b的小鼠体内,股骨中段皮质厚度增加14 μ m或5% ($P=0.06$)。图9B显示,相对于施用了盐水和对照抗体的小鼠,在施用了唑来膦酸盐处理和对照抗体的小鼠体内,血清PINP水平降低15ng/mL或50% ($P<0.001$)。相对于施用了盐水和对照抗体的小鼠,在未经唑来膦酸盐预处理的情况下,施用了NOTUM中和抗体2.78b的小鼠体内, PINP水平升高14ng/mL或47% ($P<0.001$),并且相对于施用了唑来膦酸盐和对照抗体的小鼠,在经唑来膦酸盐预处理的情况下,施用了NOTUM中和抗体2.78b的小鼠体内, PINP水平升高12ng/mL或79% ($P<0.001$)。

[0246] 6.9.5.施用NOTUM中和抗体2.78a,持续4周

[0247] 对于该实验,将为IgG2b抗体的Mab2.78(也称为“2.78b”)重新格式化为IgG2a抗体(往往IgG2a抗体的半衰期比IgG2b抗体长)。重新格式化的Mab2.78称为“2.78a”。

[0248] 通过每周一次腹腔内注射0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg,为13周龄雄性F1杂交小鼠(129×C57)施用NOTUM中和抗体2.78a,持续4周。每组有10或12只小鼠。每次研究结束时,处死小鼠。在验尸后通过microCT,使用Scanco μ CT40测定骨量和结构,阈值为240,积分时间为200ms而X-射线管电压为55keV。

[0249] 如图10所示,在该实验中施用0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg的NOTUM中和抗体2.78a使股骨中段皮质厚度分别增加3% ($P=0.57$)、7% ($P=0.02$)、9% ($P=0.002$) 和10% ($P<0.001$)。

[0250] 6.9.6.每周一次或每两周一次施用NOTUM中和抗体2.78a,持续12周

[0251] 通过每周一次腹腔内注射为10周龄雄性F1杂交小鼠(129×C57)施用对照抗体、0.3mg/kg NOTUM中和抗体2.78a,持续12周,或通过每隔一周(两周一次)腹腔内注射施用1mg/kg NOTUM中和抗体2.78a,持续12周或24周。每个施用组有12只小鼠。在研究结束时,处死小鼠。在验尸后通过microCT,使用Scanco μ CT40测定骨量和结构,阈值为240,积分时间为200ms而X-射线管电压为55keV。

[0252] 如图11A所示,在分别每周一次施用0.3mg/kg和每两周一次施用1mg/kg NOTUM中和抗体2.78a,持续12周的小鼠体内,股骨中段皮质厚度增加6% ($P<0.001$) 和9% ($P<0.001$)。类似地,如图11B所示,在分别每周一次施用0.3mg/kg和每两周一次施用1mg/kg NOTUM中和抗体2.78a,持续12周的小鼠体内,股骨中段皮质厚度增加5% ($P=0.007$) 和7% ($P<0.001$)。

[0253] 如图12A所示,在分别每周一次施用0.3mg/kg和每两周一次施用1mg/kg NOTUM中和抗体2.78a,持续24周的小鼠体内,股骨中段皮质厚度增加7% ($P=0.002$) 和9% ($P<0.001$)。如图12B所示,在分别每周一次施用0.3mg/kg和每两周一次施用1mg/kg NOTUM中和抗体2.78a,持续24周的小鼠体内,股骨中段皮质厚度增加3% ($P=0.09$) 和8% ($P<0.001$)。最后,如图12C所示,在分别每周一次施用0.3mg/kg和每两周一次施用1mg/kg NOTUM中和抗体2.78a,持续24周的小鼠体内,第九肋皮质厚度增加7% ($P=0.02$) 和9% ($P=0.003$)。

[0254] 6.10.向去卵巢小鼠施用NOTUM中和抗体

[0255] 6.10.1.卵巢切除术

[0256] 为16周龄白化C57BL/6J雌性小鼠切除卵巢或给予假手术。在卵巢切除术之后和施用NOTUM中和抗体之前的间隔,使用商用ELISA 测定(Immunodiagnostic Systems, Scottsdale,AZ)测量为骨形成标记的PINP和为骨吸收标记的CTX的血清水平,以确认在卵巢切除术之后发生的骨再造增多。

[0257] 手术之后和开始治疗之前,如表4所示,去卵巢小鼠相对于假手术小鼠显示出骨再造增多。因为小梁骨含有比皮质骨更多的骨细胞,所以这些数据很可能反映主要是小梁骨再造增多。

[0258] 表4:手术后的骨标记水平

[0259]	标记	术后周数	假手术 (N=10)	OVX 手术 (N=10)	统计数字
	PINP (ng/ml)	1	36.4±0.9	50.6±5.3	△=39% P=0.02
	CTX (ng/ml)	2	10.5±0.9	14.1±0.9	△= 33% P=0.01
	PINP (ng/ml)	4	41.2±2.3	54.8±2.5	△=33% P=0.001

[0260] 6.10.2. 向去卵巢小鼠施用NOTUM中和抗体2.78b

[0261] 从手术后8周开始,通过每周一次腹腔内注射10mg/kg,施用NOTUM中和抗体2.78b或对照抗体4周。研究包括表5所示的处理组。

[0262] 表5: 卵巢切除 (OVX) 研究中的处理组

[0263]

小鼠数量	手术	抗体
13	假	对照
13*	假	NOTUM
10	OVX	对照
11	OVX	NOTUM

[0264] *该组中最初有14只小鼠,但是研究期间一只小鼠死亡。

[0265] 为评估新骨形成的位置和程度,在处理第7、14和21天(即,第2、3和4次处理)施用荧光染料骨标记。在第7天施用发出绿色荧光的钙黄绿素;在第14天施用发出红色荧光的茜素;并且在第21天施用发出黄色荧光的四环素。在4周处理结束时处死小鼠。验尸时子宫重量证实卵巢切除手术成功。(数据未示出)。

[0266] 6.10.3. 经NOTUM中和抗体处理的去卵巢小鼠的骨量和结构

[0267] 在验尸后通过microCT,使用Scanco μ CT40测定骨量和结构,阈值为240,积分时间为200ms而X-射线管电压为55keV。扫描股骨中段、LV5椎体和股骨颈。

[0268] 如图13A所示,相对于施用了对照抗体的假手术小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的假手术小鼠体内股骨中段皮质厚度增加22 μ m或9%,并且相对于施用了对照抗体的去卵巢小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的去卵巢小鼠体内增加26 μ m或12%。如图13B所示,相对于施用了对照抗体的假手术小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的假手术小鼠体内股骨中段矿化骨面积增加0.1mm²或11%,并且相对于施用了对照抗体的去卵巢小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的去卵巢小鼠体内增加0.08mm²或10%。

[0269] 如图14A所示,相对于施用了对照抗体的假手术小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的假手术小鼠体内LV5椎体中总(皮质加上小梁)骨体积与总体积的比例增大9%,并且相对于施用了对照抗体的去卵巢小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的去卵巢小鼠体内增大3%。如图14B所示,相对于施用了对照抗体的假手术小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的假手术小鼠体内LV5椎体中皮质骨体积与总体积的比例增大13%,并且相对于施用了对照抗体的去卵巢小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的去卵巢小鼠体内增大9%。如图14C所示,在假手术小鼠或去卵巢小鼠体内施用NOTUM中和抗体2.78b不显著影响LV5椎体中小梁骨体积与总体积的比例。

[0270] 最后,如图15所示,相对于施用了对照抗体的假手术小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的假手术小鼠体内股骨颈骨体积与总体积的比例增大4%,并且相对于施用了对照抗体的去卵巢小鼠,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的去卵巢小鼠体内增大6%。

[0271] 6.10.4.经NOTUM中和抗体处理的去卵巢小鼠的骨组织形态计量学

[0272] 使用快速包埋方法将股骨干包埋在甲基丙烯酸甲酯中。见Brommage和Vafai, Calcified Tissue Int' 167:479 (2000)。使用Leica SP1600骨锯制备约80 μ m厚的中段横切片。然后用Olympus BX60荧光显微镜检查切片。使用OsteoMeasureTM软件 (OsteoMetrics, Decatur, GA) 测定各个骨组织形态计量学参数。在100 $\times$ 放大倍数下测量静态参数(例如骨面积和厚度)和动态参数(例如单标表面(SLS)、矿化沉积速率(MAR)和骨形成率(BFR))。

[0273] 图16示出了经第7天施用的钙黄绿素、第14天施用的茜素和第21天施用的四环素标记的股骨中段横切片的内皮质表面百分比。表6示出了对图16中的数据的统计分析。与施用了对照抗体的小鼠相比,施用了NOTUM中和抗体2.78b的小鼠在第7和14天显示出明显更高的内皮质标记百分比。

[0274] 表6:单标表面%的双因素ANOVA

[0275]

双因素ANOVA	第7天	第14天	第21天
卵巢切除术的影响	P=0.16	P=0.65	P=0.28
处理的影响	P<0.001	P<0.001	P=0.02
相互作用的影响	P=0.66	P=0.74	P=0.77

[0276] 图17示出了施用了对照抗体或NOTUM中和抗体2.78b的假手术和去卵巢小鼠的矿化沉积速率(A)和体积所指的骨形成率(B)。通过测量钙黄绿素标记(第7天)和茜素标记(第14天)之间的距离并除以7获得“第7-14天速率”,并且测量茜素标记(第14天)和四环素标记(第21天)之间的距离并除以7获得“第14-21天速率”测定矿化沉积速率(图17A)。表7示出了对图17A中的数据的统计分析。在从第7天到第14天的时间段内,施用了NOTUM中和抗体2.78b的小鼠显示出比施用了对照抗体的小鼠更高的矿化沉积速率。

[0277] 表7:矿化沉积速率的双因素ANOVA

双因素 ANOVA	第 7-14 天	第 14-21 天
卵巢切除术的影响	P=0.80	P=0.70
处理的影响	P<0.001	P=0.82
相互作用的影响	P=0.86	P=0.02

[0278] 通过牵涉内皮质矿化表面(源自图16的双标表面加上一半单标表面的百分比)乘以矿化沉积速率(见图17A)的标准计算测定体积所指的骨形成率(图17B)。结果为骨形成率除以骨体积,表示为每7天的百分比。表8示出了对图17B中的数据的统计分析。如图17B所示,在施用了NOTUM中和抗体2.78b的小鼠体内每个骨体积的骨形成率比施用了对照抗体的小鼠明显更高。

[0280] 表8:体积所指的骨形成率的双因素ANOVA

[0281]

双因素ANOVA	第7-14天	第14-21天
卵巢切除术的影响	P=0.95	P=0.80
处理的影响	P<0.001	P<0.001
相互作用的影响	P=0.39	P=0.30

[0282] 6.11. 鉴定适合测试NOTUM中和抗体的物种

[0283] 基于从公共领域获得的多物种蛋白序列比对,预计MAb1.802、1.815和1.846会与豚鼠NOTUM结合并且因此该物种可能适合临床前研究。为检验这个假设,通过瞬时转染克隆并表达豚鼠NOTUM,并且证实OPTS测定中有活性。通过ELISA发现MAb1.802、1.815和1.846与豚鼠NOTUM结合并且在OPTS测定中证实MAb1.802中和豚鼠NOTUM活性。MAb2.78以低于MAb1.802的亲和力结合豚鼠NOTUM,并且在OPTS测定中具有相应更低的抑制活性。MAb2.1029仅弱结合豚鼠NOTUM,并且在OPTS测定中未明显抑制豚鼠NOTUM。

[0284] 从来自所述物种的cDNA制剂克隆食蟹猴和恒河猴NOTUM。序列分析揭示,与人NOTUM D141等效的位置处的氨基酸为天冬酰胺,与小鼠和人NOTUM中该位置处的氨基酸不同。通过瞬时转染生成活性(通过OPTS测定确定)食蟹猴和恒河猴NOTUM蛋白,并且发现MAb1.802既不结合也不抑制任一种蛋白质。通过瞬时转染生成活性人NOTUM点突变体,人NOTUM D141N,并且发现MAb1.802不与人NOTUM点突变体结合。

[0285] 通过ELISA,MAb2.78弱结合食蟹猴和恒河猴NOTUM,但是在OPTS测定中并不显著抑制任一种蛋白质。相反,通过ELISA,MAb2.1029不但结合食蟹猴和恒河猴NOTUM而且结合人NOTUM,并且在OPTS测定中不但抑制两种蛋白质而且抑制人NOTUM。

[0286] 6.12. 抗体测序和人源化

[0287] 通过使用来自有关杂交瘤细胞的总RNA进行特异性RT-PCR,接着为PCR产物测序,为重链和轻链可变区测序。为来自4种活动1抗体:1.731、1.802、1.815和1.846和3种活动2抗体:2.1029、2.55和2.78的重链和轻链可变区测序。在以下第7节(序列表)中示出了所述抗体中每一种的可变区序列(无信号序列)。第7节还示出了所述抗体中每一种的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3的序列。下表示出了与所述抗体中每一种的重链和轻链可变区以及CDR1、CDR2和CDR3相对应的SEQ ID NO。

[0288] 表9:重链和轻链可变区以及CDR的SEQ ID NO

[0289]

小鼠抗体	重链可变区 SEQ ID NO (CDR1、 CDR2、CDR3 SEQ ID NO)	轻链可变区 SEQ ID NO (CDR1、CDR2、 CDR3 SEQ ID NO)
1.731	7(9、10、11)	8(12、13、14)
1.802	15(17、18、19)	16(20、21、22)
1.815	23(25、26、27)	24(28、29、30)
1.846	31(33、34、35)	32(36、37、38)
2.1029	39(41、42、43)	40(44、45、46)
2.55	47(49、50、51)	48(52、53、54)
2.78	55(57、58、59)	56(60、61、62)

[0290] 发现在两个或更多个测序抗体之间,某些重链和轻链CDR具有高同源性。MAb1.802和1.846共有相同重链CDR1 (GFTFSDYGMH;SEQ ID NO:17和33);而MAb1.815的重链CDR1 (GFTFSDFGMH;SEQ ID NO:25)与MAb1.802和1.846仅有一个保守性氨基酸取代(苯丙氨酸(F)代替酪氨酸(Y))不同。因此所述抗体重链CDR1的共有序列为GFTFSDX₁GMH(SEQ ID NO:90),其中X₁为F或Y。MAb1.802和1.846的重链CDR3仅有一个保守性氨基酸取代(组氨酸(H)与天冬酰胺(N))不同。因此所述抗体重链CDR3的共有序列为KX₂YNGGYFDV(SEQ ID NO:91),其中X₂为H或N。MAb1.802和1.846共有相同轻链CDR2 (LASNLES;SEQ ID NO:21和37),而MAb1.815的轻链CDR2 (LASDLES;SEQ ID NO:29)与MAb1.802和1.846仅有一个保守性氨基酸取代(天冬氨酸(D)代替天冬酰胺(N))不同。因此所述抗体轻链CDR2的共有序列为LASX₆LES(SEQ ID NO:93),其中X₆为D或N。最后,来自活动1的3种抗体1.802、1.846和1.815的轻链CDR1的共有序列为RASKX₃VSX₄SGYSYX₅H(SEQ ID NO:92),其中X₃为I或S,X₄为T或E,并且X₅为M或I。

[0291] 对公共数据库进行BLAST搜索以鉴定与每个小鼠重链和轻链可变区的相似性最大的人种系可变区序列。使用AbM定义,然后将硅片上来自小鼠可变区的CDR移植到这些人种系可变序列中,代替人种系CDR。用编码框内信号肽的5'前导序列合成5种小鼠抗体(2.78、2.1029、1.802、1.815和1.846)的所得人源化可变区并且在重链可变序列的情况下克隆在编码人IgG2恒定区的序列上游或在轻链可变序列的情况下克隆在编码人κ恒定区的序列上游。以下第7节(序列列表)中示出了每个人源化可变区的序列,连同全长人源化重链和轻链(无信号肽)的序列。

[0292] 将全长人源化重链和轻链的编码序列亚克隆至哺乳动物表达载体中并且将相应重链和轻链构建体共转染至CHO-S细胞中。通过用抗人二级抗体进行蛋白质印迹检查所得条件培养基以确认完整人源化抗体的表达和分泌。然后以ELISA形式测试条件培养基以确定人源化抗体是否保持结合人NOTUM蛋白的能力。人源化MAb1.802、1.815、1.846和2.1029结合人NOTUM,而人源化MAb2.78表现出与人或小鼠NOTUM很少或不结合。

[0293] 以上引用的所有参考通过引用整体并入本文用于任何目的。

[0294] 7. 序列列表

[0295]

SEQ ID NO	说明	序列
1	人 NOTU M	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSPMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VYPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SPAPACLSHE IHRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLDVSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
2	小鼠 NOTU M	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESEP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSTRYTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFIPIYC SSDVWSGASP

[0296]

		KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RYAEELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFPGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN
3	人 NOTU M S232A	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SAAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTTCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFDEAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
4	小鼠 NOTU M S239A 突变体	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGG EGRKTWRRRG QPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFI PYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSAA GGTGVLLNVD RYAEELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFPGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN
5	豚鼠 NOTU M	MGRGVRVFL LGLLHWAGGG EGRKTWRRRG QQPAPAPLPP QRTEAAPGTG QPVESFPLDF TAVEGNMDSF MAQVKSLAQSLYPCSAQQLN EDLRLHLLLN TSVTCNDGSP AGYYLKESKG SRRWLLFLEG GWYCFNRENC DSRDYMRL MSSKDWPQTR TGTGILSSQP EENPYWWNAN MVFI PYCSD VWSGASSKSE KNEYVFMGAL IIREVVQELL GRGLSGAKVL LLAGSSAGGT GVLLNVDRVA EQLEQLGYPA IQVRGLADSG WFLDNKQYRR TDCVDTVCA PTEAIRRGIR YWNGMVPERC RSQFKEGEEW NCF LGYKVYP TLRCPVFVQ WLFDEAQLTA DNAHLTGQPV QEGQWLYIQN LGHELNTLK DVPASFAPAC LSHEIIRSH WTDVQVKGTS LPRALHCWDR SLHDSHKASK TPLKGCPIHL VDSCPWPHCN PSCPTIRDQF TGQEMNVAQF LMHMGFDVQT VAQQQGLEPS KLLGMLSSGS
	食蟹猴 NOTU M	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY NTMRLMSSR DWPRTTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE

[0297]

		ELGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKIYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQESQ RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKTSKTPK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAQQ QGPEPSKLLG LPSDGS
6	恒河猴 NOTU M	MGRGVRVLLL LGLLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY NTMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALHQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE ELGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKIYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQESQ RLYIQNLGRE LRHTLKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKNSKTPK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAQQ QGPEPSKLLG LPSDGS
7	MAb 1.731 重 链可变 区	EVQLQQSGPE LVKPGASVKV SCKASGYPFT DYFIHWVKQT HGKSLEWIGY FFPKNGANGY NQKFEGKYTL TVDKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARRY GNYYSMDYWG QGTSVTYSSA KITPP
8	MAb 1.731 轻 链可变 区	SFVMTQTPKF LLVSAGDRVIT ICKASQSVG DDVAWYQQKP GQSPTLLIYR VSNRYTGVPD RETGSGYGTDT FTETINTVQA EDLAVYFCQQ DYSSPYTFGG GTQLEVKRAD AAP
9	MAb 1.731 重 链 CDR1	GYPFTDYFIH
10	MAb 1.731 重 链 CDR2	YFFPKNGANG
11	MAb 1.731 重 链 CDR3	RYGNYYSMYD
12	MAb 1.731 轻 链 CDR1	KASQSVGDDVA
13	MAb 1.731 轻 链 CDR2	RVSNRYT

[0298]

14	MAb 1.731 轻 链 CDR3	QQDYSSPYT
15	MAb 1.802 重 链可变 区	EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYGMHWFRQA PEKGLEWVAY ISSGSRTVYY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLS LQMTSLRSED TAMYVCARKH YNGGYFDVWG TGTTVTVSSA KTHP
16	MAb 1.802 轻 链可变 区	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKIVS TSGYSYMHWY QOKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPP TFGSGTKLEI KRADAAP
17	MAb 1.802 重 链 CDR1	GFTFSDYGMH
18	MAb 1.802 重 链 CDR2	YISSGSRTVY
19	MAb 1.802 重 链 CDR3	KHYNGGYFDV
20	MAb 1.802 轻 链 CDR1	RASKIVSTSGYSYMH
21	MAb 1.802 轻 链 CDR2	LASNLES
22	MAb 1.802 轻 链 CDR3	QHSRELPT
23	MAb 1.815 重 链可变 区	DVQLLES GGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS DFGMHWVRQA PEKGLEWVAY SSSGGTTVYY ADTVKGRITL SRDNSKNTLF LEMTSLRSED TAMYVCARAS YDGGYFDCWG QGTSLTVSSA KTHP
24	MAb 1.815 轻 链可变 区	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYIHWY QOKPGQPPKL LIYLASDLES GVPARFSGSG SGAAFTLNIH PVEEEDAATY YCHHSRELPP TFGSGTKLEI KRADAAP

[0299]

25	MAb 1.815 重 链 CDR1	GFTFSDFGMH
26	MAb 1.815 重 链 CDR2	YSSSGGTTVY
27	MAb 1.815 重 链 CDR3	ASYDGGYFDC
28	MAb 1.815 轻 链 CDR1	RASKSVSTSGYSYIH
29	MAb 1.815 轻 链 CDR2	LASDLES
30	MAb 1.815 轻 链 CDR3	HHSRELPFT
31	MAb 1.846 重 链可变 区	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYGMHWLRQA PEKGLEWVAY ISSGSTTLSY ANTMKGRFTI SRDNAKKTLS LQMTSLRSED TAIYYCARKN YNGGYFDVWG TGT TVTVSSA KTI PP
32	MAb 1.846 轻 链可变 区	DIVLTQSPAS IVVSLGQRAT ISCRASKSVS ESGYSYMHWY QKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEGDATTY YCQHSRVLP TFSGGTKLEI KRADAAP
33	MAb 1.846 重 链 CDR1	GFTFSDYGMH
34	MAb 1.846 重 链 CDR2	YISSGSTTLS
35	MAb 1.846 重 链 CDR3	KNYNGGYFDV

[0300]

36	MAb 1.846 轻 链 CDR1	RASKSVSESGYSYMH
37	MAb 1.846 轻 链 CDR2	LASNLES
38	MAb 1.846 轻 链 CDR3	QHSRVLPT
39	MAb 2.1029 重链可 变区	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT SYGVHWVRQP PGKGLEWLGVIWAGGSTNYSALMSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQTDDT AIYFCARDGD YGTIYAMDYWGQGTSVTVSSAKTTAPS
40	MAb 2.1029 轻链可 变区	DIQMTQFTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFTGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GKTLPRTEGG GTMLEIKRAD AAP
41	MAb 2.1029 重 链 CDR1	GFSLTSYGVH
42	MAb 2.1029 重 链 CDR2	VIWAGGSTN
43	MAb 2.1029 重 链 CDR3	DGDYGTIYAMDY
44	MAb 2.1029 轻 链 CDR1	RASQDISNYLN
45	MAb 2.1029 轻 链 CDR2	YTSRLHS
46	MAb 2.1029 轻 链 CDR3	QQGKTLPT

[0301]

47	MAb 2.55 重 链可变 区	EVQLQSGTV LARPGALVKM SCKASGYTFT SYWMHWVKQR PGQGLEWIGA IYPGKSDTRY NQKFQDKAKL TAVTSTSTAY MDLSSLTDED SAVYYCSRRY GNIFYAMDYWG QGTSVTVSSA KTTAPS
48	MAb 2.55 轻 链可变 区	SIVMTQTPKF LLVSAGDRVY MTCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPPELLIYY ASDRYTGVPD RFTGSGYGTD FTLTISTVQA EDLAVYFCQQ DYSSPYTFGG GTKLETKRAD AAP
49	MAb 2.55 重 链 CDR1	GYTFTSYWMH
50	MAb 2.55 重 链 CDR2	AIYPGKSDTR
51	MAb 2.55 重 链 CDR3	RYGNFYAMDY
52	MAb 2.55 轻 链 CDR1	KASQSVSNDVA
53	MAb 2.55 轻 链 CDR2	YASDRYT
54	MAb 2.55 轻 链 CDR3	QQDYSSPYT
55	MAb 2.78 重 链可变 区	DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY ITSGSGAIYY ADTVRGREFI SRDTPKNTLF LQMTSLRSED TAMYCARSA DGLDYWGQGT SVTVSSAKTT PPS
56	MAb 2.78 轻 链可变 区	DIQMTQSPAS LYVSVGETVT ITCRASENIY SNLAWYQQKQ GKSPQLLVYG ATNLADGVPS RPSGSGSGTQ YSLKINSLKS EDPGSIYQCQH FWGTPFTFGS GTKLEIKRAD AAP
57	MAb 2.78 重 链 CDR1	GFTFSSFGMH

[0302]

58	MAb 2.78 重 链 CDR2	YITSGSGAIY
59	MAb 2.78 重 链 CDR3	SADGLDY
60	MAb 2.78 轻 链 CDR1	RASENIYSNLA
61	MAb 2.78 轻 链 CDR2	GATNLAD
62	MAb 2.78 轻 链 CDR3	QHFWGTPFT
63	人源化 Ab (HumA b) 2.78 重链可 变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVSY ITSGSGAIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSA DGLDYWGQGT TTVTVSS
64	HumAb 2.78 重 链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVSY ITSGSGAIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSA DGLDYWGQGT TTVTVSSDVWG QGTTTVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTWSW NSGALTSGVH TPAVLQSSG LYSLSVVTV TSSNFGTQTY TCNVDPKPSN TKVDKTVRK CCVECPPCPA PPVAGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGM EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV VSVLTVVHQD WLNKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPMLESDG SFFLYSKLTV DKSIRWQQGIV FSCSVMEAL HNHYTQKSL LSPGK
65	HumAb 2.78 轻 链可变 区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SNLAWYQQKPK GKAPKLLIYG ATNLADGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLPQ EDFATYYCQH FWGTPFTFGQ GTKVEI
66	HumAb 2.78 轻 链	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SNLAWYQQKPK GKAPKLLIYG ATNLADGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLPQ EDFATYYCQH FWGTPFTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNFFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSITL LSKADYEKHK VYACEVTHQG

[0303]

		LSSPVTKSFN RGE C
67	HumAb 2.1029 重链可变区	QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSLT SYGVHWIRQP PGKGLEWIGV IWAGGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGD YGTIYAMDYW GQGTLVTVSS
68	HumAb 2.1029 重链	QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSLT SYGVHWIRQP PGKGLEWIGV IWAGGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGD YGTIYAMDYW GQGTLVTVSS DVWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVTSSNFG TQYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY VDGMEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTIPTML DSDGSFELY KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
69	HumAb 2.1029 轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLPQ EDIATYYCQQ GKTLPRTFGG GTKVEI
70	HumAb 2.1029 轻链	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLPQ EDIATYYCQQ GKTLPRTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE C
71	HumAb 1.802 重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSGSRTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKH YNGGYFDVWG QGTLVTVSS
72	HumAb 1.802 重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSGSRTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKH YNGGYFDVWG QGTLVTVSSD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALT SGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH DPEVQFNWYV DGMEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTIPTMLD SDGSFELY KLTVDKSRWQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
73	HumAb 1.802 轻链可变区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKIVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRELPP TFGQGTKLEI

[0304]

74	HumAb 1.802 轻 链	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKIVS TSGYSYMIHWY OOKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRELPP TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
75	HumAb 1.815 重 链可变 区	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFGMHWIRQA PGKGLEWVSY SSSGGTTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAS YDGGYFDCWG QGTTVTVSS
76	HumAb 1.815 重 链	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFGMHWIRQA PGKGLEWVSY SSSGGTTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAS YDGGYFDCWG QGTTVTVSSD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVITFPVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VLEFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
77	HumAb 1.815 轻 链可变 区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS TSGYSYIHWY OOKPGQPPKL LIYLASDLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHSRELPP TFGQGTKLEI
78	HumAb 1.815 轻 链	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS TSGYSYIHWY OOKPGQPPKL LIYLASDLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHSRELPP TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
79	HumAb 1.846 重 链可变 区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSGSTTISY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKN YNGGYFDVWG QGTLVTVSS
80	HumAb 1.846 重 链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSGSTTISY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKN YNGGYFDVWG QGTLVTVSSD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVITFPVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VLEFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

[0305]

81	HumAb 1.846 轻 链可变 区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS ESGYSYMIHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRVLP TFGQGTKLEI
82	HumAb 1.846 轻 链	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS ESGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRVLP TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVYVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
90	活动 1 共有重 链 CDR1	GFTFSDX ₁ GMH
91	活动 1 共有重 链 CDR3	KX ₂ YNGGYFDV
92	活动 1 共有轻 链 CDR1	RASKX ₃ VSX ₄ SGYSYX ₅ H
93	活动 1 共有轻 链 CDR2	LASX ₆ LES
83	人-小鼠 嵌合 NOTU M	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LFLGEGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTRTG TG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALHQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRRSDCI DTINCAPTDA IRRGIRYWSG MVPERCQRQF KEGEWNCF GYKVYPTLRC PVFVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGQ WLYIQNLGRE LRGTLKDVQA SFAPACLSHE IIRSYWTDV QYKGTSLPRA LHCWDRSFHD SHKASKTPMK GCPHLYDSC PWPHCNPSCP TIRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAQQ QGMEPSKLLG MLSNGN
84	小鼠-人 嵌合 NOTU M	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESEF LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSTYTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFIPIYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLHQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRHTDCVDTI TCAPTEAIRR GIRYWNGVVP ERCRRQFQEG EEWNCFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGRLRY IQNLGRELRLH TLKDVPA SFA PACLSHEIII

[0306]

		RSHWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSLHDSHK ASKTPLKGCP VHILVDSCPWP HCNPSCPTVR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD MQTVAQPQGL EPSELLGMLS NGS
85	人-小鼠 -人嵌合 NOTU M	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QOPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASPKSDKNEY AFMGSLHQE VVRELLGKGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAELLE ELGYPSIQVR GLADSGWFLD NKQYRRSDCI DTINCAPTDA IRRGIRYWSG MVPERCQRQF KEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG LRYIQNLGRE LRHTLKDVP SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHILVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
86	小鼠-人 -小鼠嵌 合 NOTU M	MGGEVRVLLL LGLLHWVGS EGRKTWRRRG QOPPPPPPP PLQRAEVEP GAGQPVESEF LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFI PYC SSDVWSGASS KSEKNEYAFM GALIQEVVR ELLGRGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAEQLEKLG YPAIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRHTDCVDTI TCAPTEAIRR GIRYWNGVVP ERCRRQFQEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN
87	人 NOTU M (Δ1-46) ； CD33 信号肽， 为斜体 字	<i>MPLLLLPLL WAGAL</i> AQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALHQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG LRYIQNLGRE LRHTLKDVP SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHILVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
88	人 NOTU M N96D	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QOPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLDTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALHQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEG LRYIQNLGRE LRHTLKDVP SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHILVDSC PWPHCNPSCP

[0307]

		TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
89	人 NOTU M Q47-MI 77	QPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANM
94	人 NOTU M D141S	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY STMRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPV SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
95	小鼠 NOTU M S148D	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGG EGRKTWRRRG QPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSDRYDTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFIPIYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFFGYK VYPTLRCVPV VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN
96	人 NOTU M N132A/ R133A	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FAENCDSDRY DTMRRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWFLD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPV SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
97	人 NOTU M E134A/ N135A	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRAACDSRY DTMRRLMSSR DWPRTGTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE

[0308]

		KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVP A SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
98	人 NOTU M D137A/ R139A	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCASAY DTMRRMLSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVP A SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
99	人 NOTU M R144A/ R145A	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMAALMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVP A SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
100	人 NOTU M R150A/ D151A	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRMLSSA AWPRTTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVP A SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
101	1,802 重 链可变 区多核 苷酸序 列	ATGGACTCCA GGCTCAATT AGTTTCCTT GTCCTTATT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGGTCCCT GAAACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC TTTCAGTGAC TATGGAATGC ACTGGTTTCTG TCAGGCTCCA GAGAAGGGGC TGGAGTGGGT TGCATATATT AGTAGTGGCA GTAGAACCGT CTACTATGCA GACACAGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAACAC CCTGTCCCTG CAAATGACCA GTCTGAGGTC

[0309]

		TGAGGACACG GCCATGTATT ACTGTGCGAG GAAACATTAC AACGGTGGAT ACTTCGATGT CTGGGGCACA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGCCAAA ACGACACCCC CATCTGTCTA TCCACTGGCC CCTGGATCTG CTGCCCAAAC TAACTCCATG GTGACCCTGG GATGC
102	1.802 轻 链可变 区多核 苷酸序 列	ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC TCTGGGTCC AGGTTCCTACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGCTG TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAATTGTC AGTACATCTG GCTATAGTTA TATGCACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCGCCCAA CTCCTCATCT ATCTTGCATC CAACCTAGAA TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGAGGA TGCTGCAACC TATTACTGTC AGCACAGTAG GGAGCTTCCT CCCACGTTCC GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GT
103	1.815 重 链可变 区多核 苷酸序 列	TCTGACAGAG GAGCCAAGCC CTGGATTCCC AGGTCTCAC ATTCAGTGAT CAGCACTGAA CACAGACCAC TCACCATGGA CTCCAGGCTC AATTIAGTTT TCCTTGTCCT TATTTTAAAA GGIGTCCAGT GTGATGTGCA ACTGCTGGAA TCTGGGGGAG GCTIAGTGCA GCCTGGAGGG TCCCGGAAAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACTTTCA GTGACTTTGG AATGCACTGG GTTCGTCAGG CTCCAGAGAA GGGGCTGGAG TGGGTGCGAT ACAGTAGTAG TGGCGGTACT ACCGTCTACT ATGCAGACAC GGTAAGGGC CGACTCACCC TCTCCAGAGA CAATTCCAAG AACACCCTGT TCCTGGAAAT GACCAGTCTA AGGTCTGAGG ACACGGCCAT GTATTACTGT GCAAGAGCGT CCTATGATGG AGGGTACTTT GACTGCTGGG GCCAAGGCAC CTCTCTCACA GTCTCTCAG CAAAACGAC ACCCCCATCT GTCTATCCAC TGGCCCCTGG ATCTGCTGCC CAAACTAACT CCATGGTGAC CCTGGGATGC
104	1.815 轻 链可变 区多核 苷酸序 列	ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC TCTGGGTCC AGGTTCCTACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGCTG TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAAGTGTC AGTACATCTG GCTATAGTTA TATACACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCACCCAAA CTCCTCATCT ATCTTGCATC CGACCTAGAA TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGATCTGGGG CAGCCTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGAGGA TGCTGCAACC TATTACTGTC ACCACAGTAG GGAGCTTCCA TTCACGTTCC GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GTGCCTCAGT CGTGTGC
105	1.846 重 链可变 区多核 苷酸序 列	AGAGGAGCCA AACCTGGAT TCCCAGGTCC TCACATTCAG TGATCAGCAC TGAACACAGA CCACTCACCA TGGACTCCAG GCTCAATTGA GTTTTCTTGG TCCTTATTTT AAAAGGTGTC CAGTGTGAGG TGCAGCTGGT GGAGTCTGGG GGAGACTTAG TGAAGCCTGG AGGGTCCCTG AACTCTCCT GTGCAGCCTC TGGATTCACT TTCAGTGAAT ATGGAATGCA CTGGCTTCGT CAGGCTCCAG AGAAGGGGCT GGAGTGGGTT GCATATATTA GTAGTGGCAG TACTACCCTC TCTATGCAA ACACAATGAA GGGCCGATC ACCATCTCCA GAGACAATGC

[0310]

		CAAGAAAACC CTGTCCCTGC AAATGACCAG TCTGAGGTCT GAGGACACGG CCATTATTA CTGTGCGCGG AAAAATTACA ACGGTGGTTA CTTCGATGTC TGGGGCACAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCAGCCAAAA CAACACCCCC ATCAGTCTAT CCACTGGCCC CTGGGTGTGG AGATACAACT GGTTCCTCTG TGA CTCTGGG ATGCCTGGTC AAGGG
106	1.846 轻 链可变 区多核 苷酸序 列	ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC TCTGGGTTC AGGTCCACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGTTG TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAAGTGTG AGTGAATCTG GCTATAGTTA TATGCACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCACCCAAA CTCTCATCT ATCTTGCAIC CAACCTAGAG TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGGGGA TGCTACAACC TATTACTGTC AGCACAGTAG GGTCTTCCT CCCACGTTCC GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GTGC
107	2.78 重 链可变 区多核 苷酸序 列	GACAGAGGAG CCAAGCCCTG GATCCCAAG TCCTCACATT CAGTGATCAG CACTGAACAC AGACCACTCA CCATGGACTC CAGGCTCAAT TTAGTTTTC TTGTCTTAT TTTAAAAGGT GTCCAGTGTG ATGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCT TAGTGCAGCC TGGAGGGTCC CGGAAACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC ACTTTCAGTA GCTTTGGCAT GCACTGGGT CGTCAGGCTC CAGAGAAGGG ACTGGAGTGG GTGCAATACA TTA CTAGTGG CAGTGGTGCC ATCTACTATG CAGACACAGT GAGGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAC TCCCAAGAAC ACCCTGTTCC TGCAGATGAC CAGTCTAAGG TCTGAGGACA CGGCCATGTA TTA CTGTGCA AGATCGGCTG ATGTTTGGGA CTACTGGGGT CAAGGAACCT CAGTCACCGT CTCCTCAGCC AAAACAACAC CCCATCAGT CTATCCACTG GCCCCTGGGT GTGGAGATAC AACTG
108	2.78 轻 链可变 区多核 苷酸序 列	CAGCCTCACA CTGATCACAC ACAGACATGA GTGTGGCCAC TCAGGTCTCTG GGGTTGCTGC TGCTGTGGCT TACAGATGCC AGATGTGACA TCCAGATGAC TCAGTCTCCA GCCTCCCTAT ATGTATCTGT GGGAGAACT GTCAACATCA CATGTCGAGC AAGTGAGAAT ATTACAGTA ATTAGCATG GTATCAGCAG AAACAGGGAA AATCTCCTCA GCTCCTGGTC TATGGTGCAA CAAACTTAGC AGATGGTGTG CCATCAAGGT TCAGTGGCAG TGGATCAGGC ACACAGTATT CCCTCAAGAT CAACAGCCTG AAGTCTGAAG ATTTGGGAG TTATTACTGT CAACATTTT GGGGTACTCC ATTCACGTTT GGCTCGGGGA CAAAGTTGGA AATAAACGG GCTGATGCTG CACCAACTGT ATCCATCTTC CCACCATCCA GTGAGCAGTT AACATCTGGA GGTGCCCTCAG TCGTGTGC
109	2.1029 重链可 变区多 核苷酸 序列	ATCTCCTCAC TAGAGCCCC ATCAGAGCAT GGCTGTCTCTG GTGCTGTTCC TCTGCCCTGGT TGCAATTCCA AGCTGTGTCC TGTCACAGGT GCAGCTGAAG GAGTCAGGAC CTGGCCTGGT GCGCCCTCA CAGAGCCTGT CCATCACTTG CACTGTCTCT GGGTTTTCAT TAACCAGCTA TGGTGTACAC TGGGTTCGCC AGCCTCCAGG AAAGGGTCTG GAGTGGCTGG GAGTAATATG GGCTGGTGG AGCACAAAT ATAATCGGC TCTCATGTCC AGACTGAGCA

[0311]

		TCAGCAAAGA CAACTCCAAG AGCCAAAGTTT TCTTAAAAAT GAACAGTCTG CAAACCTGATG ACACAGCCAT CTACTTCTGT GCCAGAGATG GCGACTACGG TACTATCTAC GCTATGGACT ACTGGGGTCA AGGAACCTCA GTCACCGTCT CCTCAGCCAA AACAAACAGCC CCATCGGTCT ATCCACTGGC CCCTGTGTGT GGAGATACAA CTGGCTCCTC GGTGACTCTA GGATGCCTGG TCAAGG
110	2.1029 轻链可 变区多 核苷酸 序列	ATTGAAGTCA AGACTCAGCC TGGACATGAT GTCCTCTGCT CAGTTCCTTG GTCTCCTGTT GCTCTGTTT CAAGGTACCA GATGTGATAT CCAGATGACA CAGACTACAT CCTCCCTGTC TGCCTCTCTG GGAGACAGAG TCACCATCAG TTGCAGGGCA AGTCAGGACA TTAGCAATTA TTTAAACTGG TATCAGCAGA AACCAGATGG AACTGTAAAA CTCTGATCT ACTACACATC AAGATTACAC TCAGGAGTCC CATCAAGGTT CACTGGCAGT GGGTCTGGAA CAGATTATTC TCTCACCATT AGCAACCTGG AGCAAGAAGA TATTGCCACT TACTTTTGGC AACAGGGTAA AACGCTTCTT CGGACGTTCG GTGGAGGCAC CATGCTGGAA ATCAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTAA ACATCTGGAG GTGCCTCAGT CGTGTC
111	人源化 Ab (HumA b) 2.78 重链可 变区多 核苷酸 序列	gaggtgcagc tgggtggagag cggcggcgcc cgggtgcagc ccggcggcag ccgagactg agctgcgctg ccagcggctt caccctcage agctcggca tgcactgggt gaggcaggcc ccggcgaagg gcctggagtg ggtagctac atcaccagcg gcagcggcgc catctactac gccgacagcg tgaagggcag attaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgcegtgt actactgcgc cagaagcgcc gacggcctgg actactgggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagc
112	HumAb 2.78 重 链多核 苷酸序 列	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTGT CACTGCAGGC TCAAGCGGAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGCAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTCAGCAGC TTCGGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC ACCAGCGGCA GCGGCGCCAT CTACTACGCC GACAGCGTGA AGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACC GCGGTGTA CTACTGCGCCAG AAGCGCCGAC GGCTTGGACT ACTGGGGCCA GGGCACCACC GTGACCGTGA GCAGCGATGT GTGGGGCCAG GGCACCACCG TGACCGTGAG CAGCGCGTCG ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG CCCTGCTCCA GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC TGACCAGCGG CGTGACACCC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGACC TCCAGCAACT TCGGCACCCA GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA AGACAGTTGA GCGCAAATGT TGTGTGAGT GCCCACCCTG CCCAGCACCA CCTGTGGCAG GACCGTCAGT CTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA

[0312]

		GCCACGAAGA CCCCAGAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCATGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCAGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCA TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACA CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGA
113	HumAb 2.78 轻 链可变 区多核 苷酸序 列	gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgga cagagtgaac atcacctga gagccagcga gaacatctac agcaacctgg ccgtgtacca gcagaagccc ggcgaagccc ccaagctgct gatctacggc gccaccaacc tggccgacgg cgtgccagc agatcagcg gcagcggcag cggcacccgac ttcacctga ccacagcag cctgcagccc gaggactcg ccacctacta ctgccagcac ttctggggca cccccttac ctteggccag ggcaccaagg tggagatc
114	HumAb 2.78 轻 链多核 苷酸序 列	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TAICTTCCTG TTCTCTGTT CTA CTCCAGC TTGGGCAGAC ATCCAGATGA CCCAGAGCCC CAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGCGACAG AGTGACCATC ACCTGCAGAG CCAGCGAGAA CATCTACAGC AACCTGGCCT GGTACCAGCA GAAGCCCGGC AAGGCCCCCA AGCTGCTGAT CTACGGCGCC ACCAACCTGG CCGACGGCGT GCCCAGCAGA TTCAGCGGCA GCGGCAGCGG CACCGACTTC ACCCTGACCA TCAGCAGCCT GCAGCCCGAG GACTTCGCCA CCTACTACTG CCAGCACTTC TGGGGCACCC CCTTCACCTT CGGCCAGGGC ACCAAGGTGG AGATCAAACG TACGGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTCTATCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCAGGAG AGTGTACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCACAGG GGAGAGTGTT GA
115	HumAb 2.1029 重链可 变区多 核苷酸 序列	cagggtcagc tgcaggagag cggcccggc ctggtgaage ccagcgagac cctgagcctg acctgacccg tgagcggtt cagcctgacc agctacggcg tgcaetggat cagacagccc cccggcaagg gcctggagtg gatcgcgctg atctgggccc gggcagcac caactaac cccagcctga agagcagagt gacctcagc gtggacacca gcaagaacca gtcagcctg aagctgagca gcgtgaccgc cggcgacacc gccgtgact actgcgccag agacggcgac tacggcaca tctacgcat ggactactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc
116	HumAb 2.1029	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTTG CACTGCAGGC TCAAGCGCAG GTGCAGCTGC AGGAGAGCGG CCCCAGCCTG

[0313]

	重链多核苷酸序列	GTGAAGCCCA GCGAGACCTT GAGCCTGACC TGCACCGTGA GCGGCTTCAG CCTGACCAGC TACGGCGTGC ACTGGATCAG ACAGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGAT CGGCGTGATC TGGGCCGGCG GCAGACCAA CTACAACCCC AGCCTGAAGA GCAGAGTGAC CATCAGCGTG GACACCAGCA AGAACCAGTT CAGCCTGAAG CTGAGCAGCG TGACCGCCGC CGACACCGCC GTGTACTACT GCGCCAGAGA CGGCGACTAC GGCACCATCT ACGCCATGGA CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT GAGCAGCGAT GTGTGGGGCC AGGGCACCAC CGTGACCGTG AGCAGCGCGT CGACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCGTGACA CCTTCCCGGC TGTCCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGA CCTCCAGCAA CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTCGA GTGCCACCG TGCCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCATGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTT CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCGTG CACCAAGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACACAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA
117	HumAb 2.1029 轻链可变区多核苷酸序列	gacatecaga tgaccagag cccageage ctgagcgcca gctgggaga cagagtgaac atcactgea gagccageca ggacatcage aactactga actggtacca gcagaagecc ggcaaggece ccaagtgtct gatetactac accageagac tgcacagegg cgtgeccage agattcageg gcageggcag eggcaccgac ttacacttea ccatcagcag cctgcagecc gaggacatg ccactacta ctgcccageag ggcaagaccc tgeccagaac ctgagggegc ggcaccaagg tggagatc
118	HumAb 2.1029 轻链多核苷酸序列	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCCAGATGA CCCAGAGCCC CAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGCGACAG AGTGACCATC ACCTGCAGAG CCAGCCAGGA CATCAGCAAC TACCTGAACT GGTACCAGCA GAAGCCCCGC AAGGCCCCCA AGCTGCTGAT CTACTACACC AGCAGACTGC ACAGCGGCGT GCCCAGCAGA TTCAGCGGCA GCGGCAGCGG CACCGACTTC ACCTTACCA TCAGCAGCCT GCAGCCCGAG GACATCGCCA CCTACTACTG CCAGCAGGGC AAGACCCTGC CCAGAACCTT

		CGGCGGCGGC ACCAAGGTGG AGATCAAACG TACGGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCICT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCC TCACAAAGAG CTTCACAGG GGAGAGTGTT GA
119	HumAb 1.802 重 链可变 区多核 苷酸序 列	gaggtgcagc iggtggagag cggcgccggc ctggtgcagc ccggcggcag ccigagactg agctgcgccg ccageggctt cacttcagc gactacggca tgcactgggt gagacagccc cccggcaagg gcctggagtg ggtagctac atcagcagcg gcagcagaac cgtgtactac gccgacagcg tgaaggcag attcaceate agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agacgaggac accgcccgtg actactgcgc cagaaagcac tacaacggcg gctacttoga cgtgtggggc cagggcaccc tggtagccgt gagcagc
120	HumAb 1.802 重 链多核 苷酸序 列	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTTG CACTGCAGGC TCAAGCGGAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCCG CGGCGGCCCTG GTGCAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGCGCCGCCA GCGGCTTAC CTTACAGCGAC TACGGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC AGCAGCGGCA GCAGAACCGT GTACTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AAAGCACTAC AACGGCGGCT ACTTCGACGT GTGGGGCCAG GGCACCCTGG TGACCGTGAG CAGCGATGTG TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAAT CAGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGACCT CCAGCAACTT CGGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCAC CTGTGGCAGG ACCGTGAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTACAG TGCCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTT CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAA GGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAAC TACAAGACCA

[0314]

[0315]

		CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA
121	HumAb 1.802 轻 链可变 区多核 苷酸序 列	gacatcgtga tgaccagag ccccgacage ctggccgtga gectgggega gagagccacc atcaactgca gagccagcaa gatcgtgagc accagcggc acagctacat gcactggtae cagcagaagc ccggccagcc ccccaaagtg ctgatctacc tggccagcaa cctggagagc ggcgtgcccg acagattcag cggcagcggc agcggcaccg acttcacct gaccatcage agcctgcagg ccgaggacgt ggcgtgtiac tactgccagc acagcagaga gctgcccccc acctcggcc agggcaccaa gctggagalc
122	HumAb 1.802 轻 链多核 苷酸序 列	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC AACTGCAGAG CCAGCAAGAT CGTGAGCACC AGCGGCTACA GCTACATGCA CTGGTACCAG CAGAAGCCCG GCCAGCCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCAACCT GGAGAGCGGC GTGCCCGACA GATTCAGCGG CAGCGGCAGC GGCACC GACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGACTACT TGCCAGCACA GCAGAGAGCT GCCCCCACC TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CTTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA
123	HumAb 1.815 重 链可变 区多核 苷酸序 列	caggtgcage tggtegagag cggcgccggc ctggtaagc ccggcgccag cctgagactg agctgcgccg ccagcggtt cacttcage gacttcgca tgcactgga cagacaggcc cccggcaagg gectggagtg ggtgagctac agcagcagcg gggcaccac cgtgtactac gcccagcagc tgaaggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagccage tacgacggcg gctacttga ctgctggggc cagggcacca ccgtgacctg gagcage
124	HumAb 1.815 重 链多核 苷酸序 列	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTG CACTGCAGGC TCAAGCGCAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCTG GTGAAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGCGCCGCCA GCGGCTTAC CTTCAGCGAC TTCGGCATGC ACTGGATCAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACAGC AGCAGCGGCG GCACCACCGT GTACTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AGCCAGCTAC GACGGCGGCT ACTTCGACTG CTGGGGCCAG GGCACCACCG TGACCGTGAG CAGCGATGTG TGGGGCCAGG

[0316]

		GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAACT CAGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGACCT CCAGCAACTT CGGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCAC CTGTGGCAGG ACCGTGAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAAATGA
125	HumAb 1.815 轻 链可变 区多核 苷酸序 列	gacatcgtga tgaccacagag ccccgacage ctgpgcgtga gcttgggga gagagccacc atcaactgea gageccagaa gacgctgagc accagcggtt acagctacat ccacttgtae cagcagaage cgggccagcc ccccaagctg ctgactacc tggccagcga cctggagagc ggcgtgcccg acagaticag cggcagcggc agcggcaccg acttaccctt gaccatcage agcctgcagg ccgaggagct ggcgtgtac tactgccacc acagcagaga gctgcccttc accttggcc agggcaccac gctggagatc
126	HumAb 1.815 轻 链多核 苷酸序 列	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC AACTGCAGAG CCAGCAAGAG CGTGAGCACC AGCGGTACA GCTACATCCA CTGGTACCAG CAGAAOCCCG GCCAGCCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCGACCT GGAGAGCGGC GTGCCCGACA GATTACGCGG CAGCGGCAGC GGCACCGACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGACTAC TGCCACCACA GCAGAGAGCT GCCCTTCACC TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAAGAGAGG CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAAG TCTACGCCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAAG

[0317]

		AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA
127	HumAb 1.846 重 链可变 区多核 苷酸序 列	gagggtgcagc tggtagagag cggcggcggc ctggtgcagc cggcggcgag cctgagactg agctgcgcgc ccagcggctt caccctcagc gactacggca tgcactgggt gagacaggcc ccgggcaaag gccgtgagtg ggtagctac atcagcagcg gcagcaccac cctgagctac ggcgacagcg tgaaggcgag atcaaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agacgaggac accgcccgtg actactgcgc cagaaagaac tacaacggcg gctacttoga cgtgtggggc cagggcaccc tggtagccgt gagcagc
128	HumAb 1.846 重 链多核 苷酸序 列	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTGTGTG CACTGCAGGC TCAAGCGGAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGCAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTCAGCGAC TACGGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC AGCAGCGGCA GCACCACCCT GAGCTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AAAGAACTAC AACGGCGGCT ACTTCGACGT GTGGGGCCAG GGCACCCTGG TGACCGTGAG CAGCGATGTG TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAAC TCGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCGGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGACCT CCAGCAACTT CGGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCAC CTGTGGCAGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TCGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTT CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAA GGCCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA
129	HumAb 1.846 轻 链可变	gacatcgtga tgaaccagag ccccgacagc ctggccgtga gcttggcgga gagagccaac atcaactgca gagccagcaa gagegtgagc gagagcggct acagctacat gactcgtac cagcagaagc ccggccagcc ccccaagctg ctgactacc tggcagcaa cctggagagc gggtgcccc acagattcag cggcagcggc

[0318]

	区多核 苷酸序 列	agcggcaccg acttcacct gaccatcage agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccage acagcagagt gctgcccccc accttcggcc agggcaccac gctggagatc
130	HumAb 1.846 轻 链多核 苷酸序 列	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC AACTGCAGAG CCAGCAAGAG CGTGAGCGAG AGCGGCTACA GCTACATGCA CTGGTACCAG CAGAAGCCCG GCGAGCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCAACCT GGAGAGCGGC GTGCCCCACA GATTTCAGCGG CAGCGGCAGC GGCACCGACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGTTACTAC TGCCAGCACA GCAGAGTGCT GCCCCCACC TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTCAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA

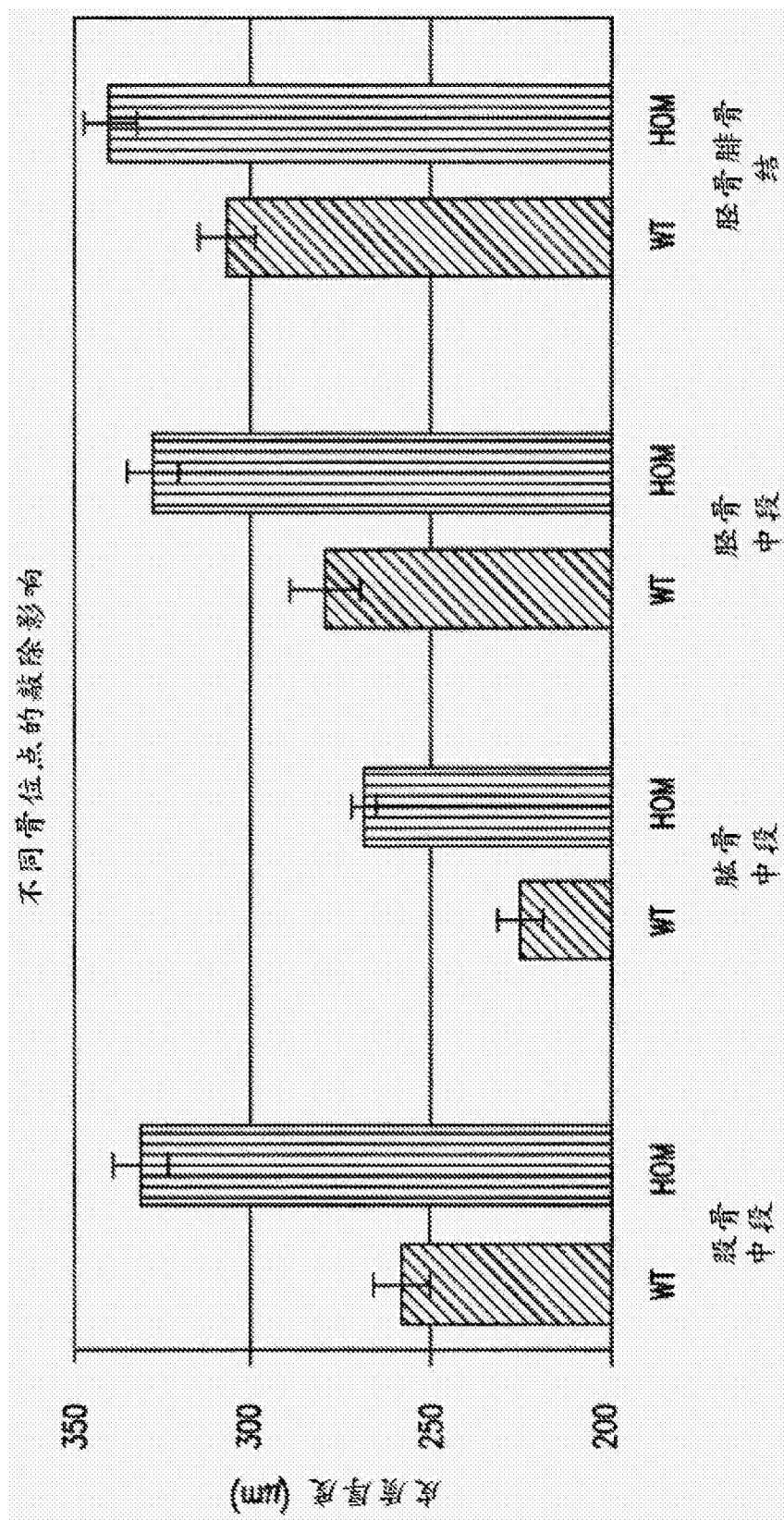


图1

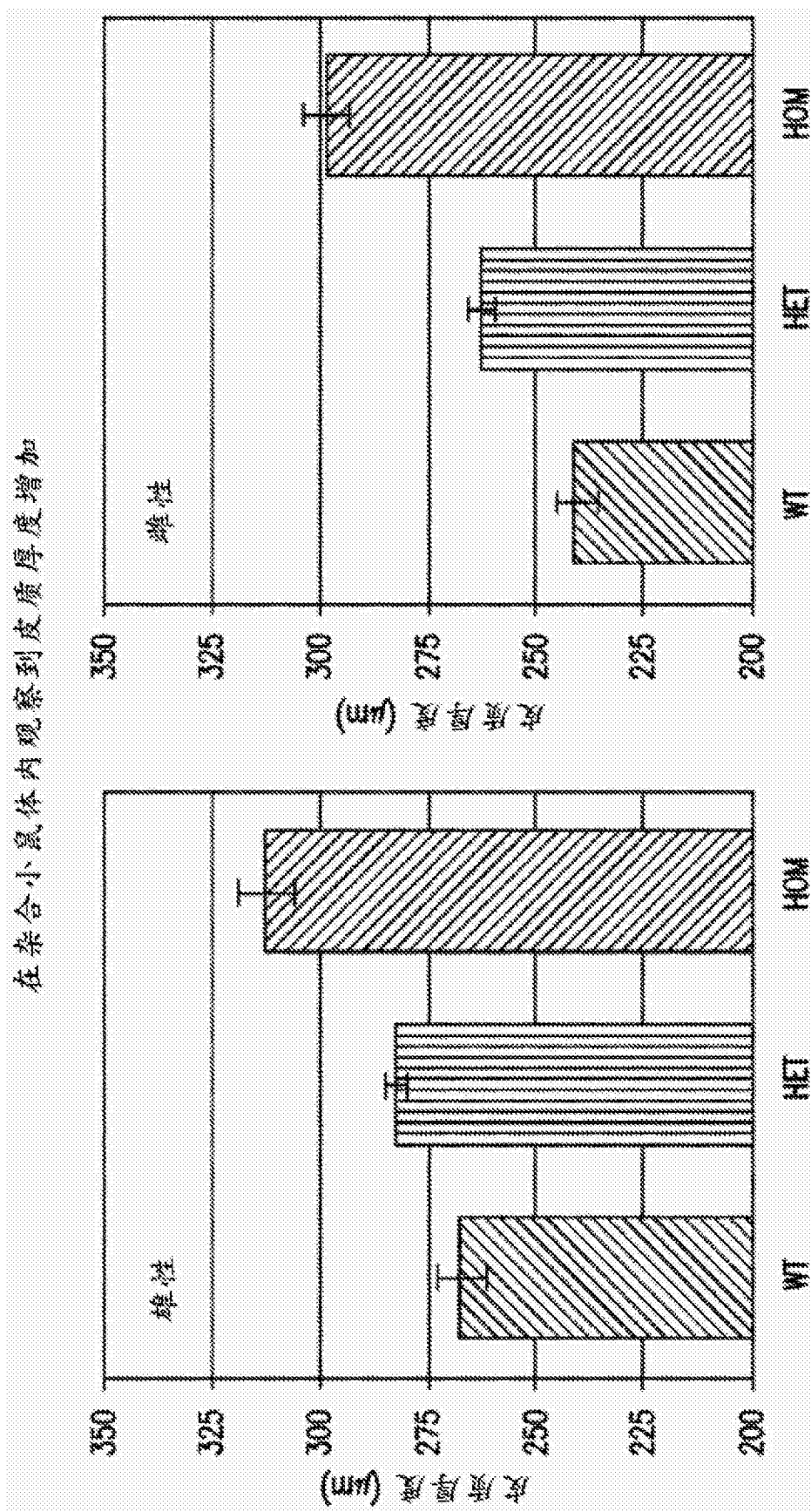
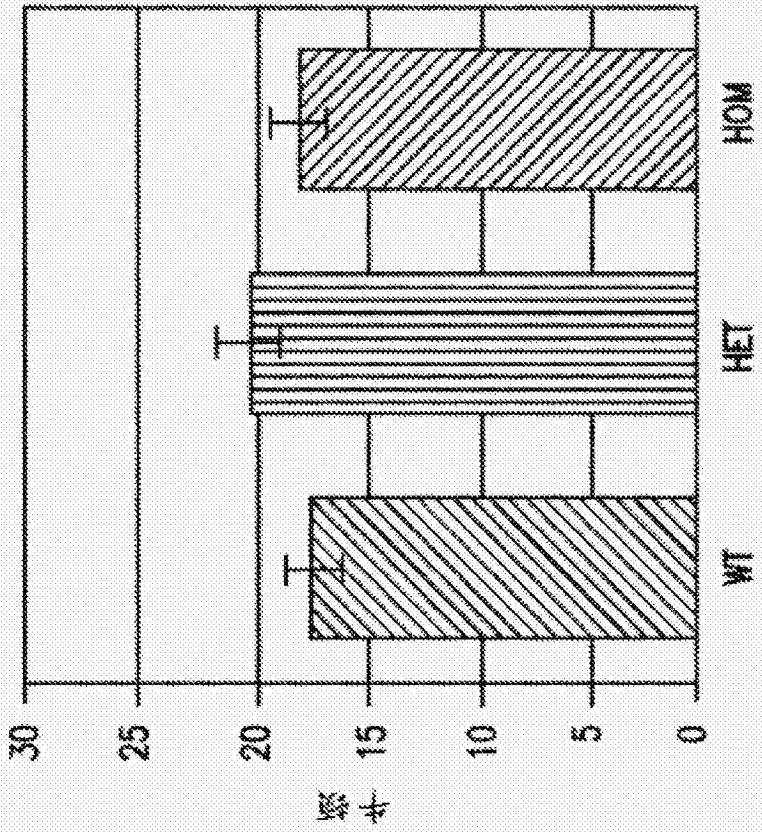


图2

雄性小鼠表现出股骨断裂强度增强

最大脊柱压缩负载



股骨4点弯曲最大负载

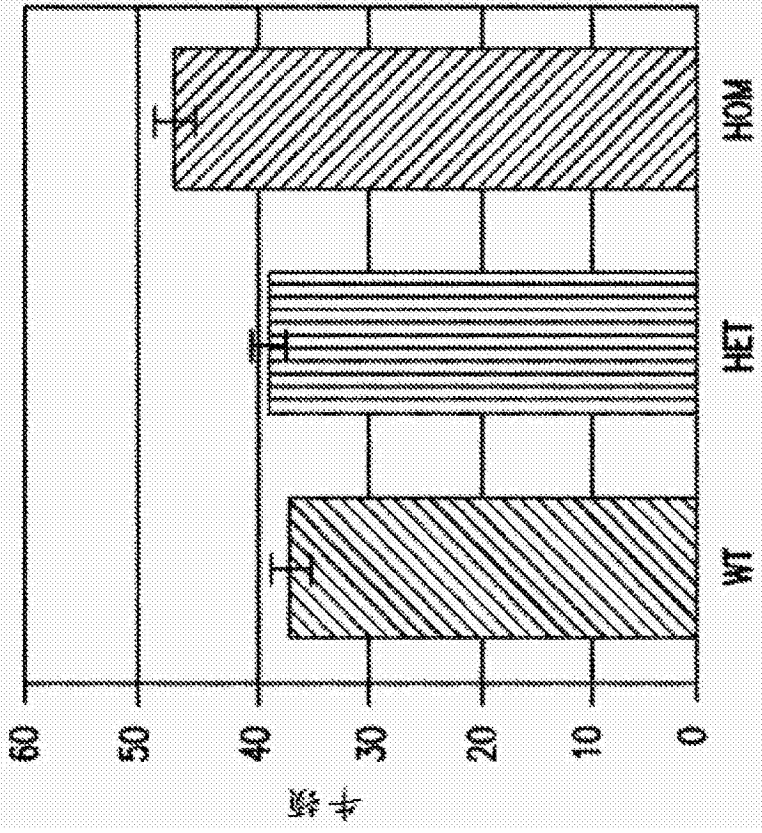


图3

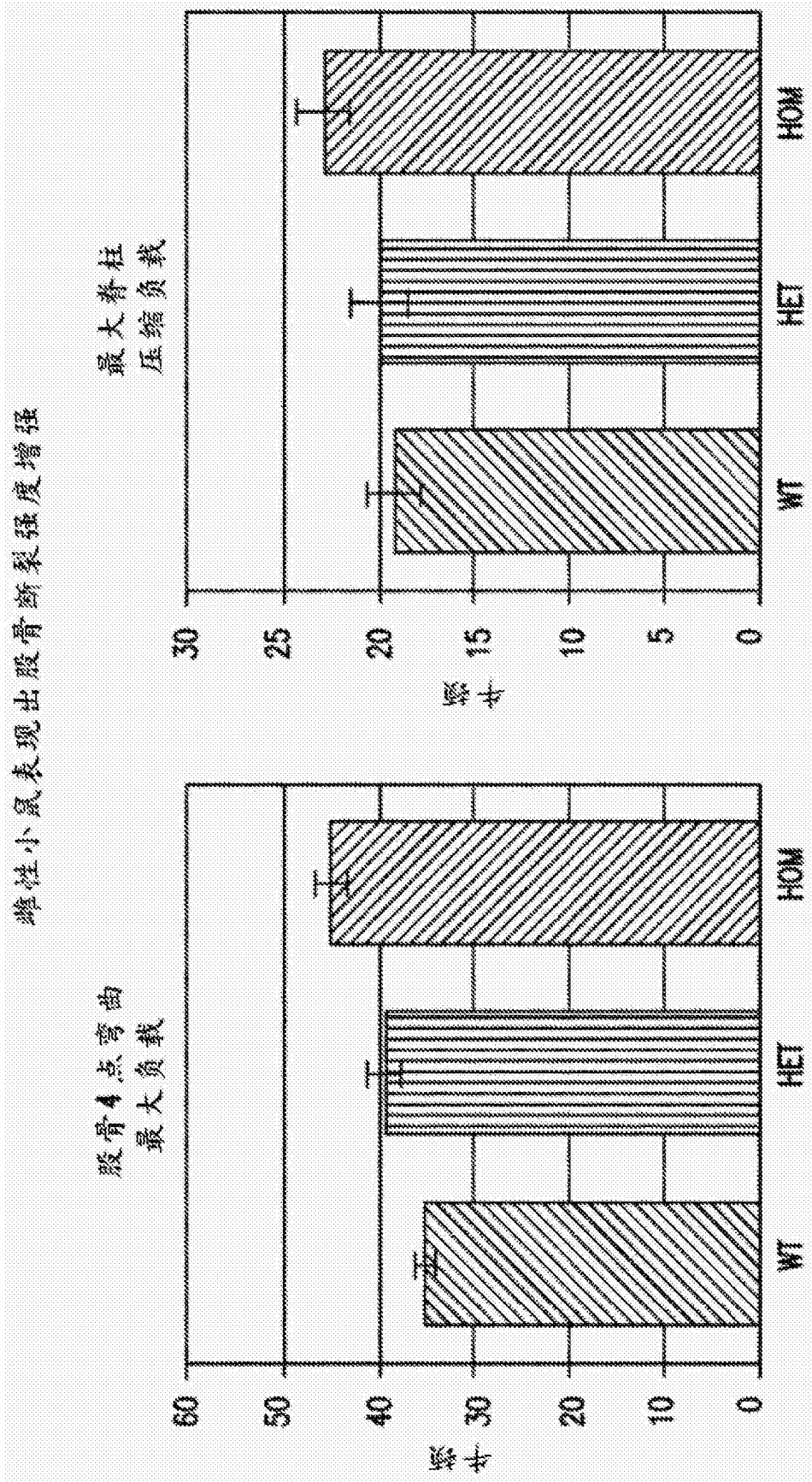


图4

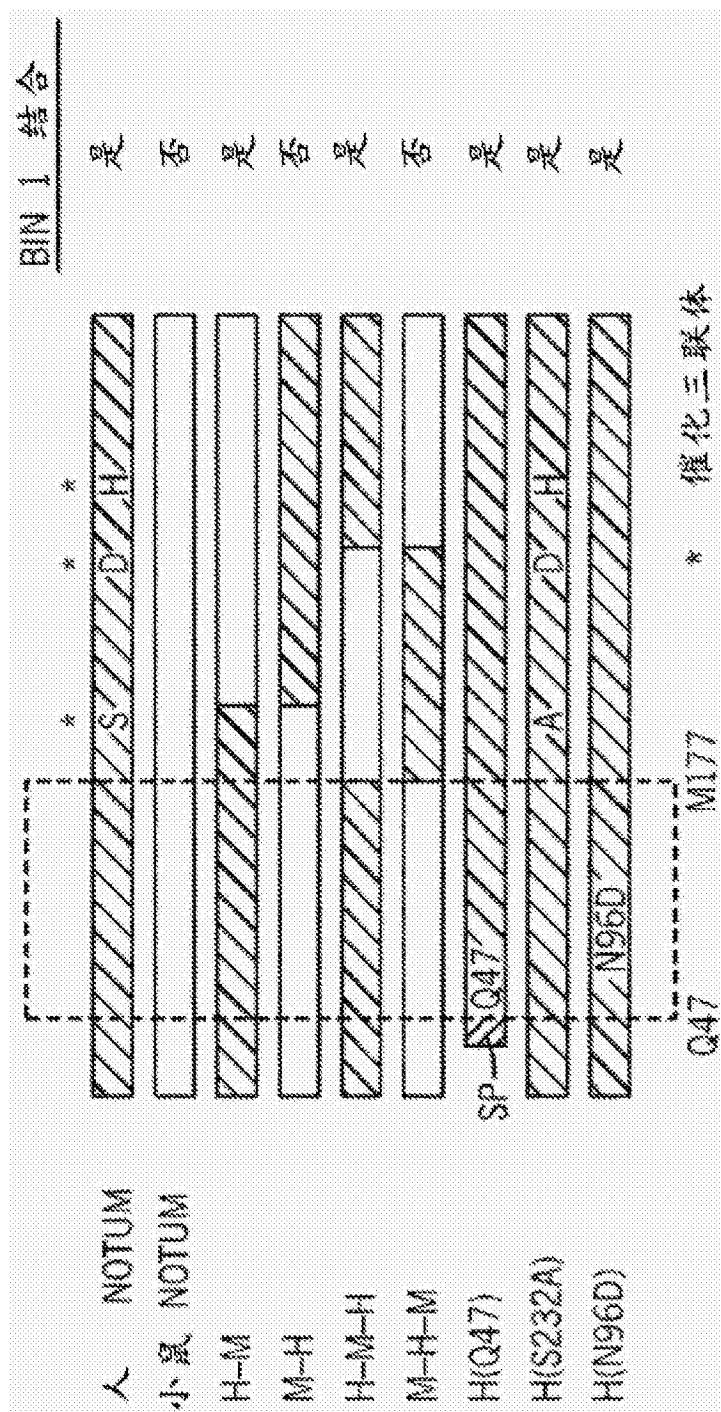


图5

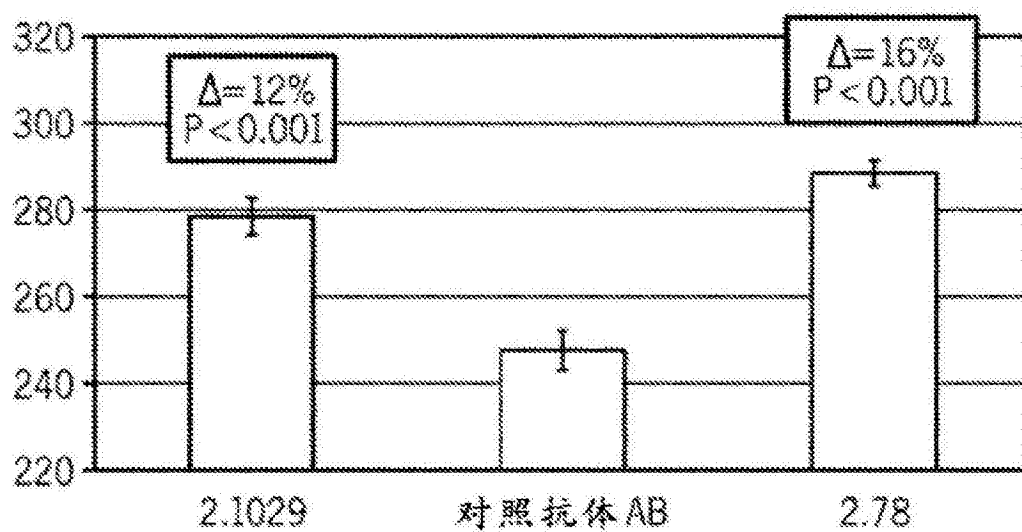
股骨中段皮质厚度 (μm)

图6

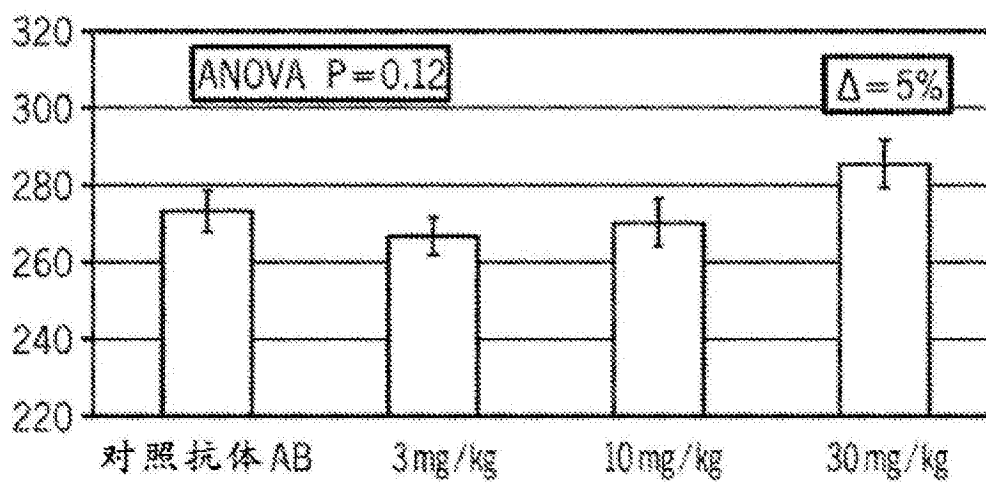
股骨中段皮质厚度 (μm)

图7

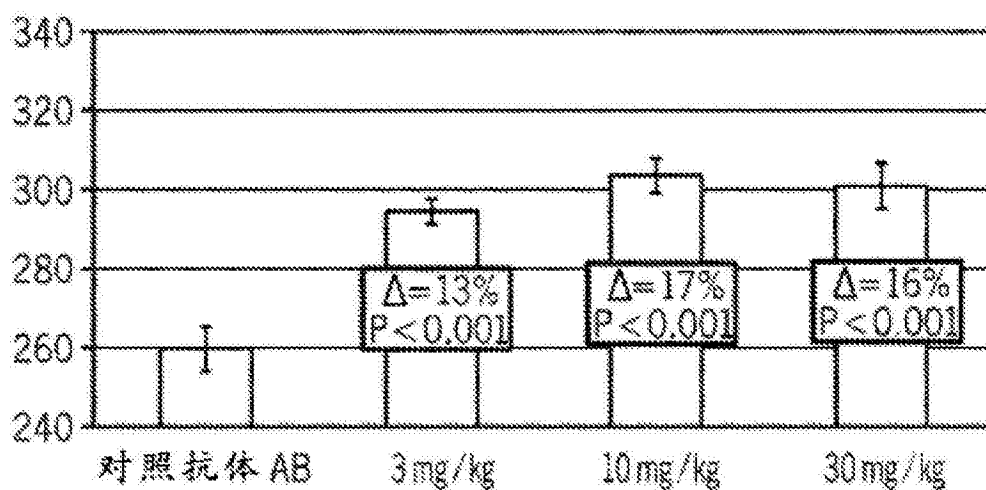
股骨中段皮质厚度 (μm)

图8A

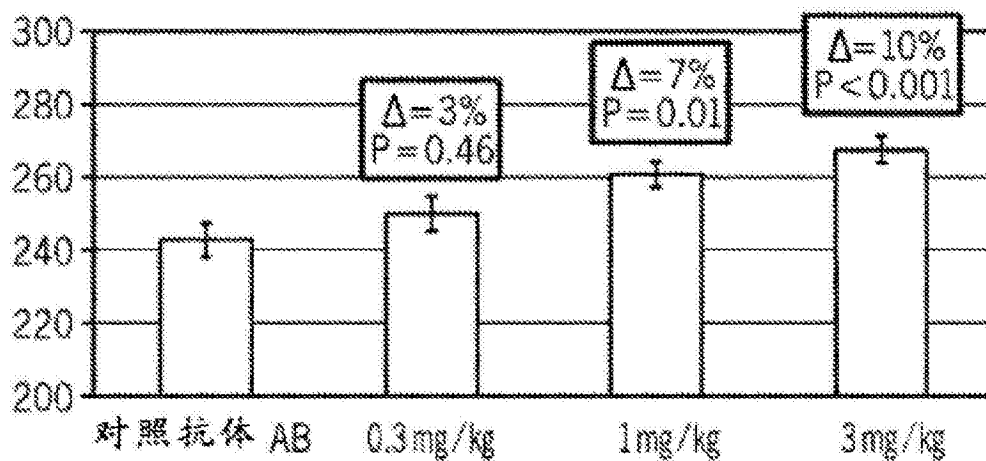
股骨中段皮质厚度 (μm)

图8B

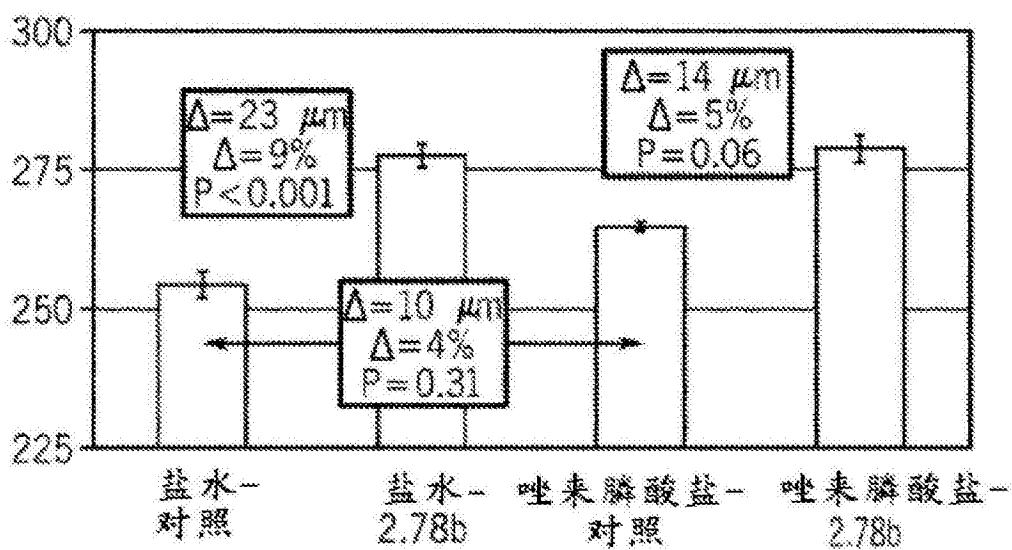
股骨中段皮质厚度 (μm)

图9A

血清 PINP (ng/ml)

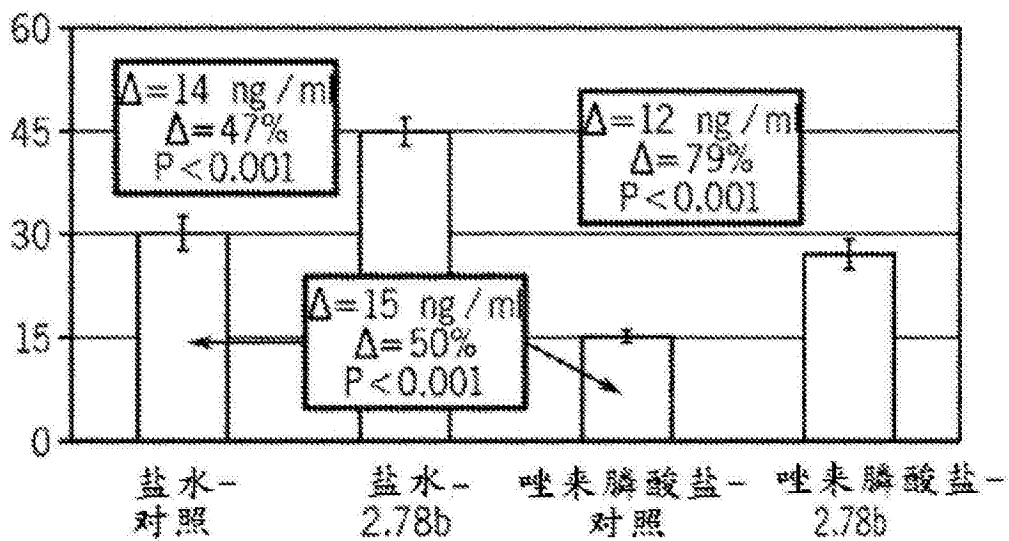


图9B

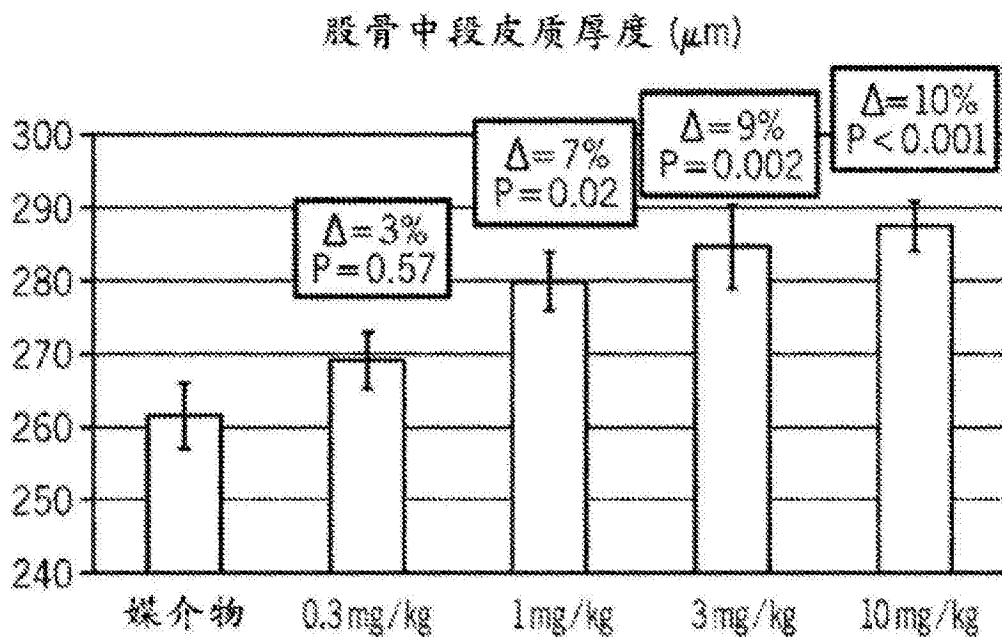


图10

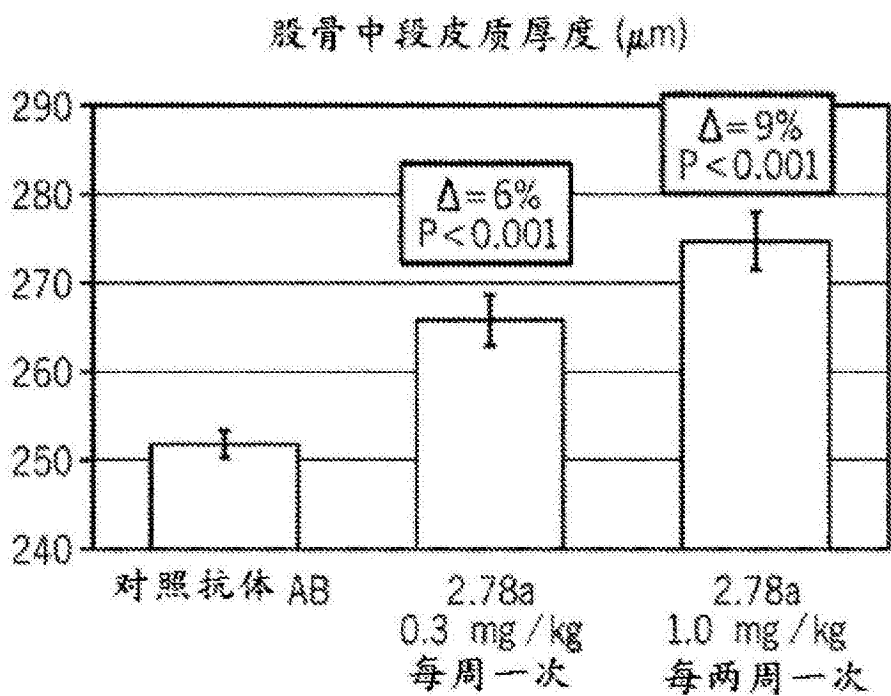


图11A

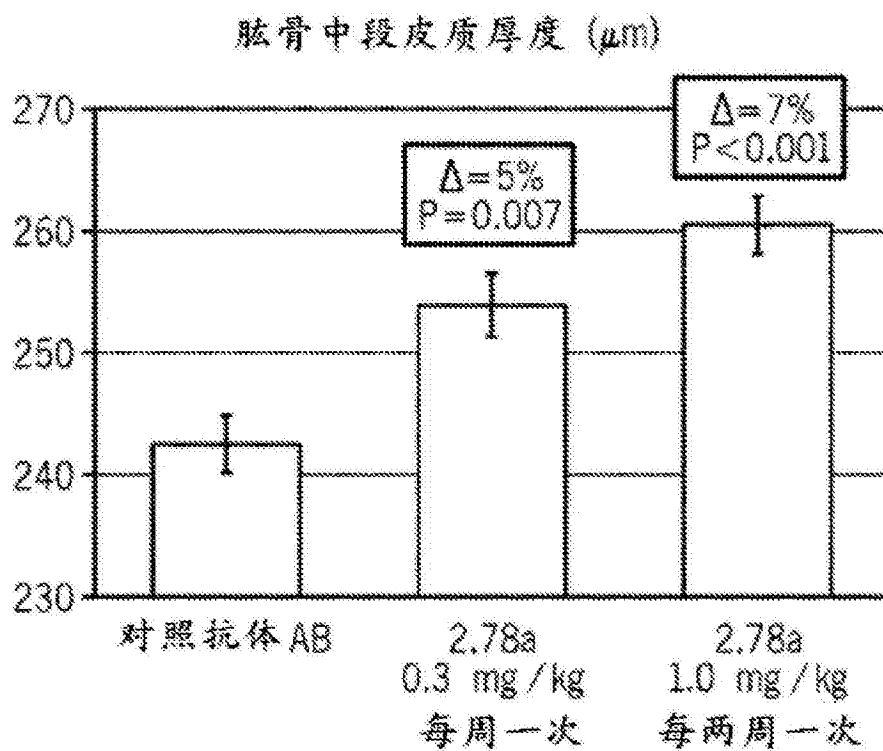


图11B

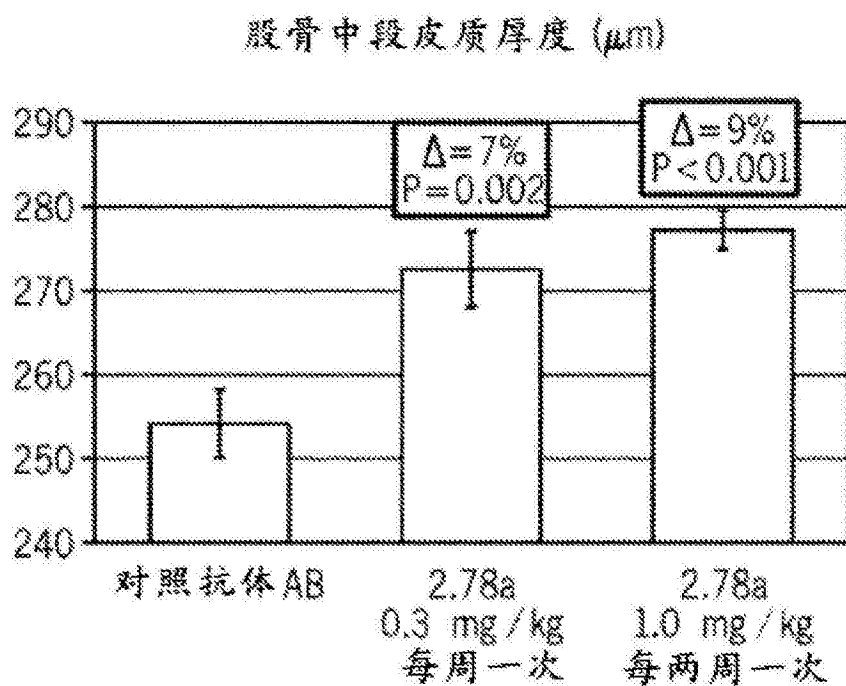


图12A

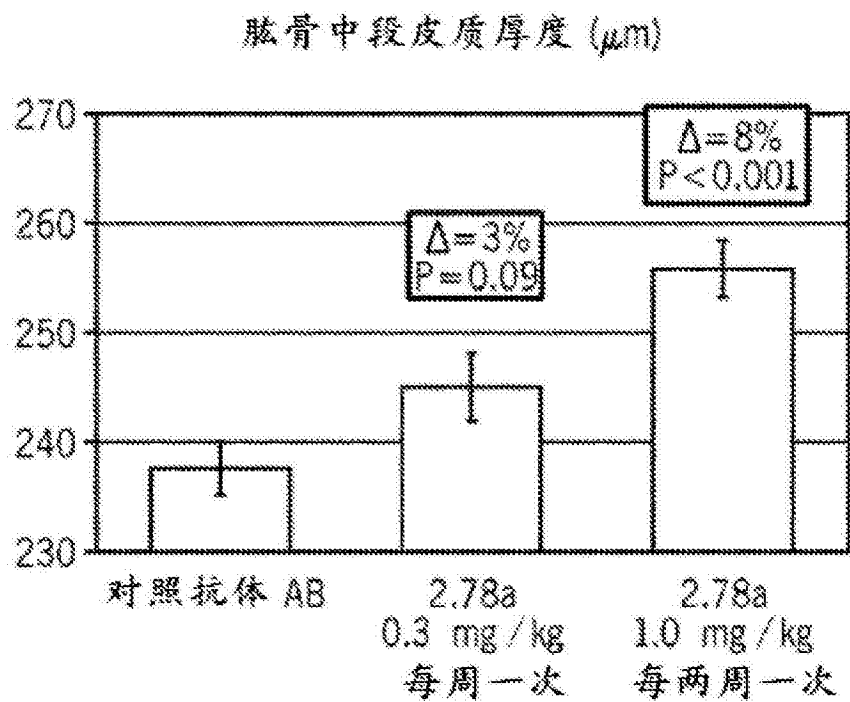


图12B

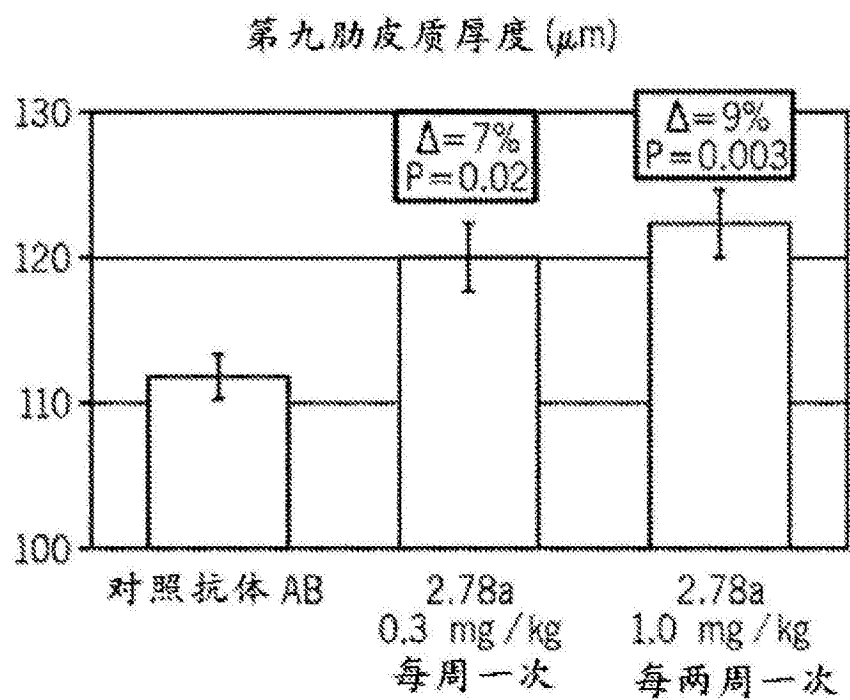


图12C

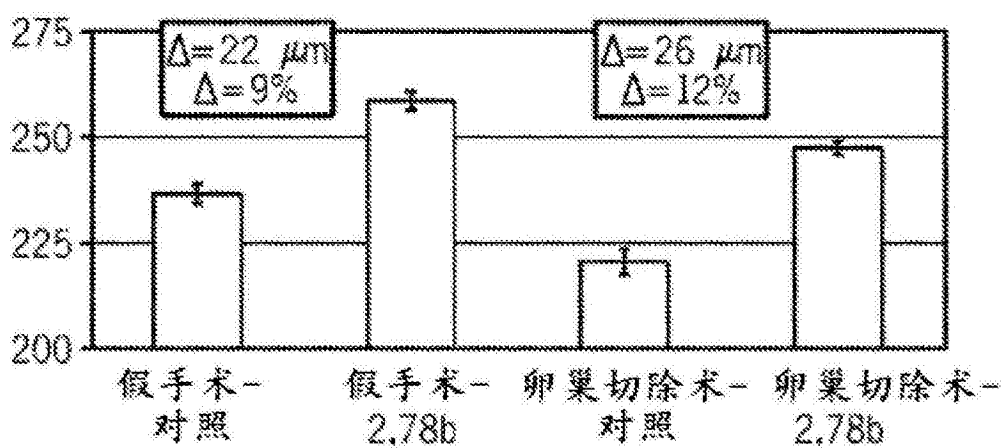
股骨中段皮质厚度 (μm)

图13A

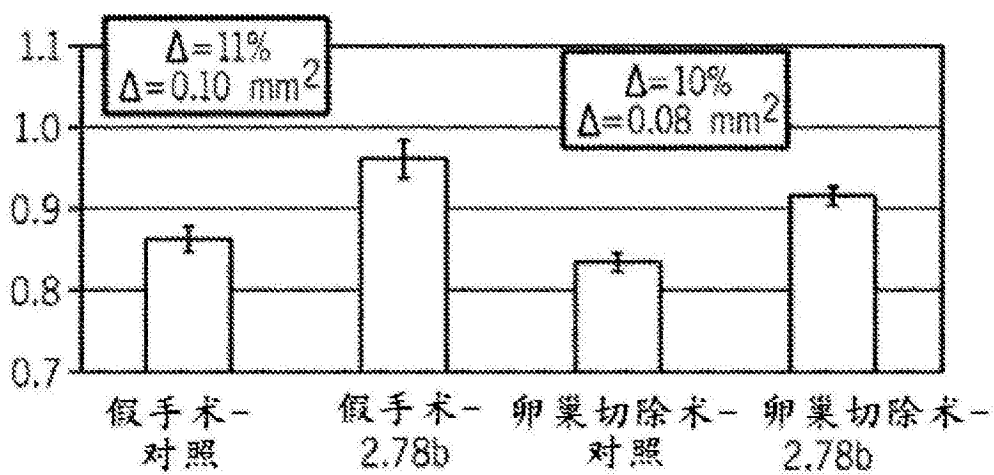
股骨中段骨面积 (mm^2)

图13B

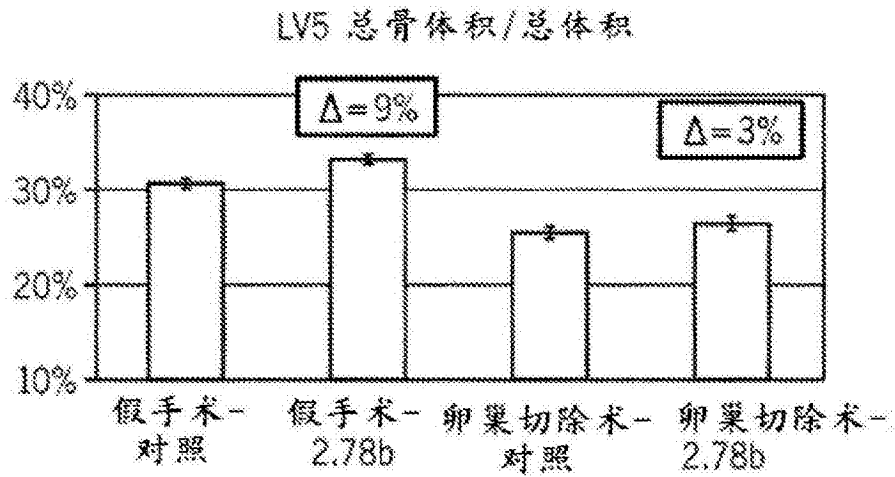


图14A

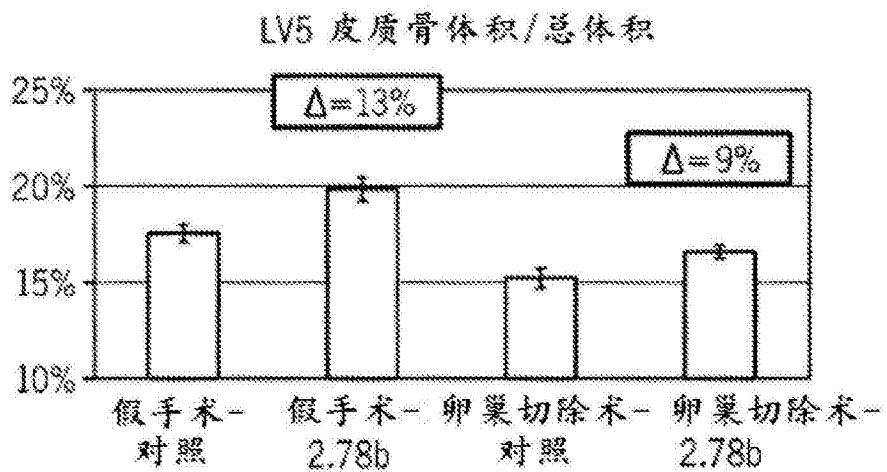


图14B

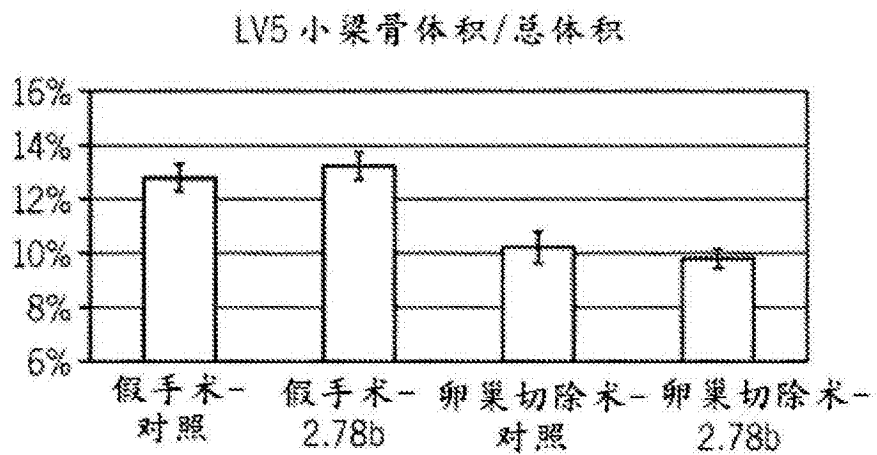


图14C

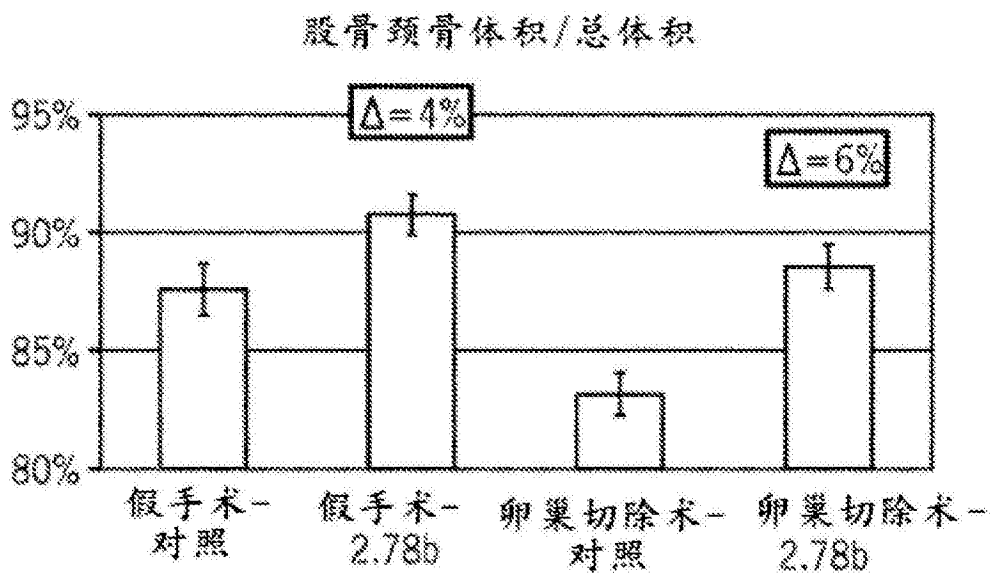


图15

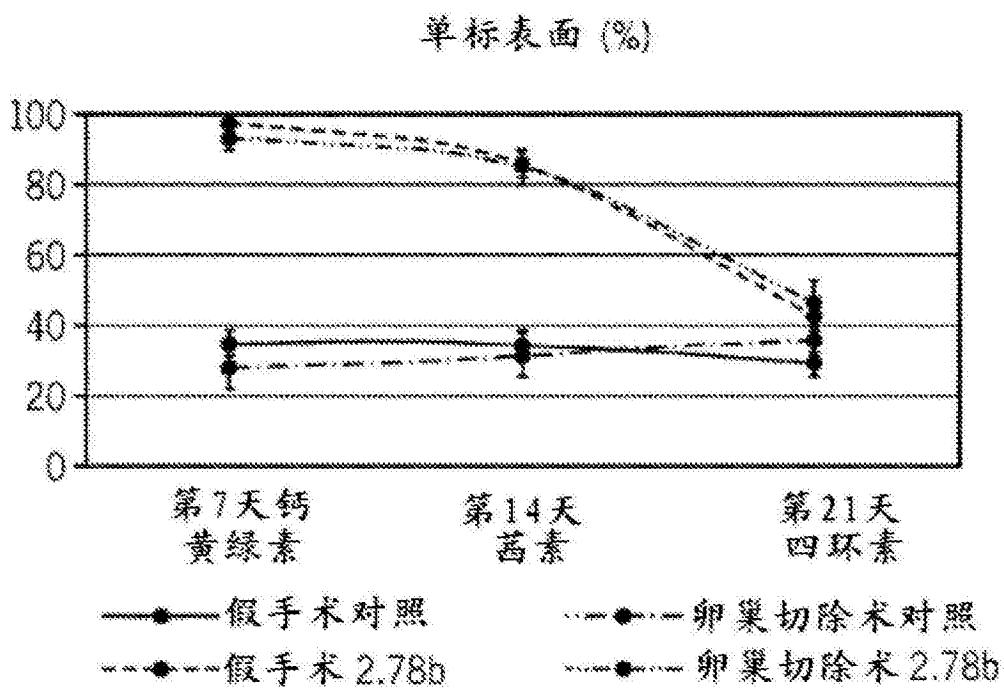


图16

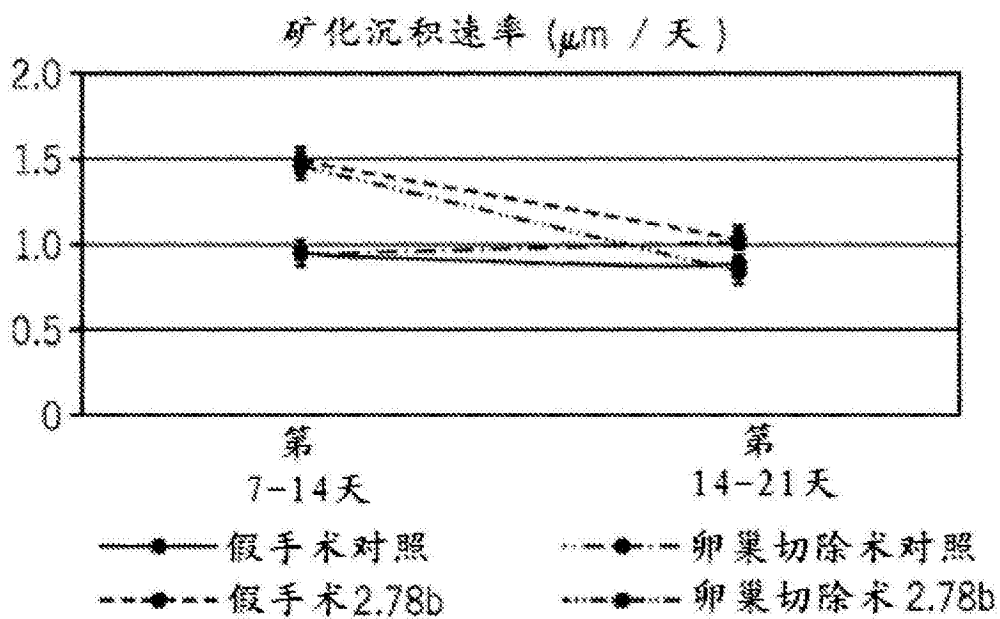


图17A

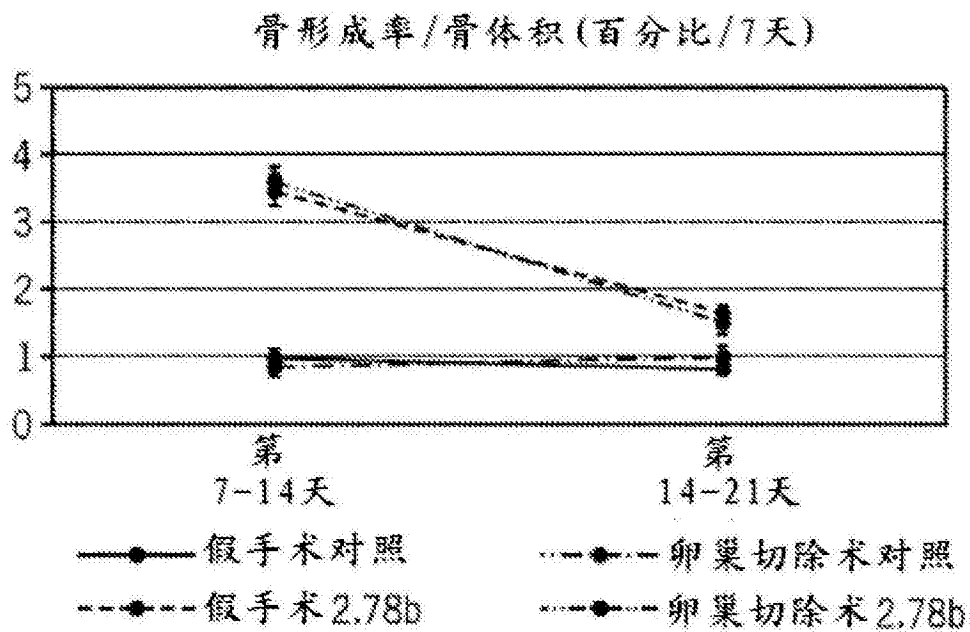


图17B