(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118271444 A
(43)申请公布日 2024.07.02

(21)申请号 202410400405.8
(22)申请日 2018.12.19
(30)优先权数据
62/607,875 2017.12.19 US
62/641,217 2018.03.09 US
62/680,522 2018.06.04 US
(62)分案原申请数据
201880086850.4 2018.12.19
(71)申请人 瑟罗泽恩奥普瑞汀公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 李阳 袁之邺 亚伦·肯·佐藤 叶文琛 克劳迪娅·伊冯·贾达 特里斯坦·威廉·福勒 海琳·巴里博 赖国宝 谢力勤 兰德尔·J·布列斯基 鲁成钢
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/22(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

权利要求书2页 说明书117页
序列表（电子公布） 附图134页

(54)发明名称

WNT替代分子和其用途

(57)摘要

本发明提供了Wnt通路激动剂和相关组合物,所述Wnt通路激动剂和相关组合物可以在用于治疗疾病的各种治疗方法中的任一种治疗方法中使用。

CN 118271444 A

1.可溶性多价多特异性Wnt替代分子,其中所述Wnt替代分子包括:

(i)与两种卷曲蛋白(Fzd)受体特异性结合的两个Fzd结合区,所述Fzd结合区包括抗体或其抗原结合片段;以及

(ii)与低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)和/或低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白6(LRP6)特异性结合的两个LRP5/6结合区,

其中两个LRP5/6结合区中的每一个都包含抗体或抗体的抗原结合片段;和

其中所述两个LRP5/6结合区中的每一个通过接头部分与两个Fzd结合区中的一个融合。

2.根据权利要求1所述的可溶性多价多特异性Wnt替代分子,其中所述Wnt替代分子包括:

(a)与两种卷曲蛋白(Fzd)受体特异性结合的两个Fzd结合区,所述Fzd结合区包括抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:(i)针对表1A或1B的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;和/或(ii)针对表1A或1B的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列;和

(b)与低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)和/或低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白6(LRP6)特异性结合的两个LRP5/6结合区,其中两个LRP5/6结合区中的每一个都包含抗体或抗体的抗原结合片段,所述抗体或抗体的抗原结合片段包括:(i)针对表2A或2B的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;和/或(ii)针对表2A或2B的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列,和

其中所述两个LRP5/6结合区中的每一个通过接头部分与两个Fzd结合区中的一个融合。

3.根据权利要求2所述的Wnt替代分子,其中所述Wnt替代分子包括:(a)两个Fzd结合区,其中每个Fzd结合区包括一个或多个抗体或其抗原结合片段,其中所述一个或多个抗体或其抗原结合片段包括:SEQ ID NO:248的CDRH1、SEQ ID NO:600的CDRH2、SEQ ID NO:757的CDRH3、SEQ ID NO:1098的CDRL1、SEQ ID NO:1175的CDRL2和SEQ ID NO:1372的CDRL3;以及

(b)两个LRP5/6结合区,其中每个LRP5/6结合区包括一个或多个抗体或其抗原结合片段,其中所述一个或多个抗体或其抗原结合片段包括:SEQ ID NO:1617的CDRH1、SEQ ID NO:1716的CDRH2和SEQ ID NO:2065的CDRH3。

4.根据权利要求3所述的Wnt替代分子,其中所述抗原结合片段选自由以下组成的组:IgG、scFv、Fab和VHH或单结构域抗体(sdAb)。

5.根据权利要求4所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区包括Fab,并且所述LRP5/6结合区包括VHH或sdAb或scFv。

6.根据权利要求5所述的Wnt替代分子,其中所述Fab存在于包括轻链和重链的完整免疫球蛋白(Ig),任选地IgG内。

7.根据权利要求6所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合区与所述轻链的N端融合。

8.根据权利要求7所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合区通过一个或多个接头部分与所述轻链融合。

9.根据权利要求8所述的Wnt替代分子,其中所述IgG包括两条轻链和两条重链,并且所

述LRP5/6结合通过接头部分与每条轻链的N端融合。

10.分离的多核苷酸,其对多肽序列进行编码,所述多肽序列包括权利要求1到9中任一项所述的Wnt替代分子的所述Fzd结合区和所述LRP5/6结合区。

11.表达载体,其包括权利要求10所述的分离的多核苷酸。

12.分离的宿主细胞,其包括权利要求11所述的表达载体。

13.药物组合物,其包括生理学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂以及治疗有效量的权利要求1到9中任一项所述的Wnt替代分子。

14.药物组合物,其包括生理学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂以及治疗有效量的权利要求10所述的多核苷酸、权利要求11所述的表达载体或权利要求12所述的宿主细胞。

15.抗Fzd抗体或其抗原结合片段,其包括,

(i)针对表1A或1B的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;和/或针对表1A或1B的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列;或

(ii)包含SEQ ID NO:1-37、129或131中的任一个或其变体的重链序列;和/或包含SEQ ID NO:38-65、130或132中的任一个或其变体的轻链序列。

16.抗LRP抗体或其抗原结合片段,其包括,

(i)针对表2A或2B的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;和/或针对表2A或2B的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列;或

(ii)包含SEQ ID NO:66-88或133中的任一个或其变体的重链序列。

WNT替代分子和其用途

[0001] 本申请是基于中国专利申请第201880086850.4号的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2017年12月19日提交的美国临时申请第62/607,875号、于2018年3月9日提交的美国临时申请第62/641,217号和于2018年6月4日提交的美国临时申请第62/680,522号的优先权,所述美国临时申请中的每个美国临时申请通过全文引用的方式并入本文。

[0004] 关于序列表的声明

[0005] 与本申请相关的序列表以文本格式提供以代替纸质副本,并且在此通过引用并入本说明书中。含有序列表的文本文件的名称为SRZN_006_03WO_ST25.txt。文本文件为1.2MB,创建于2018年12月19日并且通过EFS-Web以电子方式提交。

技术领域

[0006] 本发明总体上涉及Wnt信号传导通路激动剂分子、组合物以及所述Wnt信号传导通路激动剂分子、组合物的使用方法。此类分子可用于例如调节Wnt信号传导通路。

背景技术

[0007] Wnt(“无翅相关整合位点”或“无翅和Int-1”或“无翅-Int”)配体和其信号在控制许多基本器官和组织(包含骨、肝、皮肤、胃、肠、肾、中枢神经系统、乳腺、味蕾、卵巢、耳蜗和许多其它组织)的发育、内稳态和再生中发挥了关键作用(例如,由Clevers、Loh和Nusse综述,2014;346:1248012)。对Wnt信号传导通路的调节具有治疗变性疾病和组织损伤的潜力。

[0008] 将调节Wnt信号传导作为治疗的挑战之一是存在多种Wnt配体和Wnt受体、卷曲蛋白1-10(Fzd1-10),其中许多组织表达多种Fzd和重叠的Fzd。典型的Wnt信号还涉及作为共受体的低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)或低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白6(LRP6),除了Fzd之外,所述共受体也在各种组织中广泛表达。因此,在本领域中显然需要与一种或多种Fzd、LRP5或LRP6特异性结合以调节Wnt信号传导通路的结合部分。本发明解决了此需要。

发明内容

[0009] 在各个实施例中,本发明提供了WNT替代分子和其相关用途。

[0010] 在一个实施例中,本公开内容提供了一种可溶性二价双特异性Wnt替代分子,其中所述Wnt替代分子包括:(i)与一种或多种卷曲蛋白(Fzd)受体特异性结合的一个或多个区(Fzd结合区);以及(ii)与低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)和/或低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白6(LRP6)特异性结合的一个或多个区(LRP5/6结合区)。

[0011] 在特定实施例中,所述Wnt替代分子包括两个或更多个Fzd结合区以及两个或更多个LRP5/6结合区。在特定实施例中,一个或多个Fzd结合区包括抗体的一个或多个抗原结合片段。在特定实施例中,一个或多个抗原结合片段选自由以下组成的组:IgG、scFv、Fab和

VHH或sdAb。

[0012] 在特定实施例中,Fzd抗原结合片段中的任一个Fzd抗原结合片段包括:(i)针对表1A或1B的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;和/或(ii)针对表1A或1B的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列;或所述Fzd结合区的变体,所述变体包括一个或多个氨基酸修饰,其中所述变体在所述CDR序列中包括少于8个氨基酸取代。在特定实施例中,所述Fzd结合区中的任一个Fzd结合区包括与SEQ ID NO:1-65或129-132中所示的序列中的任一个序列具有至少90%同一性的氨基酸序列或其抗原结合片段。

[0013] 在特定实施例中,所述Fzd结合区中的任一个Fzd结合区与以下中的一种或多种结合:卷曲蛋白1(Fzd1)、卷曲蛋白2(Fzd2)、卷曲蛋白3(Fzd3)、卷曲蛋白4(Fzd4)、卷曲蛋白5(Fzd5)、卷曲蛋白6(Fzd6)、卷曲蛋白7(Fzd7)、卷曲蛋白8(Fzd8)、卷曲蛋白9(Fzd9)和卷曲蛋白10(Fzd10)。在特定实施例中,所述Fzd结合区中的任一个Fzd结合区与以下中的两种或更多种结合:卷曲蛋白1(Fzd1)、卷曲蛋白2(Fzd2)、卷曲蛋白3(Fzd3)、卷曲蛋白4(Fzd4)、卷曲蛋白5(Fzd5)、卷曲蛋白6(Fzd6)、卷曲蛋白7(Fzd7)、卷曲蛋白8(Fzd8)、卷曲蛋白9(Fzd9)和卷曲蛋白10(Fzd10)。在特定实施例中,所述Fzd结合区中的任一个Fzd结合区与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;或(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8。

[0014] 在特定实施例中,所述替代分子中的任一种替代分子包括一个或多个LRP5/6结合区,所述一个或多个LRP5/6结合区包括抗体的一个或多个抗原结合片段。在特定实施例中,所述一个或多个抗原结合片段选自由以下组成的组:IgG、scFv、Fab和VHH或sdAb。在特定实施例中,所述一个或多个LRP5/6结合区或抗原结合片段中的任一个包括:(i)针对表2的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;和/或(ii)针对表2的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列;或所述LRP5/6结合区的变体,所述变体包括一个或多个氨基酸修饰,其中所述变体在所述CDR序列中包括少于8个氨基酸取代。在特定实施例中,所述一个或多个LRP5/6结合区中的任一个LRP5/6结合区包括与SEQ ID NO:66-88或133中所示的序列中的任一个序列具有至少90%同一性的氨基酸序列或其抗原结合片段。

[0015] 在所述Wnt替代分子中的任一种Wnt替代分子的特定实施例中,所述Fzd结合区包括Fab并且所述LRP5/6结合区包括VHH或sdAb。在特定实施例中,Fab存在于包括轻链和重链的完整免疫球蛋白(Ig),任选地IgG内。在特定实施例中,所述LRP5/6结合区与所述重链的N端或C端融合。在特定实施例中,所述LRP5/6结合区与所述轻链的N端或C端融合。在某些实施例中,所述LRP5/6结合区与所述完整Ig的所述重链的N端或所述完整Ig的所述轻链的N端融合。在某些实施例中,所述LRP5/6结合区与所述完整Ig的所述重链的C端或所述完整Ig的所述轻链的C端融合。在某些实施例中,所述LRP5/6结合性Fab的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合。在某些实施例中,所述LRP5/6结合性Fab的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述LRP5/6结合性Fab的可变重链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。在特定实施例中,所述LRP5/6结合区中的任一个LRP5/6结合区通过一个或多个接头部分与所述重链或所述轻链融合。

[0016] 在所述Wnt替代分子中的任一种Wnt替代分子的某些实施例中,所述Fzd结合区包

括VHH或sdAb,并且所述LRP5/6结合区包括Fab。在特定实施例中,所述Fab存在于包括轻链和重链的完整免疫球蛋白(Ig),任选地IgG内。在某些实施例中,所述Fzd结合区与所述重链的N端或C端融合。在某些实施例中,所述Fzd结合区与所述轻链的N端或C端融合。在一些实施例中,所述Fzd结合区与所述完整Ig的所述重链的N端或所述完整Ig的所述轻链的N端融合。在一些实施例中,所述Fzd结合区与所述完整Ig的所述重链的C端或所述完整Ig的所述轻链的C端融合。在一些实施例中,所述Fzd结合性Fab的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合。在一些实施例中,所述Fzd结合性Fab的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述Fzd结合性Fab的可变重链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。在某些实施例中,所述Fzd结合区中的任一个Fzd结合区通过一个或多个接头部分与所述重链或所述轻链融合。

[0017] 在另一个实施例中,所述Fzd结合区中的任一个Fzd结合区包括Fab或Fv,并且所述LRP5/6结合区包括Fab或Fv。在特定实施例中,所述Fzd结合区的所述Fab或所述LRP5/6结合区的所述Fab或Fv存在于包括轻链和重链的完整免疫球蛋白(Ig),任选地IgG内。在特定实施例中,所述Fzd结合区的所述Fab或所述LRPp5/6结合区的所述Fab中仅一个存在于所述完整免疫球蛋白(Ig)内。在特定实施例中,所述Fzd结合区的所述Fab或Fv存在于所述完整Ig内。在特定实施例中,所述LRP5/6结合区的所述Fab或Fv与所述Ig的N端融合。在特定实施例中,所述LRP5/6结合区的所述Fab与所述Ig的C端融合。在另外的实施例中,所述LRP5/6结合区的所述Fab存在于所述完整Ig内。在特定实施例中,所述Fzd结合区的所述Fab与所述Ig的N端融合。在特定实施例中,所述Fzd结合区的所述Fab与所述Ig的C端融合。在一些实施例中,所述Fzd结合性Fab的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述Fzd结合性Fab的可变重链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。在一些实施例中,所述LRP5/6结合性Fv的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述LRP5/6结合性Fv的可变重链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。在一些实施例中,LRP5/6结合性Fv的可变重链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述LRP5/6结合性Fv的可变轻链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。在一些实施例中,所述Fzd结合性Fv的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述Fzd结合性Fv的可变重链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。在一些实施例中,所述Fzd结合性Fv的可变重链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述Fzd结合性Fv的可变轻链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。

[0018] 在另一个实施例中,所述Fzd结合区中的任一个Fzd结合区包括VHH或sdAb,并且所述LRP5/6结合区包括VHH或sdAb。在特定实施例中,所述Fzd结合区与所述Lrp5/6结合区融合,并且其中所述Fzd结合区或所述LRP5/6结合区与Fc区融合。在特定实施例中,所述Fzd结合区与Fc区的N端融合,并且其中所述LRP5/6结合区与Fc区的C端融合。在特定实施例中,所述Fzd结合区与Fc区的C端融合,并且其中所述LRP5/6结合区与Fc区的N端融合。

[0019] 在另外的实施例中,所述抗体中的任一种抗体或其一个或多个抗原结合片段是人源化的。在另外的实施例中,所述Wnt替代分子中的任一种Wnt替代分子以50μM或更低的K_D与所述一种或多种Fzd受体结合。在另外的实施例中,所述Wnt替代分子中的任一种Wnt替代分子以50μM或更低的K_D与所述LRP5和/或LRP6结合。

[0020] 在另外的实施例中,所述Wnt替代分子中的任一种Wnt替代分子调节细胞,任选地,

哺乳动物细胞中的Wnt信号传导通路。在特定实施例中,所述Wnt替代分子通过所述细胞中的所述Wnt信号传导通路增强信号传导。在特定实施例中,所述Wnt信号传导通路是典型的Wnt信号传导通路或非典型的Wnt信号传导通路。

[0021] 在相关实施例中,本公开提供了一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸对多肽序列进行编码,所述多肽序列包括Wnt替代分子的Fzd结合区中的一个或多个Fzd结合区和/或LRP5/6结合区中的一个或多个LRP5/6结合区。在特定实施例中,本公开提供了一种表达载体,所述表达载体包括分离的多核苷酸。在另外的特定实施例中,本公开提供了一种分离的宿主细胞,所述分离的宿主细胞包括表达载体。

[0022] 在相关实施例中,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括生理学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂以及治疗有效量的本文公开的Wnt替代分子中的任一种Wnt替代分子。

[0023] 在相关实施例中,本公开提供了一种用于激动细胞中的Wnt信号传导通路的方法,所述方法包括使所述细胞与Wnt替代分子中的任一种Wnt替代分子接触,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。

[0024] 在特定实施例中,本公开提供了一种用于治疗患有与Wnt信号传导减少有关的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的药物组合物,其中Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。在特定实施例中,所述疾病或病症选自由以下组成的组:骨折、骨质疏松症(例如,绝经后骨质疏松症)、骨质疏松性骨折、脊柱融合、椎体压缩性骨折、术前脊柱外科手术优化、矫形装置的骨整合、腱-骨整合、牙齿生长和再生、牙种植、牙周病、颌面重建、颌骨坏死、骨关节炎(OA)、肌营养不良症、因骨骼肌减少症或恶病质引起的肌萎缩、脱发、听觉损失(包含内和外听觉毛细胞的再生)、前庭功能减退、黄斑变性、玻璃体视网膜病变、视网膜变性疾病(包含糖尿病性视网膜病变)、影响血脑屏障完整性的疾病/病症、富克斯氏营养不良(Fuchs'dystrophy)、中风、创伤性脑损伤、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、脊髓损伤、口腔粘膜炎、短肠综合征、炎性肠病(IBD)(包含克罗恩氏病(CD)和溃疡性结肠炎(UC),具体地是伴有瘘管形成的IBD)、代谢综合征、糖尿病、血脂异常、胰腺炎、胰腺外分泌功能不全、伤口愈合、糖尿病足溃疡、冠状动脉疾病、急性肾损伤、慢性肾脏疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺纤维化(包含特发性肺纤维化)、急性肝衰竭、急性酒精性肝损伤、由于丙型肝炎病毒(HCV)引起的慢性肝病、抗病毒药物治疗后的HCV受试者、由于乙型肝炎病毒(HBV)引起的慢性肝病、纤维化、抗病毒药物治疗后的HBV受试者、慢性酒精性肝病、酒精性肝炎、非酒精性脂肪肝病和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬化以及所有原因的慢性肝功能不全。在某些实施例中,所述疾病或病症是骨骼疾病或病症。在特定实施例中,所述疾病或病症是骨骼疾病或病症,并且所述Wnt替代分子结合Fzd1、Fzd2和FZD7并且结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,所述疾病或病症是骨骼疾病或病症,并且所述Wnt替代分子结合Fzd1、Fzd2、FZD7、Fzd5和Fzd8并且还结合LRP5和/或LRP6。

[0025] 在另一个相关实施例中,本公开提供了一种用于增加有需要的受试者的骨矿物质密度、增加所述受试者的骨体积、增加所述受试者的骨皮质厚度、增加所述受试者的骨矿物质沉积速率、增加所述受试者的骨刚度、增加所述受试者的骨生物力学强度、增加所述受试者对骨折的抵抗力、减少所述受试者的骨吸收或减少所述受试者的与骨质疏松症相关的骨流失的方法,所述方法包括向所述受试者提供有效量的药物组合物,所述药物组合物包括

Wnt替代分子,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。在某些实施例中,所述Wnt替代分子结合Fzd1、Fzd2和FZD7并且结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,所述Wnt替代分子结合Fzd1、Fzd2、FZD7、Fzd5和Fzd8并且还结合LRP5和/或LRP6。

[0026] 在特定实施例中,包含涉及治疗或预防如骨质疏松症(例如,绝经后骨质疏松症)等骨骼疾病或病症的方法的本发明方法进一步包括向受试者提供抗吸收剂(与Wnt替代分子组合)。抗吸收剂的实例包含但不限于双膦酸盐或选择性雌激素受体调节剂。抗吸收剂用于增加患有骨质疏松症的个体的骨强度,并且包含五种主要类别的试剂:双膦酸盐、雌激素、选择性雌激素受体调节剂(SERM)、降钙素和如狄诺塞麦(denosumab)等单克隆抗体,所述试剂中的任一种试剂均可以使用。抗吸收剂的说明性实例包含但不限于:双膦酸盐,例如,阿仑膦酸盐通用药物(商标名:Fosamax™、Fosamax™Plus D)、利塞膦酸盐(商标名:Actonel™、Actonel™加钙)、伊班膦酸盐(商标名:Boniva™)和唑来膦酸(商标名:Reclast™);其它抗吸收剂,例如,雌激素疗法或激素疗法、雷洛昔芬(商标名:Evista™)和狄诺塞麦(Prolial™);以及合成代谢药物,例如,特立帕肽(Forteo™)。

[0027] 在另外的相关实施例中,本公开提供了一种用于增加有需要的受试者的肝脏重量与体重的比率、促进所述受试者的肝再生、增加所述受试者的肝细胞增殖或有丝分裂、减少所述受试者的肝纤维化(任选地,在慢性肝损伤后)、增加所述受试者的肝细胞功能或减少所述受试者的肝脏中的凝血时间的方法,所述方法包括向所述受试者提供有效量的包括Wnt替代分子的药物组合物,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。

[0028] 作为非限制性实例,本申请提供了以下实施方案:

[0029] 实施方案1.一种可溶性多价多特异性Wnt替代分子,其中所述Wnt替代分子包括:(i)与一种或多种卷曲蛋白(Fzd)受体特异性结合的一个或多个区(Fzd结合区);以及(ii)与低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白5(LRP5)和/或低密度脂蛋白(LDL)受体相关蛋白6(LRP6)特异性结合的一个或多个区(LRP5/6结合区)。

[0030] 实施方案2.根据实施方案1所述的Wnt替代分子,其包括一个或多个Fzd结合区和一个或多个LRP5/6结合区。

[0031] 实施方案3.根据实施方案1所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个Fzd结合区包括抗体的一个或多个抗原结合片段。

[0032] 实施方案4.根据实施方案3所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个抗原结合片段选自由以下组成的组:IgG、scFv、Fab和VHH或单结构域抗体(sdAb)。

[0033] 实施方案5.根据实施方案3到4中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个Fzd抗原结合片段包括:(i)针对表1A或1B的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;和/或(ii)针对表1A或1B的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列;或所述Fzd结合区的变体,所述变体包括一个或多个氨基酸修饰,其中所述变体在所述CDR序列中包括少于8个氨基酸取代。

[0034] 实施方案6.根据实施方案3到5中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个Fzd结合区包括与SEQ ID NO:1-65或129-132中所示的序列中的任一个序列具有至少90%同一性的氨基酸序列或其抗原结合片段。

[0035] 实施方案7.根据实施方案1到6中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个Fzd结合区与以下中的一种或多种结合:卷曲蛋白1(Fzd1)、卷曲蛋白2(Fzd2)、卷曲蛋白3

(Fzd3)、卷曲蛋白4(Fzd4)、卷曲蛋白5(Fzd5)、卷曲蛋白6(Fzd6)、卷曲蛋白7(Fzd7)、卷曲蛋白8(Fzd8)、卷曲蛋白9(Fzd9)和卷曲蛋白10(Fzd10)。

[0036] 实施方案8.根据实施方案7所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个Fzd结合区与以下中的两种或更多种结合:卷曲蛋白1(Fzd1)、卷曲蛋白2(Fzd2)、卷曲蛋白3(Fzd3)、卷曲蛋白4(Fzd4)、卷曲蛋白5(Fzd5)、卷曲蛋白6(Fzd6)、卷曲蛋白7(Fzd7)、卷曲蛋白8(Fzd8)、卷曲蛋白9(Fzd9)和卷曲蛋白10(Fzd10)。

[0037] 实施方案9.根据实施方案8所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个Fzd结合区与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;或(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8。

[0038] 实施方案10.根据实施方案1到9中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个LRP5/6结合区包括抗体的一个或多个抗原结合片段。

[0039] 实施方案11.根据实施方案10所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个抗原结合片段选自由以下组成的组:IgG、scFv、Fab和VHH或sdAb。

[0040] 实施方案12.根据实施方案1到11中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个LRP5/6结合区或抗原结合片段包括:(i)针对表2的抗体中的任何抗体所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列;和/或(ii)针对表2的抗体中的任何抗体所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列;或所述LRP5/6结合区的变体,所述变体包括一个或多个氨基酸修饰,其中所述变体在所述CDR序列中包括少于8个氨基酸取代。

[0041] 实施方案13.根据实施方案10到12中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述一个或多个LRP5/6结合区包括与SEQ ID NO:66-88或133中所示的序列中的任一个序列具有至少90%同一性的氨基酸序列或其抗原结合片段。

[0042] 实施方案14.根据实施方案1到13中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区和所述LRP5/6结合区包括表3中针对其中公开的Wnt替代分子中的任一种所示的序列。

[0043] 实施方案15.根据实施方案1到14中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区包括Fab,并且所述LRP5/6结合区包括VHH或sdAb或scFv。

[0044] 实施方案16.根据实施方案15所述的Wnt替代分子,其中所述Fab存在于包括轻链和重链的完整免疫球蛋白(Ig),任选地IgG内。

[0045] 实施方案17.根据实施方案16所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合区与所述重链的N端或C端融合或者与所述轻链的N端或C端融合。

[0046] 实施方案18.根据实施方案17所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合区通过一个或多个接头部分与所述重链或所述轻链融合。

[0047] 实施方案19.根据实施方案1到14中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区包括VHH或sdAb或scFv,并且所述LRP5/6结合区包括Fab。

[0048] 实施方案20.根据实施方案19所述的Wnt替代分子,其中所述Fab存在于包括轻链和重链的完整免疫球蛋白(Ig),任选地IgG内。

[0049] 实施方案21.根据实施方案20所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区与所述重链的N端或C端融合。

[0050] 实施方案22.根据实施方案20所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区与所述轻链的N端或C端融合。

[0051] 实施方案23.根据实施方案21或实施方案22所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区通过一个或多个接头部分与所述重链或所述轻链融合。

[0052] 实施方案24.根据实施方案1到14中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区包括Fab或Fv,并且所述LRP5/6结合区包括Fab或Fv。

[0053] 实施方案25.根据实施方案24所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区的所述Fab或所述LRP5/6结合区的所述Fab存在于包括轻链和重链的完整免疫球蛋白(Ig),任选地IgG内。

[0054] 实施方案26.根据实施方案25所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区的所述Fab或所述LRPp5/6结合区的所述Fab中仅一个存在于所述完整免疫球蛋白(Ig)内。

[0055] 实施方案27.根据实施方案26所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区的所述Fab存在于所述完整Ig内。

[0056] 实施方案28.根据实施方案27所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合区的所述Fab或Fv与所述Ig的N端融合,任选地与所述完整Ig的所述重链的N端或所述完整Ig的所述轻链的N端融合。

[0057] 实施方案29.根据实施方案27所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合区的所述Fab与所述Ig的C端融合,任选地与所述完整Ig的所述重链的C端或所述完整Ig的所述轻链的C端融合。

[0058] 实施方案30.根据实施方案27所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合性Fab的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合。

[0059] 实施方案31.根据实施方案27所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合性Fab的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述LRP5/6结合性Fab的可变重链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。

[0060] 实施方案32.根据实施方案27所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合性Fv的可变轻链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述LRP5/6结合性Fv的可变重链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。

[0061] 实施方案33.根据实施方案27所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合性Fv的可变重链区与所述完整Ig的可变重链区的N端融合,并且所述LRP5/6结合性Fv的可变轻链区与所述完整IgG的可变轻链区的N端融合。

[0062] 实施方案34.根据实施方案26所述的Wnt替代分子,其中所述LRP5/6结合区的所述Fab存在于所述完整Ig内。

[0063] 实施方案35.根据实施方案34所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区的所述Fab或Fv与所述Ig的N端融合,任选地与所述完整Ig的所述重链的N端或所述完整Ig的所述轻链的N端融合。

[0064] 实施方案36.根据实施方案34所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区的所述Fab或Fv与所述Ig的C端融合,任选地与所述完整Ig的所述重链的C端或所述完整Ig的所述轻链的C端融合。

[0065] 实施方案37.根据实施方案34所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合性Fab的所述

可变轻链区与所述完整Ig的所述可变重链区的N端融合。

[0066] 实施方案38.根据实施方案34所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合性Fab的所述可变轻链区与所述完整Ig的所述可变重链区的N端融合,并且所述Fzd结合性Fab的所述可变重链区与所述完整IgG的所述可变轻链区的N端融合。

[0067] 实施方案39.根据实施方案34或实施方案35所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合性Fv的所述可变轻链区与所述完整Ig的所述可变重链区的N端融合,并且所述Fzd结合性Fv的所述可变重链区与所述完整IgG的所述可变轻链区的N端融合。

[0068] 实施方案40.根据实施方案34或实施方案35所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合性Fv的所述可变重链区与所述完整Ig的所述可变重链区的N端融合,并且所述Fzd结合性Fv的所述可变轻链区与所述完整IgG的所述可变轻链区的N端融合。

[0069] 实施方案41.根据实施方案1到14中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区包括VHH或sdAb或scFv,并且所述LRP5/6结合区包括VHH或sdAb或scFv。

[0070] 实施方案42.根据实施方案41所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区与所述Lrp5/6结合区融合,并且其中所述Fzd结合区或所述LRP5/6结合区与Fc区融合。

[0071] 实施方案43.根据实施方案41所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区与Fc区的N端融合,并且其中所述LRP5/6结合区与Fc区的C端融合。

[0072] 实施方案44.根据实施方案41所述的Wnt替代分子,其中所述Fzd结合区与Fc区的C端融合,并且其中所述LRP5/6结合区与Fc区的N端融合。

[0073] 实施方案45.根据实施方案1到14中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述替代分子具有图1的A-D、图10的A、图15的A、图16的A或图18的A所示的结构。

[0074] 实施方案46.根据实施方案1到45中任一项所述的Wnt替代分子,其中所述其一个或多个抗原结合片段是人源化的。

[0075] 实施方案47.根据实施方案1到46中任一项所述的Wnt替代分子,其以50μM或更低的KD与所述一种或多种Fzd受体结合。

[0076] 实施方案48.根据实施方案1到47中任一项所述的Wnt替代分子,其以50μM或更低的KD与所述一种或多种LRP5/6受体结合。

[0077] 实施方案49.根据实施方案1到48中任一项所述的Wnt替代分子,其调节细胞中的Wnt信号传导通路,任选地其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0078] 实施方案50.根据实施方案49所述的Wnt替代分子,其中所述Wnt信号传导通路是典型的Wnt信号传导通路或非典型的Wnt信号传导通路。

[0079] 实施方案51.根据实施方案49或实施方案50所述的Wnt替代分子,其通过所述细胞中的所述Wnt信号传导通路增强信号传导。

[0080] 实施方案52.一种分离的多核苷酸,其对多肽序列进行编码,所述多肽序列包括根据实施方案1到51中任一项所述的Wnt替代分子的所述Fzd结合区中的一个或多个Fzd结合区和/或所述LRP5/6结合区中的一个或多个LRP5/6结合区。

[0081] 实施方案53.一种表达载体,其包括根据实施方案52所述的分离的多核苷酸。

[0082] 实施方案54.一种分离的宿主细胞,其包括根据实施方案53所述的表达载体。

[0083] 实施方案55.一种药物组合物,其包括生理学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂以及治疗有效量的根据实施方案1到51中任一项所述的Wnt替代分子、根据实施方案52所述的

多核苷酸、根据实施方案53所述的表达细胞或根据实施方案54所述的宿主细胞。

[0084] 实施方案56.一种用于激动细胞中的Wnt信号传导通路的方法,所述方法包括使所述细胞与根据实施方案1到51中任一项所述的Wnt替代分子、根据实施方案52所述的多核苷酸、根据实施方案53所述的表达细胞或根据实施方案54所述的宿主细胞接触,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。

[0085] 实施方案57.一种用于治疗患有与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据实施方案1到51中任一项所述的Wnt替代分子、根据实施方案52所述的多核苷酸、根据实施方案53所述的表达细胞、根据实施方案54所述的宿主细胞或根据实施方案55所述的药物组合物,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。

[0086] 实施方案58.根据实施方案57所述的方法,其中所述疾病或病症是骨骼疾病或病症。

[0087] 实施方案59.根据实施方案58所述的方法,其中所述Wnt替代分子结合Fzd1、Fzd2和FZD7并且结合LRP5和/或LRP6。

[0088] 实施方案60.根据实施方案59所述的方法,其中所述Wnt替代分子还结合Fzd5和Fzd8。

[0089] 实施方案61.根据实施方案57所述的方法,其中所述疾病或病症选自由以下组成的组:骨折、应力性骨折、椎体压缩性骨折、骨质疏松症、骨质疏松性骨折、不愈合骨折、延迟愈合骨折、脊柱融合、脊柱外科手术的术前优化、骨坏死、植入物或矫形装置的骨整合、成骨不全症、骨移植、腱修复、腱-骨整合、牙齿生长和再生、颌面外科手术、牙种植、牙周病、颌面重建,颌、髋或股骨头坏死,无血管性坏死、脱发、听觉损失、前庭功能减退、黄斑变性、年龄相关性黄斑变性(AMD)、玻璃体视网膜病变、视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、视网膜变性疾病、富克斯氏营养不良(Fuchs'dystrophy)、角膜疾病、中风、创伤性脑损伤、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、肌营养不良症、由骨骼肌减少症或恶病质引起的肌萎缩、影响血脑屏障(BBB)完整性的疾病、脊髓损伤、脊髓疾病、口腔粘膜炎、短肠综合征、炎性肠病(IBD)、代谢综合征、糖尿病、血脂异常、胰腺炎、胰腺外分泌功能不全、伤口愈合、糖尿病足溃疡、褥疮、静脉性下肢溃疡、大疱表皮松解、皮肤发育不全、心肌梗塞、冠状动脉疾病、心力衰竭、造血细胞病症、免疫缺陷、移植物抗宿主病、急性肾损伤、慢性肾脏疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化、所有原因的急性肝衰竭、药品诱导的急性肝衰竭;酒精性肝病,包含酒精性肝炎;所有原因的慢性肝衰竭、肝硬化、所有原因的肝纤维化、门脉高压、所有原因的慢性肝功能不全、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)(脂肪肝)、酒精性肝炎、丙型肝炎病毒诱导的肝病(HCV)、乙型肝炎病毒诱导的肝病(HBV)、其它病毒性肝炎(例如,甲型肝炎病毒诱导的肝病(HAV)和丁型肝炎病毒诱导的肝病(HDV))、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎、肝脏外科手术、肝损伤、肝移植、肝脏外科手术和移植中的"小肝(small for size)"综合征、先天性肝脏疾病和病症、由遗传疾病、变性、老化、药品或损伤引起的任何其它肝脏病症或疾病。

[0090] 实施方案62.一种用于增加骨矿物质密度、增加骨体积、增加骨皮质厚度、增加骨矿物质沉积速率、增加骨刚度、增加骨生物力学强度、增加对骨折的抵抗力或减少与骨质疏松症相关的骨流失的方法,所述方法包括向受试者提供有效量的根据实施方案55所述的药

物组合物,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。

[0091] 实施方案63.根据实施方案62所述的方法,其中所述Wnt替代分子结合Fzd1、Fzd2和FZD7并且结合LRP5和/或LRP6。

[0092] 实施方案64.根据实施方案63所述的方法,其中所述Wnt替代分子还结合Fzd5和Fzd8。

[0093] 实施方案65.一种用于增加肝脏重量与体重的比率、促进肝再生、增加肝细胞增殖或有丝分裂、减少肝纤维化,任选地在慢性肝损伤后、增加肝细胞功能或减少肝脏中的凝血时间的方法,所述方法包括向受试者提供有效量的根据实施方案55所述的药物组合物,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。

[0094] 实施方案66.根据实施方案57到65中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者提供抗吸收剂。

[0095] 实施方案67.根据实施方案66所述的方法,其用于治疗骨质疏松症,任选地绝经后骨质疏松症。

[0096] 实施方案68.一种用于抑制或减少有需要的受试者的骨吸收的方法,所述方法包括向所述受试者提供有效量的根据实施方案1到51中任一项所述的Wnt替代分子、根据实施方案52所述的多核苷酸、根据实施方案53所述的表达细胞、根据实施方案54所述的宿主细胞或根据实施方案55所述的药物组合物,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。

[0097] 实施方案69.根据实施方案68所述的方法,其进一步包括向所述受试者提供抗吸收剂。

[0098] 实施方案70.根据实施方案68或实施方案69所述的方法,其中所述受试者已经被诊断患有骨质疏松症,任选地绝经后骨质疏松症或存在骨质疏松症,任选地绝经后骨质疏松症的风险。

附图说明

[0099] 图1的A-D.Wnt替代分子的说明性形式的示意图。

[0100] 图2的A-D.Wnt替代分子R2M3-26的表征。

[0101] 图3的A-D.Wnt替代分子R2M3-32的表征。

[0102] 图4的A-B.示出了R2M3-26和R2M3-32的活性可以被可溶性Fzd ECD和不具有Lrp结合臂的单独的R2M3 IgG抑制的图形。

[0103] 图5.在293、Huh7、A375和BNL.CL2 Wnt依赖性报告基因测定法中说明性R2M3-Lrp6结合体融合物的表征。

[0104] 图6.在293、A375和BNL.CL2 Wnt依赖性报告基因测定法中说明性18R5-Lrp6结合体融合物的表征。

[0105] 图7.在293Wnt依赖性报告基因测定法中说明性18R5-Lrp5结合体融合物的表征。

[0106] 图8的A-B.在293Wnt依赖性报告基因测定法中说明性Fzd结合体-Lrp6结合体26融合物的表征。

[0107] 图9.IgG-Nab融合物形式的说明性Wnt替代分子的SAR分析。

[0108] 图10的A-B.在293Wnt依赖性报告基因测定法中Fab形式的R2M3-26的表征。

[0109] 图11的A-B.在293Wnt依赖性报告基因测定法中Fab形式的R2M3-32的表征。

[0110] 图12的A-B.在293Wnt依赖性报告基因测定法中杂Ig(Hetero-Ig)形式的R2M3-26的表征。

[0111] 图13.在293Wnt依赖性报告基因测定法中VHH/sdAb-VHH/sdAb形式、不同串联形式和Fc片段的不同端上的26-17SB9的表征。

[0112] 图14的A-H.在293Wnt依赖性报告基因测定法中串联scFv形式的18R5-LRP6结合体融合物的表征。

[0113] 图15的A-G.在293Wnt依赖性报告基因测定法中Fab-IgG形式的各种Wnt替代分子的表征。

[0114] 图16的A-C.在293Wnt依赖性报告基因测定法中F(ab')2形式的R2M3-26的表征。

[0115] 图17的A-H.在293Wnt依赖性报告基因测定法中另外的Wnt替代分子的表征。

[0116] 图18的A-C.A.2Fv-Ig形式的示意图。B-C.Wnt替代分子10SG11-1RC07的表征。

[0117] 图19.说明性Wnt替代分子的多肽链的序列。

[0118] 图20的A-B.R2M3-26的体内PK/PD表征

[0119] 图21A至图21E.示出了18R5-DKK1c的全身性表达持续14天引起骨矿物质密度增加的图像和图形。*P值<0.05;**P值<0.0001。对于每个时间点,从左到右的条形柱如下:媒剂(菱形)、罗莫珠单抗(romosozumab)(正方形)、AAV CAG-GFP(三角形)、AAV ScFv(抗GFP)-DKK1cF234K-Flag-His(倒三角形)以及AAV 18R5-DKK1c-FLagHis(圆形)。

[0120] 图22A至图22D.示出了18R5-DKK1c的全身性表达持续14天或28天引起骨体积增加的图像和图形。对于每个时间点,从左到右的条形柱如下:媒剂、罗莫珠单抗、AAV CAG-GFP、AAV ScFv(抗GFP)-DKK1cF234K-Flag-His以及AAV 18R5-DKK1c-FLagHis。*P值<0.05;**P值<0.0001,****P值<0.0001。

[0121] 图23A至图23B.示出了基于荧光染料标记的骨形成的动态参数的图形。对于每个时间点,从左到右的条形柱如下:媒剂、罗莫珠单抗、AAV CAG-GFP、AAV ScFv(抗GFP)-DKK1cF234K-Flag-His以及AAV 18R5-DKK1c-FlagHis。

[0122] 图24A至图24D.示出了18R5-DKK1c的全身性表达引起骨表面上的成骨细胞增加并且引起骨表面上的破骨细胞减少的图形和图像。对于每个时间点,从左到右的条形柱如下:媒剂、罗莫珠单抗、AAV CAG-GFP、AAV ScFv(抗GFP)-DKK1cF234K-Flag-His以及AAV 18R5-DKK1c-FlagHis。**P值<0.05。

[0123] 图25A至图25C.用于骨刚度和骨折的测定法的图示以及示出了根据指示处理的小鼠的失效极限负荷和刚度的图形。

[0124] 图26A至图26D.示出了用R2M3-26进行的全身性处理在一周后引起骨的快速且持续的增加的图形和图像。对于每个时间点,从左到右的条形柱对应于从上到下指示的处理。****指示P值<0.0001。

[0125] 图27A至图27C.示出了R2M3-26处理快速地逆转了与卵巢切除术诱导的骨质疏松症相关的骨流失的图像和图形。对于每个时间点,从左到右的条形柱对应于从上到下指示的处理。

[0126] 图28A至图28C.示出了单次注射R2M3-26快速地增加了骨体积的图像和图形。

[0127] 图29A至图29D.示出了高剂量的R2M3-26和1R-C07-26显著且快速地增加了未处理

组小鼠的骨形成的图形。对于每个时间点,从左到右的条形柱对应于从上到下指示的处理。

[0128] 图30.示出了R2M3-26和1R-C07-3增加了未处理组小鼠的骨矿物质密度的图形。对于每个时间点,从左到右的条形柱对应于从上到下指示的处理。

[0129] 图31.示出了与未处理组小鼠和假处理组的小鼠相比,切除卵巢的小鼠的每周测量的全身骨矿物质密度(BMD)的变化的图形。

[0130] 图32.在处理4周后,椎体矿物质密度的变化(以图像示出)以及以力的牛顿单位(N)测量的,在各种处理后在分离自小鼠的椎骨的对压缩性骨折的椎体抵抗力的变化(条形图)。

[0131] 图33A至图33D.在Einhorn骨折模型中Wnt替代分子的测试。示出了用Wnt替代分子处理1周(A)和6周(B)后的愈伤组织的射线照片。(C)示出了对侧股骨的全身骨矿物质密度(BMD)的变化的图形。示出了示出愈伤组织组织体积、愈伤组织骨体积、骨体积/组织体积比率(BV/TV)和每毫米骨矿物质含量(BMC/mm)的变化的散点图(如(D)所示)以及骨切片的代表性图像。

[0132] 图34.示出了在不同Wnt替代分子给药方案的情况下每周测量的全身骨矿物质密度(BMD)变化的图形。

[0133] 图35.示出了每周从用单独的和与罗莫珠单抗组合的不同Wnt替代分子处理的小鼠测量的全身骨矿物质密度(BMD)的变化的图形。

[0134] 图36.通过ELISA测量的血清中治疗分子的水平。这些数据伴随表4中呈现的基因表达数据。

[0135] 图37的A-C.用AAV递送的Wnt替代物处理后,肝(A)、小肠(B)和结肠(C)与体重的比率。(**)p<0.01。对于每个图形,从左到右示出的处理对应于图例中的从上到下的处理。

[0136] 图38的A-B.在用重组产生的Wnt替代蛋白处理后的体重(A)以及肝脏重量与体重的比率(B)。(*)p<0.05。对于每个时间点,从左到右示出的处理对应于图例中的从上到下的处理。

[0137] 图39的A-D.响应于R2M3-26和Rspo2重组蛋白的增殖标志物的诱导。肝Ki67(A)和细胞周期蛋白D1(cyclinD1)(B)mRNA表达。分别用PCNA和磷酸化组蛋白H3抗体进行免疫组织化学染色后每10倍视野中PCNA(C)或磷酸化组蛋白H3(D)阳性细胞核的平均计数。(*)p<0.05、(**)p<0.01、(***)p<0.001、(****)p<0.0001。对于每个时间点,从左到右示出的处理对应于图例中的从上到下的处理。

[0138] 图40的A-H.AAV递送的Wnt替代物和R-脊椎蛋白在硫代乙酰胺诱导的慢性肝病模型中的功效。研究1(A)和研究2(B)的设计。在研究1(C、E、G和H)和研究2(D、F、H)中响应于AAV递送的wnt替代物和R-脊椎蛋白的肝脏重量与体重的比率(C-D)、肝脏重量(E-F)、肝胶原A1 mRNA表达(G)以及用天狼星红(H)染色的肝组织学切片中红色区域百分比。(*)p<0.05、(**)p<0.01、(***)p<0.001、(****)p<0.0001。对于每个图形,从左到右示出的处理对应于图例中的从上到下的处理(不包含基线)。

[0139] 图41的A-N.重组产生的Wnt替代物和R-脊椎蛋白在硫代乙酰胺诱导的慢性肝病模型中的功效。研究设计(A)。D-2、D0、D3、D7、D10、D14表示相对于开始用重组蛋白处理的天数。在使用Rspo2单一处理(B、D、F、H、J、L)或R2M3-26/Rspo2组合处理(C、E、G、I、K、M)的研究中,肝脏重量与体重的比率(B、C)、肝axin2 mRNA(D、E)、细胞周期蛋白D1 mRNA(F、G)和Ki67

mRNA(H、I)表达、在分别用PCNA和磷酸化组蛋白H3抗体免疫组织化学染色后每10倍视野中的PCNA(J、K)或磷酸化组蛋白H3(L、M)阳性细胞核的平均计数。在无TAA暴露的情况下从对照未处理组小鼠收集的血浆中凝血酶原时间与平均凝血酶原时间的比率(N)。(*)p<0.05、(**)p<0.01、(****)p<0.0001。通过虚线指示无TAA处理。对于每个条形图时间点,从左到右示出的处理对应于以上示出的图例中的从上到下的处理。

[0140] 图42的A-C.重组产生的Wnt替代物和R-脊椎蛋白在CCl4诱导的慢性肝病模型中的功效。研究设计(A)。响应于CCl4处理、R2M3-26和Rspo2,肝脏重量与体重的比率(B)、凝血酶原时间(C)和天狼星红染色(D)。(*)p<0.05、(**)p<0.01、(***)p<0.001、(****)p<0.0001。对于每个图形,从左到右示出的处理对应于图例中的从上到下的处理(不包含基线)。

[0141] 图43的A-D.在对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤模型中,响应于重组产生的Wnt替代物的增殖标志物的诱导。研究设计(A)。用对乙酰氨基酚处理后24小时和48小时的血清丙氨酸转移酶水平(B)。相对的细胞周期蛋白D1(C)和Ki67(D)mRNA表达。(*)p<0.05、(***)p<0.001、(****)p<0.0001。

[0142] 图44的A-D.在对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤模型中,响应于R-脊椎蛋白的增殖标志物的诱导。研究设计(A)。用对乙酰氨基酚处理后24小时和48小时的血清丙氨酸转移酶水平(B)。相对的细胞周期蛋白D1(C)和Ki67(D)mRNA表达。(**)p<0.01、(***)p<0.001、(****)p<0.0001。

[0143] 图45的A-D.在对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤模型中,响应于Wnt替代物和R-脊椎蛋白的增殖标志物的诱导。研究设计(A)。用对乙酰氨基酚处理后24小时、36小时、48小时和60小时的血清丙氨酸转移酶水平(B)。相对的细胞周期蛋白D1(C)和Ki67(D)mRNA表达。(*)p<0.05、(****)p<0.0001。对于每个时间点,从左到右示出的处理对应于图例中的从上到下的处理。

[0144] 图46的A-D.重组产生的Wnt替代物和R-脊椎蛋白对在对乙酰氨基酚诱导的肝损伤后小鼠的存活率的功效。研究设计(A)。用对照抗eGFP控制蛋白或R2M3-26(B)、Rspo2(C)或R2M3-26和Rspo2的组合(D)重组蛋白处理的小鼠的存活率曲线。

具体实施方式

[0145] 本公开涉及与一种或多种Fzd受体和一种或多种LRP5或LRP6受体结合并调节下游Wnt信号传导通路的Wnt替代分子。在特定实施例中,Wnt替代分子激活Wnt信号传导通路或增加通过Wnt信号传导通路的信号传导。在特定实施例中,本文公开的Wnt替代分子包括:(i)与一种或多种Fzd受体特异性结合的一种或多种抗体或其抗原结合片段,所述一种或多种抗体或其抗原结合片段包含具有特定Fzd受体特异性和/或功能性质的抗体或其抗原结合片段;以及(ii)与LRP5和/或LRP6特异性结合的一种或多种抗体或其抗原结合片段。某些实施例涵盖有利于增加下游Wnt通路信号传导和相关生物学效应的Wnt替代分子的一个或多个Fzd结合区和一个或多个LRP5/6结合区的具体结构形式或排列。

[0146] 本发明的实施例涉及Wnt替代分子在诊断、评定和治疗与Wnt信号传导通路相关的疾病和病症中的用途。在某些实施例中,主题Wnt替代分子用于调节细胞或组织中的Wnt信号传导通路。在某些实施例中,主题Wnt替代分子用于治疗或预防与Wnt信号传导异常或失调(例如,减少)相关的疾病和病症或针对其调节(例如,增加)Wnt信号传导将提供治疗益处

的疾病和病症。

[0147] 除非特别相反地指出,否则本发明的实践将采用本领域范围内的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法,其中许多方法在下文中出于说明的目的而描述。此类技术在文献中进行了充分解释。参见例如,《现代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》或《现代免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》,纽约州纽约市的约翰威利父子公司(John Wiley&Sons,New York,N.Y.)(2009);Ausubel等人,《精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology)》,第3版,威利父子公司(Wiley&Sons),1995;Sambrook和Russell,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(第3版,2001);Maniatis等人《分子克隆:实验室手册》(1982);《DNA克隆:实用方法(DNA Cloning:A Practical Approach)》第I&II卷(D.Glover编辑);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(N.Gait编辑,1984);《核酸杂交(Nucleic Acid Hybridization)》(B.Hames&S.Higgins编辑,1985);《转录和翻译(Transcription and Translation)》(B.Hames&S.Higgins编辑,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.Freshney编辑,1986);Perbal,《分子克隆实用指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)》(1984)以和其它相似参考文献。

[0148] 如在本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个”、“一种”以及“所述”包含复数指代,除非上下文另有明确指示。

[0149] 贯穿本说明书,除非上下文另外要求,否则词语“包括”或如“包括了”或“包括着”等变体应当理解为意指包含一个所述的要素或整体、或多个要素或整体的组,但不排除任何其他一个要素或整体、或多个要素或整体的组。

[0150] 除非另外明确地说明,否则本说明书中的每个实施例在进行必要的修改后适用于所有其它实施例。

[0151] 标准技术可以用于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书执行,或者如本领域通常实现的或如本文所述的执行。这些和相关的技术和程序通常可以根据本领域熟知的并且如在本说明书通篇引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所描述的常规方法执行。除非提供具体的定义,否则与本文所述的分子生物学、分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学结合使用的命名和所述分子生物学、分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学的实验室程序和技术是本领域公知和常用的那些。标准技术可以用于重组技术、分子生物学、微生物学、化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及受试者的治疗。

[0152] 本发明的实施例涉及与一种或多种Fzd受体结合的抗体和其抗原结合片段。SEQ ID NO:1-65或129-132、表1A和1B以及表3示出了说明性抗体或其抗原结合片段或其互补决定区(CDR)的序列。可以用于或存在于本文公开的Wnt替代分子中的抗Fzd抗体和其抗原结合片段包含但不限于于2017年12月19日提交的题为“抗卷曲蛋白抗体和使用方法(Anti-Frizzled Antibodies and Methods of Use)”、代理人案卷号为SRZN-004/00US的美国临时申请第62/607,877号中描述的那些。

[0153] 本发明的实施例涉及与LRP5和/或LRP6结合的抗体和其抗原结合片段。SEQ ID NO:66-88或133、表2A和2B以及表3示出了说明性抗体或其抗原结合片段或其互补决定区

(CDR)的序列。可以用于或存在于本文公开的Wnt替代分子中的抗LRP5/6抗体和其抗原结合片段包含但不限于于2017年12月19日提交的题为“抗LRP5/6抗体和使用方法(Anti-LRP5/6Antibodies and Methods of Use)”、代理人案卷号为SRZN-005/00US的美国临时申请第62/607,879号中描述的那些。

[0154] 如本领域众所周知的,抗体是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个表位识别位点特异性结合如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等靶标的免疫球蛋白分子。如本文所使用的,所述术语不仅涵盖完整多克隆或单克隆抗体,而且涵盖其片段(如dAb、Fab、Fab’、$F(ab')_2$、Fv)、单链(scFv)、VHH或sdAb、其合成变体、天然存在的变体、包括抗体或其抗原结合片段的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体以及包括具有所需特异性的抗原结合位点或片段(表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰构型。作为通过基因融合构建的多价或多特异性片段的“双功能抗体”或2scFV-Ig抗体(WO94/13804;P.Holliger等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》906444-6448,1993)也是本文设想的抗体的特定形式。本文还包含包括连接到CH3结构域的scFv的迷你体(S.Hu等人,《癌症研究(Cancer Res.)》,56,3055-3061,1996)。参见例如Ward,E.S.等人,《自然(Nature)》341,544-546(1989);Bird等人,《科学(Science)》,242,423-426,1988;Huston等人,《美国国家科学院院刊(PNAS USA)》,85,5879-5883,1988;PCT/US92/09965;WO94/13804;P.Holliger等人,《美国国家科学院院刊》90 6444-6448,1993;Y.Reiter等人,《自然生物技术(Nature Biotech)》,14,1239-1245,1996;S.Hu等人,《癌症研究》,56,3055-3061,1996。

[0155] 如本文所使用的术语“抗原结合片段”是指含有与关注的抗原,特别是一种或多种Fzd受体或LRP5或LRP6受体结合的免疫球蛋白重链和/或轻链或VHH或sdAb的至少一个CDR的多肽片段。在这方面,本文所描述的抗体的抗原结合片段可以包括本文所示的来自结合一种或多种Fzd受体或LRP5和/或LRP6的抗体的VH和VL序列的1个、2个、3个、4个、5个或所有6个CDR。在特定实施例中,抗原结合片段可以包括所有三个VH CDR或所有三个VL CDR。类似地,其抗原结合片段可以包括VHH或sdAb的所有三个CDR。Fzd特异性抗体的抗原结合片段能够与Fzd受体结合。LRP5/6特异性抗体的抗原结合片段能够与LRP5和/或LRP6受体结合。如本文所使用的,所述术语不仅涵盖分离的片段,而且涵盖包括本文所公开的抗体的抗原结合片段的多肽,例如,包括本文所公开的抗体的抗原结合片段的融合蛋白,例如,包括结合一种或多种Fzd受体的VHH或sdAb和结合LRP5和/或LRP6的VHH或sdAb的融合蛋白。

[0156] 术语“抗原”是指能够由如抗体等选择性结合剂结合并且另外能够在动物中使用以产生能够结合所述抗原的表位的抗体的分子或分子的一部分。在某些实施例中,当结合剂(例如,Wnt替代分子或其结合区)在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其靶抗原时,所述结合剂被认为与抗原特异性结合。在某些实施例中,当平衡解离常数$\leq 10^{-7}$M或$\leq 10^{-8}$M时,Wnt替代分子或其结合区(例如,抗体或其抗原结合片段)被认为与抗原特异性结合。在一些实施例中,平衡解离常数可以$\leq 10^{-9}$M或$\leq 10^{-10}$M。

[0157] 在某些实施例中,如本文所描述的抗体和其抗原结合片段包含分别插入重链与轻链框架区(FR)组之间的重链和轻链CDR组,所述FR组提供对CDR的支持并且限定CDR相对于彼此的空间关系。如本文所使用的,术语“CDR组”是指重链或轻链V区的三个超变区。从重链或轻链的N端出发,这些区分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此,抗原结合位点包含六

个CDR,其包括来自重链和轻链V区中的每个的CDR组。包括单个CDR(例如,CDR1、CDR2或CDR3)的多肽在本文中被称为“分子识别单元”。对多种抗原-抗体复合物的晶体学分析已经证明CDR的氨基酸残基形成与结合的抗原的广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3的抗原接触。因此,分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0158] 如本文所使用的,术语“FR组”是指框住重链或轻链V区的CDR组中的CDR的四个侧翼氨基酸序列。一些FR残基可以接触结合的抗原;然而,FR主要负责将V区折叠成抗原结合位点,特别是与CDR直接相邻的FR残基。在FR内,某些氨基酸残基和某些结构特征是非常高度保守的。在这方面,所有V区序列含有具有大约90个氨基酸残基的内部二硫环。当V区折叠成结合位点时,CDR被展示为形成抗原结合表面的突出的环基序。通常认识到存在FR的保守结构区,所述保守结构区将CDR环的折叠形状变成某些“典型”结构——无论精确的CDR氨基酸序列如何。进一步地,已知某些FR残基参与非共价域间接触,所述非共价域间接触使抗体重链和轻链的相互作用稳定。

[0159] 免疫球蛋白CDR和可变结构域的结构和位置可通过参考目前可在因特网(immuno.bme.nwu.edu)上获得的Kabat,E.A.等人,《具有免疫学益处的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》第4版.美国卫生与人类服务部(US Department of Health and Human Services).1987和其更新来确定。可替代地,可以通过使用可在http://www.imgt.org获得的“IMGT® (国际ImMunoGeneTics信息系统®)”来确定CDR(参见例如,Lefranc,M.-P.等人(1999)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,27:209-212;Ruiz,M.等人(2000)《核酸研究》,28:219-221;Lefranc,M.-P.(2001)《核酸研究》,29:207-209;Lefranc,M.-P.(2003)《核酸研究》,31:307-310;Lefranc,M.-P.等人(2004)《计算机生物学(In Silico Biol.)》,5,0006[Epub],5:45-60(2005)];Lefranc,M.-P.等人(2005)《核酸研究》,33:D593-597;Lefranc,M.-P.等人(2009)《核酸研究》,37:D1006-1012;Lefranc,M.-P.等人(2015)《核酸研究》,43:D413-422)。

[0160] “单克隆抗体”是指均匀抗体群,其中单克隆抗体包括表位的选择性结合中涉及的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一表位。术语“单克隆抗体”不仅涵盖完整单克隆抗体和全长单克隆抗体,而且涵盖其片段(如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv)、单链(scFv)、VHH或sdAb、其变体、包括单克隆抗体的抗原结合片段的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体以及包括具有所需特异性的抗原结合片段(表位识别位点)和结合表位的能力的免疫球蛋白分子的任何其它经修饰构型,包含本文公开的Wnt替代分子。不旨在限制关于抗体的源或其形成的方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)。术语包含整个免疫球蛋白以及以上在“抗体”定义下描述的片段等。

[0161] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割IgG分子以产生若干片段,所述片段(F(ab)片段)中的两个各自包括包含完整抗原结合位点的共价异二聚体。胃蛋白酶能够切割IgG分子以提供若干片段,包含包括两个抗原结合位点的$F(ab')_2$片段。用于根据本发明的某些实施例使用的Fv片段可以通过IgM的优先蛋白水解切割来产生,并且在极少的情况下可以通过IgG或IgA免疫球蛋白分子的优先蛋白水解切割来产生。然而,Fv片段更常见地是使用本领域已知的重组技术来衍生。Fv片段包含非共价$V_H::V_L$异二聚体,其包含保留天然抗体分子的许多抗原识别和结合能力的抗原结合位点。Inbar等人(1972)《美国国家科学院院刊》69:2659-2662;Hochman等人(1976)《生物化学(Biochem)》15:2706-2710;以及Ehrlich等人(1980)

《生物化学》19:4091-4096。

[0162] 在某些实施例中,设想单链Fv或scFV抗体。例如,κ体(Ill等人,《蛋白质工程(Prot.Eng.)》10:949-57(1997));迷你体(Martin等人,《欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J)》13:5305-9(1994));双功能抗体(Holliger等人,《美国国家科学院院刊》90:6444-8(1993));或Janusins(Traunecker等人,《欧洲分子生物学学会杂志》10:3655-59(1991)以及Traunecker等人,《国际癌症杂志增刊(Int.J.Cancer Suppl.)》7:51-52(1992))可以使用遵循本申请关于选择具有期望特异性的抗体的教导的标准分子生物学技术来制备。在其它实施例中,可以制备涵盖本公开的配体的双特异性或嵌合抗体。例如,嵌合抗体可以包括来自不同抗体的CDR和框架区,同时可以产生通过一个结合结构域与一种或多种Fzd受体特异性结合并通过第二结合结构域与第二分子特异性结合的双特异性抗体。这些抗体可以通过重组分子生物学技术来产生或者可以物理地缀合在一起。

[0163] 单链Fv(scFv)多肽是共价连接的V_H::V_L异二聚体,其根据包含通过肽编码接头连接的V_H和V_L编码基因的基因融合表达。Huston等人(1988)《美国国家科学院院刊》85(16):5879-5883。已经描述了多种方法来辨别用于将天然聚合但是化学分离的轻多肽链和重多肽链从抗体V区转换成scFv分子的化学结构,所述scFv分子将折叠成基本上与抗原结合位点的结构类似的三维结构。参见例如Huston等人的美国专利第5,091,513号和第5,132,405号;和Ladner等人的美国专利第4,946,778号。

[0164] 在某些实施例中,如本文所描述的抗体采用双功能抗体的形式。双功能抗体是多肽的多聚体,每个多肽包括第一结构域和第二结构域,所述第一结构域包括免疫球蛋白轻链的结合区,所述第二结构域包括免疫球蛋白重链的结合区,所述两个结构域被连接(例如,通过肽接头)但是不能彼此缔合以形成抗原结合位点:抗原结合位点通过多聚体内一个多肽的第一结构域与多聚体内另一个多肽的第二结构域的缔合而形成(WO94/13804)。

[0165] 抗体的dAb片段由VH结构域组成(Ward,E.S.等人,《自然》341,544-546(1989))。

[0166] 在使用双特异性抗体的情况下,这些可以是常规的双特异性抗体,其可以以各种方式制造(Holliger,P.和Winter G.《现代生物技术评论(Current Opinion Biotechnol.)》4,446-449(1993)),例如可以用化学方法制备或由杂交杂交瘤制备,或者可以是上述双特异性抗体片段中的任一种双特异性抗体片段。可以仅使用可变结构域来构建没有Fc区的双功能抗体和scFv,从而潜在地减少抗独特型反应的影响。

[0167] 与双特异性完整抗体形成对照,双特异性双功能抗体也可以是特别有用的,因为所述双特异性双功能抗体可以容易地构建并且表达于大肠杆菌(E.coli.)中。可以使用噬菌体展示(WO94/13804)来从文库中容易地选择具有合适结合特异性的双功能抗体(和许多其它多肽,如抗体片段)。如果双功能抗体的一个臂保持恒定,例如,具有针对抗原X的特异性,则可以产生其中另一个臂变化的文库并且选择具有合适特异性的抗体。双特异性完整抗体可以通过臼包杵(knobs-into-holes)工程化方法来产生(J.B.B.Ridgeway等人,《蛋白质工程》,9,616-621,1996)。

[0168] 在某些实施例中,本文所描述的抗体可以以UniBody®形式提供。UniBody®是去除了铰链区的IgG4抗体(参见GenMab Utrecht,荷兰;还参见例如,US20090226421)。此专利抗体技术产生具有比当前小抗体形式预期更长的治疗窗的稳定更小抗体形式。IgG4抗体被认为是惰性的,并且因此不与免疫系统相互作用。完整人类IgG4抗体可以通过消除抗体的

铰链区进行修饰以获得具有相比于相应完整IgG4不同的稳定性质的半分子片段(GenMab,Utrecht)。二等分IgG4分子使得仅将一个区域留在可以结合同源抗原(例如,疾病目标)的UniBody®上,并且UniBody®因此单价地仅结合靶标细胞上的一个位点。

[0169] 在某些实施例中,本公开的抗体可以采用VHH或sdAb的形式。VHH或sdAb技术最初是在发现和鉴定骆驼科(例如,骆驼和美洲驼)具有仅由重链组成并且因此缺乏轻链的全功能抗体后才开发的。这些仅有重链的抗体含有单个可变结构域(V_{HH})和两个恒定结构域(C_H2、C_H3)。克隆和分离的单个可变结构域具有完整的抗原结合能力并且非常稳定。具有其独特的结构和功能性质的这些单个可变结构域形成"VHH或sdAb"的基础。VHH或sdAb由单一基因编码,并且在几乎所有原核和真核宿主,例如,大肠杆菌(参见例如,美国专利第6,765,087号)、霉菌(例如,曲霉(Aspergillus)或木霉(Trichoderma))和酵母(例如,酵母菌(Saccharomyces)、克鲁维酵母菌(Kluyvermyces)、汉逊酵母(Hansenula)或毕赤酵母(Pichia))(参见例如美国专利第6,838,254号)中高效地产生。生产工艺是可放大的,并且已经产生多个千克量的VHH或sdAb。可以将VHH或sdAb配制为具有长保质期的即用型溶液。VHH或sdAb方法(参见例如,WO 06/079372)是一种用于基于B细胞的自动化高吞吐量选择,针对期望靶标来产生VHH或sdAb的专利方法。VHH或sdAb是骆驼科特异性的仅有重链的抗体的单结构域抗原结合片段。VHH抗体或sdAb通常具有大约15kDa的小尺寸。

[0170] 在某些实施例中,本文公开的抗体或其抗原结合片段是人源化的。这涉及通常使用重组技术制备的嵌合分子,所述嵌合分子具有衍生自来自非人类物种的免疫球蛋白的抗原结合位点以及分子的基于人类免疫球蛋白的结构和/或序列的剩余免疫球蛋白结构。抗原结合位点可以包括融合到恒定结构域上的完整可变结构域或者仅包括接枝到可变结构域中的适当框架区上的CDR。表位结合位点可以是野生型或者由一个或多个氨基酸取代修饰。这消除了作为人类个体的免疫原的恒定区,但是仍然存在对外来可变区的免疫应答的可能性(LoBuglio,A.F.等人,(1989)《美国国家科学院院刊》86:4220-4224;Queen等人,《美国国家科学院院刊》(1988)86:10029-10033;Riechmann等人,《自然》(1988)332:323-327)。用于人源化本文公开的抗Fzd抗体的说明性方法包含美国专利第7,462,697号中描述的方法。

[0171] 另一种方法不仅着重于提供人类衍生的恒定区,而且着重于修饰可变区以便将其重塑成尽可能接近人类形式。已知重链和轻链的可变区含有三个互补决定区(CDR),所述CDR响应于讨论的表位而变化并且决定结合能力,被四个框架区(FR)侧接,所述FR在给定物种中相对保守并且推定地为CDR提供支架。当关于特定表位制备非人类抗体时,可以通过将衍生自非人类抗体的CDR接枝到存在于待修饰的人类抗体中的FR上来对可变区进行"重塑"或"人源化"。已经通过以下报道了将此方法应用于各种抗体:Sato,K.等人,(1993)《癌症研究》53:851-856.Riechmann,L.,等人,(1988)《自然》332:323-327;Verhoeyen,M.,等人,(1988)《科学》239:1534-1536;Kettleborough,C.A.,等人,(1991)《蛋白质工程》4:773-3783;Maeda,H.,等人,(1991)《人抗体杂交瘤》2:124-134;Gorman,S.D.,等人,(1991)《美国国家科学院院刊》88:4181-4185;Tempest,P.R.,等人,(1991)《生物/技术(Bio/Technology)》9:266-271;Co,M.S.,等人,(1991)《美国国家科学院院刊》88:2869-2873;Carter,P.,等人,(1992)《美国国家科学院院刊》89:4285-4289;以及Co,M.S.等人,(1992)《免疫学杂志(J Immunol)》148:1149-1154。在一些实施例中,人源化抗体保留所有CDR序列

(例如,含有来自小鼠抗体的所有六个CDR的人源化小鼠抗体)。在其它实施例中,人源化抗体具有关于原始抗体改变的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),也称为"衍生自"来自原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0172] 在某些实施例中,本公开的抗体可以是嵌合抗体。在这方面,嵌合抗体包括抗体的可操作地连接或以其它方式融合到不同抗体的异源Fc部分的抗原结合片段。在某些实施例中,异源Fc域是人源。在其它实施例中,异源Fc结构域可以来自来源于亲本抗体的不同Ig类别,包含IgA(包含子类别IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(包含子类别IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)以及IgM。在另外的实施例中,异源Fc结构域可以包括来自不同Ig类别中的一种或多种的CH2和CH3结构域。如以上关于人源化抗体所述,嵌合抗体的抗原结合片段可以仅包括本文所描述的抗体的CDR中的一个或多个(例如,本文所描述的抗体的1个、2个、3个、4个、5个或6个CDR),或者可以包括整个可变结构域(VL、VH或两者)。

[0173] Wnt替代物

[0174] 在某些方面,本公开提供了结合以下两者的Wnt替代分子:一种或多种Fzd受体;以及LRP5和/或LRP6中的一种或两种。Wnt替代分子也可以被称为"Wnt替代物"或"Wnt模拟物"。在特定实施例中,Wnt替代分子结合:一种或多种人Fzd受体;以及人LRP5和/或人LRP6中的一种或两种。

[0175] 在某些实施例中,Wnt替代分子能够调节或调节与Wnt替代分子接触的细胞中的Wnt信号传导事件。在某些实施例中,Wnt替代分子增加例如通过典型的Wnt/β-连环蛋白通路的Wnt信号传导。在某些实施例中,Wnt替代分子特异性地调节人Wnt信号传导通路的生物学活性。

[0176] 本发明的Wnt替代分子在与一种或多种Fzd受体以及LRP5和LRP6中的一种或多种结合方面以及在Wnt信号传导的激活方面具有生物学活性,即,Wnt替代分子是Wnt激动剂。术语"Wnt激动剂活性"是指激动剂模拟Wnt蛋白与卷曲蛋白和/或LRP5或LRP6结合的作用或活性的能力。本文公开的Wnt替代分子和其它Wnt激动剂模拟Wnt活性的能力可以通过多种测定法来证实。Wnt激动剂通常引发与受体的天然配体引发的反应或活性相似或相同的反应或活性。具体地,本文公开的Wnt激动剂激活、增强或增加典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导通路。如本文所使用的,术语"增强"是指Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平与不存在Wnt激动剂(例如,本文公开的Wnt替代分子)的情况下的水平相比的可测量增加。在特定实施例中,例如,在相同细胞类型中,与不存在Wnt激动剂的情况下的Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平相比,Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平的增加为至少10%、至少20%、至少50%、至少两倍、至少五倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍。测量Wnt/β-连环蛋白信号传导的方法是本领域已知的并且包含本文所述的方法。

[0177] 在特定实施例中,本文公开的Wnt替代分子是双特异性的,即,其特异性结合两个或更多个不同的表位,例如,一种或多种Fzd受体以及LRP5和/或LRP6。

[0178] 在特定实施例中,本文公开的Wnt替代分子是多价的,例如,其包括各自与相同的表位特异性结合的两个或更多个区,例如,与一种或多种Fzd受体内的表位结合的两个或更多个区和/或与LRP5和/或LRP6内的表位结合的两个或更多个区。在特定实施例中,本文公开的Wnt替代分子包括与一种或多种Fzd受体内的表位结合的两个或更多个区以及与LRP5和/或LRP6内的表位结合的两个或更多个区。在某些实施例中,Wnt替代分子的结合一种或

多种Fzd受体的区的数目与结合LRP5和/或LRP6的区的数目的比率为或约为:1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、2:3、2:5、2:7、7:2、5:2、3:2、3:4、3:5、3:7、3:8、8:3、7:3、5:3、4:3、4:5、4:7、4:9、9:4、7:4、5:4、6:7、7:6、1:2、1:3、1:4、1:5或1:6。在某些实施例中,Wnt替代分子是双特异性且多价的。

[0179] 本文公开的Wnt替代分子可以具有各种不同结构形式或构型中的任一种结构形式或构型。Wnt替代分子可以包括多肽和/或非多肽结合部分,例如小分子。在特定实施例中,Wnt替代分子包括多肽区和非多肽结合部分两者。在某些实施例中,Wnt替代分子可以包括单一多肽,或者Wnt替代分子可以包括两个或更多个、三个或更多个或四个或更多个多肽。在某些实施例中,Wnt替代分子的一个或多个多肽是抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,Wnt替代物包括两种抗体或其抗原结合片段,一种抗体或其抗原结合片段结合一种或多种Fzd并且另一种抗体或其抗原结合片段结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,Wnt替代物包括例如彼此连接或结合或彼此融合的一个、两个、三个或四个多肽。

[0180] 当Wnt替代分子包括单一多肽时,所述Wnt替代分子可以是包括一个或多个Fzd结合结构域和一个或多个LRP5/6结合结构域的融合蛋白。结合结构域可以直接融合,或者所述结合结构域通过接头(例如,多肽接头,包含但不限于本文公开的多肽接头中的任一种多肽接头)连接。

[0181] 当Wnt替代分子包括两个或更多个多肽时,多肽可以通过共价键(例如,二硫键)和/或非共价相互作用连接。例如,人免疫球蛋白IgG的重链直接在其CH3结构域的水平处相互作用,而在其CH2结构域的水平处,所述重链通过附接到DE弯曲部中的天冬酰胺(Asn)N84.4的碳水化合物相互作用。在特定实施例中,Wnt替代分子包括衍生自抗体或其抗原结合片段(例如,抗体重链或抗体轻链或其片段)的一个或多个区。在某些实施例中,Wnt替代多肽包括通过一个或多个二硫键结合在一起的两个抗体重链区(例如,铰链区)。在某些实施例中,Wnt替代多肽包括通过一个或多个二硫键结合在一起的抗体轻链区(例如,C_L区)和抗体重链区(例如,C_H1)。

[0182] 可以工程化Wnt替代多肽以促进两个多肽之间的结合。例如,可以将臼包杵(Knob-into-holes)氨基酸修饰引入两个不同多肽中以促进它们的结合。臼包杵(AA)变化是在抗体工程中开发的用于双特异性IgG抗体生产中重链异二聚化的合理设计策略。工程化AA变化是为了在第一抗体的重链的CH3上产生杵(knob),并且在第二抗体的重链的CH3上产生臼(hole)。杵可以由属于AA的‘非常大’IMGT体积类别的酪氨酸(Y)表示,而臼可以由属于‘小’IMGT体积类别的苏氨酸(T)表示。将修饰引入多肽中以促进其结合的其它手段是本领域已知的和可用的。例如,可以引入特定氨基酸并且将其用于交联,如引入半胱氨酸以形成分子间二硫键。

[0183] Wnt替代分子可以具有各种不同的结构形式,包含但不限于图1所示的那些。

[0184] 在一个实施例中,Wnt替代分子包括与VHH或sdAb或其抗原结合片段融合的scFv或其抗原结合片段。在某些实施例中,scFv特异性结合一种或多种Fzd受体,并且VHH或sdAb特异性结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,scFv特异性结合LRP5和/或LRP6,并且VHH或sdAb特异性结合一种或多种Fzd受体。在特定实施例中,scFv或其抗原结合片段与VHH或sdAb或其抗原结合片段直接融合,而在其它实施例中,两个结合区通过接头部分融合。在特定实施例中,VHH或sdAb与scFV的N端融合,而在其它实施例中,VHH或sdAb与scFv的C端融

合。在特定实施例中,scFv在本文中描述或包括本文所述的CDR组中的任一个CDR组。在特定实施例中,VHH或sdAb在本文中描述或包括本文公开的CDR组中的任一个CDR组。

[0185] 在各个实施例中,包含但不限于图1的A所描绘的那些的Wnt替代分子包括一个或多个Fab或其抗原结合片段以及一个或多个VHH或sdAb或其抗原结合片段(或可替代地,一个或多个scFv或其抗原结合片段)。在某些实施例中,Fab特异性结合一种或多种Fzd受体,并且VHH或sdAb(或scFv)特异性结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,Fab特异性结合LRP5和/或LRP6,并且VHH或sdAb(或scFv)特异性结合一种或多种Fzd受体。在某些实施例中,VHH或sdAb(或scFv)与Fab的N端融合,而在一些实施例中,VHH或sdAb(或scFv)与Fab的C端融合。在特定实施例中,Fab以完整IgG形式存在,并且VHH或sdAb(或scFv)与IgG轻链的N端和/或C端融合。在特定实施例中,Fab以完整IgG形式存在,并且VHH或sdAb(或scFv)与IgG重链的N端和/或C端融合。在特定实施例中,两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)在这些位置的任何组合处与IgG融合。

[0186] 可以例如使用基因工程以产生包括与Fc区融合的Fab的融合多肽来将Fab转化成包含Fab和Fc片段两者的完整IgG形式,即,Fab以完整IgG形式存在。完整IgG形式的Fc区可以衍生自各种不同的Fc中的任一种,包含但不限于野生型或经修饰的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其它同种型,例如野生型或经修饰的人IgG1、人IgG2、人IgG3、人IgG4、人IgG4Pro(包括防止IgG4半分子的形成的核心铰链区中的突变)、人IgA、人IgE、人IgM或被称为IgG1 LALAPG的经修饰的IgG1。已经表明L235A、P329G(LALA-PG)变体消除鼠IgG2a和人IgG1两者中的补体结合和固定以及Fc-γ依赖性抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。这些LALA-PG取代允许在小鼠和灵长类动物之间更准确地翻译用“无效应子”抗体框架支架产生的结果。在本文公开的IgG中的任一种的特定实施例中,IgG包括以下氨基酸取代中的一个或多个:N297G、N297A、N297E、L234A、L235A或P236G。

[0187] 作为对一种或多种Fzd受体和LRP5和/或LRP6两者都是二价的二价且双特异性Wnt替代分子的非限制性实例被提供为图1的A中描绘的前四个结构,其中VHH或sdAb或scFv以白色描绘并且Fab或IgG以黑色描绘。如所示出的,VHH或sdAb(或scFv)可以与两条轻链的N端、两条重链的N端、两条轻链的C端或两条重链的C端融合。进一步设想的是,例如,VHH或sdAb(或scFv)可以与重链和/或轻链的N端和C端、轻链和重链的N端、重链和轻链的C端、重链的N端和轻链的C端,或重链的C端和轻链的N端融合。在其它相关实施例中,两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)可以任选地通过接头部分融合在一起,并且在这些位置中的一个或多个位置处与Fab或IgG融合。在相关实施例中,Wnt替代分子具有杂IgG形式,而Fab以半抗体的形式存在,并且一个或多个VHH或sdAb(或scFv)与Fc的N端、Fab的N端、Fc的C端或Fab的C端中的一个或多个融合。此形式的相对于每种受体的双特异性但单价的版本在图1的A的底部处描绘。在某些实施例中,Fab或其抗原结合片段(或IgG)与VHH或sdAb(或scFv)或其抗原结合片段直接融合,而在其它实施例中,结合区通过接头部分融合。在特定实施例中,Fab在本文中描述或包括本文所述的CDR组中的任一个CDR组。在特定实施例中,VHH或sdAb或scFv在本文中描述或包括本文公开的CDR组中的任一个CDR组。

[0188] 在各个实施例中,包含但不限于图1的B所描绘的那些的Wnt替代分子包括结合一种或多种Fzd受体的一个或多个Fab或其抗原结合片段以及结合LRP5和/或LRP6的一个或多个Fab或其抗原结合片段。在某些实施例中,Wnt替代分子包括结合一种或多种Fzd受体的两

个Fab或其抗原结合片段和/或结合LRP5和/或LRP6的两个Fab或其抗原结合片段。在特定实施例中,Fab中的一个或多个以完整IgG形式存在,并且在某些实施例中,两个Fab均以完整IgG形式存在。在某些实施例中,完整IgG形式的Fab特异性结合一种或多种Fzd受体,而另一个Fab特异性结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,Fab特异性结合一种或多种Fzd受体,并且完整IgG形式的Fab特异性结合LRP5和/或LRP6。在某些实施例中,Fab特异性结合LRP5和/或LRP6,并且完整IgG形式的Fab特异性结合一种或多种Fzd受体。在某些实施例中,Fab任选地通过接头与IgG的N端(例如,重链或轻链N端)融合。在某些实施例中,Fab与IgG的重链的N端融合并且不与轻链融合。在特定实施例中,两条重链可以直接融合或通过接头融合在一起。相对于两种受体的这种双特异性和二价的实例在图1的B的顶部处示出。在其它相关实施例中,两个或更多个VHH或sdAb可以任选地通过接头部分融合在一起,并且在这些位置中的一个或多个位置处与Fab或IgG融合。在相关实施例中,Wnt替代分子具有杂IgG形式,而Fab之一以半抗体的形式存在,并且另一Fab与Fc的N端、Fab的N端、Fc的C端中的一个或多个融合。此形式的相对于每种受体的双特异性但单价的版本在图1的B的底部处描绘。在某些实施例中,Fab或其抗原结合片段与另一Fab或IgG或其抗原结合片段直接融合,而在其它实施例中,结合区通过接头部分融合。在特定实施例中,两个Fab中的一个或两个在本文中描述或包括本文描述的CDR组中的任一个CDR组。

[0189] 在某些实施例中,Wnt替代分子具有PCT申请公布第WO2017/136820号中所述的形式,例如,串联Fab(Fabs-in-tandem)IgG(FIT-IG)形式。Shiyong Gong、Fang Ren、Danqing Wu、Xuan Wu&Chengbin Wu(2017)。FIT-IG还包含“串联Fab免疫球蛋白是一种用于接合多个治疗靶标的新颖且通用双特异性设计(Fabs-in-tandem immunoglobulin is a novel and versatile bispecific design for engaging multiple therapeutic targets)”《单克隆抗体(mAbs)》,9:7,1118-1128,DOI:10.1080/19420862.2017.1345401中公开的形式。在某些实施例中,FIT-IG通过将两种亲本单克隆抗体的DNA序列重新排列成两种或三种构建体并将它们在哺乳动物细胞中共表达来将两种抗体的功能组合到一个分子中。FIT-IG形式和构建体的实例在PCT申请公布第WO2017/136820号的图1的A和图1的B以及图2的A和图2的B中提供。在某些实施例中,FIT-IG不需要Fc突变;不需要scFv要素;并且不需要接头或肽连接体。每个臂中的Fab结构域“串联”工作,从而形成具有四个活性且独立的抗原结合位点的四价双特异性抗体,所述四个活性且独立的抗原结合位点保留了其亲本抗体的生物学功能。在特定实施例中,Wnt替代物包括Fab和IgG。在某些实施例中,Fab结合体LC例如通过其间各种长度的接头与IgG的HC融合。在各个实施例中,Fab结合体HC可以与IgG的LC融合或不融合。此形式的变体被称为串联Fab IgG(或FIT-Ig)。

[0190] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括两个或更多个VHH或sdAb(或scFv),包含结合一种或多种Fzd受体的至少一个VHH或sdAb(或scFv)以及结合LRP5和/或LRP6的至少一个VHH或sdAb(或scFv)。在某些实施例中,结合区中的一个结合区是VHH或sdAb,并且另一个结合区是scFv。包括两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)的Wnt模拟分子可以以各种构型形式化,包含但不限于图1的C中所描绘的那些。在某些双特异性二价形式中,两个或更多个VHH或sdAb(或scFv)任选地通过一个或多个接头与Fc的两个不同端串联融合或融合。在存在接头的情况下,接头和其长度在VHH或sdAb(或scFv)与其它VHH或sdAb(或scFv)之间或在VHH或sdAb与Fc之间可以相同或不同。例如,在某些实施例中,VHH或sdAb与IgG重链的N端和/或

C端融合。在特定实施例中,两个或更多个VHH或sdAb在这些位置的任何组合处与IgG融合。此形式的二价且双特异性Wnt替代分子的非限制性实例被描绘为图1的C中描绘的前七个结构,其中第一VHH或sdAb以白色描绘,Fc或IgG以黑色描绘,并且第二VHH或sdAb以浅灰色描绘。在各个实施例中,VHH或sdAb均可以与Fc的N端、Fc的C端融合,或者一个或多个VHH或sdAb可以与Fc的N端或C端的任一个或两个融合。在相关实施例中,Wnt替代分子具有杂IgG形式,而一个VHH或sdAb以半抗体的形式存在,并且另一VHH或sdAb与Fc的N端或Fc的C端融合。此形式的相对于每种受体的双特异性但单价的版本在图1的C的底部处描绘。在某些实施例中,VHH或sdAb与另一VHH或sdAb直接融合,而在其它实施例中,结合区通过接头部分融合。在特定实施例中,VHH或sdAb在本文中描述或包括本文描述的CDR组中的任一个CDR组。在各个实施例中,这些形式中的任一种形式可以包括一个或多个scFv来代替一个或多个VHH或sdAb。

[0191] 在某些实施例中,Wnt替代分子被形式化为双功能抗体。如图1的D所示,针对Fzd和LRP的结合体也可以以双功能抗体(或DART)构型连接在一起。双功能抗体也可以呈单链构型。如果双功能抗体与Fc融合,则将产生二价双特异性形式。在不与Fc融合的情况下,这将是单价双特异性形式。在某些实施例中,双功能抗体是由通过小肽接头连接的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)组成的非共价二聚体scFv片段。双功能抗体的另一种形式是单链(Fv)2,其中两个scFv片段彼此共价连接。

[0192] 如所讨论的,在各个实施例中,Wnt替代分子包括本文公开的一种或多种抗体或其抗原结合片段。因此,在特定实施例中,Wnt替代物包括两个多肽,其中每个多肽包括结合LRP5/6的Nab或scFv以及结合一种或多种Wnt的Nab或scFv,任选地,其中结合结构域之一是scFv并且另一个结合结构域是Nab。在某些实施例中,Wnt替代物包括三个多肽,其中第一多肽包括抗体重链并且第二多肽包括抗体轻链,其中抗体重链和轻链结合LRP5/6或一种或多种Fzd,并且其中第三多肽包括与重链Fc区融合的VHH或sdAb,其中VHH或sdAb与LRP5/6或一种或多种Fzd结合。在其它实施例中,Wnt多肽包括四个多肽,所述四个多肽包含两个重链多肽和两个轻链多肽,其中两个重链和两个轻链结合LRP5/6或一种或多种Fzd;并且进一步包括与重链和/或轻链中的一个或多个融合的一个或多个Nab或scFv,其中Nab或scFv与LRP5/6或一种或多种Fzd结合。在另一个说明性实施例中,Wnt替代物包括至少四个多肽,所述至少四个多肽包含结合LRP5/6或一种或多种Fzd的两个重链多肽和两个轻链多肽,其中Wnt替代物进一步包括结合LRP5/6或一种或多种Fzd的Fab。例如,Fab可以包括各自与两个重链多肽之一融合的两个多肽以及各自与两个轻链多肽之一融合的两个多肽,或者Fab可以包括各自与两个重链多肽之一融合的两个多肽以及各自结合与重链多肽融合的两个多肽之一的两个另外的多肽,从而形成第二Fab。其它构型可以用于产生本文公开的Wnt替代物。

[0193] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括与特异性结合一种或多种Fzd受体的多肽融合或结合的Fzd结合区,例如,抗Fzd抗体或其抗原结合片段。在特定实施例中,与一种或多种Fzd受体特异性结合的多肽是抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,其是本文公开的或在于2017年12月19日提交的题为“抗卷曲蛋白抗体和使用方法(Anti-Frizzled antibodies and Methods of Use)”、代理人案卷号为SRZN-004/00US的美国临时专利申请第62/607,877号中公开的抗体或其抗原结合片段,所述美国临时专利申请通过全文引用的方式并入本文。在特定实施例中,Fzd结合结构域包括针对表1A中提供的与一种或多种Fzd

受体结合的说明性抗体或其片段中的任一种抗体或其片段公开的三个重链CDR和/或三个轻链CDR。在特定实施例中,Fzd结合结构域包括针对表1A中提供的与一种或多种Fzd受体结合的说明性抗体或其片段中的任一种抗体或其片段公开的三个重链CDR和/或三个轻链CDR,其中CDR共同包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸修饰,例如,取代、缺失或添加。在某些实施例中,Fzd结合结构域是VHH或sdAb或衍生自VHH或sdAb,因此表1A仅包含三个重链CDR。在特定实施例中,Fzd结合结构域包括表1A中提供的三个CDR HC序列或变体,其中CDR共同包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸修饰。在特定实施例中,Fzd结合结构域包括表1B或SEQ ID NO:1-65或129-132中提供的与一种或多种Fzd受体结合的说明性抗体或其片段中任一种抗体或其片段的重链片段和/或轻链片段(或任一者的抗原结合片段或变体)。在某些实施例中,Fzd结合结构域是Fab或衍生自Fab,因此表1B的重链包含VH和CH1序列,但不包含CH2或CH3序列。在某些实施例中,Fzd结合结构域是VHH或sdAb或衍生自VHH或sdAb,因此表1B包含VHH结构域。在某些实施例中,Fzd结合区是与这些抗体中的任一种抗体竞争与一种或多种Fzd受体结合的多肽,例如,抗体或其抗原结合片段。

[0194] 表1A:抗Fzd抗体克隆ID和CDR序列

[0195]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
001S-A01	Fzd1	YTFTSYGIS	391	GWISAYNGNTNYA	570	CARASAWTPYGAFDIW	752	SGSSSNIGSHTVS	1156	SNYQRPS	1256	CAAWDGSLFGHWVF	1265
001S-B01	Fzd1	GSISSGGYSWS	283	GSIYHSGSTYYN	547	CARFYYDILTGYSYFDYW	818	RSSRSLLDTDDGNTYLD	1142	TLSHRAS	1259	CMQSIQLPWTF	1295
001S-E01	Fzd1	GSISNYYWS	282	GEIDRSGDTNYN	488	CARVRARRFLVSDRSAFDIW	945	SGNTLGSHYVS	1155	QDSKRPS	1246	CQVWDSSTVVF	1431
001S-F01	Fzd1	GSISGNNYYZG	281	GSIYFTGGTYYN	546	CARVMLITDAFDIW	942	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSNRAS	1237	CMQGTHWPYTF	1289
001S-G01	Fzd1	GSISSSSYYWG	285	GYIYYSGSTYYN	589	CARATYGGDAFDIW	760	TRSSSNIGAGYDVH	1161	GNSIRPS	1220	CGTWDSSLSAWVF	1267
001S-H01	Fzd1	GSISSGGYYWS	284	GYIYYSGSTYYN	589	CARHAGFYGLADYFDYW	875	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSKRAS	1236	CMQALQIPPTF	1280
001S-A02	Fzd1	GSISSGGYYWS	284	GYIYYSGSTYYN	589	CARGKGYSYGYGKDWFDPW	845	QASQDIGKYLN	1041	DASNLET	1185	CQQNDYLPLTF	1332
001S-E02	Fzd1	GSISGNNYYWG	280	GSIYFTGGTYYN	546	CARVMLITDAFDIW	942	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSNRAS	1237	CMQGTHWPYTF	1289
001S-G02	Fzd1	GAISGTSYFWG	266	GSIYYTGNTYYN	548	CARIGIAVAAPVDHW	882	RASQSVGTYLT	1110	DASNRAT	1188	CMQATQFPLTF	1284
001S-H02	Fzd1	GSISSSSYYWG	285	GYIYYSGSTYYN	589	CARATYGGDAFDIW	760	TRSSSNIGAGYDVH	1161	GNSIRPS	1220	CGTWDSSLSAWVF	1267
001S-A03	Fzd1	GSISSGGYYWS	284	GYIYYSGSTYYN	589	CARVRDYYDSSGYYYDYFDYW	946	RASRSISSYFN	1128	AASSLQS	1175	CQQADTFPPTF	1314
001S-B03	Fzd1	ASFSGHYWT	158	GEIDHTGSTNYE	487	CARGGQGGYDWGHYHGLDVW	835	SGDKVGHKYAS	1154	EDSQRPS	1199	CQAWDSSTDVVF	1301
001S-H08	Fzd5	RAFTDNVMA	329	ATISGGGGSTFDD	466	CAAASSLTSTPYDLW	678						
001S-A09	Fzd5	RSFRTNALG	333	AAISWTGGSTYYA	422	CNTVTYTGGSYKNYW	1005						

[0196]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
001S-B09	Fzd5	SIDSINAMA	356	AALTSGGITYHA	428	CNVITIVRGMGPRAYW	1006						
001S-C09	Fzd5	SIFSINAMG	357	ATIQSGGRTNYA	465	CNVITIVRGMGPRAYW	1006						
001S-C07	Fzd8	YTFTSYGIS	391	GWISAYNGNTNYA	570	CARDGTPFYSGSYYGSW	772	QGDSLRTYYAS	1052	GKNNRPS	1219	CNSRDNSGKHKVF	1300
001S-D07	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CARVPTSPYDILTGPFDYW	944	RSSQSLLHSNGFNYVD	1136	FGSYRAS	1206	CMQNLQTPWTF	1291
001S-E07	Fzd8	ASVSSNSAAWN	159	GRTYYRSKWYNDYA	542	CARWKNYFDPW	953	RASQGIRSDLA	1070	AASTLES	1177	CLQDYSYPRTF	1273
001S-H07	Fzd8	FTFSSYAMS	228	STISGGGGSTYYA	646	CAKDLVPWGSSAFNIW	704	RASQSVSSYLA	1121	GASSRAT	1213	CQQYGSSPPTF	1410
004S-E05	Fzd5	FTFSTYEMN	243	SGVSWNGSRTHYV	618	CARGQSEKWWSGLYGMDVW	856	RASQGISSALA	1076	AASALQS	1165	CQQTYSTPRTF	1394
004S-E03	Fzd5	GTFSTYAIS	298	GWINSGNGNTKYS	565	CWTGLLWFGESTDAFDIW	1031	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G06	Fzd5	GTFTYRYLH	307	GGIIPIFGTGNYA	501	CASSMVRVPYYYGMDVW	964	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
001S-D09	Fzd8	GPFNLFAMG	272	AGISRTGGNTGYA	445	CASKTTINSGWSREYHYW	958						
001S-E09	Fzd8	GPFNLFAMG	272	AGISRTGGNTGYA	445	CASKTTINSGWSREYHYW	958						
001S-F09	Fzd8	GFFSSFTMG	268	AAISRNGVYTRFA	409	CNALAPGVRGSW	987						
001S-G09	Fzd8	SLFRLNGMG	360	ATISTRGTTHYA	467	CTDEESW	1011						
001S-H09	Fzd8	GPFNLLAMG	273	AGISRTGGNTGYA	445	CASKTTINSGWSREYHYW	958						
001S-A10	Fzd8	SVVNFVVMG	364	AAITSGGSTNYA	425	CNRVGSREYSYW	1001						
001S-B10	Fzd8	RTSDLYTMG	352	AAIGYKVKWNGERTYYL	404	CNAVTYNGYTIW	994						
001S-G12	Fzd1	SIFSSNTIY	359	ALITTSGNTNYA	455	CNAGAPAWTYRMGTYYPQFGSW	986						

[0197]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
002S-A01	Fzd1	STFSTYAMG	362	AAISGSGENTYYA	408	CVKFGMNLGYSGYDYW	1028						
002S-B01	Fzd1	STFSNYAMG	361	AAISWGGGSTFYS	411	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-C01	Fzd1	RMFSNYAMG	331	AAISSGGSGTYYS	410	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-D01	Fzd1	RTDGGYVMG	337	ATVTWRTGTTYYA	469	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-E01	Fzd1	RTFSSAAMG	345	AAISWSGSTAYYA	421	CATLTPYGTVASY	974						
002S-F01	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAVNWSGGSTYYA	430	CAAVFLSRNYEIQEYYRYQ	689						
002S-G01	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-H01	Fzd1	RSFSTYPMG	336	TVISGSGGSTYYS	676	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-A02	Fzd1	RRFTTYGMG	332	AAVTWRSGSTYYA	436	CYLEGPLDVYW	1032						
002S-B02	Fzd1	RTFNRHVMG	341	AAISWSGDSTYYA	415	CAKLGGSSWLREYDYW	724						
002S-C02	Fzd1	RTFRAYAMG	342	SAISWSGGSTYYA	603	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-D02	Fzd1	RTFSEYAMG	343	AAISWSGGSTHYA	417	CNADSLRGIDYW	984						
002S-E02	Fzd1	FTFREYAMT	199	SGISRDGGRTSYS	613	CAPRVLVTAPSGGMDYW	734						
002S-F02	Fzd1	GDFTNYAMA	267	AAVNWRGDGTYYS	429	CAAVFLSRNYEIQEYYRYQ	689						
002S-G02	Fzd1	RTFGTWAMG	340	AAISYNGFSTYYS	424	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-H02	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-D03	Fzd1	RTFGSYAMG	339	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						

[0198]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
002S-E03	Fzd1	SIFSIYAMG	358	AVVATGGATNYA	481	CNMRGNWYREGRPAEFLSW	1000						
002S-F03	Fzd1	RTSSSYAMG	353	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-G03	Fzd1	RTFGSYAMG	339	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-H03	Fzd1	QTFTAYAMG	327	AAISWSGSATHYA	420	CNAWVLVAGSRGTSADYW	996						
002S-A04	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAISWSGRSTYYA	419	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
002S-B04	Fzd1	RTFSSYAMG	347	AAISWSGGSTYYA	418	CAAGPNYSWFMPSSSRLIW	682						
002S-C04	Fzd1	RRFTTYGMG	332	AAVTWRAGSTYYA	435	CSADKLDYLDDQPFKTWDYW	1010						
002S-D04	Fzd1	GTSSTYAMG	309	AAINRSGGSTYYA	405	CAAVFLSRNYEIQEYYRYQ	689						
002S-E04	Fzd1	GTFSTYAMG	300	AAISWSGDSTYYL	416	CAAGPIARWYRGDMDYW	681						
004S-H04	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GWISTYNGATNYA	577	CARGGAGRFGEGMDVW	826	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
001S-A04	Fzd5	YTFTSYGIS	391	GWISAYNGNTNYA	570	CASSKEKATYYYGMDVW	963	GLSSGSVSTNYYPS	1035	YTNTRSS	1263	CLLYLGRGIWVF	1271
001S-D03	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CARLDPGYYYGMDVW	886	TGTSSDVGGYNSVS	1159	DVTKRPS	1196	CFSYAGSRF	1266
001S-F03	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GGIIPIFGTANYA	499	CARVIFSTVTTTNDIW	939	TRSSGSIASNYVQ	1160	ENDKRPS	1202	CQSYDYDHRWVF	1430
004S-E04	Fzd5	YTFSGYYLH	374	GTVTPILGTANYA	549	CARVDGSGYYGIDYW	933	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A06	Fzd5	GSFSNYAIS	278	GRIIPILGSANYA	530	CARTYLKAFDIW	930	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F04	Fzd5	YTFTNNFMH	383	GRINPNSGGTNYA	537	CARDRFDNWFDPW	788	RASQGISSALA	1076	AASTLQS	1179	CQQSYNTPWTF	1351

[0199]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
001S-C03	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CAREGRSRVYGGNSFDYW	808	RSSQSLLRRNGHNYVD	1139	MGSNRAP	1238	CMHGLHPPFTF	1279
003S-A01	Fzd1	YIFTDYYMH	368	GGIIPIFGTANYA	499	CARMSSDYYDSSGYYRRGMDVW	895	RASQGISNNLN	1072	GASTLQS	1215	CQQADSFPPTF	1312
003S-E01	Fzd1	YIFTDYYMH	368	GGIIPIFGTANYA	499	CARAWKGLWFGEGTFDYW	761	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-F01	Fzd1	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARLAFDIW	885	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-A02	Fzd1	YTFTGYYMH	379	GWINAGNGNTTYA	558	CAKDRGNYGDYLDYW	707	RASQGISNYLA	1074	EVSSVQG	1204	CQQSYSTPLAF	1370
003S-C02	Fzd1	FTFSNSDMN	214	ALISYDGSHTYYA	454	CTRGSRIGWFDPW	1015	RASQSIGRWLA	1084	AASRLQS	1171	CQQGFNFPLTF	1325
003S-E02	Fzd1	GTFSSYTIS	296	GGIIPISGKTDYA	505	CARARGGDSPLSL	749	RASQGISNNLN	1072	TASSLQS	1258	CLQDYSYPYTF	1274
003S-F02	Fzd1	GTFRSYAIN	292	GGIIPIFGTANYA	499	CARGGWRPDYYGSGSYYSFDYW	840	RASQSVSSDLA	1115	GASTRAT	1217	CQQYETWPVLTF	1405
003S-G02	Fzd1	FTFGTYWVT	196	SGITGSGGRTFYA	616	CARMKDWFGAFDIW	894	RASESVSSSSFA	1056	GASTRAT	1217	CQQYNNWPPNYTF	1420
003S-C03	Fzd1	FTFSRYAMS	220	SYISGDSGYTNYA	658	CARGLVIATNWFDPW	849	QANQDISNYLN	1038	AASSLQS	1175	CQQTYNPPRTF	1389
003S-D03	Fzd1	YTFTSYYMH	392	GWINTYNGNTNYP	567	CAESLTSTADW	691	RASQGISNNLN	1072	AASSLQR	1174	CQQSYSTPFTF	1368
003S-E03	Fzd1	YIFTDYYMH	368	GWVNPTTGNTGYA	586	CARNVEGATSFPEFDYW	898	RASQGISNNLN	1072	SASNLQS	1252	CQQSYSPPPYTF	1364
003S-H03	Fzd1	GTFSSYAIS	295	GGIIPIFGTANYA	499	CAKDIGSSWYYYMDVW	701	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-A04	Fzd1	FTFGTYWVT	196	SGITGSGGRTFYA	616	CARMKDWFGAFDIW	894	RTSERSSISSFA	1148	GASTRAT	1217	CQQYNNWPRNYTF	1420
003S-C04	Fzd1	FAVSSSYMS	168	ASIWFDGSNQDYA	463	CAPNESGNVDYW	733	RASQGISNNLN	1072	KASSLEN	1225	CQQSYSTPHTF	1369
003S-D04	Fzd1	FTFSSYAMH	227	SAISGSGGSTYYA	600	CARDHGSSWYQNTDAFDIW	774	QASQDIGNYLN	1042	DVSNLER	1195	CQHLNSYPPGDTF	1304

[0200]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
003S-G04	Fzd1	FRFISHPIH	177	GRVIPILGVTNYA	545	CASSSDYGDYLKEPNYGMDVW	966	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-D05	Fzd2	FTFSNYAMT	216	SAIGTGGGTYYA	595	CATAYRRPGGLDVW	969	RSSQSLLHSDGKTYLY	1134	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTR	1293
003S-E05	Fzd2	FTFSSYTMS	236	GRIKSKANGGTTDYA	535	CARGSSSWYDW	863	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTR	1293
003S-A06	Fzd2	FTFADYGMH	188	SYISSGSYTIYYS	659	CARGTFDWLLSPSYDYW	865	RASQGISNNLN	1072	AASRLES	1170	CQQSYSTPLTF	1372
003S-C06	Fzd2	FTFSNYGMH	217	SAISNSGGSTYYA	601	CTSSFLTGSQPSGYW	1018	RASQDISSYLA	1065	AASSLQS	1175	CQQSYRTPLTF	1353
003S-G06	Fzd2	FTFSDYGMH	207	SSTSGSGGNSKYS	642	CARHNPGYMGYYYGMDVW	877	RASQSVSSNLA	1116	DASNRAT	1188	CQHRTSWPLTF	1307
003S-H06	Fzd2	GTFSSYTIS	296	GLVDPEDGETIYA	520	CTILPAAAAGTYYYYGMDVW	1012	RASQRVGNNLA	1083	DASIRAT	1184	CQQYKDWPTF	1415
003S-B07	Fzd2	FTFSDHYMS	205	SSITRTPSGGTTEYA	639	CARDGGYW	768	RASQSVGSYLA	1109	GSSNRAA	1221	CQQYGTSLLTF	1414
003S-D07	Fzd2	YTFTNNFMH	383	GIINPSGGSTSYA	513	CARATSLGRRYCSSTSCYPRDAFDIW	759	QASQGISNNLN	1049	LGSDRAS	1233	CQQSYSTPFTF	1368
003S-E07	Fzd2	YTFTNNFMH	383	GWINPNSGGTKYA	563	CARSVGEVGATMLGIGVWYWFDPW	926	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPFTF	1368
003S-A08	Fzd2	FTFSNYAMT	216	SAIGTGGGTYYA	595	CATAYRRPGGLDVW	969	RSSQSLLHSDGKTYLY	1134	LGFNRAS	1232	CMQNTHWPLTR	1293
003S-C08	Fzd2	LTVSTNFMS	324	AGIGWDSTNIGYA	440	CARDLVAARPSNWDYW	782	RASQGIRNDLG	1069	GASTLQR	1214	CQQSYSTPRVTF	1374
003S-E08	Fzd2	FTFRNSAMH	201	STISGSGGSTYYS	647	CARGGGYSSSW	829	RSSRSLLHSDGKTYLY	1143	LGSNRAS	1237	CMQSSHWPKTF	1298
003S-G09	Fzd4	FTFDHNPMN	194	SAIGAGGGTYYA	593	CASPTVTRR	960	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-C10	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-D10	Fzd4	FNFGIYSMT	172	SYISGDSGYTNYA	658	CARVGPGGWFDPW	936	RASQGISSYLA	1076	AASNLLG	1167	CQQTYSTPWTF	1396

[0201]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
003S-E10	Fzd4	FTFSSYAMH	227	AGISASGGSTYYA	442	CARPSTTGTKAFDIW	901	RASQSIGSNLD	1085	AASTLET	1178	CQQSYSVPDTF	1380
003S-A11	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880	RASQSISZYZN	1103	ZASSLQS	1264	CQQSYSTPLTF	1372
003S-G11	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GRIIPIFGTVNYA	528	CARGARLDYW	820	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-H11	Fzd4	YTFTGYYMH	379	GGIIPIFGTPHYA	502	CASTDPSSGLDYW	967	RASQSIGSNLD	1085	DASSLES	1189	CQQSFIMPLTF	1341
003S-C12	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINPNSGGTNYA	564	CARGGSSDVR	838	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-F12	Fzd4	FTFSSYAMH	227	SVISTSGDTVLYT	652	CARGGSSDVR	838	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-B01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GIINPSGGSTSYA	513	CAKDGVVR	698	RAIQSISSYLN	1054	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-C01	Fzd4	FTFSNHYTS	213	STISSSGGRTFYA	650	CARASRIDGGWPIIDHL	754	RASQDIRDELA	1062	AASTLQS	1179	CQQADSFPLTF	1311
004S-D01	Fzd4	FTFTNYAMS	248	SAISGSGGSTYYA	600	CARATGFGTVVFDYW	757	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880	ZACLRIISYLN	1163	FASSLQS	1205	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARDGVE	773	RASQGISNWLA	1073	DASSLQS	1190	CQQSHITPYTF	1344
004S-H01	Fzd4	FTFSNYAMH	215	ALMSPDGTIIYYA	456	CAKGIVGDYGAFDIW	717	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-B02	Fzd4	FTFSSYGMH	230	SSINNSSRTVFYA	630	CAKDHLAVADAHGR	700	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E02	Fzd4	FTFSSYAMH	227	AVISYDGSNEYYA	474	CAGGEVYEL	692	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F02	Fzd4	FTFSTYAMH	242	AVISSDGNNKYYT	473	CAAPDVVVTADGYYW	685	RASQGISSALA	1076	AASTLQS	1179	CQQANTVPFTF	1322
004S-G02	Fzd4	FTFANYAMN	190	ALISYDGGTKYYA	453	CAKTLVTSHALHIW	728	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-H02	Fzd4	FTFANYAMH	189	ALISYDGGNKYYA	452	CAKTLVTSHALHIW	728	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
001S-E03	Fzd5	GSFSGYYWH	276	GEINHSGSTNYN	489	CARGRRLVRFTVTSAFDIW	858	TGSSSNIGAGFGVH	1158	SDRNRPS	1255	CQSYDSSLRASVF	1429
001S-B05	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GGIIPILGIANYA	504	CARIPKPRGYSYGDNGSW	883	RSSQSLLHSNGNTYLD	1137	LGSDRTS	1234	CMQSLQTPYTF	1297

[0202]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
004S-A07	Fzd6	GNFKNYGIT	271	GRIIPALGTANYA	525	CARQYCSGGSCYPDAFDIR	908	RASQDIRSALA	1063	QASSLIS	1245	CQQSYSMPQTF	1361
004S-B07	Fzd6	FTFSSYSMN	233	GVISKDGDNKYYA	553	CASSRDGYNRLAFDIW	965	QASQDIRNYLN	1043	AASSLQS	1175	CQQSSRFWTF	1347
004S-A08	Fzd6	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CARDGGDYGMDVW	767	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-B08	Fzd6	YTFTNNFMH	383	GRINPNSGGTNYA	537	CASQNYYGSGSYPGFDYW	961	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D08	Fzd6	YTFTYRYLH	394	GGIIPIFGTANYA	499	CATHDSSGYYSFDYW	973	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E08	Fzd6	FSVSSNYMN	187	SAIGTGGGTYYA	595	CTTRTYDSSGYYETQNYYMDVW	1024	RSSRSLLHSNGNTYLQ	1144	LGSNRAS	1237	CVQTTQSPLTF	1434
004S-G08	Fzd6	FTFSDYYMS	208	AAISYDESNKFYA	423	CARSAVAGAFDIW	916	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A09	Fzd6	FTFRDYAMN	198	SGISWNSGSIGYA	615	CARRSGYSGSVYYYYGMDVW	913	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-B09	Fzd6	FTFSSFGMH	221	AGINWNGGSVVYA	441	CARGPSHQHTFDIW	854	RASQGISSALA	1076	AASSLQS	1175	CQQSYSHTAFTF	1357
004S-C09	Fzd6	YTFTNNFMH	383	GGFDPEDGETIYA	492	CARVGRGYSFDYW	937	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E09	Fzd6	DTFSNYVIS	163	GRISAYNGYKSYA	538	CARSSGYVGWFDPW	924	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F09	Fzd6	FTFSNYYTS	218	SYISGAGGSTEYA	657	CARLPRRSGKGSAFDIW	888	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-H09	Fzd6	GTFSSYTIS	296	GWMNPNSGNTGYA	583	CARVGATSAGGMDVW	935	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-C10	Fzd6	YIFTDYYMH	368	GLVDPEDGETIYA	520	CAHSDFFSGLSFGDW	693	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D10	Fzd6	FTFSNSDMN	214	SSISTSGGSTYYA	637	CARGSYW	864	RASQNINNYLA	1081	RASTLQS	1249	CQQYSSYPYTI	1425
004S-E10	Fzd6	TTLNKYAIS	365	GRITPVVGVTNYA	539	CALSSSWYGGFDYW	731	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F10	Fzd6	GFTFSDHY	269	ALVGYDGSQQFYG	458	CNTGIPMLYW	1003	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G10	Fzd6	FTFSDYYMS	208	SAISGSGFTYYA	599	CARVSRGFAFDYW	948	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0203]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
004S-A11	Fzd6	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGIANYA	529	CARESVNNYYYMDVW	813	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-C11	Fzd6	FTFSSYAMH	227	ALTSYDGSKKFYA	457	CAKTGRGYAFDIW	726	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E11	Fzd6	FTFSSYNMN	232	GRIKSKANGGTTDYA	535	CAKAGQQLDW	696	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-H11	Fzd6	FTFTSSAMQ	249	GGIIPIFGTANYA	499	CATVQTNYYDSSGRFSYRAHYFDYW	977	RASQSISRWLA	1094	AASSLQS	1175	CQQYVSYPLTF	1426
004S-A12	Fzd6	YTFTNNFMH	383	GRINPNSGGTNYA	537	CARGQGYSSGWYRGDAFDIW	855	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D12	Fzd6	FAFDDYAMH	165	GFIRSKAYGGTTEYA	490	CAKDRGYSSGWYLDYW	708	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-H01	Fzd7	FNFSSYTMR	173	SVIYGGGNTNYA	653	CARGGSGGNLSYW	836	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-A02	Fzd7	GTFSSYAIS	295	GMIIPFLGITNYA	521	CTRPYDAFDIW	1016	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-C02	Fzd8	YTFASYGMH	373	GWINAGNGNTTYA	558	CARLSVWKWEQVTNWFDPW	890	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-E02	Fzd8	GTFTSYAIS	305	GWINAGNGNTKYS	557	CTTGLFPYYRYNWNNDAFDIW	1022	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-A03	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWMNPNSGNTGYA	583	CAKWHIGATGNWFDPW	729	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-H03	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GGIFPIYGISTYA	494	CARDRPTSSWYAFDYW	792	RASQGISNNLN	1072	DASTLQT	1193	CQQSFSAPITF	1342
005S-F04	Fzd8	FSFSSTAMS	181	SYISSSGSITHYA	670	CARYGDYGDYW	954	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-H04	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GWINAGNGNTTYA	558	CARVATGNAFDIW	932	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-B05	Fzd8	FTFSSYWMH	239	AGISGSGKTTFYA	444	CARGGLLFDYW	831	QASQDISNYLN	1046	KASSLES	1226	CQQSYSTPRTF	1373
005S-F05	Fzd8	FTFTSSAVQ	251	GWMNPNSGNTGYA	583	CARRTAVAGTIDYW	914	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-G05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISPYNGNTNYA	573	CARGGWTNYGGNLDYW	841	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0204]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
005S-H05	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GRINPNSGGTNYA	537	CARVPDFWSGYLDYW	943	RASQGISRTLZ	1075	AASSLQS	1175	CQQTYSMPITF	1392
005S-D06	Fzd8	YTFTYRYLH	394	GGIIPIFGTANYA	499	CARDSYPYGMDVW	800	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-F06	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GRVIPILGVTNYA	545	CAREYLGSFDIW	815	RASQSVGSNLA	1108	GASSRAT	1213	CQQYGSSPPFTF	1409
005S-A07	Fzd9	FTFTGSAVQ	247	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGFDYW	822	RASQSVSRNLA	1114	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
005S-B07	Fzd9	FTFTSSAVQ	251	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGRGQQWLTGYYGMDVW	857	RASQGISSALA	1076	GASTLQS	1215	CLQDYNYPFTF	1272
005S-C07	Fzd9	FTFSSYSMN	233	SYIENDGSITTYA	654	CARAPYYYGSGSLFRLDYW	748	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D07	Fzd9	GTFNSYAIA	291	GGIIPIFGTANYA	499	CARAGSGYYNFDYW	740	RASQSINRWLA	1090	AASSLQS	1175	CQQTYNIPITF	1388
005S-F07	Fzd9	FSFSSYGMH	182	AYINSRGSLMYYA	483	CAKTKLPIW	727	RASQSINRNYLG	1089	AASSRVT	1176	CQQYDSWPPTF	1402
005S-G07	Fzd9	GSFSGYAIN	274	GGIIPIFGTANYA	499	CATGYYYDYYFDYW	972	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CQHYYNLPLTF	1309
005S-H07	Fzd9	GTFTNNFMH	303	GLVDPEDGETIYA	520	CARTYRIVGATPRYYYYGMDVW	931	RASQTINNQLA	1125	KASNLET	1224	CQQANSFPVTF	1318
005S-B08	Fzd9	YIFTDYYMH	368	GWINPNSGGTIYA	562	CARGPRDSGYYPGGAFDIW	853	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D08	Fzd9	FAFSSHWMH	166	SAIDGSGGSTYYA	592	CARDRQLGWAHWYFDLW	794	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-G08	Fzd9	YTFTGYYMH	379	GWINAGNGNTTYA	558	CARDRDYW	787	QTSQDINNNLN	1053	KASSLES	1226	CQQSYSSPPTF	1366
005S-C09	Fzd9	FTFSSYGMH	230	SAIGTGGGTYYA	595	CALLVGAARGISYYYYYGMDVW	730	QASQDISNYLN	1046	AASTLQS	1179	CLQHKSFPTF	1276
005S-D09	Fzd9	YTFTSYAMH	389	GWINAGNGNTTYA	558	CARDRPYSSGWYYPAFDIW	793	RASQSVSSNQLA	1117	GASTRAT	1217	CQQRYNWPPSITF	1339
005S-E09	Fzd9	FNLRRYNMN	175	SRISNSGSLVYYA	627	CARDADSSGYYRYDAFDIW	762	RASQSVSSNLA	1116	DASNRAT	1188	CQQRNNWLYTF	1334
005S-A10	Fzd9	YTFTDYYMH	376	GIINPSGGSTSYA	513	CARHVYGSGTYNNWFDPW	878	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0205]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
005S-D10	Fzd9	YTFTSYYMH	392	GWMSPNSANTGYA	583	CARGGPIHYYYYYMDVW	834	RASQGISNNLN	1072	AASTLQS	1179	CQQTNLFPYTF	1385
005S-H10	Fzd9	GAFSTSSIS	265	GRIIPVLGTANYA	534	CAKGGWRSSFDPW	715	RASQSVSSNLA	1116	GASTRAT	1217	CQQYNSWPLTF	1421
005S-B11	Fzd9	YTFTSYDIN	390	GGFDPEDGETIYA	492	CAKAGDWGLYGMDVW	695	RASQSISRWLA	1094	AASSLQS	1175	CQQTNTFPFTF	1386
005S-C11	Fzd9	FTFTGSAVQ	247	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGFDYW	822	RASQSVSRKLA	1113	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
005S-D11	Fzd9	YTFTNNFMH	383	GWINPNSGDTKFA	561	CAREANYDILTGYIRPDAFDIW	806	RASQSLRSKLA	1106	GASTRAT	1217	CQQYANSPWTF	1401
005S-E11	Fzd9	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTKYS	557	CTTTEYSSSPDYYYGMDVW	1025	QASQDISNYLN	1046	GASTLQS	1215	CQQLSRYPSLF	1331
005S-G11	Fzd9	GTFTRNSIS	304	GGIIPIFGTANYA	499	CARSSDLRIFDYW	922	RASQSVSSNLA	1116	GASNRPT	1209	CQQYGSSPYTF	1413
005S-H11	Fzd10	YTFASYDIH	372	GWINAGNGNTTYA	558	CARDGIWDIFDYW	769	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-E12	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GVIFPVYPTPDYA	551	CARGGSTGYYGMDVW	839	RASQSVGRWMA	1107	AASSLQS	1175	CQQANTFPFTF	1321
005S-F12	Fzd10	GTFSSYAIS	295	GRIVPIVDVVKYA	541	CARDTCSSTSCSPDYW	801	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-A01	Fzd10	FTFSSYSMN	233	SAIGTGGGTYYA	595	CAREGWFGESPFGMDVW	810	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-F01	Fzd10	YTFTRYAVH	385	GWISTFNDNTNYA	576	CASPTGMTTNFDYW	959	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-H01	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GGIIPIFGTANYA	499	CAKGSYYYDSSGYYWDAFDIW	723	RASQGISNNLN	1072	AASNLET	1166	CQQTSSTPLTF	1387
006S-A02	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GGIIPLFGTTDYA	507	CARDITGADGMDVW	775	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-D02	Fzd10	GTFSSYAIS	295	GRIIPTVGTANYA	533	CARDVCSGGSCSPDVW	802	RASQGISNNLN	1072	DASSLES	1189	CQQTYNTPRTF	1390
006S-E02	Fzd10	FTFTSSATQ	250	GGIIPIFGTANYA	499	CARDGSSGWYSPNAFDIW	770	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CLQHNGYPITF	1277
006S-H02	Fzd10	FTFRMYGMH	200	SRISPDGRTTTYA	628	CARSPRWYDAFDIW	920	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	RVSSRFS	1251	CMQGTHWPPTF	1288

[0206]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
006S-A03	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GWINAGNGNTTYA	558	CARDPIMFGDQPGWFDPW	784	RASESVSSNLA	1055	GASSRAT	1213	CQQYNKSPSF	1419
006S-B03	Fzd10	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTKYA	556	CAREGYDFWSGPYAFDIW	811	RASQTISRYLN	1126	EVSSLQG	1203	CQQSYSTPWTF	1378
006S-C03	Fzd10	GTFSSNVIS	293	GGIIPIFGTANYA	499	CARGGYYYGMDVW	843	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-B01	Fzd1	YIFTDYYMH	368	GGIIPIFGTANYA	499	CARMSSDYYDSSGYYRRGMDVW	895	RASQGISNNLN	1072	GASTLQS	1215	CQQADSFPPTF	1312
014S-D01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880	RASQSISSHZN	1096	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-E01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880	RASQSIZZYZN	1105	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-G01	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWMNPNNGNTTYA	581	CARHYYGSGNYRDW	879	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPFTF	1368
014S-A02	Fzd4	FTFSSNAMH	223	SGISGSGGSTYYA	608	CAKPGIAAAGTNNWFDPW	725	RASQGISSALA	1076	GASTVES	1218	CQQSYSTPRTF	1373
014S-B02	Fzd4	FTFSSYAMH	227	SGISGSGSSTYYA	611	CARPSTTSFGMDVW	902	RASQSVSSNLA	1116	GASTRAT	1217	CQQYDTPLRTF	1403
014S-C02	Fzd5	YTFTSYYMH	392	GRINPNSGGTNYA	537	CARVPDFWSGYLDYW	943	RASQGISSALA	1076	AASSLQS	1175	CQQTYSMPITF	1392
014S-D02	Fzd5	GTFSTYAIS	299	GIINPSGGSTSYA	513	CARAKGSGWYVGSAFDIW	744	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-E02	Fzd5	FTFSDSYMS	206	GFIRSKAYGGTTEYA	490	CARATQELLLPYGMDVW	758	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-F02	Fzd5	YTFTSYYMH	392	GRINPNSGGTNYA	537	CARVPDFWSGYLDYW	943	RASQGVSTZLS	1079	AASSLQS	1175	CQQTYSMPITF	1392
014S-G02	Fzd6	YTFTSYYMN	392	GIISPSGGSTSYA	516	CARWGDYGDLYYFDYW	951	RASQGISSALA	1076	ATSTLQS	1183	CQQVNSYPPTF	1399
014S-H02	Fzd6	YIFTDYYMH	368	GRINPNSGGTNYA	537	CARARSSGWTDAFDIW	751	RASQSVSSWLA	1120	AASTLQT	1180	CQQSYSTPTF	1376
014S-A03	Fzd6	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-B03	Fzd6	FTFSSYNMN	232	GRIKSKANGGTTDYA	535	CARAGDSPDYW	739	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0207]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
014S-E03	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISPYNGYTKYA	574	CARAMWSYGQQNAFDIW	745	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-G03	Fzd8	FTFTSSAVQ	251	GWMNPNSGNTGYA	583	CARRTAVAGTIDYW	914	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-H03	Fzd8	YTFTSSAIH	387	GRINPNSGGTNYA	537	CARVKWELAIDYW	940	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-B04	Fzd8	YIFTDYYMH	368	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGGSRYDFWSGHWYFDLW	837	RASQGISNYLA	1074	AASSLQS	1175	CQQSYSTPFTF	1368
014S-E04	Fzd8	YTFTGYYMH	379	GRINPNSGGTNYA	537	CARDVPKLVTRGVAYGMDVW	804	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-F04	Fzd8	YSFTTYGMN	371	GWINAGNGNTTYA	558	CARAAAGSYGGGYW	736	RASQGISNNLN	1072	EASSVAS	1197	CQQSYTSTPLNSF	1381
014S-G04	Fzd8	FTFSSYGMS	231	SAISGSGGSTYYA	600	CARDLTPFTQQQLVLGLL	780	RASQSVSGYLA	1112	GASTRAA	1216	CQQYNYWPPAF	1423
014S-H04	Fzd8	FTFTSSAVQ	251	GRIVPAIGFTQYA	540	CARSGYNRRGYFDYW	919	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GGIIPIFGTANYA	499	CARVTLGASVDAFDIW	949	RASQGISNNLN	1072	DASSLES	1189	CLQHNSLPFTF	1278
014S-B05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWVSPNTGNTVYA	587	CTTDRRYSTYFDLW	1021	RASQSVSSNLA	1116	GVSNRAT	1223	CQQYNIWPRTF	1418
014S-C05	Fzd8	YTFASYGMH	373	GWINAGNGNTTYA	558	CARLSVWKWEQVTNWFDPW	890	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-D05	Fzd8	GTFTSYAIS	305	GWINAGNGNTKYS	557	CTTGLFPYYRYNWNNDAFDIW	1022	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-F05	Fzd9	FTFTGSAVQ	247	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGCDYW	821	RASQZVSRZZA	1127	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
014S-G05	Fzd9	FTFSSSWMH	226	SAIGTGGGTYYA	595	CARKVKGYCSGGSCYGYW	884	RVSQGISSALA	1151	AASSLQS	1175	CQQTFSVPWTF	1384
014S-H05	Fzd9	FTFSNYAMT	216	STISGSGVSTFYA	648	CARHGRIAADIW	876	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A06	Fzd9	FTFZZSZVQ	254	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGFDYW	822	RASQSVSRNLA	1114	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
014S-B06	Fzd9	FTFSSYSMN	233	SYIENDGSITTYA	654	CARAPYYYGSGSLFRLDYW	748	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0208]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
014S-C06	Fzd10	FTFTGSAVQ	247	GGILPIYGTTKYA	509	CARGARLYGFDYW	822	RASQSVSRNLA	1114	GASTRAT	1217	CQQRSNWPITF	1335
014S-D06	Fzd10	FTFSRYAMH	219	SGIGVGGGTYYA	605	CARDAYNWFDPR	763	RASQSISRYLN	1095	AASSLQS	1175	CQQRYSTPLTF	1340
014S-F06	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GVIFPVYPTPDYA	551	CARGGSTGYYGMDVW	839	RASQSVGRWMA	1107	AASSLQS	1175	CQQANTFPFTF	1321
014S-G06	Fzd10	FTFSSYAMH	227	SAIGAGGGTYYA	593	CARDAYNWFDPW	764	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-H06	Fzd10	FTFSSYDMN	229	SAIGTGGGTYYA	595	CARDAYNWFDPW	764	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A07	Fzd10	FTFSNAQMS	210	SAIGTGGGTYYA	595	CAREGSYYDWYFDLW	809	RASQNIGSRLA	1080	GASNRAS	1208	CQQYNHWPPLFTF	1417
017S-E08	Fzd8	IIFSPNDMG	313	ALISSGGSTSYA	450	CHFGVASVGLNYW	980						
017S-H08	Fzd8	RTFSSFVMG	346	AAVSASGGYTWYA	432	CNLAQRGETYW	998						
017S-A09	Fzd8	LAFNGYTMG	317	AAISWSDNTYYA	414	CAAGFPTVFVVDGEYDYW	680						
017S-B09	Fzd8	FTLDYYAIS	255	ADITSGGSTNYA	437	CNAVTYNGYTIW	994						
017S-C09	Fzd8	LTFSDYTVG	319	ASSTGGGVFENYA	464	CNAVTYNGYTIW	994						
018S-D06	Fzd4	RIFSSYAQA	330	PRIPSDSTTFYA	590	CEVHNFGATYW	979						
018S-E06	Fzd4	RTFSNYVMG	344	AVISRSGGNTYYT	472	CNAVSTDWTTDYW	992						
018S-F06	Fzd4	RTFSTYGMG	349	AAISWSDNTYYA	414	CNSFPLRLHDW	1002						
018S-G06	Fzd5	LAIDDYYMV	318	SYISTSDGSTYYA	673	CNAVTYNGYSIW	993						
018S-H06	Fzd5	LAFNGYTMG	317	AQISWTGGSTDYA	460	CNADYGTWYGIGW	985						
018S-A07	Fzd5	LAFNGYTMG	317	AAISWMSNTYYA	412	CNMGLGYSEYRPLGYW	999						
018S-B07	Fzd5	SAFSNYAMG	355	AAITWSGARTYYA	426	CNAVWKFGTTHW	995						
018S-C07	Fzd7	LTIDDYYVV	323	SYISAGDGFTYYA	656	CNAVTYNGYTIW	994						
017S-F09	Fzd4	GSFSGYYWS	277	GEINHSGSTNYN	489	CARDLRFYSSSWRRVGMDVW	778	RSSRSLLHTSGYNYLD	1147	LGSNRAS	1237	CMQGTRWPTF	1290

[0209]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
017S-G09	Fzd4	YTITTYAIH	396	GWINADTGDTAYS	555	CARGWTTISSLGVW	872	RSSRSLLHTNGYNYLD	1146	LGSNRAS	1237	CMQALQTPLTF	1281
017S-H09	Fzd5	NIFRIYAIA	326	AALTGQRTTNYA	427	CNTVTYNAGCYKKYW	1004						
017S-A10	Fzd5	LAFNGYTMG	317	ASITWNGRYTYYA	462	CNARLDAVYGHSRYDSW	988						
017S-B10	Fzd5	NFFSNYPLG	325	GAISRTGSGTFYA	484	CAAGVTGSWRYW	684						
017S-C10	Fzd8	RSFSNYRVA	335	AVSWSVGMTYYA	479	CNAVTYNGYTIW	994						
017S-D10	Fzd8	GTFGSYAVG	288	GLISRNAGNTLYA	518	CNAVNGRLNYW	991						
017S-E10	Fzd8	RTFSSYSLA	348	AAVSASGANTYYA	431	CAAPQSPNMYIRTDQLWWYKYW	687						
018S-D07	Fzd1	RSFSTYPMG	336	TVISGSGGSTYYA	675	CAAGPTLPFRYW	683						
018S-E07	Fzd1	RAFSNYAMG	328	AAINWSGDSAYYA	406	CNARLSFAGGMGYW	989						
018S-F07	Fzd1	IKSMFDMNFMG	314	AFITRGGTTRYG	438	CNAVSTDWTRDYW	992						
018S-G07	Fzd1	LTIDDYYMV	322	SYIGTSDGTTYYA	655	CNAVTYNGYTIW	994						
018S-H07	Fzd4	RVFSSYAQA	354	AGIASDSTTFYA	439	CKVHNFGATYW	983						
018S-A08	Fzd4	RIFSSYAQA	330	ASIPSDGTTFYA	461	CKVHNFEATYW	982						
018S-B08	Fzd4	LTFSTYGMG	321	AAINWSGRSTVYA	407	CNSFPLRLHDW	1002						
018S-C08	Fzd4	RTLSSYVVG	351	ALISLSGASTYYA	449	CNAVSTDWTTDYW	992						
018S-D08	Fzd5	IKSMFDMNFMG	314	AFITRGGTTRYG	438	CNAVSTDWTRDYW	992						
018S-E08	Fzd5	RTDGMQAMG	338	GAITWSLGSAFYA	486	CNVLAQNDGDYRTYG	1007						
018S-F08	Fzd5	RTFSSFVMG	346	AAVSASGGYTWYA	432	CNAVWKFGTTHW	995						
018S-G08	Fzd5	RTFSSFVMG	346	AAVSASGGYTWYA	432	CNAVCKFGTTHW	990						
018S-H08	Fzd5	RTFSSFVMG	346	AAVTASGGYAWYA	434	CNAVWKFGTTHW	995						

[0210]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
018S-A09	Fzd8	ITFSFNSVG	316	AVFIAGYGAYA	470	CNGVTYNGYTIW	997						
018S-B09	Fzd8	HDFSSTYGVG	310	ATISWGGTNIA	468	CAAQKPYYNGHFYADDKHYDHW	688						
018S-C09	Fzd8	ITFGFDSVG	315	AVFNAGYRAYYA	471	CNAVTYNGYTIW	994						
018S-D09	Fzd8	RTFSWYSMG	350	AAVSWSGVSTYYP	433	CNAVTYNGYTIW	994						
018S-E09	Fzd8	ITFSFNSVG	316	AVFIAGYGAYA	470	CIGVTYNGYTIG	981						
018S-F09	Fzd8	RTDGMQAMG	338	GAITWSLGIAFYA	485	CNVLAQNDGDYRTYW	1008						
018S-G09	Fzd8	HDFSSTYGVG	311	AAISWRGTNIA	413	CAAQKPYYNGHFYADDKHYDHW	688						
021S-A01	Fzd8	DSVSSNSAAWN	160	GRAYYKSRWYYDYA	524	CVRDLRPSGDLNFDYW	1029	RASQSIGSSLH	1087	YASQSVS	1260	CHQSGRVPVTF	1268
021S-C01	Fzd1	GSISSGGYSWS	283	GSIYHSGSTYYN	547	CARFYYDILNGYSYFDYW	817	RSSRSLLDTDDGNTYLD	1142	TLSHRAS	1259	CMQSIQLPWTF	1295
021S-D01	Fzd1	FTFSSYGMH	230	AVISYDGSNKYYA	475	CAKGSVFGLKAGGYADYW	721	RSSQSLVHSDGNTYLS	1140	KISNRFS	1230	CMQATQFPHTF	1283
021S-E02	Fzd8	YTFTSYGIS	391	GWISAYNGNTNYA	570	CARDGTPFYSGSYYGSW	772	QGDSLRTYYAS	1052	GKNNRPS	1219	CNSRDNSGKHKVF	1300
021S-G02	Fzd8	DSVSSNSGAWN	162	GRTYYRSKYYNGYA	544	PRLDYW	1034	RSSQSLLDSDDGNTYLD	1133	MLSSRAP	1240	CMQRLEFPYTF	1294
021S-A03	Fzd8	DSVSSNSAAWN	160	GRTYYRSKWYNDYA	542	CARSQATGERFDYW	921	RSSQNIFQSLN	1131	SASSLQS	1254	CQQSYNSPITF	1349
022S-H06	Fzd4	FTFSSYAMS	228	SVISTSGGTVLYT	652	CADGSGTSHR	690	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
022S-A11	Fzd10	YIFTDYYMH	368	GGIFPIFGTANYA	493	CAKGSYYYDNSGYYWDAFDIW	722	RASQGISNNIN	1071	AASNLET	1166	CQQTYSIPFTF	1391
OMP-18R5		GFTFSHYTLS	270	VISGDGSYTYYADSVKG	677	NFIKYVFAN	1033	SGDKLGKKYAS or SGDNIGSFYVH	1152 or 1153	EKDNRPSG or DKSNRPSG	1200 or 1201	SSFAGNSLE or QSYANTLSL	1435 or 1436
027S-H02	Fzd5	FTFSSYAMS	228	SAISGSGGSTYYA	600	CAKGLWGPLLNW	718	RASQSVSSNYLS	1118	GASSRAP	1212	CQQRTNWPPRVTF	1337

[0211]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
027S-B03	Fzd8	DSVSSNSATWN	161	GRTYYRSKWYSDYA	543	CTRGNWNVGLANW	1014	SGTSSNIGAGYDVH	1157	GNNNRPS	1219	CSAWDDNLNGVVF	1432
027S-E01	Fzd5	RSFSIYNTA	334	AAISWSGGSTYYA	418	CNVITIVRGMGPRAYW	1006						
004S-D05	Fzd5	LTFSIYAMH	320	SAISGDGALTYYA	597	CARGVYPYSSKHKPSYYYYGMDVW	870	QASQDISNYLN	1046	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLFTF	1371
004S-D04	Fzd5	YDFTTYGIH	367	GGVIPAFGATDYS	511	CARGYYYGMDVW	874	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-B05	Fzd5	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CASGLGYFDYW	957	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G03	Fzd5	YTFTNNFMH	383	GGIIPIFGTPHYA	502	CARTLTTPPYYYGMDVW	929	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F03	Fzd5	FTFSNSDMN	214	SAIGTGGDTYYA	594	CTRDLYGGYRDYW	1013	KSSQSLLHSDGYTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQGLQTPWTF	1286
004S-C04	Fzd5	YIFTGYYMH	369	GRINPNSGGTNYA	537	CARGGEYSSGWTYYYYYGMDVW	827	RATQTISTYLN	1129	AASRLQS	1171	CQQYYSYPWTS	1427
004S-B06	Fzd5	YTFTYRYLH	394	GMINPIGGSINYA	522	CARDVMDVW	803	RASQGISNNLN	1072	AASALQS	1165	CQHLNNFPLTF	1303
004S-F06	Fzd5	FSVGSNYMT	186	SSISSGNSYIYYA	634	CARGPKTMWEDRPDYW	851	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A04	Fzd5	FTFSTYSMI	245	GFIRSKDYGGTTEYA	491	CARLTGGAVAGTHRDYW	892	RASQGISNNLN	1072	GASSLQS	1211	CQQSHSSPRTF	1346
004S-A05	Fzd5	FTFSSYVMS	237	SAIGTGGGTYYA	595	CARGSSGYYVAW	862	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F05	Fzd5	FTFSNHYMS	212	AGVSIDANKKYYA	447	CARDQNDSWYRSDYW	785	RSSQSLLHSDGYTYLY	1135	LGSHRAS	1235	CMQGLQTPHTF	1285
003S-C01	Fzd1	GTFSSYAIS	295	GRINPNSGGTNYA	537	CARGSGYDFFDYGMDVW	861	RASQSISNNLN	1092	AASSLQS	1175	CQQSYNTPFTF	1350
003S-H01	Fzd1	DTFSNYVLS	164	GLVDPEDGETIYA	520	CAKASTPMVQGAPDYW	697	RASQSIGSNLD	1085	AASTLQS	1179	CQQNYATPRTF	1333
003S-H02	Fzd1	GTFNRYAIT	289	GGIIPIFGTANYA	499	CATTQGVYSSSWYGGGRAFDIW	976	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-H04	Fzd1	YTFTYRYLH	394	GRINPNSGGTNYA	537	CWGGSYYGDYW	1030	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CQQANSFPITF	1316

[0212]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
003S-A05	Fzd2	FTFSSYAMH	227	SSISWNSGRVDYA	638	CARGSGIAASGSYW	860	TSSQSLLHSDGKTYLY	1162	LGSNRAS	1237	CMQGTHWPYTF	1289
003S-B05	Fzd2	FTFSNAWMS	211	STIAGSGGRTYYS	643	CAKDSIGRRGRGAPQPYYYYGMDVW	709	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQSLQSPLTF	1296
003S-F05	Fzd2	FSFSTYTMS	184	SRINGDGSSTRYA	624	CARAIVGATGLNRFKAFDIW	743	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTR	1293
003S-G05	Fzd2	STFTNAWMS	363	SAIGTGGGTYYA	595	CARDRVTLRGGYSYGTDAFDIW	796	RSSRSLLHSNGNTYLR	1145	LASRRAS	1231	CIQNTHWPLTR	1270
003S-H05	Fzd2	FTLSTYNMN	257	SRINYDGSATTYA	626	CARDRDIVVVPAQRGEGGFDPW	786	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	MGSYRAS	1239	CMQGTHWPLTF	1287
003S-A07	Fzd2	FTFSSYAMS	228	SAISGSGGSTYYA	600	CAKGGRDGYKGYFDYW	714	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTL	1292
003S-C07	Fzd2	FSFRSYSMS	178	SAIGTGGGTYYA	595	CTTTTVTTSW	1026	RTSQSVSSNLA	1150	DASNRAS	1187	CQQYGSSPYNF	1412
003S-F07	Fzd2	FSFSSYGMS	183	SHISSGGATIDYA	619	CARDGGYW	768	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-G07	Fzd2	FTFSSYWMH	239	SYISGDSGYTNYA	658	CARDNGYCSGGSCYATYYGMDVR	783	RASQAISSYLA	1060	KASTLDT	1228	CQQADTFPFTF	1313
003S-B08	Fzd2	FTFSSZZMH	240	AVISYDGSNRZYA	476	CARSYYDSSGYPRKDAFDIW	927	KSSQSLLHSDGKTYLY	1036	LGSNRAS	1237	CMQTLKAPLTF	1299
003S-F08	Fzd2	ZSVSSNYMS	401	SRINSDGSTISYA	625	CARARLLGGYYTPDRMDVW	750	RSSQYLSSAYLA	1141	GASSRAT	1213	CQQYGSSPTF	1411
003S-H08	Fzd2	FTFNRHALS	197	ALISSNGDHKYYT	451	CARDLMVGRNKLDYW	777	QASQGISNNLN	1049	AASSLQS	1175	CQQSYSTPAFTF	1367
003S-A09	Fzd2	FTFSSSNMN	225	SGISGSGSSTYYA	611	CARGRVWSSRDYW	859	RSSQSLLHSDGYTYLY	1135	LGSNRAS	1237	CMQGTHWPLTF	1287
003S-B09	Fzd2	FNIRRZNMZ	174	SAIGTGGGTYYA	595	CARGDSGSYRDYW	823	RSSESLLHSDGKTYLY	1130	LGSNRAS	1237	CTQTVQFPITF	1433
003S-C09	Fzd2	FTFSSSAMH	224	SGISGSGTTTYYR	612	CARRLIAVAGAEFDPW	912	RASQGISNNLN	1072	SASNLQS	1252	CQQSYSTPWTF	1378
003S-F09	Fzd4	FTFSNSDMN	214	GRIKSKAYGGTTEYA	536	CARQYYFDYW	909	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0213]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
003S-H09	Fzd4	FTFSSFGMH	221	SVISSGGSPYYA	651	CATASGDFDYW	968	RASQSIGSNLN	1086	RASTLES	1248	CQQTYTTPRF	1398
003S-A10	Fzd4	FTFDDYAMH	191	AIVSYDGTYKYYS	448	CARQTRGGTTDGW	907	RASQGISNNLN	1072	YASSLQS	1262	CQQSHSPPGTF	1345
003S-B10	Fzd4	FTFSSHSTH	222	SAISASGDSTFYA	596	CARPIVGATAFDIW	900	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-G10	Fzd4	FTZSSYSMN	264	SYSSGNSGYTNYA	674	CARGVVGSGAFDIW	868	RASQSIVSYLN	1104	DASNLQS	1186	CQQGYSAPWTF	1329
003S-B11	Fzd4	FTFSDYYMS	208	SAIDGAGRTYYT	591	CARAIPGDYDYW	742	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-C11	Fzd4	FTFTSYAMH	252	GGIIPIFGIANYA	496	CARTGRGYYGMDVW	928	RASQSIGSNLD	1085	AASTLQS	1179	CQQSYSTPRTF	1373
003S-D11	Fzd4	FTFSSYSMS	234	SYISGDSGYTNYA	658	CARAGVATIAFDYW	741	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-F11	Fzd4	FTFDDYGMH	192	SAISGSGGSTYYA	600	CTTPNYYDSR	1023	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
003S-E12	Fzd4	GTFSSYAIS	295	GWINAGNGNTTYA	558	CARHYYGSGSYPDW	880	ZPZQTZZSHLN	1164	PASSLQS	1242	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A01	Fzd4	FTFSTYGMH	244	SYISSSSSAIYYA	671	CARGGLDGPIDYR	830	RASQGISNNLN	1072	AASTLQS	1179	CQQGNNFPFTF	1326
004S-G01	Fzd4	FTVSSHSMG	260	SLVSFDGSKEHYA	621	CARLGSTPDYW	887	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CQQYYTYPYTF	1428
004S-C02	Fzd4	FTFSSYGMH	230	AVISYDGSNKYYA	475	CASDPVTAATR	956	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D02	Fzd4	FSFSSYGMS	183	SGISGSGRSTYYA	610	CAKDGYW	699	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-A03	Fzd4	FTFSSYAMH	227	SGINWNGGSTGYA	606	CARPAGSAQNWFDPW	899	RASQGISNNLN	1072	DASNLET	1185	CHQSYSIPRTF	1269
004S-B03	Fzd4	FSFSRYGMS	180	SGVGGSGGSTZYA	617	CARDGSW	771	RASQDVDTWLA	1066	DASTLET	1191	CQQGYNIPWTF	1328
004S-C03	Fzd4	YTFTSYAIS	388	GIINPSGGSTSYA	513	CARQIGWELMPDIW	906	QASQDISSYLN	1047	AASTLQS	1179	CQQAISFPLTF	1315
004S-C05	Fzd5	ZZZTDYYZQ	403	GGMNZNRGNTGYA	510	CANGSYAQHLW	732	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G05	Fzd5	FTFSSYWMH	239	STISPSGLYIYQA	649	CAKDKVPYSYGPNFDYW	703	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-E06	Fzd5	FFFSGYWMS	169	ANIKQDGSEKYYV	459	CARVFPLHDYW	934	QASQDISNYLN	1046	KASSLES	1226	CQQANSFPYTF	1319
004S-C06	Fzd5	FPFSTFSMN	176	AGISWNSGTIDYA	446	CARSGPAAMVYYYYGMDVW	918	RSSQNVSSYLA	1132	GASTRAT	1217	CQHRANWPQTF	1305

[0214]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
004S-E07	Fzd6	FTLSSHHMN	256	SAIGTGGGTYYA	595	CAAPDYW	686	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F07	Fzd6	FSFSKKYMT	179	SSIDGNGDHVFYA	629	CARPYYYDSSGYDPMGDYW	904	QASQDITNYLN	1048	KASTLES	1229	CQQSYSAPYTF	1356
004S-C08	Fzd6	FTVSSNYMN	261	SAIGTGGGTYYA	595	CAQGTYW	735	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-F08	Fzd6	FTFDDYYMN	193	SAVSGNGGGTFYA	604	CARGGNYGSGDYW	833	RASQSISZWLA	1102	EASTLQS	1198	CQQTYTPPFTF	1397
004S-G09	Fzd6	GTLNNHTLS	308	GRIIPIFGTANYA	526	CARDRRGYGMDVW	795	RASQAISNSLA	1058	DASNLET	1185	CQQAYSFPWTF	1324
004S-B10	Fzd6	FTFSDYYMS	208	SGINWNSAKIGYV	607	CARIGAGGAFDIW	881	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-H10	Fzd6	FIFSDYYMS	170	AVITSGGTFKYYA	477	CARNGIAAAEDYW	896	RASQSISTYLS	1101	GASSLES	1210	CQQSYSPPFTF	1362
004S-B11	Fzd6	FTFSSSWMH	226	SGISWNSGSIGYA	615	CARYSSGGSLDYW	955	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-D11	Fzd6	YZFZZZYMH	400	GRINPNSGGTNYA	537	CARARSSGWTDAFDIW	751	RASQSVSSWLA	1120	AASTLQT	1180	CQQSYSTPTF	1376
004S-F11	Fzd6	FTFSSYAMS	228	SSISGGGRHTYYA	632	CARPYSSSRQGDYW	903	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-G11	Fzd6	YIFTDYYMH	368	GWINPNSGGTNYA	564	CARDRPGFDPW	790	RASQSVSSYLA	1121	GASSRAT	1213	CQQYAISYTF	1400
004S-B12	Fzd6	FTFSSYWIH	238	SYISGDSGYTNYA	658	CAKGIRWFDPW	716	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
004S-C12	Fzd6	YIFTDYYMH	368	GWMNPNSGNTGYA	583	CASSHYAPGMDVW	962	RASQGISSYLA	1076	RTSTLES	1250	CQQSYSTPWTF	1378
004S-F12	Fzd7	FTVGNNYMS	258	SSITTTSTLYA	640	CARGKEGRYSNYEAAW	844	RASQSISSYLN	1098	AASTLQT	1180	CQQSYSIPFTF	1358
005S-B01	Fzd7	FTFRSYGMH	202	SLISGSGDNTNYA	620	CARREPLYSSRRGAFDIW	910	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-C01	Fzd7	FTFSSYSMS	234	SAISGSGGSTYYA	600	CTRTIVGATPHYW	1017	RASQGISNNLN	1072	KASSLQS	1227	CQQSYSLPYTF	1360
005S-F01	Fzd7	FTVSSNYMS	262	SAISGSGATTTYA	598	CAKGAGYGSGSWQAAW	711	RASQSVSSSYLS	1119	GASSRAT	1213	CQQRYKSYTF	1338
005S-B02	Fzd8	YSFTNYAMH	370	GRIIPIFGTAZYA	527	CARGTFLEWLLTNYGMDVW	866	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D02	Fzd8	GTFSSYVIS	297	GWIGPHNGNTNYA	554	CATGWPRYYYGMDVW	971	RASQSVSSNLA	1116	NTSNRAT	1241	CQHYNNWPFTF	1308

[0215]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
005S-G02	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GGIIPIFGTAZYA	500	CARLPYYDFWSGYYGGRTGFDYW	889	RASQSVSTNLA	1122	DASNRAT	1188	CQQRSNWPPQITF	1336
005S-H02	Fzd8	YTFTYRYLH	394	GWINAGNGNTTYA	558	CARASLYYDYVWGSYRHYYFDYW	753	QASQDISHYLN	1044	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-B03	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GIINPSGGRTTYA	512	CATSFGGGWIVVDTSLWYW	975	RASQSINSNLA	1091	GASSRAT	1213	CQQYGSSPYTF	1413
005S-C03	Fzd8	GSFSGYAIS	275	GGIIPIFGTANYA	499	CRVDAFDIW	1009	RASQSVSSSYLS	1119	DTSNRAT	1194	CQQYGSSPITF	1408
005S-E03	Fzd8	FTFTSSAVQ	251	GGIIPIFGTANYA	499	CARSSGWQNRFAFDIW	923	RTSQSISSYLN	1149	AASTSQS	1181	CQQSFSSWTF	1343
005S-F03	Fzd8	YTFTYRYLH	394	GWINAGNGNTKYS	557	CATDLPVRKGFTYYDILTGSYGMDVW	970	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-B04	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GGIIPIFGTANHA	498	CARGLRYFDWPQGIYYYYGMDVW	848	QASHDINIALN	1039	AASSLQS	1175	CQQSYSSPLTF	1365
005S-C04	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GRINPNSGGTNYA	537	CARGGLLFDYW	831	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-D04	Fzd8	FTFSTYSMS	246	STIGTGGGTYYA	645	CARVGWLRFLDYW	938	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-G04	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWMSPSSGNAGYA	585	CARNNFLRAFDIW	897	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-A05	Fzd8	FAFSSYAMS	167	SRIDTDGSTTVYA	622	CARAPSYSSGWYVRW	747	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-C05	Fzd8	YTFTYYAMH	395	GIINPSGGSTSYA	513	CARELLPMTTVTSPFIW	812	RASQGISNNLN	1072	RASSLQS	1247	CQQANSYPLTF	1320
005S-E05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GGIIPIFGTANYA	499	CAIRAFDIW	694	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-C06	Fzd8	ZTFSZYDMH	402	SSISSSSHYKYYA	635	CARVRSKAVAGTLPKRLFDIW	947	RASQSVSSSYLS	1119	AASRRAT	1172	CQQYSNWPFTF	1424
005S-E06	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGNPTSGHIVVVPAATFSDYW	850	QASQDISNRLN	1045	SASRLQI	1253	CQQSYRTPRTF	1354

[0216]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
005S-G06	Fzd8	GTFSZZTIS	302	GWMNPDSGKTGYA	579	CARWAFPIPNAFDIW	950	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-H06	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GGIFPIYGISTYA	494	CARDRPSSSWYAFDYW	791	RASQGISNNLN	1072	DASTLQT	1193	CQQSFSAPITF	1342
005S-A08	Fzd9	GTFSZYAIS	301	GGIIPIFGTANYA	499	CARGGLLRFGDGWGMGMDVW	832	RASQSISSKSLA	1097	GASTRAT	1217	CQQYGIAPTF	1407
005S-C08	Fzd9	YTFTDYHMH	375	GWINAGNGNTTYA	558	CARASSWYLHYYYGMDVW	755	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-E08	Fzd9	FIFSZYAMS	171	SSISAAGAYKYYA	631	CARRGYSSGWRDAFDIW	911	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-F08	Fzd9	YTFTSYYMH	392	GWINAGNGNTTYA	558	CAKDVNYW	710	QASQGISNYLN	1050	AASSLQS	1175	CQQTYSTPTTF	1395
005S-H08	Fzd9	GTFSSYAIS	295	GRIIPILGTPNYA	531	CARDRLAFDYW	789	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-A09	Fzd9	FAFSSHWMH	166	SAISVSGGTTFYA	602	CARWGKRLRGSPYYFDYW	952	RASQSIGSNLD	1085	RASTLQS	1249	CQQSYSTPSF	1375
005S-F09	Fzd9	FTFSIYGMH	209	SGISWNSGNIGYA	614	CARGPLPTKIGGHYMDVW	852	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-B10	Fzd9	FTFSTXWMS	241	AVMYSGGTTYYA	478	CARLSYYYDSSGPKGDAFDIW	891	RASQGISNNLN	1072	AASSLQS	1175	CQQGNNFPLTF	1327
005S-C10	Fzd9	FSLSSYGMH	185	SSISSSSSYIYYA	636	CARSGMVKWLRSFDYW	917	RASQDIGSFLA	1061	AASSLQS	1175	CQKYNRAPFTF	1310
005S-E10	Fzd9	FTFTSSAMQ	249	GVINPGSGGTSYN	552	CARGYGDYVWGENYFDYW	873	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-F10	Fzd9	YTLSNYGIS	397	GWISAYNGDTKYA	568	CARFDYFGGMDVW	816	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
005S-G10	Fzd9	YTFTRYAVH	385	GGIIPFFNTVNYA	495	CAADRSPYYYDSSGYYPDAFDIW	679	RASQGISNNLN	1072	QASSLDS	1244	CQQSYNVPYTF	1352
005S-A11	Fzd9	FTFSSYDMN	229	SGISWNSGYIGYA	615	CAKGSLLLGYYGMDVW	720	RASQSISNNLN	1092	DASTLKR	1192	CQQSYNTPRTF	1350
005S-B12	Fzd10	FTZSSYDMH	263	SSISGLGGSTYZA	633	CAREAGTTGGWFDPW	805	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0217]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
005S-D12	Fzd10	FTFSDHYMD	204	STIGPAGDTYYP	644	CARASTSGDYSLW	756	RASQSVSTSYLA	1123	GASTRAT	1217	CQQYGASPWTF	1406
006S-B01	Fzd10	YTFTNYCTR	384	GLVCPSDGSTSYA	519	CARRTSASDIW	915	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-C01	Fzd10	FTFTZSAVQ	253	GGFDPEDGETIYA	492	CTTDPLELPWYW	1020	RASQGISSALA	1076	SASNLQS	1252	CQQAISFPLTF	1315
006S-E01	Fzd10	YTFTGYYMH	379	GIINPSSGRTDYA	514	CARDLTYYYDSSGHSPLGAFDIW	781	RASQSVTSSLA	1124	GASTRAT	1217	CQQYNDWPPTF	1416
006S-G01	Fzd10	FTFSDFGMN	203	AGISGGGGSTDYA	443	CARDSDFWYYYGMDVW	797	KSSQSVLYSSNNKNYLA	1037	STNTRSS	1257	CQHRNFF	1306
006S-B02	Fzd10	VSFSGYAMH	366	AYINSGSSEMNYA	482	CAREEWELFGMDVW	807	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
006S-G02	Fzd10	YTVTSYAMH	399	GGIIPIFGTAKYA	497	CAKGGQWLYGMDVW	713	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A01	Fzd1	YTFTSYYMH	392	GWVSPSSGNTAYA	588	CARDEGAGYYYYMDVW	766	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-C01	Fzd2	FTFSNYAMT	216	SAIGTGGGTYYA	595	CATAYRRPGGLDVW	969	RSSQSLLHSDGKTYLY	1134	LGSNRAS	1237	CMQNTHWPLTR	1293
014S-F01	Fzd4	FTFSSYAMH	227	SVISTSGDTVLYT	652	CARGGSSDVR	838	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-H01	Fzd4	FTFSNYGMH	217	SYISSSSSTIYYA	672	CARAALGYCTGGVCPPVDYW	737	RASQGISNNLN	1072	AASRLQS	1171	CQQSYSPPLTF	1363
014S-C03	Fzd7	YTFTNNFMH	383	GIIZPGGGRTIYA	517	CAKGDYGALDYW	712	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-D03	Fzd7	FNFSSYTMR	173	SVIYGGGNTNYA	653	CARGGSGGNLSYW	836	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-F03	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GGIIPLFGTANYA	506	CARLVVRGGYGMDVW	893	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-A04	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISSFNGNTKYA	575	CARADDYYDSSGYYYGFDYW	738	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-C04	Fzd8	FTFSSYTMN	235	SRINGDGSNTNYA	623	CARGWAGFDYW	871	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-D04	Fzd8	HTFSGYHIH	312	GWINAGNGNTTYA	558	CARDLSPMVRGVISGMDVW	779	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372

[0218]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
014S-E05	Fzd8	YTFTNNFMH	383	GIISPGGGRTIYA	515	CAKGDYGALDYW	712	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPLTF	1372
014S-E06	Fzd10	FTFGNYDMN	195	SSLSWNSGTIVYA	641	CARDSSSGWYASYYGMDVW	798	RASQSISRYLN	1095	AASSLQS	1175	CLQHHSYPFTF	1275
027S-C02	Fzd5	YTLTTWYMX	398	GWMNPNSGNTAYA	582	CARGALGMDVW	819	QASQDISNYLN	1046	AASSLHT	1173	CQESYSSPYTF	1302
027S-E03	Fzd8	YTFTGHYMH	378	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGTGGFDYW	867	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYSTPYTF	1379
027S-F03	Fzd8	YTFTGHYIH	377	GWMNPISGNTGYA	580	CARSTPFDPW	925	RASHDIGTFLA	1057	AASTLQS	1179	CQQSYRTPYTF	1355
027S-G03	Fzd8	YTFTHSYIH	380	GWINAKSGGTFYA	559	CARGDYDFWSGYHEYYYYGMDVW	824	QATQNIKKYLN	1051	KASTLES	1229	CQQSYSTPLTF	1372
027S-H03	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GWINPNSGGTNYA	564	CARAPLDGSGSYYVDW	746	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSNRAS	1237	CMQALQTPQTF	1282
027S-A04	Fzd8	YTFTNHFMH	382	GWISPNRGGTNYA	571	CARDCSGGSCYSHFDYW	765	RASQSISRSLA	1093	AASNLQS	1169	CQQAYSFPQTF	1323
027S-B04	Fzd8	FTVGSWYMS	259	SAIGTGGGTYYA	595	CAKDITPYGDYSILSHW	702	RASQAISNYLN	1059	AASSLQS	1175	CQQTFSPPLTF	1383
027S-C04	Fzd8	YTFTSHWMH	386	GGIIPIFGTTNYA	503	CARDSSSWYSYYYYYMDVW	799	RASQGINNYLA	1067	QASNLES	1243	CQQTYSSPLTF	1393
027S-D04	Fzd8	YTFTTYFMH	393	GWIYPNSGGTKYA	578	CTTDLRYDSSGPAAFDIW	1019	QASQDIDNYLN	1040	AASSLQS	1175	CQQSYSTPVTF	1377
027S-E04	Fzd8	FTFSDHYMS	205	SGISGSGGTTYYA	609	CATYGDFGYFDLW	978	RASQGIRNDLG	1069	AASTLQS	1179	CQQAYSFPWTF	1324
027S-C05	Fzd8	GSFSTSVFG	279	GRIIPLFGTTNYA	532	CVKDRAWGFDYW	1027	RASQGIRNDLA	1068	AASSLQR	1174	CQQSYSKPTF	1359
027S-D05	Fzd8	YTFTSYYMH	392	GWINPKSGGTNYA	560	CARGGFVFDYW	828	QASQDISNYLN	1046	ASSTLQT	1182	CQQSYSAPYTF	1356
027S-E05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GMINPSGGSTTYA	523	CARQAGLHCSSTSCYLGNWFDPW	905	RASQGITKSLA	1077	AASNLQL	1168	CQQYNTFPITF	1422
027S-F05	Fzd8	GTFNRYGIS	290	GGIIPRLGATDYA	508	CAKGNWAFDIW	719	RASQSISTYLA	1100	GASTRAT	1217	CQQYGSSPTF	1411
027S-G05	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISPYNGNTKYA	572	CARGVWTTPMGGGGNWFDPW	869	RASQSISSYLN	1098	YASSLQN	1261	CQQSYSTPFTF	1368

[0219]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
027S-H05	Fzd8	GTFGNYGIN	286	GWINPNSGGTNYA	564	CARETTDYYYGMDVW	814	RASQSIGTYLN	1088	DASNLET	1185	CQQANSFPLTF	1317
027S-A06	Fzd8	GTFSSYAIN	294	GVIDPSTGGTNYA	550	CARVLPGDSSGWYRGYYYYYGMDVW	941	RASQGISNNLN	1072	KASSLES	1226	CQQANSFPITF	1316
027S-C06	Fzd8	GTFTSYPIS	306	GWINTYNGNTIYA	566	CARDLDSGFDLW	776	RASQGVGDYLA	1078	DASNLQS	1186	CQQHNAYPLTF	1330
027S-D06	Fzd8	GTFSSYAIS	295	GWISAYNGHTNYA	569	CARGGYSYGTVFDYW	842	RASQDISSWLA	1064	KASTLES	1229	CQQSYGAPLTF	1348
027S-E06	Fzd8	YTFTKDYMH	381	GGIIPIFGTANYA	499	CARGLPPAAGGGGYFQHW	847	RASQNVNDWLA	1082	SASNLQS	1252	CQQSYSTPFTF	1368
027S-F06	Fzd8	FTFSSYAMH	227	AVTWYDGSNKYYA	480	CAKDLVPYCSGGSCPPSGW	705	RASQSISSYLN	1098	GASNLQS	1207	CQQSYSTPLTF	1372
027S-G06	Fzd5	YTFTDYYMH	376	GWMSPNSGNAGFA	584	CARGKSGSFDYW	846	RASQSVNNTYVA	1111	GTSTRAT	1222	CQQYDTSPPTF	1404
027S-H06	Fzd5	YTFTGHYIH	377	GIINPSGGSTSYA	513	CARGFCSGGSCLWYGMDVW	825	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSYTTPFTF	1382
027S-A07	Fzd5	GTFGSYAIT	287	GGIIPIFGTANYA	499	CAKDNGWYFDLW	706	RASQSISTNVN	1099	AASSLQS	1175	CQQSYSTPYTF	1379
029S-B01	Fzd1	GTFSSYAIS	295	GRINPHNGNTNYA	1461	CARATRVSAAGTVHFQHW	1472	KSSQSVLHSSNNKNYLA	1498	STNTRSS	1257	CQQYYSTPFTF	1544
029S-D01	Fzd2	YTFTRYYIH	1452	GWMNPNSGNTGYA	583	CARVRFLEEMDVW	1494	RASQSLSSWLA	1512	DASTLQS	1520	CQQAISFPLTF	1315
029S-C02	Fzd2	GTFSSYGIS	1457	GIINPSGGSTSYA	513	CARGDIVATMGMKKVDYYYYMDVW	1478	RASQDISNNLN	1500	GASHLQT	1522	CQQANSFPVTF	1318
029S-F02	Fzd2	YTFTRYYLH	1453	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGIGYW	1481	RASQGISNYLA	1074	AASRLQT	1515	CLQYNTYPWTF	1528
029S-H02	Fzd2	GTFSTYAIS	298	GDIIPIFGSANYA	1458	CARELGLGWFDPW	1476	RSSQSLLHSNGYNYLD	1138	LGSSRAS	1525	CMQALQTPLTF	1281
030S-A02	Fzd7	YTFTDYYMH	1449	GWMNPNSGSTGYA	1467	CARGDINYGNFDYW	1477	RASQSISSYLN	1098	KASTLHN	1523	CQQAISFPLTF	1315
030S-B02	Fzd3	YTFTDYYMH	1449	GWMNPNSGNTGYA	583	CARQGGSYSMGLDPW	1488	RASQSITTYLN	1511	KTSSLQS	1524	CQQGDSFPYTF	1531
029S-E03	Fzd3	YTFTGYYMH	379	GWINPNSGNTGYA	1463	CARSYYGVIDAFDIW	1492	RASQSISSYLN	1098	AASSLQT	1516	CQQSFRLPLTF	1532

[0220]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
029S-G03	Fzd3	YTFTNYYMH	1451	GWMNPNSGNTGYA	583	CAREDDFWSGGGMDVW	1474	RASQSIISYLN	1509	AASSLQS	1175	CQQSWRFPYTF	1535
030S-E03	Fzd3	FTFSDYYMS	1438	SAISGSGHSTYYA	1468	CAREGLRGWSIFDIW	1475	KSSQSVLYSSNNKNYLA	1037	WASTRES	1526	CQQYYSTPPTF	1545
029S-D05	Fzd3	YTFTDHYFH	1447	GWANPSSGNTGTA	1462	CARSRLRWDWYFDLW	1491	RASQTISSYLN	1513	DASNLET	1185	CQQSYSIPLTF	1536
030S-H03	Fzd3	FSFSSHAMS	1437	SAIGTGGGTYYA	595	CANPKHYW	1470	RASQGVSTYLA	1505	AASSLQS	1175	CQQYYSSPQTF	1543
029S-B06	Fzd3	YTFSRHYIH	1446	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGGHTGYSSGWYNHW	1479	RASQSVSSWLA	1120	AASSLQS	1175	CQQAFRFPPTF	1529
029S-E06	Fzd3	YWFTASYMH	1455	GWMKPDSGNTGYA	1465	CARRSSSWGWYFDLW	1489	RASQNINSWLA	1506	AASSLQS	1175	CQQYYSFPLTF	1542
029S-H06	Fzd3	YTFAKYYIH	1444	GWMNPNSGNTGYA	583	CARHKRHTPYAFDIW	1487	RASQSISSYLN	1098	AASSLQS	1175	CQQSHSTPLTF	1533
029S-G07	Fzd3	YTFTDSYIH	1448	GWISAYNGNTNYA	570	CARGSGYFDLW	1486	RASQSISKWLA	1510	GASTLQS	1215	CQQAYSFPWTF	1324
029S-H08	Fzd3	YTFTGHYMH	378	GWMNPNSGNTGYA	583	CARVGDYDRFNWYFDLW	1493	RASRTVYNFLA	1514	DASNLRT	1519	CQQSYSTPPTF	1537
029S-F09	Fzd3	GTFSSYAIT	1456	GWISAYNGNTNYA	570	CARANRGLRKNYYYGMDVW	1471	RASQSIARYLN	1507	GASSLQS	1211	CQQSYNTPWTF	1351
030S-F04	Fzd3	YTFTSSYIH	1454	GIINPSGGGAVYA	1459	CARWTTVVTGAAFDIW	1495	RASQGIRNDLN	1502	DASNLGT	1518	CQQSSRIPPTF	1534
029S-A10	Fzd3	YSFTGYYLH	1442	GWINPNSGGTNYA	564	CARDHGTMIAVAGTFDYYYYMDVW	1473	RASQGISKYLA	1503	AASSLQS	1175	CQQSYSTPWTF	1538
029S-B11	Fzd3	YTFNGYYMH	1445	GIVNPSGGGTNYA	1460	CARGGNYGRWLQPWYFDLW	1480	QASQDISNYLN	1046	GASALRS	1521	CQQTKSFPLTF	1540
029S-D11	Fzd3	HTFTSHYMH	1440	GWMNPNSANAGYA	1466	CARGLGYFDLW	1483	RASQDISRGLG	1501	AASTLYR	1517	CQQAYSFPWTF	1324
030S-H05	Fzd7	YSFTNYYMH	1443	GWMNPNSGNTGYA	583	CARSPDFWSGEGYFDLW	1490	RASQSIGNYLN	1508	AASSLQS	1175	CQQANSFPLTF	1530
030S-A06	Fzd7	YMFTGHDMH	1441	GRIIPILGIANYA	529	CARGIHGDYGLDYYYMDVW	1482	RASQAIGRRLA	1499	AASSLQS	1175	CQQYDTYWTF	1541

[0221]

克隆ID	初始结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
029S-C12	Fzd7	YTFTGYYMH	379	GWMNPNSGNTGYA	583	CARGMEYW	1484	RASQGISSYLA	1076	AASTLQS	1179	CLQYNTYPWTF	1528
030S-C06	Fzd7	YTFTGYYIH	1450	GWMDPNSGYTGYA	1464	CARGPADFWSGYKNDYFDFW	1485	RASQGISSWLA	1504	DASSLQS	1190	CQQSYSTPYSF	1539
4A12	Fzd5	GYTFTNYDIN	1439	WIYPRDGSTKYNEKFKG	1469	CVRSAWGFAY	1496	KASQDVGTAVA	1497	WASTRHT	1527	QQYSTYPLT	1546

[0222] 表1B:抗Fzd抗体克隆ID、重链(HC)和轻链(LC)Seq ID No以及结合特性

[0223]

克隆 ID	HC SID NO	LC SID NO	确认的结合
001S-B01	1	38	Fzd1、Fzd2、Fzd7、Fzd9
001S-E02	2	39	Fzd1、Fzd2、Fzd7
001S-G02	3	40	Fzd1、Fzd2、Fzd7
001S-H02	4	41	Fzd1、Fzd2、Fzd7
001S-A03	5	42	Fzd1、Fzd2、Fzd7、Fzd9
001S-B03	6	43	Fzd1、Fzd2、Fzd7
004S-G06	7	44	Fzd5、Fzd8
002S-B01	8		Fzd1
002S-C02	9		Fzd1
002S-E02	10		Fzd1
002S-G02	11		Fzd1
002S-F03	12		Fzd1
002S-A04	13		Fzd1
002S-B04	14		Fzd1
002S-D04	15		Fzd1
004S-H04	16	45	Fzd5
001S-A04	17	46	Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7、Fzd8
003S-E07	18	47	Fzd2
003S-D10	19	48	Fzd4
004S-B08	20	49	Fzd6
004S-D08	21	50	Fzd6
004S-C09	22	51	Fzd6
004S-F10	23	52	Fzd6
004S-A11	24	53	Fzd6
004S-A12	25	54	Fzd6
005S-B07	26	55	Fzd9
005S-D08	27	56	Fzd9
005S-E09	28	57	Fzd9
005S-H10	29	58	Fzd9
005S-B11	30	59	Fzd9
005S-D11	31	60	Fzd9
014S-G02	32	61	Fzd6

[0224]

克隆 ID	HC SID NO	LC SID NO	确认的结合
014S-B04	33	62	Fzd8
014S-B06	34	63	Fzd9
014S-G06	35	64	Fzd10
014S-A07	36	65	Fzd10
017S-B09	37		Fzd8
004S-D01	129	130	Fzd4
004S-E09	131	132	Fzd6
004S-F09			Fzd6
004S-H09			Fzd6
004S-B10			Fzd6
004S-C10			Fzd6
004S-F10			Fzd6
004S-G10			Fzd6
004S-A11			Fzd6
004S-B11			n.b.
004S-D11			Fzd6
004S-E11			n.b.
004S-F11			Fzd6
004S-G11			Fzd6
004S-A12			Fzd6
004S-B12			Fzd6
004S-C12			n.b.
004S-D12			n.b.
004S-F12			n.b.
004S-F12			n.b.
004S-G12			n.b.
005S-B02			n.b.
005S-C02			n.b.
005S-D02			Fzd5、Fzd8
005S-E02			Fzd5、Fzd8
005S-H02			Fzd5、Fzd8
005S-A03			Fzd5、Fzd8
005S-C03			n.s.
005S-E03			n.s.
005S-F03			Fzd8
005S-B04			Fzd5、Fzd8
005S-F04			n.b.
005S-G04			Fzd5、Fzd8
005S-H04			n.b.
005S-E05			n.b.
005S-G05			Fzd5、Fzd8
005S-H05			Fzd5、Fzd8
005S-D06			Fzd8
005S-F06			n.b.
005S-G06			n.b.
005S-A07			Fzd9、Fzd10
005S-B07			Fzd9
005S-A08			Fzd9

[0225]

克隆 ID	HC SID NO	LC SID NO	确认的结合
005S-B08			Fzd9
005S-D08			Fzd9
005S-E08			Fzd9
005S-F08			n.b.
005S-C09			Fzd9
005S-D09			Fzd9
005S-E09			Fzd9
005S-F09			Fzd9
005S-A10			Fzd9
005S-B10			Fzd9
005S-E10			Fzd9
005S-H10			Fzd9
005S-B11			Fzd9
005S-D11			Fzd9
005S-G11			n.b.
005S-H11			n.b.
005S-E12			Fzd10
006S-A01			Fzd10
006S-H01			n.b.
006S-A02			Fzd10
006S-D02			n.b.
006S-H02			Fzd10
006S-A03			n.b.
006S-B03			n.b.
006S-C03			n.b.
014S-A01			Fzd1、Fzd2、Fzd7
014S-B02			n.b.
014S-G02			Fzd6
014S-B03			n.b.
014S-C03			Fzd1、Fzd2、Fzd7
014S-A04			n.b.
014S-B04			Fzd8
014S-B05			Fzd5、Fzd8
014S-B06			Fzd9
014S-F06			n.s.
014S-G06			Fzd10
014S-A07			Fzd10
017S-E08			Fzd8
017S-H08			n.b.
017S-A09			n.b.
017S-B09			Fzd8
018S-F06			Fzd4
018S-H06			n.b.
018S-B07			n.b.
017S-A10			n.b.
017S-B10			n.b.
017S-D10			n.b.
018S-H08			n.b.

[0226]

克隆 ID	HC SID NO	LC SID NO	确认的结合
018S-B09			Fzd5、Fzd8
021S-A01			n.b.
021S-E02			Fzd5、Fzd8
021S-G02			n.s.
021S-A03			n.b.
029S-B01			n.b.
029S-D01			Fzd1、Fzd2、Fzd7
029S-C02			Fzd1、Fzd2、Fzd7
029S-H02			Fzd1
030S-A02			Fzd7
029S-E06			Fzd2、Fzd6、Fzd3
030S-F04			Fzd3
030S-H05			Fzd7
030S-A06			Fzd1、Fzd2、Fzd7、Fzd5
029S-C12			Fzd7
030S-C06			Fzd1
001S-A01			Fzd1、Fzd2、Fzd7
001S-H01			Fzd1、Fzd2、Fzd7

[0227] 在某些实施例中,Fzd结合结构域可以选自以例如K_D为以下的亲和力与Fzd结合的任何结合结构域:至少约1×10^{-4}M、至少约1×10^{-5}M、至少约1×10^{-6}M、至少约1×10^{-7}M、至少约1×10^{-8}M、至少约1×10^{-9}M或至少约1×10^{-10}M。在某些实施例中,Fzd结合结构域可以选自以例如K_D为以下的高亲和力与一种或多种Fzd结合的任何结合结构域:小于约1×10^{-7}M、小于约1×10^{-8}M、小于约1×10^{-9}M或小于约1×10^{-10}M。在某些实施例中,在Wnt替代分子的上下文中,Fzd结合结构域可以选自以例如K_D为以下的高亲和力与Fzd结合的任何结合结构域:小于或等于约1×10^{-4}M、小于或等于约1×10^{-5}M、小于或等于约1×10^{-6}M、小于或等于约1×10^{-7}M、小于或等于约1×10^{-8}M、小于或等于约1×10^{-9}M或至少约1×10^{-10}M。

[0228] 适合的Fzd结合结构域包含但不限于从头设计的Fzd结合蛋白、抗体衍生的结合蛋白(例如,scFv、Fab等)以及与一种或多种Fzd蛋白特异性结合的抗体的其它部分;VHH或单结构域抗体衍生的结合结构域;基于打结素(knottin)的工程化支架;norrin和由其衍生的工程化结合片段、天然存在的Fzd结合结构域等。Fzd结合结构域可以是亲和力选择的,以增强与期望的Fzd蛋白或多种Fzd蛋白的结合以例如提供组织选择性。

[0229] 在一些实施例中,Fzd结合结构域与一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同的卷曲蛋白,例如人卷曲蛋白Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9、Fzd10中的一种或多种人卷曲蛋白结合。在一些实施例中,Fzd结合结构域与Fzd1、Fzd2和Fzd7结合。在一些实施例中,Fzd结合结构域与Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8结合。在其它实施例中,Fzd结合结构域对关注的一种或多种卷曲蛋白具有选择性,例如相对于其它卷曲蛋白,针对所述一种或多种期望的卷曲蛋白具有至少10倍、25倍、50倍、100倍、200倍或更多倍的特异性。

[0230] 在某些实施例中,Fzd结合结构域包括泛特异性卷曲蛋白抗体OMP-18R5(vantictumab)的六个CDR区。在某些实施例中,Fzd结合结构域是包括泛特异性卷曲蛋白抗体OMP-18R5(vantictumab)的六个CDR区的scFv。参见例如通过引用的方式具体并入本文中的美国专利第8507442号。例如,OMP-18R5的CDR序列包含:包括GFTFSHYTLS(SEQ ID NO:270)的重链CDR1、包括VISGDGSYTYYADSVKG(SEQ ID NO:677)的重链CDR2和包括NFIKYVFAN(SEQ ID NO:1033)的重链CDR3;以及(ii)包括SGDKLGKKYAS(SEQ ID NO:1152)或

SGDNIGSFYVH(SEQ ID NO:1153)的轻链CDR1、包括EKDNRPSG(SEQ ID NO:1200)或DKSNRPSG(SEQ ID NO:1201)的轻链CDR2和包括SSFAGNSLE(SEQ ID NO:1435)或QSYANTLSL(SEQ ID NO:1436)的轻链CDR3。在特定实施例中,Fzd结合结构域是抗体或其衍生物,包含但不限于scFv、迷你体、VHH或单结构域抗体(sdAb)以及包括这些CDR序列中的任一个的各种抗体模拟物。在某些实施例中,这些CDR序列包括一个或多个氨基酸修饰。

[0231] 在其它实施例中,Fzd结合结构域包括来自多种卷曲蛋白特异性抗体中的任一种卷曲蛋白特异性抗体的可变区序列或其CDR,所述多种卷曲蛋白特异性抗体是本领域中已知的并且可商购获得或者可以从头产生。卷曲蛋白多肽中的任一种卷曲蛋白多肽可以用作免疫原或在筛选测定法中用于开发抗体。卷曲蛋白结合结构域的非限制性实例包含可购自Biolegend的抗体,例如,针对人卷曲蛋白4(CD344)具有特异性的克隆CH3A4A7、针对人Fzd9(CD349)具有特异性的克隆的W3C4E11;可购自艾博抗(Abcam)的抗体,例如,针对Fzd7具有特异性的ab64636;针对人Fzd4具有特异性的ab83042;针对人Fzd7具有特异性的ab77379;针对人Fzd8具有特异性的ab75235;针对人Fzd9具有特异性的ab102956;等。适合的抗体的其它实例尤其描述于美国专利申请20140105917;美国专利申请20130230521;美国专利申请20080267955;美国专利申请20080038272;美国专利申请20030044409;等,所述美国专利申请各自通过引用的方式具体并入本文。

[0232] Wnt替代分子的Fzd结合区可以是被选择用于与wnt蛋白的卷曲蛋白结合区的结构同源的工程化蛋白。此类蛋白质可以通过筛选结构数据库的同源性来鉴别。由此鉴别出初始蛋白,例如微生物Bh1478蛋白。然后,天然蛋白被工程化以提供增加亲和力的氨基酸取代,并且可以通过亲和力成熟进行进一步的选择以便在与期望的卷曲蛋白结合时具有增加的亲和力和选择性。卷曲蛋白结合部分的非限制性实例包含Fz27和Fz27-B12蛋白。

[0233] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括与特异性结合一种或多种Fzd受体的多肽融合的LRP5/6结合结构域,例如,抗LRP5/6抗体或其抗原结合片段。在特定实施例中,与LRP5/6特异性结合的多肽是抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,其是于2017年12月19日提交的题为“抗LR5/6抗体和使用方法(Anti-LR5/6Antibodies and Methods of Use)”、代理人案卷号为SRZN-005/00US的美国临时专利申请第62/607,879号中公开的抗体或其抗原结合片段,所述美国临时专利申请通过全文引用的方式并入本文。在特定实施例中,LRP5/6结合结构域包括针对表2A中提供的与LRP5和/或LRP6结合的说明性抗体或其片段中的任一种抗体或其片段公开的三个重链CDR和/或三个轻链CDR。在特定实施例中,LRP5/6结合结构域包括针对表2A中提供的与一种或多种Fzd受体结合的说明性抗体或其片段中的任一种抗体或其片段公开的三个重链CDR和/或三个轻链CDR,其中CDR共同包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸修饰,例如,取代、缺失或添加。在某些实施例中,LRP5/6结合结构域是VHH或sdAb或衍生自VHH或sdAb,因此表2A仅包含三个重链CDR。在某些实施例中,LRP5/6结合结构域包括表2A中所示的三个重链CDR或变体,其中CDR共同包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸修饰。在特定实施例中,LRP5/6结合结构域包括表2B或SEQ ID NO:66-88或133中提供的与LRP5和/或LRP6结合的说明性抗体或其片段中任一种抗体或其片段的重链片段和/或轻链片段(或任一者的抗原结合片段或变体)。在某些实施例中,LRP5/6结合结构域是Fab或衍生自Fab,因此表2B包含VH和CH1序列,但不包含CH2或CH3序列。在某些实施例中,LRP5/6结合结构域是VHH或sdAb或衍生自VHH或sdAb,因此表2B

包含VHH结构域。在某些实施例中,LRP5/6结合区是与这些抗体之一竞争与LRP5和/或LRP6结合的多肽,例如,抗体或其抗原结合片段。

[0234] 表2A:抗LRP5/6抗体克隆ID和CDR序列。

[0235]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
001S-C08	LRP6 e1e2	YTISNYYIH	1682	GMINPSGGSTTYA	1762	CAIVRGKKWYFDLW	1842	RASQYISNYLN	2098	AASSLQS	2110	CQQSYITPLTF	2160
001S-C10	LRP6 e1e2	RTFGTYPNG	1632	AAISWGGRTAYA	1700	CYARTVIGGFGAFRAHW	2061						

[0236]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
001S-D10	LRP6 e1e2	RTFSRYAMA	1642	AAIRWSGGGTYYA	1689	CAASMEAMNSLRVNKERYYQSW	1836						
001S-E10	LRP6 e1e2	LTFSNAAMA	1614	AAISRSGANTAYS	1696	CTLVNEIKTWW	2039						
001S-F10	LRP6 e1e2	RTFSSYAMA	1645	AAIKWSGTNTYYA	1684	CAASMEAMNSLRVNKERYYQSW	1834						
001S-G10	LRP6 e1e2	RTFSRYVMG	1644	AAITWRGGSTYYA	1706	CATGPNSIY	1987						
001S-A11	LRP6 e1e2	RTFGNYDMG	1630	AGIRWSGSTLYA	1709	CYARTVIGGFGAFRAHW	2062						
001S-B11	LRP6 e1e2	RRFTTYGMG	1623	AAVTWRSGSTYYA	1708	CAAGSTVVAEFNYW	1828						
001S-C11	LRP6 e1e2	SISSFNTMG	1659	AVITTGGDTSYS	1741	CNKVNAITKL	2025						
001S-E11	LRP6 e1e2	RTLSRYSMG	1651	AAISRSGDRIYYS	1697	CTLVNEIKTWW	2040						
001S-F11	LRP6 e1e2	RTFSSYAMS	1646	AVIGRSGGIKYYA	1736	CATRRPFNSYNTEQSYDSW	1989						
001S-G11	LRP6 e1e2	SIFRLGTMY	1655	ASIGKSGSTNYA	1719	CKQHPNGYR	2005						
001S-H11	LRP6 e1e2	RTLSSFAMG	1652	ATISRSGGNTYYA	1732	CNLREWNNSGAGYW	2026						
001S-A12	LRP6 e1e2	IAFRYYDMG	1608	AAITWNGRSSDYA	1704	CAAVFTGRFYGRPPREKYDYW	1838						
001S-B12	LRP6 e1e2	RLLSYYALA	1622	AAISRNGDKSHYS	1694	CTLVNEIKTWW	2038						
001S-C12	LRP6 e1e2	RTFSNYAVG	1641	AAISRFGGSTYYV	1693	CAADRIENYLGRYYDPSEYEYW	1824						
001S-D12	LRP6 e1e2	RTFSRYAMG	1643	GAISRSGNNTYYA	1744	CTLVNEIKTWW	2041						
001S-F12	LRP6 e1e2	RTFRSYTMG	1637	AAISGSGGSTTYA	1690	CNADIKTTTYSPLRNYW	2009						
008S-B01	LRP5	TIFSINTMG	1664	ATMTSGGNTNYA	1734	CYRRQWASSWGARNYEYW	2064						

[0237]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
008S-C01	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CHGRDYGSNAPQYW	2001						
008S-D01	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CYVKLRDDDYVYR	2065						
008S-E01	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CNAVTYNGYTIR	2023						
008S-G01	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CYARTQRMGVVNSYW	2060						
008S-A02	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CNAVTFGGNTIR	2021						
008S-C02	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CNAVTYDGY	2022						
008S-D02	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CAAQFRNDYGLRYQSTNNYW	1832						
008S-E02	LRP5	NINSIETLG	1617	ANMRGGGYMKYA	1716	CNANYRGNRYW	2019						
009S-C01	LRP6e3e4	GSFSGYYWT	1595	GEINHSGATNYN	1745	CVRYAWPEFDHW	2053	RASQRVSNYLN	2089	AASSLQG	2110	CQQSYSVPYTF	2178
009S-B02	LRP6e3e4	GSLSGYYWS	1596	GEINHSGSTNYN	1746	CVRYAWPEFDHW	2055	RASQSISNYLN	2090	AASSLQS	2110	CQQSYSLPLTF	2170
009S-C02	LRP6e3e4	GSFSDYYWS	1594	GEINHSGSTNYN	1746	CVRYAWPEFDHW	2054	RASQSISNYLN	2090	AASSLQS	2110	CQQSYSMPLTF	2171
009S-D02	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GGIIPIFGTANYA	1749	CVYGRDFDYW	2056	SGSSSNVGNNYVS	2105	DNDKRPS	2122	CESWDSSLSSEVF	2139
010S-A02	LRP6e1e2	HTFSSYAMG	1607	AAISQSGYVRYYA	1691	CKIYGLNGQPLGSW	2003						
010S-B02	LRP6e1e2	RTFNSGTMG	1634	AAITWRGGITYYA	1705	CNADGYSWDGRSGRRLELW	2008						
010S-D02	LRP6e1e2	RTFSSYAVG	1647	AAISYSGGSTKYA	1702	CAASVYISRRDSDYGYW	1837						
010S-E02	LRP6e1e2	LSSGRPFSSYVMG	1612	AAISWSGGSTKYA	1701	CKLQVRPIGYSSAYSRNYW	2004						
010S-F02	LRP6e1e2	RSFNSYVIG	1625	AAIRWSGDNTYYA	1688	CAASMEAMNSLRVNKERYYQSW	1835						
009S-E02	LRP6e1e2	RRFTTYGMG	1623	AAVTWRSGSTYYA	1708	CAAGSTVVAEFNYW	1829						
009S-F02	LRP6e1e2	RTFSYYAMG	1649	AAISRSGGIYYA	1698	CNTVRPLWAW	2029						

[0238]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
009S-G02	LRP6 e1e2	SIFSIYAMG	1658	AVITSGGKTVYA	1740	CYADSRSSWYDEYLEHW	2058						
009S-H02	LRP6 e1e2	SIVRSLPMA	1660	ATINDAQRYYA	1727	CNTSPYMHDVW	2027						
009S-A03	LRP6 e1e2	RTFSVYGVG	1648	AAVSASGGYTWYA	1707	CKAAPRWGGATAYW	2002						
010S-G02	LRP6 e1e2	SIVRSLPMA	1660	ATINDAQRYYA	1727	CNTSPYMHDVW	2028						
010S-A03	LRP6 e1e2	RTFRRYAMG	1636	ATISASGGNTAYA	1731	CNAPAWLYDDDYW	2020						
009S-B03	LRP6 e1e2	RTFSNYAVG	1641	AAISRFGGSTYYV	1693	CAADRIENYLGRYYDPSEYEYW	1825						
010S-B03	LRP6 e1e2	RTFSNYAVG	1641	AAISRFGGSTYYA	1692	CHAKQLRNGQMYTYW	1999						
010S-D03	LRP6 e1e2	ISSVYGMG	1609	AAIQWSADNTFYA	1686	CAARTSGGLFHYRRSDHWDTW	1833						
009S-C03	LRP6 e1e2	LPFSRYAMA	1610	AGMSGEGRNTKYR	1713	CSSRGYW	2034						
009S-D03	LRP6 e1e2	SIFSDGAMG	1656	AVISGGRTGYA	1737	CNTYPFPIYKKGYPFW	2030						
009S-E03	LRP6 e1e2	RRFTTYGMG	1623	AAVTWRSGSTYYA	1708	CAAGSTVVAEFNYW	1830						
009S-F03	LRP6 e1e2	RTFSSYAMS	1646	AVIGRSGGIKYYA	1736	CATRRPFNSYNTEQSYDSW	1990						
010S-E03	LRP6 e1e2	RSVSIYPMG	1628	AAINWSGDSTKYA	1685	CNAVVVGLSRRIDNIW	2024						
010S-F03	LRP6 e1e2	RTFSRYVMG	1644	AAITWRGGSTYYA	1706	CATGPNSIY	1988						
009S-G03	LRP6 e1e2	RSVSSYNMG	1629	AAISRRGGIIEYG	1695	CHAVENILGRFVDYW	2000						
009S-H03	LRP6 e1e2	SIFSINTMG	1657	AVITSGGKTVYA	1740	CYADSRSSWYDEYLEHW	2057						
009S-A04	LRP6 e1e2	RTLSAYDMG	1650	GGIRWSGGTTLYP	1753	CYARTVIGGFGAFRAHW	2063						
009S-B04	LRP6 e3e4	SIFMINTMA	1654	ATIRPVVSETTYA	1728	CNAKRPWGTRDEYW	2018						

[0239]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
010S-G03	LRP6e3e4	RSFNSYTTT	1624	AAIRGSSGSTFYA	1687	CNAASTVTAWPYYGPDYW	2006						
009S-C04	LRP6e3e4	FRFSISTMG	1553	AYITGGGRTMDG	1743	CNAFVRSDFDRYYDYW	2011						
009S-D04	LRP6e3e4	TIVSIYRIN	1665	AGITSSGRTIYA	1712	CNAASTVTAWPYYGPDYW	2007						
010S-H03	LRP6e3e4	RIFSIYDMG	1621	SGIRWSGGTSYA	1789	CSSRGYW	2035						
009S-E04	LRP6e3e4	RIFAIYDIA	1618	AMIRPVVTEIDYA	1715	CNAKRPWGSRDEYW	2012						
010S-A04	LRP6e3e4	SLFSFNAVG	1662	ASISSGGRTNYA	1722	CSKGGVYGGTYVPDSW	2032						
009S-F04	LRP6e3e4	RSLSSFAMG	1627	ARISRGDGYTDEA	1718	CAAVQAVIGGTLTTAYDYW	1839						
010S-B04	LRP6e3e4	RVLSYYAMA	1653	AGITRGGATTYYS	1711	CAAGPNWSTRNREYDYW	1827						
009S-G04	LRP6e3e4	GTFSRYHMG	1601	SAITWSGGRTYYA	1788	CALTWAPTPTNRRSDYAYW	1872						
009S-H04	LRP6e3e4	RIFAIYDMA	1619	ATIRPVVSETTYA	1728	CNAKRPWGTRDEYW	2017						
010S-C04	LRP6e3e4	SLFSFNAMG	1661	ASISSGSRTNYA	1723	CSKGGVYGGTYVPDSW	2033						
010S-D04	LRP6e3e4	RIFAIYDIA	1618	ATIRPVVTQIDYA	1730	CNAKRPWGSRDEYW	2015						
010S-E04	LRP6e3e4	RTFGSDVMG	1631	ALTGWGDGSTTYYE	1714	CAAARRSGTYDIGQYLRESAYVFW	1820						
010S-F04	LRP6e3e4	RTFSRYAMG	1643	AAITRSGSNTYYA	1703	CAADPRGVTLPRATAYEYW	1823						
009S-A05	LRP6e3e4	RTFSDYSMG	1639	AGISWIADNRYYA	1710	CTAGRSRYLYGSSLNGPYDYW	2036						
010S-G04	LRP6e3e4	VIFALYDIA	1666	ATIRPVVTETDYA	1729	CNAKRPWGSRDEYW	2014						
010S-H04	LRP6e3e4	RSFSDFFMG	1626	ATISWSGSSANYE	1733	CAAAYSYSQYGSSYSYW	1821						

[0240]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
010S-A05	LRP6e3e4	LSFSSYAMG	1611	AAISRSGVSTYYA	1699	CAAKFGVLATTESRHDYW	1831						
010S-C05	LRP6e3e4	RTFNIDDMG	1633	ASIRWSGQSPYYA	1720	CNAETYSGNTIW	2010						
010S-D05	LRP6e3e4	RTFSDYSMA	1638	AGISWIADNRYYA	1710	CAGDRSRYLYGDSLRGPYGYW	1841						
010S-E05	LRP6e3e4	SVFTTFAKG	1663	ASITASSDRTFYA	1725	CAAYSTFNTDVASMKPDYW	1840						
010S-F05	LRP6e3e4	RIFSIYDIA	1620	ATIRPVVTETDYA	1729	CNAKRPWGSRDEYW	2013						
013S-G04	LRP6e3e4	RIFAIYDIA	1618	ATIRPVVSETTYA	1728	CNAKRPWGTRDEYW	2016						
013S-H04	LRP6e3e4	RTFSMYDMG	1640	ASIRWSSGNTWYA	1721	CYANIYYTRRAPEEYW	2059						
013S-A05	LRP6e3e4	RTFNTYAMG	1635	ASVSWRYDRTYYT	1726	CAADTNWRAGPRVGIDEYAYW	1826						
013S-B05	LRP6e3e4	FAFSTTAMS	1549	STINPGGLSKSYA	1806	CTKGGIQ	2037						
013S-C05	LRP6e3e4	NIFPIDDMS	1616	ATVTSGGRINYA	1735	CNVDRTLYGKYKEYW	2031						
013S-D05	LRP6e3e4	RIFSIYDMG	1621	SGIRWSGGTSYA	1789	CGSRGYW	1998						
013S-E05	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTADYA	1748	CARDWELYGMDVW	1907	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
013S-F05	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GIINPSGGSTSYA	1761	CARAGYYDSSGYYAFDIW	1882	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
013S-G05	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGVIPIFGTADYA	1755	CASDIVVDDAFDTW	1969	RASQDISNYLN	2079	AASTLQS	2113	CQQGNSFPYTF	2152
010S-G06	LRP6e3e4	FSFETYGMS	1555	SGISGSGGRTHYA	1792	CARDLDYW	1897	QASQDISNYLN	2077	AASSLQS	2110	CQQSYRIHWTF	2163
009S-B05	LRP6e3e4	FTFDAYAMH	1560	STLSGDANNAYYA	1811	CARGGSGWSNYYGMDVW	1931	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-C05	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPVLKITNYA	1768	CAVVDDAFDIW	1996						
009S-D05	LRP6e3e4	FTLRNHWLS	1591	SAISGSGGSTYYA	1786	CATRTGYSYGFNFWAFDIW	1991	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0241]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
009S-E05	LRP6e3e4	YTFTNNFMH	1676	GHVDPGDGETIYA	1756	CARDWGIAAAGDYYYYGMDVW	1908	RASQGINSYLA	2081	DAKGLHP	2114	CQQSYSAPLSF	2166
009S-F05	LRP6e3e4	FTFDDYGMS	1561	SAIGTGGGTYYA	1781	CARLGSYGSPYYYYGMDVW	1959	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-G05	LRP6e3e4	FTFSDYYMS	1568	SGVSWNGSRTHYA	1799	CAKDSGLV	1852	QASQDISNYLN	2077	AASTLQR	2112	CQQSYSAPLTF	2167
009S-C06	LRP6e3e4	YTFASYDIH	1671	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARATGSGWYTDLGYW	1883	RASRNINRYLN	2099	AASSLLS	2109	CQQSYNVPFTF	2162
009S-D06	LRP6e3e4	FTFSSHSTH	1573	STISDTNSGTYYA	1807	CAKAQATGWSGYYTFDYW	1843	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-E06	LRP6e3e4	FTFTDYGLH	1587	AVISYGGSNKYYA	1739	CASGYSYGLYYYGMDVW	1973	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-F06	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATEAALDAFDIW	1985	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-G06	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GWINPNSGGTNYA	1774	CARDFLGSTGDYW	1892	RASQNIGLYLN	2088	DASSLQR	2121	CQQSYSTPYTF	2176
009S-H06	LRP6e3e4	FTFSSSAMH	1574	SAIGTGGSTYYA	1783	CAKGGDYFYYYGMDVW	1856	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATAYGSSSLNIDYW	1980	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWINPNSGGTNYA	1774	CVKDGGSFPLAYAFDIW	2049	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D07	LRP6e3e4	FPFRYYGMS	1551	ARIGWNGGSIVYA	1717	CARDYSDRSGIDYW	1910	RSSQSLLHSNGYNYLD	2102	LGSNRAS	2131	CMQATQFPLTF	2146
009S-F07	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GIINPSGGSTSYA	1761	CARAAGNFWSGYYTFDYW	1876	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-G07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGSYGMDVW	1947	RASQGISNYLA	2083	DASNLET	2115	CLQDFSFPWTF	2140
009S-H07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWMNPNSGNTGYA	1776	CASSVVPAGPAGVYAFDIW	1975	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A08	LRP6e3e4	GTFSSHAIN	1602	GWISANNGNTDYA	1775	CARDQDYGDYGWYYYGMDVW	1902	RASQGISNYLA	2083	GSSTLQS	2127	CQQTYSIPPTF	2181
011S-C01	LRP6e3e4	LTFTSHGMS	1615	SYVSDSGSSVYYA	1818	CARHPGSFGGYSYAWYYYYGMDVW	1956	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0242]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
009S-C08	LRP6e3e4	FSFNTFGIH	1556	AVISYDGSNKYYA	1738	CAKSIAAAGTGYYGMDVW	1868	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D08	LRP6e3e4	YTFTSYDIN	1679	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGPYYFDYW	1939	RASQGISNNLN	2082	DASSLES	2120	CLQHNSYPFTF	2143
011S-F01	LRP6e3e4	FSFSDYYMS	1558	SGISESGGRTYYA	1790	CASAADFDYW	1966	RASQDISNYLN	2079	AASSLQS	2110	CLQDYSYPRTF	2141
009S-E08	LRP6e3e4	YGFTGYYIH	1668	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARGYGDYDLW	1951	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYRYPTF	2165
009S-F08	LRP6e3e4	DTFANYGFS	1547	GXVNAGNGNTTYA	1777	CAKGWLDFDYW	1866	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYSTSITF	2177
009S-G08	LRP6e3e4	FTFSDFAMT	1566	SYISGDSGYTNYA	1813	CARLGSYPGPYYYYMDVW	1961	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-H08	LRP6e3e4	YTFTDYFMN	1673	GIINPSGDSTRFA	1758	CARDDGLGGMDVW	1888	QASQDISNYLA	2076	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A09	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPILGSTNYA	1767	CTTDLWDYW	2047	QASQGITNYLN	2078	AASSLQS	2110	CLQDYTDPFTF	2142
011S-F02	LRP6e3e4	FTFSTYGMH	1584	SSISVSSGTTHYA	1804	CARGGSGSYYYAFDIW	1929	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-G02	LRP6e3e4	YTFTSYAMN	1678	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDASGGSTGWYYFDSW	1886	RASQGISSYLA	2087	AASSLQS	2110	CQQAYSFPWTF	2150
011S-A03	LRP6e3e4	FTFSSYWMH	1580	STISGSGGRTYYA	1808	CATSPYGVFTLDYW	1993	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-C03	LRP6e3e4	YTFSYRYLH	1672	GGIIPIFGTANYA	1749	CASTVTTDAFDIW	1977	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYSFPPFTF	2168
011S-D03	LRP6e3e4	FSFDDYGMS	1554	SVISSGGTIYYA	1812	CARHLSSGYLSYYGMDVW	1954	RASQSISSYLA	2093	AASTLQS	2113	CQQSYSTPLTF	2174
011S-F03	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1859	KSSQSVLYTTTNRNHIA	2073	WASSRKS	2135	CQQYYSTPYTF	2189
011S-C04	LRP6e1e2	GTFNSNAIS	1598	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARDYYGSGSYNYGMDVW	1912	GASQSVPRNSLA	2066	GASQRAT	2124	CQQYHNWPPEYTF	2184
011S-D04	LRP6e1e2	YTFTSYDIN	1679	GIINPSGGSTSYA	1761	CAREAYYYYYGMDVW	1915	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-H04	LRP6e1e2	YIFTDYYMH	1669	GRIIPILGRANYA	1765	CARGGYSTLDYW	1932	QASQDISNYLN	2077	AASTLQS	2113	CQQSFSTPRTF	2156
008S-F02	LRP5	YTFTNYCMH	1677	GIINPSDGSTSHA	1757	CAKDMVHLIVALAIDYW	1851	RSSQSLLHSDGYTYLY	2101	TLSYRAS	2134	CMQALEALFTF	2144

[0243]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
010S-C06	LRP6e1e2	FTFNSYSMD	1563	SSISPRGGSTYYA	1802	CAPYYYDKSAKPLRSYFDHW	1875	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-E06	LRP6e3e4	LTVSSNYMS	1615	SGISWNSGSIGYA	1796	CARGSDCSGGSCYYSFDYW	1944	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F06	LRP6e3e4	FTFSSSWMH	1575	SAIGTGGGTYYA	1781	CAREVAVKDYYYYYMDVW	1921	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-H06	LRP6e3e4	YTFTSYDIN	1679	GRIIPILGRTNYA	1766	CAREERGATGRAFDIW	1918	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-A07	LRP6e3e4	FTFSSYAMH	1576	ASISSTSGSKYYA	1724	CAKTYYDFWSGYYTFDYW	1870	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-B07	LRP6e3e4	FTFSDYYMS	1568	SMISYNGGRAFYA	1800	CARGNPYYFDYW	1937	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-C07	LRP6e3e4	FTFSKTDMH	1569	STITTDSRGTYYA	1810	CAKGGDYYYYYGMDVW	1858	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-D07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CANGLEDAYAFDIW	1873	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D05	LRP6e3e4	FTLRNHWLS	1591	SAISGSGGSTYYA	1786	CATRTGYSYGFNFWAFDIW	1992	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-E05	LRP6e3e4	YTFTNNFMH	1676	GHVDPGDGETIYA	1756	CARDWGIAAAGDYYYYGMDVW	1909	RASQGINSYLA	2081	DAKGLHP	2114	CQQSYSAPLSF	2166
010S-E07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CAKDDFSLYGMDVW	1845	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-F05	LRP6e3e4	FTFDDYGMS	1561	SAIGTGGGTYYA	1781	CARLGSYGSPYYYYGMDVW	1960	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARLDYGETEGNGDW	1958	RASQSVYSNLA	2097	DTSNRAT	2123	CQQYNNWPPITF	2185
010S-G07	LRP6e3e4	FTFSSYAMH	1576	STISGSGGSTYYA	1809	CARAGYGRYYYGMDVW	1880	RVSQGISSYLN	2103	AASSLQS	2110	CQQTYTIPFTF	2182
009S-G05	LRP6e3e4	FTFSDYYMS	1568	SGVSWNGSRTHYA	1799	CAKDSGLV	1853	QASQDISNYLN	2077	AASTLQR	2112	CQQSYSAPLTF	2167
010S-H07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDDSMGAFDIW	1890	QASQDISNYLN	2077	GTSNLQS	2128	CQQSYSTPYTF	2176
010S-A08	LRP6e3e4	HTFLTYDIN	1606	GRITPRLGIANYA	1770	CASYFGVMDVW	1979	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0244]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
009S-A07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATAYGSSSLNIDYW	1981	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWINPNSGGTNYA	1774	CVKDGGSFPLAYAFDIW	2050	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B06	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CAPALTDAGSFDYW	1874	RVSQSISSYLN	2103	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-B08	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPVFGTADYA	1751	CARDREQQILDYW	1904	RASQGISNNLN	2082	DASNLET	2115	CQQSYTSRLTF	2179
010S-C08	LRP6e3e4	FTFSTFGMH	1582	STITSSGGSTYYA	1809	CARAGIAAAPGSRNYYGMDVW	1878	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-C06	LRP6e3e4	YTFASYDIH	1671	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARATGSGWYTDLGYW	1884	RASRNINRYLN	2099	AASSLLS	2109	CQQSYNVPFTF	2162
009S-D06	LRP6e3e4	FTFSSHSTH	1573	STISDTNSGTYYA	1807	CAKAQATGWSGYYTFDYW	1844	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-D08	LRP6e3e4	FTFSSSWMH	1575	SAIGTGGGTYYA	1781	CAKEDYDSSGYYYYYFQHW	1855	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-E06	LRP6e3e4	FTFTDYGLH	1587	AVISYGGSNKYYA	1739	CASGYSYGLYYYGMDVW	1974	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-E08	LRP6e3e4	YSFTRTDMH	1670	GYISAYTGHTSYA	1778	CARDLGGTADYW	1898	RASQSISSYLN	2094	ZASSLQS	2137	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F08	LRP6e3e4	LTFDDHAMH	1613	SYISSSGRTIFYA	1815	CVRGDSGWGILYYVMDVW	2052	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-F06	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATEAALDAFDIW	1986	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-G08	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GGFDPEDGETIYA	1747	CARGGGPNEHDYYFDYW	1927	RASQSVRSSDLA	2096	GSSSRAT	2126	CQQYGRSPRYSF	2183
010S-H08	LRP6e3e4	FTFZNAWMS	1590	SGISGSGGSTYYA	1793	CARGRGKKNYYYGMDVW	1942	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-A09	LRP6e3e4	FTFSTYYMS	1586	SGISWNGGKTHYV	1794	CARGGDFDYW	1925	QASQDIANYLN	2075	AASSLQS	2110	CQQSYSTPYTF	2176
010S-B09	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GWINPNSGDTNYA	1773	CARGEQWLVWGFDPW	1924	RASQSISRYLN	2092	KASSLES	2130	CQQSYDSPWTF	2159
009S-G06	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GWINPNSGGTNYA	1774	CARDFLGSTGDYW	1893	RASQNIGLYLN	2088	DASSLQR	2121	CQQSYSTPYTF	2176
010S-C09	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDEVEGGMDVW	1891	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0245]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
009S-H06	LRP6e3e4	FTFSSSAMH	1574	SAIGTGGSTYYA	1783	CAKGGDYFYYYGMDVW	1857	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-D09	LRP6e3e4	GTFSSYTIS	1603	GGIVPAYRRANYA	1754	CAKGGYELDYW	1865	QASQDISNYLN	2077	AASSLQS	2110	CQQIHSYPLTF	2155
010S-E09	LRP6e3e4	GDLSIYTIN	1593	GWINAGNGNTTYA	1772	CARGGDSSGYYYYAFDIW	1926	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATAYGSSSLNIDYW	1982	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWINPNSGGTNYA	1774	CVKDGGSFPLAYAFDIW	2051	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D08	LRP6e3e4	YTFTSYDIN	1679	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGPYYFDYW	1940	RASQGISNNLN	2082	DASSLES	2120	CLQHNSYPFTF	2143
010S-F09	LRP6e3e4	FTFDEYAMH	1562	STISGSGGSTYYA	1809	CASAKNDFWSGYFAFDYW	1968	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-G09	LRP6e3e4	GTFNTHTIT	1599	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARGNLDFDYW	1936	QASQDISNYLN	2077	DASNLET	2115	CQQSYSTPLTF	2174
010S-H09	LRP6e3e4	FTFSDHYMS	1567	SAISSGSDRTYYA	1787	CARYSGYDFDYW	1965	RASQGISNYLN	2084	AASTLQS	2113	CQQGYGTPPMF	2153
010S-A10	LRP6e3e4	FSFSSYSMN	1559	SYISSSSSTIYYA	1816	CARGSGYYGPGYYGMDVW	1946	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-D07	LRP6e3e4	FPFRYYGMS	1551	ARIGWNGGSIVYA	1717	CARDYSDRSGIDYW	1911	RSSQSLLHSNGYNYLD	2102	LGSNRAS	2131	CMQATQFPLTF	2146
010S-B10	LRP6e3e4	FAFKDYYMT	1548	SAIGAGGGTYYA	1779	CARESALYSSSWYYYYYGMDVW	1920	RASQSISSYLN	2094	GTSSLHT	2129	CQQANSFPFTF	2148
010S-C10	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1860	KSSQSILSSSSNRDSLA	2072	WASSRKS	2135	CQQYYNIPYSF	2187
009S-E07	LRP6e3e4	YTFTGYYIH	1674	ZHVDPEDGETIYA	1819	CARGPAAIGILGWFDPW	1938	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-D10	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARTLSGYSSSWYVFDYW	1964	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-E10	LRP6e3e4	FTFSSYSMN	1579	SGISWNSGTTGYS	1797	CARDHSSGWRHYFDYW	1895	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F10	LRP6e3e4	FTFSNSDMN	1570	SYISGNSGYTNYA	1814	CASGSYYSDFDYW	1971	RASQSISNYLN	2090	AASTLES	2111	CQQANSFPPTF	2148
010S-G10	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GRINPNGGGTIYA	1769	CAREGGYYFDYW	1919	RASQGISNYLA	2083	AASSLQS	2110	CQQSYSTPWTF	2175

[0246]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
009S-F07	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GIINPSGGSTSYA	1761	CARAAGNFWSGYYTFDYW	1877	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-G07	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGSYGMDVW	1948	RASQGISNYLA	2083	DASNLET	2115	CLQDFSFPWTF	2140
010S-H10	LRP6e3e4	YTFTSYYMH	1680	GWINPNSGGTNYA	1774	CAREAAEIPVGAFDIW	1914	KSSHSLLYSSDNKNYLA	2071	WSSTRES	2136	CQQYYSTPQTF	2188
010S-A11	LRP6e3e4	FTFSNSDMN	1570	SYISGNSGYTNYA	1814	CASGSYYSDFDYW	1972	RASQSIZNYLN	2095	ZASTLES	2138	CQQANSFPPTF	2148
010S-B11	LRP6e3e4	FTFRNYAIH	1564	SAIGTGGDTYYA	1780	CARDGGIRDFDYW	1894	QASQDISNYLN	2077	AASTLQS	2113	CQQSYSTPLTF	2174
010S-C11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CAADDLGLELHYW	1822	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-H07	LRP6e3e4	YTFTGYYMH	1675	GWMNPNSGNTGYA	1776	CASSVVPAGPAGVYAFDIW	1976	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A08	LRP6e3e4	GTFSSHAIN	1602	GWISANNGNTDYA	1775	CARDQDYGDYGWYYYGMDVW	1903	RASQGISNYLA	2083	GSSTLQS	2127	CQQTYSIPPTF	2181
010S-D11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPVFGTANYA	1752	CATDEYSSSYAFDIW	1983	RASQSVSSNLA	2097	GASTRAT	2125	CQQFDRSPLTF	2151
010S-E11	LRP6e3e4	FTFSAHGMH	1565	SGISESGGSTYYA	1791	CARGRGYSYGYYAFDIW	1943	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDSDWGVVDPW	1905	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-G11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPVLKITNYA	1768	CAVVDDAFDIW	1997	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-H11	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CAKDGTDGRFDPW	1846	RASQDISSYLA	2080	SASTLQS	2133	CQQSNSFPYTF	2157
009S-B08	LRP6e3e4	FTFTSSAVQ	1589	GWINAGNGNTTYA	1772	CARRGGDVTVPAAYYAMDVW	1963	RASQSISSYLN	2094	ZASSLQS	2137	CQQSYSTPLTF	2174
010S-A12	LRP6e3e4	VTFSRYPIS	1667	GGIIPIFGTANYA	1749	CAKDSGNYGYYGMDVW	1854	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-B12	LRP6e3e4	FTFSSYDMH	1578	SGITSNGGATYYA	1798	CARGTTGKGYYYYGMDVW	1949	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-C12	LRP6e3e4	FTFSNYWIH	1571	SAIGTGGGTYYA	1781	CTTAGYKAARRSVYPRIFNFDYW	2044	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0247]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
010S-D12	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPIFGTANYA	1763	CAREEGVGGMDVW	1917	RPSQSIGSWLA	2100	DASNLQS	2116	CQQSSSTPYTF	2158
010S-E12	LRP6e3e4	FTFSSYAMH	1576	SAIGAGGGTYYA	1779	CARGVSSGYYYYYGMDVW	1950	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
010S-F12	LRP6e3e4	FTVSSNYMS	1592	SAIGTGGGTYYA	1781	CARAGTNWGGWYFDLW	1879	RASQGISRDLA	2085	AASTLQS	2113	CQQSYSPPFTF	2172
010S-G12	LRP6e3e4	FALSGYYMS	1550	SSISSSSTYIRYA	1803	CATVTGYSSAGAFDIW	1995	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-A01	LRP6e3e4	FTFSTHAFH	1583	SAIRGSGERTYYA	1784	CARDLRNWGSPYWYFDLW	1901	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-B01	LRP6e3e4	GTFSHYTIS	1600	GWINAGNGNTKYS	1771	CAKGGSLDMDVW	1864	RASQGISNYLA	2083	AASSLHS	2108	CQQSYRTPLTF	2164
011S-C01	LRP6e3e4	LTFTSHGMS	1615	SYVSDSGSSVYYA	1818	CARHPGSFGGYSYAWYYYYGMDVW	1957	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-D01	LRP6e3e4	GTISDYTVS	1605	GIINPSGGSTSYA	1761	CARGYYDFDYW	1953	RASQGISNYLA	2083	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-C08	LRP6e3e4	FSFNTFGIH	1556	AVISYDGSNKYYA	1738	CAKSIAAAGTGYYGMDVW	1869	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-E01	LRP6e3e4	FPFZYYSMN	1552	SAISGRDGRTYYA	1785	CAKDLGIQLPDYYFDYW	1847	RASQGISSALA	2086	AASTLQS	2113	CQQSYSSPPTF	2173
009S-D08	LRP6e3e4	YTFTSYDIN	1679	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGPYYFDYW	1941	RASQGISNNLN	2082	DASSLES	2120	CLQHNSYPFTF	2143
011S-F01	LRP6e3e4	FSFSDYYMS	1558	SGISESGGRTYYA	1790	CASAADFDYW	1967	RASQDISNYLN	2079	AASSLQS	2110	CLQDYSYPRTF	2141
009S-E08	LRP6e3e4	YGFTGYYIH	1668	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARGYGDYDLW	1952	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYRYPTF	2165
009S-F08	LRP6e3e4	DTFANYGFS	1547	GXVNAGNGNTTYA	1777	CAKGWLDFDYW	1867	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYSTSITF	2177
011S-G01	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPLFGTANYA	1750	CTTDDYGDQYGMDVW	2046	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-H01	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CTTDDYGDLTHLDYW	2045	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-A02	LRP6e3e4	GTFSSYAIS	1603	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARDKGYAFDIW	1896	RSSQSLLHSNGYNYLD	2102	AASSLQS	2110	CMQALQTPITF	2145
011S-B02	LRP6e3e4	YSFTRTDMH	1670	GYISAYTGHTSYA	1778	CARDLGGTADYW	1899	RZSQSZSZYLN	2104	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174

[0248]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
011S-C02	LRP6e3e4	FTFSTYSMN	1585	SGISWNSGRIGYA	1795	CARDVGAFDIW	1906	QASQDISNYLN	2077	AASILQS	2107	CQQSYSIPFTF	2169
009S-G08	LRP6e3e4	FTFSDFAMT	1566	SYISGDSGYTNYA	1813	CARLGSYPGPYYYYMDVW	1962	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-D02	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SSISGSGGVTYYA	1801	CARGGNTYYYYYGMDVW	1928	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-H08	LRP6e3e4	YTFTDYFMN	1673	GIINPSGDSTRFA	1758	CARDDGLGGMDVW	1889	QASQDISNYLA	2076	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-E02	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GGIIPIFGTANYA	1749	CATDYGDYYYGMDVW	1984	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-A09	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPILGSTNYA	1767	CTTDLWDYW	2048	QASQGITNYLN	2078	AASSLQS	2110	CLQDYTDPFTF	2142
011S-F02	LRP6e3e4	FTFSTYGMH	1584	SSISVSSGTTHYA	1805	CARGGSGSYYYAFDIW	1930	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-G02	LRP6e3e4	YTFTSYAMN	1678	GGIIPIFGTANYA	1749	CARDASGGSTGWYYFDSW	1887	RASQGISSYLA	2087	AASSLQS	2110	CQQAYSFPWTF	2150
011S-H02	LRP6e3e4	YTFTNNFMH	1676	GIINPSGGSTSYA	1761	CARGLYKRYSYGYGMDVW	1935	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
009S-B09	LRP6e3e4	FSFNTYAMN	1557	AVTSYDGGKKNYA	1742	CARDAGGDYDYW	1885	QASQDISNYLN	2077	AASSLQS	2110	CQQSYNTPRTF	2161
009S-C09	LRP6e3e4	GTFHTYGLS	1597	GGIIPIFGTANYA	1749	CARGSGWSGLDYW	1945	QASQDISNYLN	2077	DASNLET	2115	CQQSYTTPFTF	2180
011S-A03	LRP6e3e4	FTFSSYWMH	1580	STISGSGGRTYYA	1808	CATSPYGVFTLDYW	1994	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-B03	LRP6e3e4	GTFSZYAIS	1604	GIINPSGGSTNYA	1760	CARAGYWSGYGYYGMDVW	1881	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-C03	LRP6e3e4	YTFSYRYLH	1672	GGIIPIFGTANYA	1749	CASTVTTDAFDIW	1978	QASQDISNYLN	2077	DASSLES	2120	CQQSYSFPPFTF	2168
011S-D03	LRP6e3e4	FSFDDYGMS	1554	SVISSGGTIYYA	1812	CARHLSSGYLSYYGMDVW	1955	RASQSISSYLA	2093	AASTLQS	2113	CQQSYSTPLTF	2174
009S-F09	LRP6e3e4	YSFTRTDMH	1670	GYISAYTGHTSYA	1778	CARDLGGTADYW	1900	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-E03	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1861	KSSHSLLSTSTNRNQLA	2070	WASSRKS	2135	CQQYNNWPYTF	2186
009S-G09	LRP6e3e4	FTFSRHSMN	1572	SYSSGNSGYTNYA	1817	CARGDLEFDYW	1923	RASQGISNYLA	2083	SASSLQS	2132	CQQGYNTPRTF	2154

[0249]

克隆ID	确认的结合	CDRH1	CDRH1 SEQ ID	CDRH2	CDRH2 SEQ ID	CDRH3	CDRH3 SEQ ID	CDRL1	CDRL1 SEQ ID	CDRL2	CDRL2 SEQ ID	CDRL3	CDRL3 SEQ ID
011S-F03	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1862	KSSQSVLYTTTNRNHIA	2074	WASSRKS	2135	CQQYYSTPYTF	2189
009S-H09	LRP6e3e4	FTFSSYAMS	1577	SAISGSGGSTYYA	1786	CAKGGRDGYKGYFDYW	1863	KSSHSLLSTSTNRNHLA	2069	WASSRKS	2135	CQQYYNIPYSF	2187
011S-G03	LRP6e3e4	YTFTYRYLH	1681	GRIIPIHGIANYA	1764	CAREYSYGYFRYW	1922	RASQGISSYLA	2087	DASNLET	2115	CQQANSLFTF	2149
009S-A10	LRP6e3e4	FTFTSSAMQ	1588	GIINPSGGSTIYA	1759	CASGDTYDLYSLDVW	1970	RASQSISRWLA	2091	AASSLQS	2110	CQQAYSFPWTF	2150
009S-B10	LRP6e3e4	YIFTDYYMH	1669	GWINAGNGNTTYA	1772	CAKVASGWSWPFDIW	1871	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-B04	LRP6e1e2	YTFTSYDIN	1679	GIINPSGGSTSYA	1761	CTREHSYYYYGMDVW	2042	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-C04	LRP6e1e2	GTFNSNAIS	1598	GWMNPNSGNTGYA	1776	CARDYYGSGSYNYGMDVW	1913	GASQSVPRNSLA	2066	GASQRAT	2124	CQQYHNWPPEYTF	2184
011S-D04	LRP6e1e2	YTFTSYDIN	1679	GIINPSGGSTSYA	1761	CAREAYYYYYGMDVW	1916	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-E04	LRP6e1e2	FTFSSZZMH	1581	SAIGTGGGTZYA	1782	CAKDLGRAAAGSMDVW	1850	WASQSVRGNYVA	2106	DASNRAA	2117	CQHRSNWPLTF	2147
011S-F04	LRP6e1e2	YIFTDYYMH	1669	GRIIPILGRANYA	1765	CARGGYSTLDYW	1933	HGSQDISNYLN	2067	DASNRQS	2119	CQQSFSTPRTF	2156
011S-H04	LRP6e1e2	YIFTDYYMH	1669	GRIIPILGRANYA	1765	CARGGYSTLDYW	1934	QASQDISNYLN	2077	AASTLQS	2113	CQQSFSTPRTF	2156
011S-A05	LRP6e1e2	FTFSSYAMH	1576	SAIGTGGGTYYA	1781	CAKDLGRAAAGSMDVW	1848	WASQSVRGNYVA	2106	DASNRAG	2118	CQHRSNWPLTF	2147
011S-B05	LRP6e1e2	YZFTDYYMH	1683	GWMNPNSGNTGYA	1776	CTRVAWGLDYW	2043	RASQSISSYLN	2094	AASSLQS	2110	CQQSYSTPLTF	2174
011S-C05	LRP6e1e2	FTFSSYAMH	1576	SAIGTGGGTYYA	1781	CAKDLGRAAAGSMDVW	1849	WASQSVRGNYVA	2106	DASNRAA	2117	CQHRSNWPLTF	2147
1115.3	LRP6e1e2	GFSFSTS		NLNGGS		ELAGYGTPFAY		KASQSISYNLH		YTSQSIS		QQSNSWPLT	
421.1	LRP6e1e2	GYTFTTY		FPGNVNT		EELQYYFDY		SANSSVRFMF		RTSNLAS		QQYHSYPWT	
YW211.31.57	LRP6e3e4	GFTFTSY		SPYSGS		RARPPIRLHPRGSVMDY		RASQDVSTAVA		SASFLYS		QQSYTTPPT	

[0250] 表2B.抗LRP5/6抗体克隆ID、重链(HC)Seq ID No以及结合特性。

[0251]

克隆 ID	HC Seq ID NO	确认的结合

[0252]

001S-F11	66	LRP6e1e2
009S-G02	67	LRP6e1e2
009S-A03	68	LRP6e1e2
009S-D03	69	LRP6e1e2
009S-F03	70	LRP6e1e2
009S-H03	71	LRP6e1e2
009S-A04	72	LRP6e1e2
009S-B04	73	LRP6e3e4
009S-D04	74	LRP6e3e4
009S-E04	75	LRP6e3e4
009S-F04	76	LRP6e3e4
009S-G04	77	LRP6e3e4
009S-H04	78	LRP6e3e4
009S-A05	79	LRP6e3e4
013S-G04	80	LRP6e3e4
013S-H04	81	LRP6e3e4
013S-C05	82	LRP6e3e4
013S-D05	83	LRP6e3e4
013S-G04	84	LRP6e3e4
013S-H04	85	LRP6e3e4
013S-A05	86	LRP6e3e4
013S-C05	87	LRP6e3e4
013S-D05	88	LRP6e3e4
008S-D01	133	LRP5

[0253] 在某些实施例中,在Wnt替代分子的上下文中,LRP5/6结合结构域可以选自以为以下的K_D与LRP5或LRP6结合的任何结合结构域:小于或等于约1×10^{-4}M、小于或等于约1×10^{-5}M、小于或等于约1×10^{-6}M、小于或等于约1×10^{-7}M、小于或等于约1×10^{-8}M、小于或等于约1×10^{-9}M或小于或等于约1×10^{-10}M。在某些实施例中,在Wnt替代分子的上下文中,LRP5/6结合结构域可以选自以为以下的K_D与LRP5或LRP6结合的任何结合结构域:大于或等于约1×10^{-4}M、大于或等于约1×10^{-5}M、大于或等于约1×10^{-6}M、大于或等于约1×10^{-7}M、大于或等于约1×10^{-8}M、大于或等于约1×10^{-9}M或大于或等于约1×10^{-10}M。在某些实施例中,LRP5/6结合结构域可以选自以例如K_D为以下的高亲和力与LRP5或LRP6结合的任何结合结构域:小于约1×10^{-7}M、小于约1×10^{-8}M、小于约1×10^{-9}M或小于约1×10^{-10}M。

[0254] 其它适合的LRP5/6结合结构域包含但不限于从头设计的LRP5/6结合蛋白、抗体衍生的结合蛋白(例如,scFv、Fab等)以及与一种或多种Fzd蛋白特异性结合的抗体的其它部分;VHH或sdAb衍生的结合结构域;基于打结素的工程化支架;天然存在的LRP5/6,包含但不限于DKK1、DKK2、DKK3、DKK4、硬化蛋白;Wise;包括以上中的任一种的融合蛋白;以上中的任一种的衍生物;以上中的任一种的变体;以及以上中的任一种的生物活性片段等。可以亲和选择LRP5/6结合结构域以增强结合。

[0255] Dickkopf(DKK)基因家族的成员(参见Krupnik等人(1999)《基因(Gene)》238(2):301-13)包含DKK-1、DKK-2、DKK-3和DKK-4,并且DKK-3相关蛋白Soggy(Sgy).hDKK 1-4含有两个不同的富半胱氨酸的结构域,其中10个半胱氨酸残基的位置在家族成员之间高度保守。人Dkk基因和蛋白质的示例性序列是公开可用的,例如,Genbank登录号NM_014419(soggy-1);NM_014420(DKK4);AF177394(DKK-1);AF177395(DKK-2);NM_015881(DKK3);和NM_014421(DKK2)。在本发明的一些实施例中,Lrp6结合部分是DKK1肽,包含但不限于人DKK1的C端结构域。C端结构域可以包括以下序列:KMYHTKGQEGSVCLRSSDCASGLCCARHFWSKIC

KPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLEI FQRCYCGEGLSCRIQKDHHQASNSSRLHTCQRH(SEQ ID NO:2190)(参见Genbank登录号NP_036374)或其生物活性片段。

[0256] 例如在以下中讨论了DKK蛋白与LRP5/6的结合:Brott和Sokol《分子与细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》22(17),6100-6110(2002);以及Li等人《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》277(8),5977-5981(2002),所述文献各自通过引用的方式具体并入本文。人DKK2(Genbank参考NP_055236)的对应区可以包括以下序列:KMSHIKGHEGDPCLRSSDCIEGF CCARHFWTKICKPVLHQGEVCTKQRKKGSHGLEIF QRCDCAKGLSCKVWKDATYSSKARLHVCQK(SEQ ID NO:2191)或其生物活性片段。

[0257] 与LRP5或LRP6特异性地结合的抗体是本领域中已知的并且可商购获得或者可以从头产生。LRP5、LRP6或其片段可以用作免疫原或用于筛选测定法以开发抗体。已知抗体的实例包含但不限于:Gong等人(2010)《公共科学图书馆期刊(PLoS One)》.5(9):e12682;Ettenberg等人(2010)《美国国家科学院院刊》.107(35):15473-8中描述的那些;以及可商购自例如Santa Cruz生物技术抗体克隆1A12的那些,其针对人类来源的合成LRP5/6产生并且与小鼠和人类来源的LRP6和LRP5的全长和蛋白水解片段两者结合;单克隆抗体2B11;对LRP5(D80F2)具有特异性的细胞信号传导抗体,目录号5731;等。

[0258] 在某些实施例中,本文公开的Wnt替代分子包括一个或多个多肽,所示一个或多个多肽包括两个或更多个结合区。例如,两个或更多个结合区可以是两个或更多个Fzd结合区或两个或更多个LRP5/6结合区,或者所述两个或更多个结合区可以包括一个或多个Fzd结合区和一个或多个LRP5/6结合区。结合区可以直接连接或邻接或者可以被接头(例如,多肽接头或非肽接头等)分开。接头的长度以及因此结合结构域之间的间隔可以用于调节信号强度并且可以根据Wnt替代分子的期望用途进行选择。结合结构域之间的加强距离可以有所变化,但在某些实施例中可以小于约100埃、小于约90埃、小于约80埃、小于约70埃、小于约60埃或小于约50埃。在一些实施例中,接头是刚性接头,在其它实施例中,接头是柔性接头。在某些实施例中,在接头是肽接头的情况下,接头在长度上可以为约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个氨基酸,并且具有足够的长度和氨基酸组成来加强结合结构域之间的距离。在一些实施例中,接头包括一个或多个甘氨酸和/或丝氨酸残基或由其组成。

[0259] 在特定实施例中,Wnt替代分子包括与SEQ ID NO:89-128或134-157中任一个所公开的多肽序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性或与SEQ ID NO:89-128或134-157中任一个所公开的多肽序列的抗原结合片段具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性的多肽序列。在某些实施例中,Wnt替代分子包括SEQ ID NO:89-128或134-157中任一个所示的多肽序列或其抗原结合片段或由其组成。在特定实施例中,抗原结合片段结合一种或多种Fzd受体并且还结合LRP5和/或LRP6。

[0260] Wnt替代分子可以例如通过Fc结构域、借助于级联、卷曲螺旋、多肽拉链、生物素/抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素多聚化等来进行多聚化。Wnt替代分子还可以与本领域中已知的如PEG、Fc等部分连接以增强体内稳定性。

[0261] 在某些实施例中,Wnt替代分子通过与一种或多种Fzd蛋白和LRP5/6结合,特别是通过与细胞表面(例如,人类细胞的表面)上的这些蛋白结合而直接激活典型的Wnt信号传

导。Wnt替代分子对Wnt信号传导的直接激活与Wnt信号传导的加强相反,其仅在存在天然Wnt蛋白时才增强活性。

[0262] Wnt替代分子例如通过模拟Wnt蛋白与卷曲蛋白结合的作用或活性来激活Wnt信号传导。本发明的Wnt替代分子模拟Wnt活性的能力可以通过多种测定法来证实。Wnt替代分子通常引发与受体的天然配体引发的反应或活性相似或相同的反应或活性。具体地,本发明的Wnt替代分子增强了典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导通路。如本文所使用的,术语“增强”是指Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平与不存在本发明的Wnt替代分子的情况下的水平相比的可测量增加。

[0263] 在本领域中已知多种用于测量典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导水平的方法。这些方法包含但不限于测量以下的测定法:Wnt/β-连环蛋白靶基因表达;TCF报告基因表达;β-连环蛋白稳定;LRP磷酸化;Axin从细胞质易位到细胞膜并且结合LRP。典型的Wnt/β-连环蛋白信号传导通路最终通过转录因子TCF7、TCF7L1、TCF7L2(又称TCF4)和LEF引起基因表达的变化。在许多细胞和组织中已经表征了对Wnt激活的转录应答。由此,通过本领域众所周知的方法进行的全局转录谱可以用于评定Wnt/β-连环蛋白信号传导激活或抑制。

[0264] Wnt应答性基因表达的变化通常由TCF和LEF转录因子介导。TCF报告基因测定法评定TCF/LEF控制基因的转录变化以确定Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平。TCF报告基因测定法最早由Korinek,V.等人,1997描述。此方法也称为TOP/FOP,其涉及使用位于最小c-Fos启动子驱动荧光素酶表达上游的最佳TCF基序CCTTTGATC的三个拷贝或突变基序CCTTTGGCC的三个拷贝(分别为pTOPFI_ASH和pFOPFI_ASH),以确定内源性p-连环蛋白/TCF4的反式激活活性。这两个报告基因活性的较高比率(TOP/FOP)指示较高的β-连环蛋白/TCF4活性,而这两个报告基因活性的较低比率指示较低的β-连环蛋白/TCF4活性。

[0265] 对Wnt信号进行应答的各种其它报告转基因在动物中完整存在,并且因此有效地反映了内源性Wnt信号传导。这些报告基因基于多聚化的TCF结合位点,所述多聚的TCF结合位点驱动LacZ或GFP的表达,这可通过本领域已知的方法容易地检测。这些报告基因包含:TOP-GAL、BAT-GAL、ins-TOPEGFP、ins-TOPGAL、LEF-EGFP、Axin2-LacZ、Axin2-d2EGFP、Lgr5tm1(cre/ERT2)、TOPdGFP。

[0266] 在某些情况下,由与TCF转录因子和TNIK形成复合物介导的去磷酸化β-连环蛋白向膜的募集、β-连环蛋白的稳定化和磷酸化状态以及β-连环蛋白向细胞核的易位(Klapholz-Brown Z等人,《公共科学图书馆期刊》2(9)e945,2007)是Wnt信号传导通路中的关键步骤。稳定化由抑制“破坏”复合物的Disheveled家族蛋白介导,因此减少了细胞内β-连环蛋白的降解,并且此后β-连环蛋白易位到细胞核。因此,测量细胞中β-连环蛋白的水平和位置很好地反映了Wnt/β-连环蛋白信号传导的水平。这种测定法的非限制性实例是“Biolmageβ-连环蛋白重分布测定法”(赛默科技(Thermo Scientific)),其提供稳定表达与增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的C端融合的人β-连环蛋白的重组U2OS细胞。利用荧光显微镜或HCS平台执行成像和分析,从而允许EGFP-β-连环蛋白的水平和分布可视化。

[0267] 抑制破坏复合物的另一种方式是通过将Axin募集到Wnt共受体LRP的细胞质尾区来去除Axin。Axin已经表现出优先结合LRP尾区的磷酸化形式。因此,例如用GFP-Axin融合蛋白可视化Axin易位是用于评定Wnt/β-连环蛋白信号传导水平的另一种方法。

[0268] 在某些实施例中,如在上述测定法中测量的,例如在TOPFIash测定法中测量的,与

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

[0269] 当在本文中使用时,"Wnt基因产物"或"Wnt多肽"涵盖天然序列Wnt多肽、Wnt多肽变体、Wnt多肽片段和嵌合Wnt多肽。在特定实施例中,Wnt多肽是天然人全长成熟Wnt蛋白。

[0270] 例如,本申请中关注的人天然序列Wnt蛋白包含以下:Wnt-1(GenBank登录号NM_005430);Wnt-2(GenBank登录号NM_003391);Wnt-2B(Wnt-13)(GenBank登录号NM_004185(同种型1)、NM_024494.2(同种型2))、Wnt-3(RefSeq.:NM_030753)、Wnt3a(GenBank登录号NM_033131)、Wnt-4(GenBank登录号NM_030761)、Wnt-5A(GenBank登录号NM_003392)、Wnt-5B(GenBank登录号NM_032642)、Wnt-6(GenBank登录号NM_006522)、Wnt-7A(GenBank登录号NM_004625)、Wnt-7B(GenBank登录号NM_058238)、Wnt-8A(GenBank登录号NM_058244)、Wnt-8B(GenBank登录号NM_003393)、Wnt-9A(Wnt-14)(GenBank登录号NM_003395)、Wnt-9B(Wnt-15)(GenBank登录号NM_003396)、Wnt-10A(GenBank登录号NM_025216)、Wnt-10B(GenBank登录号NM_003394)、Wnt-11(GenBank登录号NM_004626)、Wnt-16(GenBank登录号NM_016087))。尽管每个成员与家族具有不同程度的序列同一性,但是所有成员均对含有间距高度保守的23-24个保守半胱氨酸残基的较小(即,39-46kD)、酰化、棕榈酰化、分泌的糖蛋白进行编码(McMahon,A P等人、《遗传学趋势(Trends Genet.)》1992;8:236-242;Miller,J R.《基因组生物学(Genome Biol.)》2002;3(1):3001.1-3001.15)。关注的其它天然序列Wnt多肽包含来自任何哺乳动物的上述直系同源物,所述哺乳动物包含家养和农场动物以及动物园、实验室或宠物动物,如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔、大鼠、小鼠、青蛙、斑马鱼、果蝇、蠕虫等。

[0271] 本文使用的"Wnt通路信号传导"或"Wnt信号传导"指代生物活性Wnt通过其对细胞施加其作用以调节细胞的活性的机制。Wnt蛋白通过与Wnt受体结合来调节细胞活性,所述Wnt受体包含来自蛋白质的卷曲蛋白(Fzd)家族的蛋白质、来自蛋白质的ROR家族的蛋白质、来自蛋白质的LRP家族的蛋白LRP5、LRP6、蛋白FRL1/crypto和蛋白Derailed/Ryk。一旦通过Wnt结合激活,一种或多种Wnt受体就将激活一个或多个细胞内信号传导级联。这些包含典型的Wnt信号传导通路;Wnt/平面细胞极性(Wnt/PCP)通路;Wnt-钙(Wnt/Ca^{2+})通路(Giles,RH等人(2003)《生物化学与生物物理学报(Biochim Biophys Acta)》1653,1-24;Peifer,M.等人(1994)《发育(Development)》120:369-380;Papkoff,J.等人(1996)《分子与细胞生物学》16:2128-2134;Veeman,M.T.等人(2003)《发育细胞(Dev.Cell)》5:367-377);以及如本领域所公知的其它Wnt信号传导通路。

[0272] 例如,典型的Wnt信号传导通路的激活引起细胞内蛋白β-连环蛋白的磷酸化的抑制,从而导致β-连环蛋白在细胞溶质中积累,并随后易位到细胞核,在所述细胞核处,β-连环蛋白与转录因子(例如,TCF/LEF)相互作用以激活靶基因。Wnt/PCP通路的激活会激活RhoA、c-Jun N端激酶(JNK)和nemo样激酶(NLK)信号传导级联,以控制如组织极性和细胞运

动等生物过程。通过结合Wnt-4、Wnt-5A或Wnt-11激活Wnt/Ca^{2+}引起细胞内钙离子的释放,这激活了钙敏感酶,如蛋白激酶C(PKC)、钙-钙调素依赖性激酶II(CamKII)或钙调磷酸酶(CaCN)。通过测定上述信号传导通路的活性,可以容易地确定抗体或其抗原结合片段(例如,Wnt替代分子)的生物学活性。

[0273] 在某些实施例中,Wnt替代分子的功能性质可以使用技术人员已知的多种方法来评定,所述多种方法包含例如使用体外或体内模型(包含但不限于本文所述的任何体外或体内模型)应答于Wnt、癌细胞和/或肿瘤生长抑制的亲和力/结合测定法(例如,表面等离子体共振、竞争性抑制测定法)、细胞毒性测定法、细胞活力测定法、细胞增殖或分化测定法。还可以测试本文所述的Wnt替代分子对Fzd受体内在化、体外和体内功效等的影响。可以使用技术人员已知的公认的方案或可商购的试剂盒执行此类测定(参见例如《现代分子生物学实验指南》(格林出版联合公司(Greene Publ.Assoc.Inc.)和纽约州纽约市的约翰威利父子公司);《现代免疫学实验指南》(由纽约州纽约市的约翰威立父子公司的John E.Coligan、Ada M.Kruisbeek、David H.Margulies、Ethan M.Shevach、Warren Strober 2001编辑)。

[0274] 在某些实施例中,Wnt替代分子的Fzd结合区(例如,抗Fzd抗体的抗原结合片段)包括本文所述的抗Fzd抗体的CDR中的一个或多个CDR。在某些实施例中,Wnt替代分子的LRP5/6结合区(例如,抗LRP5/6抗体的抗原结合片段)包括本文所述的抗LRP5/6抗体的CDR中的一个或多个CDR。在这方面,已表明在一些情况下可以执行抗体的仅VHCDR3的转移,同时仍保留期望的特异性结合(Barbas等人,《美国国家科学院院刊》(1995)92:2529-2533)。还参见McLane等人,《美国国家科学院院刊》(1995)92:5214-5218,Barbas等人,《美国化学学会杂志(J.Am.Chem.Soc.)》(1994)116:2161-2162。

[0275] 本文还公开了一种用于获得对Fzd受体具有特异性的抗体或抗原结合结构域的方法,所述方法包括通过氨基酸序列中的一个或多个氨基酸的添加、缺失、取代或插入来提供本文所示的VH结构域或作为VH结构域的氨基酸序列变体的VH结构域;任选地将由此提供的VH结构域与一个或多个VL结构域组合;以及测试VH结构域或一个或多个VH/VL组合以鉴定特异性结合成员或对一种或多种Fzd受体具有特异性并任选地具有一种或多种期望性质的抗体抗原结合结构域。VL结构域可以具有基本上如本文所示的氨基酸序列。可以采用类似的方法,其中将本文公开的VL结构域的一个或多个序列变体与一个或多个VH结构域组合。

[0276] 在特定实施例中,Wnt替代分子是水溶性的。“水溶性”意指在不存在清洁剂的情况下可溶于水性缓冲液,通常以提供生物有效剂量的多肽的浓度可溶的组合物。水溶性的组合物形成基本上均质的组合物,所述基本上均质的组合物的比活性为所述基本上均质的组合物从其纯化的起始材料的比活性的至少约5%,通常为起始材料的比活性的至少约10%、20%或30%,更通常为起始材料的比活性的约40%、50%或60%,并且可以为约50%、约90%或更大。本文所公开的Wnt替代分子通常形成浓度为至少25μM或更高,例如,至少25μM、40μM或50μM,通常至少60μM、70μM、80μM或90μM,有时多达100μM、120μM或150μM的基本上均质的水溶液。换句话说,本文所公开的Wnt替代分子通常形成浓度为约0.1mg/ml、约0.5mg/ml、约1mg/ml或更大的基本上均质的水溶液。

[0277] 与抗体或其抗原结合片段“特异性结合”或“优先结合”(在本文中可互换使用)的抗原或表位是本领域中公知的术语,并且用于确定这种特异性或优先结合的方法也是本领

域中公知的。如果分子(例如,Wnt替代分子)与特定细胞或物质比其与替代性细胞或物质更频繁地、更快速地、持续时间更长地和/或亲和力更大地反应或缔合,则所述分子被称为展现出“特异性结合”或“优先结合”。如果分子或其结合区(例如,Wnt替代分子或其结合区)比其与其它物质亲和力更大地、亲合性更高地、更容易地和/或持续时间更长地结合,则所述分子或其结合区与靶抗原(例如,Fzd受体)“特异性结合”或“优先结合”。例如,与Fzd1受体特异性结合或优先结合的Wnt替代分子或其结合区是比其结合其它Fzd受体或非Fzd蛋白亲和力更大地、亲合性更高地、更容易地和/或持续时间更长地结合Fzd1受体的抗体。通过阅读此定义还应理解,例如特异性或优先结合第一靶标的Wnt替代分子或其结合区可以或可以不特异性或优先结合第二靶标。如此,“特异性结合”或“优先结合”不一定需要(尽管其可以包含)排他结合。通常,但不是必然地,提及结合意指优先结合。

[0278] 在一些实施例中,Wnt替代分子的一个或多个Fzd结合区中的任一个Fzd结合区与一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同的卷曲蛋白,例如人卷曲蛋白Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9、Fzd10中的一种或多种人卷曲蛋白结合。在一些实施例中,Fzd结合区中的任一个Fzd结合区与Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8结合。在各个实施例中,Fzd结合区中的任一个Fzd结合区与以下结合:(i)Fzd1、Fzd2、Fzd7和Fzd9;(ii)Fzd1、Fzd2和Fzd7;(iii)Fzd5和Fzd8;(iv)Fzd5、Fzd7和Fzd8;(v)Fzd1、Fzd4、Fzd5和Fzd8;(vi)Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8;(vii)Fzd4和Fzd9;(viii)Fzd9和Fzd10;(ix)Fzd5、Fzd8和Fzd10;或(x)Fzd4、Fzd5和Fzd8;Fzd1、Fzd5、Fzd7和Fzd8。在一些实施例中,Fzd结合区对关注的一种或多种Fzd蛋白具有选择性,例如相对于其它Fzd蛋白,针对所述一种或多种期望的Fzd蛋白具有至少10倍、25倍、50倍、100倍、200倍或更多倍的特异性。在一些实施例中,Wnt替代分子的一个或多个Fzd结合区中的任一个Fzd结合区是单特异性的并且仅与以下之一结合或特异性结合:Fzd1、Fzd2、Fzd3、Fzd4、Fzd5、Fzd6、Fzd7、Fzd8、Fzd9或Fzd10。

[0279] 在一些实施例中,Wnt替代分子的一个或多个LRP5/6结合区中的任一个LRP5/6结合区与LRP5/6中的一个或两个结合。为了方便起见,术语“LRP5/6”用于共同地指代LRP5和/或LRP6中的任一个或两个。

[0280] 免疫结合通常是指在免疫球蛋白分子与抗原之间发生的类型的非共价相互作用,例如通过说明而非限制的方式,由于静电的、离子的、亲水的和/或疏水的吸引力或排斥力、空间力、氢键结合、范德华力和其它相互作用,免疫球蛋白对所述抗原具有特异性。可以在相互作用的解离常数(K_d)方面表达免疫结合相互作用的强度或亲和力,其中更小的K_d表示更大的亲和力。可以使用本领域中公知的方法对所选多肽的免疫结合性质定量。一个这种方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力并且取决于同样在两个方向上影响速率的几何参数。因此,可以通过计算缔合和解离的浓度和实际速率来确定“缔合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{on})。K_{off}/K_{on}的速率实现消除与亲和力无关的所有参数,并且因此等于解离常数K_d。通常参见Davies等人,(1990)《生物化学年鉴(Annual Rev.Biochem.)》59:439-473。

[0281] 在某些实施例中,本文所述的Wnt替代分子或其结合区具有小于约10,000nM、小于约1000nM、小于约100nM、小于约10nM、小于约1nM或小于约0.1nM的亲和力,并且在一些实施例中,抗体可以具有对一种或多种Fzd受体或LRP5或LRP6受体的甚至更高的亲和力。

[0282] 免疫球蛋白的恒定区表现出比可变区少的序列多样性,并且负责结合许多天然蛋

白以引发重要的生化事件。在人类中,存在五种不同类别的抗体,包含IgA(其包含亚类IgA1和IgA2)、IgD、IgE、IgG(其包含亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)和IgM。这些抗体类别之间的区别特征是其恒定区,但是V区可以存在细微差异。

[0283] 抗体的Fc区与许多Fc受体和配体相互作用,从而赋予一系列重要的被称为效应子功能的功能能力。对于IgG,Fc区包括Ig结构域CH2和CH3以及通向CH2的N端铰链。IgG类别的Fc受体的重要家族是Fcγ受体(FcγR)。这些受体介导抗体与免疫系统的细胞免疫部分(cellular arm)之间的通讯(Raghavan等人,1996,《细胞和发育生物学年度评论(Annu Rev Cell Dev Biol)》12:181-220;Ravetch等人,2001,《免疫学年度评论(Annu Rev Immunol)》19:275-290)。在人类中,此蛋白家族包含:FcγRI(CD64),其包含同种型FcγRIa、FcγRIb和FcγRIc;FcγRII(CD32),其包含同种型FcγRIIa(包含同种异型H131和R131)、FcγRIIb(包含FcγRIIb-1和FcγRIIb-2)和FcγRIIc;以及FcγRIII(CD16),其包含同种型FcγRIIIa(包含同种异型V158和F158)和FcγRIIIb(包含同种异型FcγRIIIb-NA1和FcγRIIIb-NA2)(Jefferis等人,2002,《免疫学快报(Immunol Lett)》82:57-65)。这些受体通常具有介导与Fc结合的细胞外结构域、跨膜区和可以介导细胞内的一些信号传导事件的细胞内结构域。这些受体在各种免疫细胞中表达,所述免疫细胞包含单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、B细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞和T细胞。Fc/FcγR复合物的形成将这些效应细胞募集到结合抗原的位点,从而通常产生细胞内的信号传导事件和重要的后续免疫应答,如炎症介质的释放、B细胞激活、内吞作用、吞噬作用和细胞毒性攻击。

[0284] 介导细胞毒性和吞噬效应子功能的能力是抗体破坏靶细胞的潜在机制。其中表达FcγR的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞裂解的细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)(Raghavan等人,1996,《细胞和发育生物学年度评论》12:181-220;Ghetie等人,2000,《免疫学年度评论》18:739-766;Ravetch等人,2001,《免疫学年度评论》19:275-290)。其中表达FcγR的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞吞噬作用的细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。所有FcγR在Cg2(CH2)结构域和之前的铰链的N端处结合Fc上的相同区。这种相互作用在结构上得到了很好的表征(Sondermann等人,2001,《分子生物学杂志》309:737-749),并且已经解决了与人FcγRIIIb细胞外结构域结合的人Fc的若干种结构(pdb登录码1E4K)(Sondermann等人,2000,《自然》406:267-273)。(pdb登录码1IIS和1IIX)(Radaev等人,2001,《生物化学杂志》276:16469-16477)。

[0285] 不同的IgG亚类对FcγR具有不同的亲和力,与IgG2和IgG4相比,IgG1和IgG3通常明显更好地与受体结合(Jefferis等人,2002,《免疫学快报》82:57-65)。所有FcγR都结合IgG Fc上的相同区,但具有不同的亲和力:高亲和力结合体FcγRI针对IgG1的K_d为$10^{-8}M^{-1}$,而低亲和力受体FcγRII和FcγRIII通常分别以10^{-6}和10^{-5}结合。FcγRIIIa和FcγRIIIb的细胞外结构域具有96%的同一性;然而,FcγRIIIb不具有细胞内信号传导结构域。此外,虽然FcγRI、FcγRIIa/c和FcγRIIIa是免疫复合物触发激活的正调节物(所述正调节物的特征在于具有细胞内结构域,所述细胞内结构域具有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)),但是FcγRIIb具有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)并且因此是抑制性的。因此,前者被称为激活受体并且FcγRIIb被称为抑制受体。受体在不同免疫细胞上的表达

方式和水平也不同。复杂性的另一个层次是人类蛋白质组中存在许多Fc γ R多态性。具有临床意义的特别相关的多态性是V158/F158 Fc γ RIIIa。人IgG1与V158同种异型的结合亲和力大于与F158同种异型的结合亲和力。亲和力的这种差异以及可假定地其对ADCC和/或ADCP的影响已表明是抗CD20抗体利妥昔单抗(rituximab)(Rituxan®,IDEC药物公司(IDEC Pharmaceuticals Corporation)的注册商标)的功效的重要决定因素。具有V158同种异型的受试者对利妥昔单抗治疗应答良好;然而,具有较低亲和力F158同种异型的受试者应答较差(Cartron等人,2002,《血液(Blood)》99:754-758)。大约10-20%的人是V158/V158纯合子,45%的人是V158/F158杂合子,并且35-45%的人是F158/F158纯合子(Lehrnbecher等人,1999,《血液》94:4220-4232;Cartron等人,2002,《血液》99:754-758)。因此,80-90%的人是较差应答者,也就是说,他们具有F158 Fc γ RIIIa的至少一个等位基因。

[0286] Fc区也参与补体级联的激活。在经典的补体通路中,C1利用其C1q亚基结合已与一个或多个抗原形成复合物的IgG或IgM的Fc片段。在本发明的某些实施例中,对Fc区的修饰包括改变(增强或降低)本文所述的Fzd特异性抗体激活补体系统的能力的修饰(参见例如美国专利7,740,847)。为了评定补体激活,可以执行补体依赖性细胞毒性(CDC)测定法(参见例如Gazzano-Santoro等人,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》,202:163(1996))。

[0287] 因此,在某些实施例中,本发明提供了具有经修饰的Fc区的抗Fzd抗体,其具有改变的功能性质,如降低或增强的CDC、ADCC或ADCP活性或增强的对特定Fc γ R的结合亲和力或增加的血清半衰期。本文设想的其它经修饰的Fc区描述于例如已公布的美国专利7,317,091;7,657,380;7,662,925;6,538,124;6,528,624;7,297,775;7,364,731;公开的美国申请US2009092599;US20080131435;US20080138344;以及公开的国际申请WO2006/105338;WO2004/063351;WO2006/088494;WO2007/024249中。

[0288] 在某些实施例中,Wnt替代分子包括具有期望结合特异性的与免疫球蛋白恒定结构域序列融合的抗体可变结构域。在某些实施例中,融合是与包括铰链区、C_H2和C_H3区的至少部分的Ig重链恒定结构域融合。在特定实施例中,含有轻链键合所必需的位点的第一重链恒定区(C_H1)存在于融合中的至少一个融合中。将对免疫球蛋白重链融合和(如果需要)免疫球蛋白轻链进行编码的DNA插入单独的表达载体中,并且共转染到适合的宿主细胞中。当在构建中使用的三个多肽链的不相等比率提供期望双特异性抗体的最佳得率时,这在调节实施例中的三个多肽片段的相互比例方面提供了更大的灵活性。然而,当至少两个多肽链以相等的比率表达引起高得率时或者当比率对期望的链组合的得率没有明显影响时,可以将两个或全部三个多肽链的编码序列插入单个表达载体中。

[0289] 还可以修饰本文公开的Wnt替代分子以包含例如用于纯化或诊断应用的表位标签或标记。存在许多本领域已知的用于制备抗体缀合物的连接基团,包含例如在美国专利第5,208,020号或EP专利0 425 235B1和Chari等人,《癌症研究》52:127-131(1992)中公开的那些。如上述专利中所公开的,连接基团包含二硫基、硫醚基、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团或酯酶不稳定基团,优选二硫基和硫醚基。

[0290] 在某些实施例中,存在于Wnt替代分子内的抗LRP5/6抗体和其抗原结合片段和/或抗Fzd抗体和其抗原结合片段是单克隆的。在某些实施例中,其是人源化的。

[0291] 在某些实施例中,本发明进一步提供了一种对存在于本文公开的Wnt替代分子中的多肽进行编码的分离的核酸。核酸包含DNA和RNA。这些和相关的实施例可以包含对结合

本文所述的一种或多种Fzd受体和/或LRP5或LRP6的抗体片段进行编码的多核苷酸。如本文所使用的术语“分离的多核苷酸”应意指基因组、cDNA或合成来源的多核苷酸或其某种组合,由于其来源,分离的多核苷酸:(1)不与多核苷酸的全部或一部分缔合,(2)与其天然未连接的多核苷酸连接,或(3)作为较大序列的一部分在自然界中不存在。分离的多核苷酸可以包含天然存在的序列和/或人工序列。

[0292] 术语“可操作地连接”意指所述术语所应用的组分处于允许它们在适当条件下执行其固有功能的关系。例如,将与蛋白质编码序列“可操作地连接”的转录控制序列连接到其上,从而在与控制序列的转录活性相容的条件下实现蛋白质编码序列的表达。

[0293] 如本文所使用的术语“控制序列”是指可以影响与其连接或可操作地连接的编码序列的表达、加工或细胞内定位的多核苷酸序列。此类控制序列的性质可以取决于宿主生物体。在特定实施例中,原核生物的转录控制序列可以包含启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。在其它特定实施例中,真核生物的转录控制序列可以包含启动子,所述启动子包括针对转录因子、转录增强子序列、转录终止序列和聚腺苷酸化序列的一个或多个识别位点。在某些实施例中,“控制序列”可以包含前导序列和/或融合配偶体序列。

[0294] 本文所提及的术语“多核苷酸”意指单链或双链核酸聚合物。在某些实施例中,包括多核苷酸的核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一种核苷酸类型的经修饰形式。所述修饰包含碱基修饰,如溴尿嘧啶核苷、核糖修饰,如阿拉伯糖苷和2',3'-二脱氧核糖以及核苷酸间键合修饰,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、硫代苯胺磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phoshoraniladate)和氨基磷酸酯。术语“多核苷酸”具体包含DNA的单链和双链形式。

[0295] 术语“天然存在的核苷酸”包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“经修饰的核苷酸”包含具有经修饰的或取代的糖基等的核苷酸。术语“寡核苷酸键”包含寡核苷酸键,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、硫代苯胺磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等。参见例如LaPlanche等人,1986,《核酸研究》,14:9081;Stec等人,1984,《美国化学学会杂志》,106:6077;Stein等人,1988,《核酸研究》16:3209;Zon等人,1991,《抗癌症药物设计(Anti-Cancer Drug Design)》,6:539;Zon等人,1991,《寡核苷酸和类似物:实用方法(OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES:A PRACTICAL APPROACH)》,第87到108页(F.Eckstein编辑),英国牛津的牛津大学出版社(Oxford University Press,Oxford England);Stec等人,美国专利第5,151,510号;Uhlmann和Peyman,1990,《化学评论(Chemical Reviews)》,90:543,所述文献的公开内容出于任何目的通过引用的方式特此并入。寡核苷酸可以包含可检测标记以使得能够检测寡核苷酸或其杂交。

[0296] 术语“载体”用于指代用于将编码信息转移到宿主细胞的任何分子(例如,核酸、质粒或病毒)。术语“表达载体”是指适合于转化宿主细胞并含有引导和/或控制插入的异源核酸序列的表达的核酸序列的载体。如果存在内含子,则表达包含但不限于如转录、翻译和RNA剪接等过程。

[0297] 如本领域技术人员将理解的,多核苷酸可以包含表达或可以适于表达蛋白质、多肽、肽等的基因组序列、基因组外和质粒编码的序列以及较小的工程化基因节段。此类节段可以是天然分离的或者由本领域技术人员合成修饰。

[0298] 如本领域技术人员还将认识到的,多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链的,

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

[0299] 本领域的普通技术人员应理解,由于遗传密码的简并性,存在许多对本文所述的抗体进行编码的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些多核苷酸与对Wnt替代分子内的多肽进行编码的天然或原始多核苷酸序列的核苷酸序列具有最小的序列同一性。然而,本公开明确设想了由于密码子使用的差异而变化的多核苷酸。在某些实施例中,具体设想了已经针对哺乳动物表达进行了密码子优化的序列。

[0300] 因此,在本发明的另一个实施例中,如位点特异性诱变等诱变方法可以用于制备本文所述的多肽的变体和/或衍生物。通过这种方法,多肽序列的特异性修饰可以通过诱变对其进行编码的基础多核苷酸来进行。这些技术提供了一种用于通过将一个或多个核苷酸序列改变引入多核苷酸中来制备和测试序列变体(例如,包括了上述考虑因素中的一个或多个考虑因素)的直接方法。

[0301] 位点特异性诱变允许通过以下来产生突变体:使用对期望突变的DNA序列进行编码的特异性寡核苷酸序列以及足够数量的相邻核苷酸,以提供具有足够大小和序列复杂性的引物序列,从而形成在遍历的缺失连接部两侧的稳定双链体。可以在所选的多核苷酸序列中采用突变以改善、改变、减少、修饰或以其它方式改变多核苷酸本身的性质和/或改变所编码多肽的性质、活性、组成、稳定性或一级序列。

[0302] 在某些实施例中,本发明人设想了诱变对存在于Wnt替代分子中的多肽进行编码的多核苷酸序列,以改变编码的多肽的一种或多种性质,如结合亲和力或特定Fc区的功能或Fc区对特定Fcγ R的亲和力。位点特异性诱变技术是本领域中公知的,并且广泛用于产生多肽和多核苷酸的变体。例如,位点特异性诱变通常用于改变DNA分子的特定部分。在此类实施例中,采用在长度上通常包括约14个到约25个核苷酸左右的引物,其中在序列的连接部的两侧上约5个到约10个残基被改变。

[0303] 如本领域技术人员将理解的,位点特异性诱变技术通常采用以单链和双链形式存在的噬菌体载体。可用于定点诱变的典型载体包含如M13噬菌体等载体。这些噬菌体可以容易地商购获得,并且其用途通常是本领域技术人员公知的。双链质粒还通常用于消除了将目的基因从质粒转移到噬菌体的步骤的定点诱变。

[0304] 使用定点诱变制备所选的编码肽的DNA节段的序列变体提供了一种产生潜在有用物种的手段,但并不意味着进行限制,因为还存在可以获得肽和对其进行编码的DNA序列的序列变体的其它方法。例如,可以用如羟胺等诱变剂处理对期望肽序列进行编码的重组载体以获得序列变体。关于这些方法和方案的具体细节可以在Maloy等人,1994;Segal,1976;Prokop和Bajpai,1991;Kuby,1994;以及Maniatis等人,1982的教导中找到,所述文献各自出于所述目的通过引用的方式并入本文。

[0305] 在许多实施例中,将对Wnt替代分子的多肽进行编码的一种或多种核酸直接引入宿主细胞种,并且在足以诱导编码的多肽的表达的条件下培育细胞。可以使用本领域技术人员熟知的标准技术并与本文提供的多肽和核酸序列组合来制备本公开的Wnt替代多肽。

多肽序列可以用于确定对由此公开的特定多肽进行编码的适当核酸序列。根据本领域技术人员公知的标准方法,可以优化核酸序列以反映各种表达系统的特定密码子“偏好”。

[0306] 根据某些相关实施例,提供了一种重组宿主细胞,所述重组宿主细胞包括一种或多种本文所述的构建体,例如,包括对Wnt替代分子或其多肽进行编码的核酸的载体;以及一种产生编码产物的方法,所述方法包括从针对其的编码核酸表达。通过在适当条件下培养含有核酸的重组宿主细胞可以方便地实现表达。在通过表达产生后,抗体或其抗原结合片段可以使用任何适合的技术分离和/或纯化,并且然后根据需要使用。

[0307] 多肽以及编码核酸分子和载体可以例如从其天然环境中分离和/或纯化,其呈基本上纯净或均质的形式,或者在核酸的情况下,不含或基本上不含除了对具有期望功能的多肽进行编码的序列以外的原始核酸或基因。核酸可以包括DNA或RNA,并且可以是全部或部分合成的。除非上下文另外要求,否则提及本文所示的核苷酸序列涵盖具有指定序列的DNA分子,并且涵盖具有其中U取代了T的指定序列的RNA分子。

[0308] 用于在各种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是公知的。适合的宿主细胞包含细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。在本领域中可获得的用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包含中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NSO小鼠黑素瘤细胞等。常见的优选细菌宿主是大肠杆菌。

[0309] 在本领域中已很好地建立了如大肠杆菌等原核细胞中的多肽(例如,抗体和其抗原结合片段)的表达。对于综述,参见例如Pluckthun,A.《生物/技术》9:545-551(1991)。作为产生抗体或其抗原结合片段的选择方案,本领域技术人员也可获得在培养物中的真核细胞中的表达,参见最近的综述,例如Ref,M.E.(1993)《生物技术当前观点(Curr.Opinion Biotech.)》4:573-576;Trill J.J.等人(1995)《生物技术当前观点》6:553-560。

[0310] 可以选择或构建适合的载体,所述载体含有合适的调控序列,包含启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和其它合适的序列。载体可以根据需要是质粒、病毒,例如噬菌体或噬菌粒。对于另外的细节,参见例如《分子克隆:实验室手册》:第2版,Sambrook等人,1989,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)。《现代分子生物学实验指南》,第二版,Ausubel等人编辑,约翰威利父子公司,1992或其后续更新详细描述了用于例如在制备核酸构建体、诱变、测序、将DNA引入细胞中和基因表达以及蛋白质分析中操控核酸的许多已知技术和方案。

[0311] 术语“宿主细胞”用于指代在其中已经引入或能够引入对本文所述多肽中的一种或多种多肽进行编码的核酸序列的细胞,并且所述细胞进一步表达或能够表达关注的所选基因,如对任何本文所述多肽进行编码的基因。所述术语包含亲本细胞的子代,无论所述子代是否在形态上或遗传构成上与原始亲本相同,只要存在所选基因即可。因此,还设想了包括将这种核酸引入宿主细胞中的方法。引入可以采用任何可用的技术。对于真核细胞,适合的技术可以包含磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其它病毒(例如,牛痘或针对昆虫细胞的病毒、杆状病毒)的转导。对于细菌细胞,适合的技术可以包含氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。在引入之后,可以引起或允许例如通过在表达基因的条件下培养宿主细胞从核酸表达。在一个实施例中,核酸被整合到宿主细胞的基因组(例如,染色体)中。根据标准技术,可以通过包含促进与基因组重组的序列来促进整合。

[0312] 在某些实施例中,本发明还提供了一种方法,所述方法包括在表达系统中使用如上所述的构建体以表达特定多肽,如本文所述的Wnyt模拟分子。术语“转导”用于指代基因通常通过噬菌体从一种细菌转移到另一种细菌。“转导”还指代通过逆转录病毒获取和转移真核细胞序列。术语“转染”用于指代细胞对外来或外源DNA的摄取,并且当外源DNA已经被引入细胞膜内部时,细胞已经被“转染”。许多转染技术是本领域中公知的并且在本文中公开。参见例如Graham等人,1973,《病毒学(Virology)》52:456;Sambrook等人,2001,《分子克隆,实验室手册(MOLECULAR CLONING,A LABORATORY MANUAL)》,冷泉港实验室;Davis等人,1986,《分子生物学的基本方法(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY)》,爱思唯尔(Elsevier);以及Chu等人,1981,《基因(Gene)》13:197。此类技术可以用于将一个或多个外源DNA部分引入适合的宿主细胞中。

[0313] 如本文所使用的术语“转化”是指细胞遗传特性的改变,并且当细胞已经被修饰以含有新的DNA时,所述细胞已经被转化。例如,在将细胞从其天然状态进行遗传修饰的情况下,所述细胞被转化。在转染或转导后,转化DNA可以通过物理整合到细胞的染色体中而与细胞的DNA重组,或者可以作为附加型元件短暂地维持而不被复制,或者可以作为质粒独立复制。当DNA随着细胞分裂而复制时,认为细胞已经稳定转化。当与如核酸分子、多肽、宿主细胞等生物材料结合使用时,术语“天然存在的”或“天然的”是指在自然界发现并且未被人类操控的材料。类似地,如本文所使用的“非天然存在的”或“非天然的”是指在自然界中未发现或已被人类结构修饰或合成的材料。

[0314] 术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”以及“糖蛋白”可互换使用并且意指不限于任何特定长度的氨基酸的聚合物。所述术语不排除如豆蔻酰化、硫酸化、糖基化、磷酸化和信号序列的添加或缺失等修饰。术语“多肽”或“蛋白质”意指一个或多个氨基酸链,其中每个链包括通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白质可以包括多个通过肽键非共价和/或共价连接且具有天然蛋白质序列的链,即,由天然存在的以及特别是非重组细胞、或基因工程或重组细胞产生的蛋白质,并且包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子、或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的分子。术语“多肽”和“蛋白质”具体涵盖与本文公开的Fzd受体或LRP5或LRP6受体结合的Wnt替代分子、其Fzd结合区、其LRP5/6结合区、抗体和其抗原结合片段,或具有这些多肽中的任一种多肽的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的序列。因此,“多肽”或“蛋白质”可以包括一个(称为“单体”)或多个(称为“多聚体”)氨基酸链。

[0315] 本文提及的术语“分离的蛋白质”、“分离的Wnt替代分子”或“分离的抗体”意指主题蛋白质、Wnt替代分子或抗体:(1)不含至少一些其它蛋白质,通常将使用所述至少一些其它蛋白质在自然界中发现所述主题蛋白质;(2)基本上不含来自相同来源,例如,来自相同物种的其它蛋白质;(3)由来自不同物种的细胞表达;(4)已与至少约50%的多核苷酸、脂质、碳水化合物或与其天然缔合的其它物质分离;(5)不和与“分离的蛋白质”天然缔合的蛋白质部分缔合(通过共价或非共价相互作用);(6)和不与其天然缔合的多肽可操作地缔合(通过共价或非共价相互作用);或(7)在自然界中不存在。这种分离的蛋白质可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其它RNA编码,或者可以具有合成来源,或其任何组合。在某些实施例中,分离的蛋白质可以包括天然存在的多肽序列和/或人工多肽序列。在某些实施例中,分离的蛋白质基本上不含在其天然环境中会发现的且会干扰其使用(治疗、诊断、预防、研究或其

它)的蛋白质或多肽或其它污染物。

[0316] 设想了本文描述的多肽(例如,Wnt替代分子或其Fzd结合区或LRP5/6结合区)中的任一种多肽的一个或多个氨基酸序列修饰。例如,可能期望改善Wnt替代分子的结合亲和力和/或其它生物学性质。例如,可以通过将适当的核苷酸改变引入对抗体或其链进行编码的多核苷酸中或通过肽合成来制备Wnt替代分子的氨基酸序列变体。此类修饰包含例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终Wnt替代分子,条件是最终构建体具有期望特性(例如,与一种或多种Fzd和/或LRP5/6受体结合的高亲和力)。氨基酸变化还可以改变抗体的翻译后过程,如改变糖基化位点的数量或位置。上文针对本发明的多肽描述的变化和修饰中的任何变化和修饰可以包含在本发明的抗体中。

[0317] 本公开提供了本文公开的多肽(例如,Wnt替代分子或其Fzd结合区或LRP5/6结合区,或抗体或其抗原结合片段)中的任一种多肽的变体。在某些实施例中,变体与本文公开的多肽具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一性。在某些实施例中,此类变体多肽与一种或多种Fzd受体和/或一种或多种LRP5/6受体的结合为相对于本文具体所示的Wnt替代分子与一种或多种Fzd受体和/或一种或多种LRP5/6受体的结合的至少约50%、至少约70%,并且在某些实施例中至少约90%。在另外的实施例中,此类变体Wnt替代分子以比本文所示的Wnt替代分子更大的亲和力与一种或多种Fzd受体和/或一种或多种LRP5/6受体结合,例如,其结合定量地为相对于本文具体所示的抗体序列的结合的至少约105%、106%、107%、108%、109%或110%。

[0318] 在特定实施例中,Wnt替代分子或其结合区(例如,Fab、scFv或VHH或sdAb)可以包括:a)重链可变区,所述重链可变区包括:i.氨基酸序列与本文所述的所选抗体的重链CDR1区相同的CDR1区;ii.氨基酸序列与所选抗体的重链CDR2区相同的CDR2区;和iii.氨基酸序列与所选抗体的重链CDR3区相同的CDR3区;和/或b)轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括:i.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR1区相同的CDR1区;ii.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR2区相同的CDR2区;和iii.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR3区相同的CDR3区;其中抗体特异性结合所选靶标(例如,一种或多种Fzd受体或LRP5或LRP6受体)。在另外的实施例中,所述抗体或其抗原结合片段是变体抗体或其抗原结合片段,其中除了VH和VL区的CDR区中的至多8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代之外,所述变体包括与所选抗体相同的重链和轻链。在这方面,在所选抗体的CDR区中可以存在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个氨基酸取代,或者在某些实施例中,可以存在9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代。取代可以在VH和/或VL区中的CDR中。(参见例如Muller,1998,《结构(Structure)》6:1153-1167)。

[0319] 在特定实施例中,Wnt替代分子或其结合区(例如,Fab、scFv或VHH或sdAb)可以具有:a)重链可变区,所述重链可变区具有与本文所述的抗体或其抗原结合片段的重链可变区具有至少80%同一性、至少95%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或至少98%同一性或99%同一性的氨基酸序列;和/或b)轻链可变区,所述轻链可变区具有与本文所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区具有至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性或至少98%同一性或99%同一性的氨基酸序列。其说明性抗原结合片段的氨基酸序列在SEQ ID NO:1-128中示出。

[0320] 多肽与另一种多肽具有一定的“序列同一性”百分比,这意味着在进行比对时,当比较两个序列时,氨基酸的百分比是相同的。序列相似性可以通过多种不同的方式来确定。为了确定序列同一性,可以使用包含可通过万维网ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/获得的BLAST在内的方法和计算机程序来比对序列。另一种比对算法是FASTA,可从牛津分子集团有限公司(Oxford Molecular Group,Inc.)的全资子公司、来自美国威斯康星州麦迪逊市(Madison,Wis.,USA)的遗传学计算机集团(Genetics Computing Group)(GCG)的软件包中获得。以下中描述了用于比对的其它技术:《酶学方法(Methods in Enzymology)》,第266卷:用于大分子序列分析的计算机方法(Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis)(1996),Doolittle编,学术出版社有限公司(Academic Press,Inc.),美国加利福尼亚州圣地亚哥哈考特布瑞斯公司(Harcourt Brace&Co.,San Diego,Calif.,USA)的分公司。特别关注了允许序列中有空位的比对程序。Smith-Waterman是允许序列比对中有空位的一种类型的算法。参见《(分子生物学方法(Meth.Mol.Biol.)》70:173-187(1997)。而且,可以利用使用Needleman和Wunsch比对方法的GAP程序来比对序列。参见《分子生物学杂志》48:443-453(1970)

[0321] 关注了使用Smith和Waterman的局部同源性算法(《应用数学进展(Advances in Applied Mathematics)》2:482-489(1981))来确定序列同一性的BestFit程序。空位生成罚分的范围通常将为1到5,经常为2到4并且在许多实施例中将为3。空位生成罚分的范围通常将为0.01到0.20并且在许多情况下将为0.10。程序具有由输入以进行比较的序列确定的默认参数。优选地,序列同一性是使用由程序确定的默认参数来确定的。此程序也可从来自美国威斯康星州麦迪逊市的遗传学计算集团(GCG)的软件包获得。

[0322] 关注的另一个程序是FastDB算法。以下中描述了FastDB:序列比较和分析的当前方法(Current Methods in Sequence Comparison and Analysis),《大分子测序与合成所选方法与应用(Macromolecule Sequencing and Synthesis,Selected Methods and Applications)》,第127-149页,1988,Alan R.Liss有限公司(Alan R.Liss,Inc.)。基于以下参数通过FastDB来计算序列同一性百分比:不匹配罚分:1.00;空位罚分:1.00;空位大小罚分:0.33;以及连接罚分:30.0。

[0323] 在特定实施例中,Wnt替代分子或其结合区(例如,Fab、scFv或VHH或sdAb)可以包括:a)重链可变区,所述重链可变区包括:i.氨基酸序列与本文所述的所选抗体的重链CDR1区相同的CDR1区;ii.氨基酸序列与所选抗体的重链CDR2区相同的CDR2区;和iii.氨基酸序列与所选抗体的重链CDR3区相同的CDR3区;以及b)轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包括:i.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR1区相同的CDR1区;ii.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR2区相同的CDR2区;和iii.氨基酸序列与所选抗体的轻链CDR3区相同的CDR3区;其中抗体特异性结合所选靶标(例如,Fzd受体,如Fzd1)。在另外的实施例中,抗体或其抗原结合片段是变体抗体,其中除了VH和VL区的CDR区中的至多8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代之外,所述变体包括与所选抗体相同的重链和轻链。在这方面,在所选抗体的CDR区中可以存在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个氨基酸取代,或者在某些实施例中,可以存在9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或更多个氨基酸取代。取代可以在VH和/或VL区中的CDR中。(参见例如Muller,1998,《结构》6:1153-1167)。

[0324] 代表性多肽(例如,本文提供的Wnt替代分子的变体Fzd结合区或LRP5/6结合区)的

三维结构的确定可以通过常规方法进行,使得例如,利用所选的天然或非天然氨基酸进行的一个或多个氨基酸的取代、添加、缺失或插入可以出于确定如此衍生的结构变体是否保留当前公开的物种的空间填充性质的目的来虚拟地建模。参见例如Donate等人,1994《蛋白质科学(Prot.Sci.)》3:2378;Bradley等人,《科学》309:1868-1871(2005);Schueler-Furman等人,《科学》310:638(2005);Dietz等人,《美国国家科学院院刊》103:1244(2006);Dodson等人,《自然》450:176(2007);Qian等人,《自然》450:259(2007);Raman等人《科学》327:1014-1018(2010)。可以用于这些和相关实施例(如用于结合区的合理设计)的计算机算法的一些另外非限制性实例包含VMD,其是用于使用3-D图形和内置脚本显示、动画化并分析大生物分子系统的分子可视化程序,(参见伊利诺伊大学厄巴纳-香槟分校的理论和计算生物物理小组(the Theoretical and Computational Biophysics Group,University of Illinois at Urbana-Champagne)的网站ks.uiuc.edu/Research/vmd/。许多其它计算机程序是本领域已知的并且是技术人员可获得的,并且允许从能量最小化的构象的空间填充模型(范德华半径)确定原子尺寸;GRID,其试图确定对不同化学基团具有高亲和力,从而增强结合的区;蒙特卡洛(Monte Carlo)搜索,其计算数学比对;以及CHARMM(Brooks等人(1983)《计算化学杂志(J.Comput.Chem.)》4:187-217)和AMBER(Weiner等人(1981)《计算化学杂志》106:765),其评定力场计算和分析(还参见Eisenfield等人(1991)《美国生理学杂志(Am.J.Physiol.)》261:C376-386;Lybrand(1991)《比利时制药学杂志(J.Pharm.Belg.)》46:49-54;Froimowitz(1990)《生物技术(Biotechniques)》8:640-644;Burbam等人(1990)《蛋白质(Proteins)》7:99-111;Pedersen(1985)《环境健康展望(Environ.Health Perspect.)》61:185-190;以及Kini等人(1991)《生物分子结构与动力学杂志(J.Biomol.Struct.Dyn.)》9:475-488)。各种合适的计算计算机程序也可以商购自例如Schrödinger(德国慕尼黑(Munich,Germany))。

[0325] 组合物

[0326] 还公开了包括本文所描述的Wnt替代分子和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物。在特定实施例中,所述药物组合物进一步包括一种或多种Wnt多肽或Norrin多肽。

[0327] 在进一步的实施例中,还公开了包括多核苷酸和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物,所述多核苷酸包括对本文所描述的Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在特定实施例中,药物组合物进一步包括一种或多种多核苷,所述一种或多种多核苷酸包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的多核苷酸中。

[0328] 在进一步的实施例中,还公开了包括表达载体例如病毒载体和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物,所述载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括对本文所描述的Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在特定实施例中,药物组合物进一步包括表达载体(例如,病毒载体),所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列

和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的多核苷酸(例如,表达盒)中。

[0329] 本发明进一步设想了包括细胞和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物,所述细胞包括表达载体,所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括与对Wnt替代分子进行编码的核酸操作性地连接的启动子。在特定实施例中,药物组合物进一步包括细胞,所述细胞包括表达载体,所述表达载体包括多核苷酸,所述多核苷酸包括与对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列操作性地连接的启动子。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的多核苷酸(例如,表达盒)和/或相同细胞中。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0330] 本公开设想了药物组合物,所述药物组合物包括用于递送作为第一活性剂的Wnt替代分子的第一分子和用于递送Wnt多肽或Norrin多肽的第二分子。第一分子和第二分子可以是相同类型的分子或不同类型的分子。例如,在某些实施方案中,第一分子和第二分子可以各自独立地选自以下类型的分子:多肽、有机小分子、对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸(任选地,DNA或mRNA,任选地,经修饰的RNA)、包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的载体(任选地,表达载体或病毒载体)以及包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的细胞(任选地,表达盒)。

[0331] 单独的或组合的主题分子可以与可用于制备通常安全、无毒且理想的配制物的药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂和试剂进行组合,并且包含可接受以供哺乳动物例如人或灵长类动物使用的赋形剂。此类赋形剂可以是固体、液体、半固体或在气雾组合物的情况下为气态的。此类载剂、稀释剂和赋形剂的实例包含但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。补充性活性化合物也可以并入配制物中。用于配制物的溶液或悬浮液可以包含:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌化合物,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合化合物,如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;清洁剂,如用于防止聚合的吐温20;以及用于调节渗透压的化合物,如氯化钠或右旋糖。可以用如盐酸或氢氧化钠等酸或碱调整pH。在特定实施例中,药物组合物是无菌的。

[0332] 药物组合物可以进一步包含无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,适合的载剂包含生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在某些情况下,组合物是无菌的,并且应该是流体,使得其可以被抽吸到注射器中并从注射器递送给受试者。在某些实施例中,组合物在制造和储存条件下是稳定的,并且抵抗如细菌和真菌等微生物的污染作用进行保存。载剂可以是例如溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及其适合的混合物。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散体的情况下维持所需的颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持恰当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现防止微生物的作用。在许多情况下,组合物中包含等渗剂(例如糖、如甘露醇、山梨醇等多元醇、氯化钠)是优选的。可以通过在组合物中包含延缓吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现内部组合物的延长吸收。

[0333] 无菌溶液可以通过根据需要将所需量的抗Fzd抗体或其抗原结合片段(或编码多

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

[0334] 在一个实施例中,药物组合物与保护抗体或其抗原结合片段免于从体内快速消除的载剂一起制备,如控释配制物,包含植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这种配制物的方法对于本领域技术人员而言将是显而易见的。材料也可以商购获得。脂质体悬浮液也可以用作药学上可接受的载剂。这些脂质体悬浮液可以根据本领域技术人员已知的方法制备。

[0335] 以易于施用和实现剂量均匀性的剂量单位形式来配制药物组合物可以是有利的。如本文所使用的,剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位;每个单位含有预定量的经计算结合所需药物载剂可产生所期望治疗作用的活性抗体或其抗原结合片段。剂量单位形式的规格由抗体或其抗原结合片段的独特特性和待实现的特定治疗效果以及本领域中在混配这种活性抗体或其抗原结合片段以用于治疗个体时固有的局限性决定并且直接依赖于此。

[0336] 药物组合物可以与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器(例如,注射器,例如载药注射器)中。

[0337] 本发明的药物组合物涵盖任何药学上可接受的盐、酯或这种酯的盐、或在施用于包括人的动物时能够(直接或间接)提供生物活性抗体或其抗原结合片段的任何其它化合物。

[0338] 本发明包含本文所描述的Wnt替代分子的药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的生理学上和药学上可接受的盐:即,保留了母体化合物的期望生物学活性并且不赋予其不期望的毒理作用的盐。各种药学上可接受的盐是本领域已知的并且描述于例如以下中:《雷明顿药学大全(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第17版,Alfonso R.Gennaro(编),美国宾夕法尼亚州伊斯顿Mark出版公司(Mark Publishing Company,Easton,PA,USA),1985(以及其最近的版本);《制药技术百科全书(Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology)》,第3版,James Swarbrick(编),美国纽约州美国英富曼卫生保健(有限公司)(Informa Healthcare USA(Inc.),NY,USA),2007;以及《药物科学杂志(J.Pharm.Sci.)》66:2(1977)。而且,有关适合的盐的综述,参见Stahl和Wermuth的《“药用盐手册:性质、选择和使用(Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use)”》(Wiley-VCH,2002)。

[0339] 用如碱金属和碱土金属或有机胺等金属或胺形成药学上可接受的碱加成盐。用作阳离子的金属包括钠、钾、镁、钙等。胺包括N-N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、二环己胺、乙二胺、N-甲基葡糖胺和普鲁卡因(参见例如Berge等人,“药用盐(Pharmaceutical Salts)”、《药物科学杂志(J.Pharma Sci)》,1977,66,119)。酸性化合物的碱加成盐是通过使游离酸形式与足量的期望的碱相接触以常规方式产生盐来制备的。游离酸形式可以通过使盐形式与酸相接触并且以常规方式分离游离酸来再生。游离酸形式在

某些物理性质方面如在极性溶剂中的溶解度与其各自的盐形式略有不同,但是出于本发明的目的,盐等同于其各自的游离酸。

[0340] 在一些实施例中,本文所提供的药物组合物包括与药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂混合的治疗有效量的Wnt替代分子或其药学上可接受的盐,所述药学上可接受的载剂、稀释剂和/或赋形剂例如盐水、磷酸盐缓冲盐水、磷酸盐和氨基酸、聚合物、多元醇、糖、缓冲剂、防腐剂和其它蛋白质。示例性氨基酸、聚合物和糖等是辛基苯氧基聚乙氧基乙醇化合物、聚乙二醇单硬脂酸酯化合物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、蔗糖、果糖、右旋糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露醇、葡聚糖、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、木糖醇、乳糖、海藻糖、牛或人血清白蛋白、柠檬酸盐、乙酸盐、林格氏和汉克氏(Hank's)溶液、半胱氨酸、精氨酸、肉毒碱、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯和乙二醇。优选地,此配制物在4℃下在至少六个月内是稳定的。

[0341] 在一些实施例中,本文所提供的药物组合物包括缓冲液,如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或磷酸钠/硫酸钠、tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、无菌水和普通技术人员已知的其它缓冲液,如Good等人(1966)《生物化学》5:467所描述的那些缓冲液。所述缓冲液的pH值可以处于6.5到7.75的范围内,优选地7到7.5,并且最优选地7.2到7.4。

[0342] 使用方法

[0343] 本公开还提供了用于使用本文公开的Wnt替代分子,例如来调节Wnt信号传导通路(例如,增加Wnt信号传导)的方法,以及用于施用本文在多种治疗设置中公开的Wnt替代分子的方法。本文提供了使用Wnt替代分子的治疗方法。在一个实施例中,Wnt替代分子被提供给患有涉及不适当或失调的Wnt信号传导(例如,Wnt信号传导减少)的疾病的受试者。

[0344] 增加Wnt通路信号传导和相关治疗方法

[0345] 在某些实施例中,Wnt替代分子可以用于增加组织或细胞中的Wnt信号传导。因此,在一些方面,本发明提供了一种用于增加组织或细胞中的Wnt信号传导或增强组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的本文公开的Wnt替代分子或其药学上可接受的盐接触,其中Wnt替代分子是Wnt信号传导通路激动剂。在一些实施例中,接触发生在体外、离体或体内。在特定实施例中,细胞是培养细胞,并且接触发生在体外。在某些实施例中,所述方法包括进一步使组织或细胞与一种或多种Wnt多肽或Norrin多肽接触。

[0346] 在相关方面,本发明提供了一种用于增加组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的包括本文公开的Wnt替代分子的多核苷酸接触。在某些实施例中,还使靶组织或靶细胞与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的多核苷酸接触。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的多核苷酸中。

[0347] 在相关方面,本发明提供了一种用于增加组织或细胞中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织或细胞与有效量的包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列的载体接触。在某些实施例中,还使组织或细胞与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列

的载体接触。在某些实施例中,载体是表达载体并且可以包括与核酸序列操作性地连接的启动子序列。在特定实施例中,载体是病毒载体。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的载体(例如,相同表达盒)中。

[0348] 在相关方面,本发明提供了一种用于增加组织中的Wnt信号传导的方法,所述方法包括使组织与有效量的包括对本发明的Wnt替代分子进行编码的核酸序列的细胞接触。在某些实施例中,还使组织与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的细胞接触。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的细胞中。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在某些实施例中,用包括对Wnt替代分子或Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的表达盒的载体对细胞进行转导。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0349] 本文公开的Wnt替代分子可以用于治疗疾病、病症或病状,例如通过增加靶向细胞、组织或器官中的Wnt信号传导。因此,在一些方面,本发明提供了一种用于治疗有需要的受试者的疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使受试者与有效量的本公开的组合物接触。在特定实施例中,组合物是药物组合物,所述药物组合物包括以下中的任一种:Wnt替代分子;包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列的多核苷酸,例如,DNA或mRNA,任选地,经修饰的mRNA;包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列的载体,例如,表达载体或病毒载体;或包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列的细胞,例如,用对Wnt替代分子进行编码的表达载体或病毒载体转导的细胞。在特定实施例中,疾病或病况是病理性疾病或病症或者损伤,例如由伤口引起的损伤。在某些实施例中,伤口可能是另一种治疗性治疗的结果。在某些实施例中,疾病或病况包括受损组织修复、愈合或再生,或者会受益于增加的组织修复、愈合或再生。在一些实施例中,在体内发生接触,即,向受试者施用主题组合物。

[0350] 在某些实施例中,所述方法包括进一步使受试者与药物组合物接触,所述药物组合物包括一种或多种Wnt多肽或Norrin多肽。本公开设想了使受试者与用于递送作为第一活性剂的Wnt替代分子的第一分子和用于递送Wnt多肽或Norrin多肽的第二分子接触。第一分子和第二分子可以是相同类型的分子或不同类型的分子。例如,在某些实施方案中,第一分子和第二分子可以各自独立地选自以下类型的分子:多肽、有机小分子、对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸(任选地,DNA或mRNA,任选地,经修饰的RNA)、包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的载体(任选地,表达载体或病毒载体)以及包括对第一活性剂或第二活性剂进行编码的核酸序列的细胞(任选地,表达盒)。

[0351] 在相关方面,本发明提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或者针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的多核苷酸的药物组合物接触,所述多核苷酸包括对本文公开的Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使受试者与包括有效量的多核苷酸的药物组合物接触,所述多核苷酸包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,多核苷酸是DNA或mRNA,例如经修饰的mRNA。在特定实施例中,多核苷酸是进一步包括5'帽序列和/或3'拖尾序列(例如polyA尾)的经修饰的mRNA。在

其它实施例中,多核苷酸是包括与编码序列操作性地连接的启动子的表达盒。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的多核苷酸中。

[0352] 在相关方面,本发明提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或者针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的载体的药物组合物接触,所述载体包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使受试者与包括有效量的载体的药物组合物接触,所述载体包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列。在某些实施例中,载体是表达载体并且可以包括与核酸序列操作性地连接的启动子序列。在特定实施例中,载体是病毒载体。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的载体(例如,相同表达盒)中。

[0353] 在相关方面,本发明提供了一种用于治疗疾病或病况(例如,与Wnt信号传导减少相关的疾病或病症或者针对其增加Wnt信号传导将提供治疗益处的疾病或病症)的方法,所述方法包括使有需要的受试者与包括有效量的细胞的药物组合物接触,所述细胞包括对Wnt替代分子进行编码的核酸序列。在某些实施例中,还使受试者与包括对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列的细胞接触。在某些实施例中,对Wnt替代分子进行编码的核酸序列和对Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的核酸序列存在于相同的细胞中。在特定实施例中,细胞是从待治疗受试者获得的异源细胞或自体细胞。在某些实施例中,用包括对Wnt替代分子或Wnt多肽或Norrin多肽进行编码的表达盒的载体对细胞进行转导。在特定实施例中,细胞是干细胞,例如脂肪源干细胞或造血干细胞。

[0354] Wnt信号传导在干细胞的发育过程和维持中发挥着关键作用。Wnt信号的重新活化与损伤和疾病后大多数组织的再生和修复相关。预期Wnt替代分子响应于损伤和疾病而提供愈合和组织修复的益处。组织损害和损失的原因包含但不限于老化、变性、遗传性病况、感染和炎症、创伤性损伤、毒素/代谢诱导的毒性、或其它病理性病况。已经显示Wnt信号和Wnt信号的增强子使成年组织驻留干细胞活化。在一些实施例中,施用本发明的化合物以用于治疗患病组织或受损组织、用于组织再生以及用于细胞生长和增殖和/或用于组织工程化。

[0355] 与Wnt通路的突变相关的人类疾病针对治疗和预防疾病中Wnt信号的增强提供了有力证据。临床前体内和体外研究提供了许多疾病病况中涉及Wnt信号的另外的证据,并且进一步支持将Wnt替代分子用于各种人类疾病。例如,本发明的组合物可以用于促进或增加骨生长或再生、骨移植、骨折愈合、骨质疏松症和骨质疏松性骨折的治疗、脊柱融合、脊髓损伤(包含椎体压缩性骨折)、术前脊柱外科手术优化、矫形装置的骨整合、腱-骨整合、牙齿生长和再生、牙种植、牙周病、颌面重建和颌骨坏死。其也可以用于治疗脱发;增强感觉器官的再生(例如,治疗听力损失,包含内和外听觉毛细胞的再生)、治疗前庭功能减退、治疗黄斑变性、治疗视网膜病变(包含玻璃体视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、其它视网膜变性疾病)、富克斯氏营养不良、其它角膜疾病等;治疗中风、创伤性脑损伤、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、肌营养不良症、因骨骼肌减少症或恶病质引起的肌萎缩以及其它影响血脑屏障的变性或完整性的病况。本发明的组合物还可以用于治疗口腔粘膜炎、治疗短肠综合征、炎性肠病(IBD)(包含克罗恩氏病(CD)和溃疡性结肠炎(UC),具体地是伴有瘘管形成的CD)、其

它胃肠道病症;治疗代谢综合征、血脂异常、治疗糖尿病、治疗胰腺炎、外分泌或内分泌胰腺组织受损的病况;需要增强表皮再生的病况(例如表皮伤口愈合)、治疗糖尿病足溃疡、涉及牙齿、指甲或皮肤发育不全等的综合征、其中血管生成是有益的病况;治疗心肌梗塞、冠状动脉疾病、心力衰竭;增强造血细胞的生长(例如增强从骨髓的造血干细胞移植)、动员外周血、治疗免疫缺陷、移植物抗宿主疾病等;治疗急性肾损伤、慢性肾脏疾病;治疗肺部疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺纤维化(包含特发性肺纤维化)、增强肺组织的再生。本发明的组合物还可以用于增强肝细胞再生,例如肝再生、治疗肝硬化、增强肝移植、治疗急性肝功能衰竭、治疗经历丙型肝炎或乙型肝炎病毒感染或抗病毒后药物疗法的慢性肝病、酒精性肝病(包含酒精性肝炎)、伴随脂肪变性或脂肪性肝炎的非酒精性肝病等。本发明的组合物可以治疗疾病和病症,包含但不限于其中期望再生性细胞生长的病况。

[0356] 涉及Wnt信号传导组分中的功能丧失突变或功能获得突变的人类遗传学显示了支持增强Wnt信号以用于骨生长的有力证据。其中期望增强的骨生长的病况可以包含但不限于骨折、移植、在假体装置周围向内生长、骨质疏松症、骨质疏松性骨折、脊柱融合、椎体压缩性骨折、脊柱外科手术的术前优化、颌骨坏死、牙种植、牙周病、颌面重建等。Wnt替代分子增强和促进了对促进骨再生至关重要的Wnt信号。用于使骨组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。在一些实施例中,使骨髓细胞暴露于本发明的分子,从而使得所述骨髓内的干细胞活化。

[0357] 在一些实施例中,通过使响应性细胞群(例如,骨髓、骨祖细胞、骨干细胞等)与有效剂量的本文公开的Wnt替代分子接触来增强骨再生。用于使骨组织再生的方法受益于施用Wnt替代分子,所述施用可以是全身性的或局部化的。在一些这种实施例中,在体内执行接触。在其它这种实施例中,离体地执行接触。分子可以例如通过加载到任选地可生物降解的基质上而定位到作用位点,并且任选地提供活性剂的缓释。基质载剂包含但不限于可吸收的胶原海绵、陶瓷、水凝胶、高分子微球、纳米颗粒、骨水泥等。

[0358] 在特定实施例中,包括本文公开的一种或多种Wnt替代分子(或对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸,或包括对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸的载体或细胞)的组合物用于治疗或预防包含但不限于以下中的任一种的骨骼疾病或病症,或治疗或预防与以下中的任一种相关但不限于其的损伤:骨质疏松症、骨质疏松性骨折、骨折(包含椎体压缩性骨折)、不愈合骨折、延迟愈合骨折、脊柱融合、骨坏死,颌、髋或股骨头等的坏死,植入物的骨整合(例如,用于在部分或全部膝盖或髋置换后加速恢复)、成骨不全症、骨移植、腱修复、颌面外科手术、牙种植、由遗传疾病、变性、老化、药品或损伤引起的任何其它骨病症或缺陷。在一个实施例中,结合Fzd1、Fzd2和Fzd7以及LRP5和/或LRP6的Wnt替代分子用于治疗或预防任何骨骼疾病或病症。在一个实施例中,结合Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8以及LRP5和/或LRP6的Wnt替代分子用于治疗或预防任何骨骼疾病或病症。与另外的Fzd受体结合的其它Fzd分子也可以与LRP5和/或LRP6结合体一起使用。

[0359] 在特定实施例中,本文公开的组合物和方法可以用于:增加受试者的骨矿物质密度、增加所述受试者的骨体积(例如,胫骨和/或股骨骨体积)、增加所述受试者的皮质厚度(例如,在骨小梁区或在股骨中骨干中)、增加所述受试者的矿物质沉积速率、增加所述受试者的(例如,骨中的)成骨细胞的数量和/或减少所述受试者的(例如,骨中的)破骨细胞的数量、增加所述受试者的骨刚度、增加所述受试者的骨折点的极限负荷、改善所述受试者的骨

的对骨折的抵抗力、减少所述受试者的骨吸收、减少所述受试者的与骨质疏松症相关的骨流失或增加所述受试者的骨的生物化学强度。在一个实施例中,结合Fzd1、Fzd2和Fzd7的Wnt替代分子用于这些指定用途中的任一种用途。在一个实施例中,结合Fzd1、Fzd2、Fzd5、Fzd7和Fzd8的Wnt替代分子用于这些指定用途中的任一种用途。

[0360] 包含用于治疗或预防骨骼疾病或病症的方法的本文公开的方法包含包括向有需要的受试者提供Wnt替代分子和抗吸收剂两者的方法。在某些实施例中,所述方法用于治疗骨质疏松症,任选地,绝经后骨质疏松症。

[0361] 本公开还提供了一种用于抑制或减少有需要的受试者的骨吸收的方法,所述方法包括向所述受试者提供有效量的Wnt替代分子,其中所述Wnt替代分子是Wnt信号传导通路的激动剂。在某些实施例中,所述方法进一步包括向受试者提供抗吸收剂。在某些实施例中,所述受试者已经被诊断患有骨质疏松症(任选地,绝经后骨质疏松症)或处于患有骨质疏松症(任选地,绝经后骨质疏松症)的风险中。各种抗吸收剂是本领域已知的并且包含但不限于本文公开的那些。

[0362] 当将Wnt替代分子与如抗吸收剂等另一种治疗剂组合提供给受试者时,可以以相同或不同的药物组合物提供两种药剂。所述两种药剂可以同时、在不同时间(例如,同时地、连续地或在重叠或不重叠的时间段期间)提供给受试者。在某些实施例中,所述两种药剂在重叠时间段期间在受试者中具有治疗活性。

[0363] 包括本文公开的一种或多种Wnt替代分子(或对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸,或包括对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸的载体或细胞)的组合物可以用于体内治疗骨骼组织缺陷。“骨骼组织缺陷”意指骨骼或其它骨骼结缔组织在期望恢复骨骼或结缔组织的任何位点处的缺陷,无论缺陷是如何引起的,例如无论是手术干预、肿瘤切除、溃疡、植入、骨折还是其它创伤性或变性病况的结果。本发明的组合物可以用作用于恢复结缔组织的软骨功能、用于修复软骨组织的缺损或损伤的方案的一部分,所述软骨组织的缺损或损伤如变性磨损和关节炎、组织创伤、半月板撕裂移位、半月板切除、由韧带撕裂、关节不齐、骨折或遗传性疾病引起的关节脱位。

[0364] Wnt替代分子还可以用于治疗牙周病。牙周病是牙齿脱落的主要原因并且与多种全身性病况有关。在一些实施例中,通过接触响应性细胞群来增强牙齿或下层骨再生。在一些这种实施例中,在体内执行接触。在其它这种实施例中,离体地执行接触,随后植入活化的干细胞或祖细胞。分子可以例如通过加载到任选地可生物降解的基质上而定位到作用位点,并且任选地提供活性剂的缓释。基质载剂包含但不限于可吸收的胶原海绵、陶瓷、水凝胶、骨水泥、聚合物微球、纳米颗粒等。

[0365] 研究已经表明,Wnt信号传导和R-脊椎蛋白的生物学能够在损伤、老化或变性后促进内耳中的感觉毛细胞再生。听力丧失或前庭功能减退所涉及的内耳中感觉毛细胞的损失也可以受益于本发明的组合物。在内耳中,听觉器官容纳将声音振动转化为电脉冲所需的机械敏感毛细胞。包括半规管(SSC)、椭圆囊和球囊的前庭器官还含有感觉毛细胞,以检测头部位置和头部运动。本发明的组合物可以例如在输注中使用;在基质或其它药性持久的系统中使用;或在增强听觉再生的其它耳局部应用中使用。

[0366] Wnt替代分子还可以用于视网膜组织的再生。在成年哺乳动物视网膜中,穆勒神经胶质细胞(Muller glia cell)能够例如在体内神经毒性损伤后之后使视网膜细胞(包含光

感受器)再生。Wnt信号传导和Wnt信号的增强子可以促进穆勒神经胶质源视网膜祖细胞在损害后或在变性期间增殖。本发明的组合物还可以用于使眼中的组织和其它细胞类型再生。例如,年龄相关性黄斑变性(AMD)、其它视网膜变性疾病、角膜病、富克斯氏营养不良、玻璃体视网膜病变、遗传性疾病等可以受益于本发明的组合物。AMD的特征在于渐进性降低的中心视觉和视敏度。富克斯氏营养不良症的特征在于角膜内皮细胞逐渐丧失。Wnt信号和Wnt信号的增强可以促进眼部组织中角膜内皮、视网膜上皮等的再生。在其它实施例中,本发明的组合物可以例如在输注中使用;在基质或其它药性持久的系统中使用;或在用于视网膜再生和黄斑变性的治疗的其它眼局部应用中。

[0367] 已经通过谱系示踪研究鉴别出用于肝细胞的稳态更新的特定增殖细胞群,例如中心周围区的Axin2阳性细胞。谱系示踪研究还鉴别出了另外可能的肝脏祖细胞,包含但不限于Lgr阳性细胞。包含Lgr5阳性细胞和Axin2阳性细胞在内的自我更新肝细胞和其它可能祖细胞群被鉴别为能够在损伤后响应于Wnt信号和/或R-脊椎蛋白进行再生。急性肝损伤和衰竭以及慢性肝病的许多临床前模型显示出肝细胞的恢复和再生受益于增强Wnt信号。

[0368] 在某些实施例中,包括本文公开的Wnt替代分子(或对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸,或包括对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸的载体或细胞)的组合物用于促进肝再生、减少纤维化和/或改善肝功能。在某些实施例中,本文公开的组合物和方法用于:增加肝脏重量、增加肝脏重量与体重的比率、增加肝中PCNA和pH3阳性细胞核的数目、增加肝中Ki67和/或细胞周期蛋白D1的表达、增加肝细胞增殖和/或有丝分裂、减少慢性肝损伤后的纤维化或增加肝细胞功能。

[0369] 在特定实施例中,本发明的组合物可以用于:治疗急性肝衰竭、急性酒精性肝损伤;治疗经历丙型肝炎或乙型肝炎病毒感染或抗病毒后药物疗法的慢性肝疾病、慢性酒精性肝病、酒精性肝炎、非酒精性脂肪肝疾病和非酒精性脂肪性肝炎(NASH);治疗肝硬化和所有原因的严重慢性肝病;以及增强肝细胞的再生。用于使肝组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。这些方法包含但不限于全身性施用方法和局部化施用方法,例如通过注射到肝组织中、通过注射到通向肝脏的静脉或血管中、通过植入缓释配制物等。

[0370] 在特定实施例中,包括本文公开的Wnt替代分子(或对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸,或包括对Wnt替代分子进行编码的多核苷酸的载体或细胞)的组合物用于治疗或预防包含但不限于以下的肝脏疾病或病症,或治疗或预防由以下中的任一种引起的肝损伤或病症:急性肝衰竭(所有原因)、慢性肝衰竭(所有原因)、肝硬化、肝纤维化(所有原因)、门脉高压、酒精性肝病(包含酒精性肝炎)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)(脂肪肝)、酒精性肝炎、丙型肝炎病毒诱导的肝病(HCV)、乙型肝炎病毒诱导的肝病(HBV)、其它病毒性肝炎(例如,甲型肝炎病毒诱导的肝病(HAV)和丁型肝炎病毒诱导的肝病(HDV))、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎、肝脏外科手术(livery surgery)、肝损伤、肝移植、肝脏外科手术和移植中的“小肝(small for size)”综合征、先天性肝脏疾病和病症,由遗传疾病、变性、老化、药品或损伤引起的任何其它肝脏病症或疾病。

[0371] Wnt信号在各种上皮组织的再生中发挥着重要作用。各种表皮病况受益于用本发明的化合物进行的治疗。当附在胃肠道上的快速分开的上皮细胞破裂从而使粘膜组织易于溃疡和感染时,发生粘膜炎。上皮层(epithelial lining)的覆盖口腔的部分,被称为口腔

粘膜,是身体最敏感的部位之一,并且特别容易受到化疗和放射的伤害。口腔粘膜炎可能是癌症治疗特别是化疗和放射中最常见的使人衰弱的并发症。另外,本发明的组合物还可以有益于治疗短肠综合征、炎性肠病(IBD)或其它胃肠病症。其它表皮病况包含表皮伤口愈合、糖尿病足溃疡、涉及牙齿、指甲或皮肤发育不全的综合征等。本发明的分子可以用于所有这些病况,其中再生性细胞与本发明的化合物接触。用于使上皮组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。接触可以是例如局部的,包含皮内、皮下,以施加在靶向位点等处的凝胶、洗剂、乳膏等形式。

[0372] 除皮肤和胃肠道外,Wnt信号以及Wnt信号的增强和促进还在临床前模型中在包含胰腺、肾和肺在内的组织的修复和再生中发挥着重要作用。Wnt替代分子可以有益于涉及外分泌和内分泌胰腺、肾或肺的各种疾病病状。Wnt替代分子可以用于治疗代谢综合征;治疗糖尿病;治疗急性或慢性胰腺炎、外分泌胰腺功能不全;治疗急性肾损伤、慢性肾病;治疗肺病包含但不限于慢性阻塞性肺病(COPD)、肺纤维化,特别是特发性肺纤维化(IPF),以及导致肺上皮组织缺失的其它病况。用于使这些组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。

[0373] 与经由其它发育因子进行的信号传导协调的表皮Wnt信号传导对成人毛囊再生至关重要。脱发是常见问题,并且雄激素性脱发,通常称为男性型秃发,是男性最常见的脱发形式。在一些实施例中,通过使响应性细胞群与本发明的分子接触来增强毛囊再生。在一些这种实施例中,在体内执行接触。在其它这种实施例中,离体地执行接触。分子可以定位到作用位点处,例如外用洗剂、凝胶、乳膏等。

[0374] 可以用Wnt替代分子治疗中风、创伤性脑损伤、阿尔茨海默症、多发性硬化和影响血脑屏障(BBB)的其它病状。血管生成对确保向贯穿全身的许多组织供应氧气和营养物至关重要,并且对CNS而言尤其重要,因为神经组织对缺氧和缺血极其敏感。形成BBB的CNS内皮细胞与非神经组织中的内皮细胞的不同之处在于,CNS内皮细胞是通过紧密连接保持在一起的高度极化细胞并且表达特定转运蛋白。Wnt信号传导调节CNS血管形成和/或功能。BBB受损的病况可以受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的,例如通过直接注射、鞘内施用、植入缓释配制物等。另外,Wnt信号积极参与神经发生并且在损伤后发挥神经保护的作用。本发明的组合物还可以用于治疗脊髓损伤、其它脊髓疾病、中风、创伤性脑损伤等。

[0375] Wnt信号还在血管生成中发挥作用。Wnt替代分子可以有益于血管生成有利的病状、治疗心肌梗死、冠状动脉疾病、心力衰竭、糖尿病性视网膜病变等、以及源自遗传性疾病的病状。用于使这些组织再生的方法受益于施用本发明的化合物,所述施用可以是全身性的或局部化的。

[0376] 在某些实施例中,本发明的方法促进组织再生,例如在经受损害或者组织或细胞减少或损耗的组织中。损耗或损害可以是导致细胞数量减少的任何事物,包含疾病或损伤。例如,事故、自身免疫病症、治疗副作用或疾病况态可能会构成创伤。组织再生增加了组织内的细胞数量,并且优选地使组织的细胞之间能够重新建立连接,并且更优选地使组织能够重新获得功能。

[0377] 如本文所使用的,术语“施用”或“引入”或“提供”是指向细胞、向受试者的细胞、组织和/或器官或者向受试者递送组合物。这种施用或引入可以在体内、在体外或离体地发

生。

[0378] 在特定实施例中,药物组合物是肠胃外施用的,例如,静脉内、口服、直肠或通过注射施用。在一些实施例中,局部(locally),例如局部地(topically)或肌内地施用药物组合物。在一些实施例中,组合物施用于靶组织,例如骨、关节、耳组织、眼组织、胃肠道、皮肤、伤口部位或脊髓。可以在体内或离体地实践本发明的方法。在一些实施例中,离体地执行靶细胞或靶组织与Wnt替代分子的接触,随后将细胞或组织例如活化的干细胞或祖细胞植入到受试者体内。技术人员可以基于正在治疗的疾病或病症确定适合的施用位点和施用途径。

[0379] 剂量和剂量方案可以取决于医师容易确定的各种因素,如疾病或病症的性质、受试者的特性和受试者的病史。在特定实施例中,向受试者施用或提供的Wnt替代分子的量的范围为受试者体重的约0.01mg/kg到约50mg/kg、0.1mg/kg到约500mg/kg或约0.1mg/kg到约50mg/kg。

[0380] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等在本文中用于通常意指获得期望的药理学和/或生理学效应。效果在完全或部分地预防疾病或其症状方面可以是预防性的,例如降低受试者体内发生疾病或其症状的可能性,和/或在部分或完全治愈疾病和/或由疾病引起的不良反应方面可以是治疗性的。如本文所使用的,“治疗”覆盖了对哺乳动物的疾病的任何治疗,并且包含:(a)预防疾病在可能倾向于患有疾病但尚未被诊断为患有疾病的受试者身上发生;(b)抑制疾病,即,阻止其发展;或(c)减轻疾病,即,使疾病消退。可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用治疗剂(例如,Wnt替代分子)。特别关注了对发展中的疾病的治疗,其中所述治疗稳定或减少了患者的不期望的临床症状。理想的是,在受影响组织的功能完全丧失之前执行这种治疗。理想的是,将在疾病的症状期期间并且在一些情况下在疾病的症状期之后施用主题治疗。在一些实施例中,主题方法产生了治疗益处,例如预防病症的发展、停止病症的进展、逆转病症的进展等。在一些实施例中,主题方法包括检测到已经达到治疗益处的步骤。本领域内普通技术人员应了解,治疗功效的这种量度将适用于正被修饰的特定疾病,并且应认识到用于测量治疗功效的适当检测方法。

[0381] 其它实施例部分涉及本文公开的Wnt替代分子用于例如通过使细胞或组织与任选地与Norrin或Rspondin多肽组合的一种或多种Wnt替代物接触来促进或增强细胞、组织和类器官的生长或增殖的用途。在某些实施例中,所述细胞或组织离体、体外或体内接触。此类方法可以用于产生细胞、组织或类器官以用于治疗用途,例如,将其植入或移植到受试者中。它们也可以用于产生细胞、组织或类器官以供研究使用。Wnt替代分子在非治疗方法,例如体外研究方法中具有广泛的应用。

[0382] 本发明提供了一种用于受损组织(如上述组织)的组织再生的方法,所述方法包括向细胞施用Wnt替代分子。可以将Wnt替代分子直接体内施用到细胞,口服、静脉内或通过本领域已知的其它方法施用到受试者或施用到离体细胞。在将Wnt替代分子施用到离体细胞的一些实施例中,可以在施用Wnt替代分子之前、之后或期间将这些细胞移植入受试者中。

[0383] Wnt信号传导是干细胞培养的关键组成部分。例如,在WO2010/090513、WO2012/014076、Sato等人,2011(《肠胃病学(GASTROENTEROLOGY)》201 1;141:1762-1772)以及Sato等人,2009(《自然》459,262-5)中描述的干细胞培养基。本文公开的Wnt替代分子是用于这些干细胞培养基的Rspondin的适合替代方案,或者可以与Rspondin组合。

[0384] 因此,在一个实施例中,本公开提供了一种用于增强干细胞增殖的方法,所述方法

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

[0385] 干细胞培养基通常包括另外的生长因子。因此,此方法可以另外包括向干细胞供应生长因子。细胞培养基中常用的生长因子包含表皮生长因子(EGF,(派普泰克(Peprotech))、转化生长因子-α(TGF-α,派普泰克)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,派普泰克)、脑源性神经营养因子(BDNF,R&D系统)、肝细胞生长因子(HGF)和角质形成细胞生长因子(KGF,派普泰克,也被称为FGF7)。EGF是各种培养的外胚层和中胚层细胞的强效促有丝分裂因子,并且对体内和体外特定细胞以及细胞培养中某些成纤维细胞的分化具有深远的影响。EGF前体以膜结合分子的形式存在,所述膜结合分子通过蛋白水解方式切割以产生刺激细胞的53个氨基酸的肽激素。因此,EGF或其它促有丝分裂生长因子可以供应给干细胞。在干细胞培养期间,可以每两天将促有丝分裂生长因子添加到培养基,同时培养基优选地每四天更新一次。一般地,促有丝分裂因子选自:i)EGF、TGF-α和KGF,ii)EGF、TGF-α和FGF7;iii)EGF、TGF-α和FGF;iv)EGF和KGF;v)EGF和FGF7;vi)EGF和FGF;vii)TGF-α和KGF;viii)TGF-α和FGF7;或ix)TGF-α和FGF。在某些实施例中,本公开包含干细胞培养基,所述干细胞培养基包括例如任选地与本文所述的生长因子中的一种或多种生长因子或其组合进行组合的本文公开的Wnt替代分子。

[0386] 这些增强干细胞增殖的方法可以用于从干细胞中生长出新的类器官和组织,如例如在WO2010/090513、WO2012/014076、Sato等人,201 1(《肠胃病学》2011;141:1762-1772)以及Sato等人,2009(《自然》459,262-5)中描述的。

[0387] 在一些实施例中,Wnt替代分子用于增强干细胞再生。关注的说明性干细胞包含但不限于:肌肉卫星细胞;造血干细胞和由其衍生的祖细胞(美国专利第5,061,620号);神经干细胞(参见Morrison等人(1999)《细胞(Cell)》96:737-749);胚胎干细胞;间充质干细胞;中胚层干细胞;肝干细胞;脂肪组织衍生的干细胞等。

[0388] 本发明的其它实施例部分地涉及用于检测表达一种或多种Fzd受体或LRP5或LRP6受体的细胞或组织的存在的诊断应用。因此,本公开提供了检测样品中的一种或多种Fzd受体或LRP5或LRP6受体(如检测表达Fzd1的细胞或组织)的方法。此类方法可以例如通过检测Wnt替代分子的结合以多种已知的检测形式应用,包含但不限于免疫组织化学(IHC)、免疫细胞化学(ICC)、原位杂交(ISH)、整装原位杂交(WISH)、荧光DNA原位杂交(FISH)、流式细胞术、酶免疫测定法(EIA)和酶联免疫测定法(ELISA)。

[0389] ISH是一种杂交类型,其使用标记的互补DNA或RNA链(即,主要结合剂)将特定DNA或RNA序列定位在细胞或组织(原位)的一部分或区段中,或者如果组织是足够小,则定位在整个组织中(整装ISH)。本领域普通技术人员将认识到,这与使用抗体作为主要结合剂将蛋白质定位在组织切片中的免疫组织化学不同。DNA ISH可以针对基因组DNA用于确定染色体的结构。荧光DNA ISH(FISH)可以例如用于医学诊断以评定染色体完整性。RNA ISH(杂交组

织化学)用于测量和定位组织切片或整装中的mRNA和其它转录物。

[0390] 在各种实施例中,本文所述的Wnt替代分子与可以直接或间接检测的可检测标记缀合。在这方面,抗体“缀合物”是指与可检测标记共价连接的Wnt替代分子。在本发明中,DNA探针、RNA探针、单克隆抗体、其抗原结合片段和其抗体衍生物,如单链可变片段抗体或表位标记的抗体可以全部与可检测标记共价连接。在“直接检测”中,仅使用一种可检测抗体,即,第一可检测抗体。因此,直接检测意指可以检测本身与可检测标记缀合的抗体,而无需添加第二抗体(第二抗体)。

[0391] “可检测标记”是可以产生指示样品中标记的存在和/或浓度的可检测(如视觉上、以电子地方式或其它方式)信号的分子或材料。当与抗体缀合时,可检测标记可以用于定位和/或定量特异性抗体所针对的靶标。因此,可以通过检测由可检测标记产生的信号来检测样品中靶标的存在和/或浓度。可以直接或间接检测可检测标记,并且可以将与不同特异性抗体缀合的若干种不同可检测标记组合使用以检测一个或多个靶标。

[0392] 可以直接检测的可检测标记的实例包含荧光染料和放射性物质以及金属颗粒。相反,间接检测需要在应用第一抗体后应用一种或多种另外的抗体,即,第二抗体。因此,通过检测第二抗体或结合剂与第一可检测抗体的结合来执行检测。需要添加第二结合剂或抗体的第一可检测结合剂或抗体的实例包含酶可检测结合剂和半抗原可检测结合剂或抗体。

[0393] 在一些实施例中,可检测标记与包括第一结合剂的核酸聚合物缀合(例如,在ISH、WISH或FISH过程中)。在其它实施例中,可检测标记与包括第一结合剂的抗体缀合(例如,在IHC过程中)。

[0394] 可以与本公开的方法中使用的Wnt替代分子缀合的可检测标记的实例包含荧光标记、酶标记、放射性同位素、化学发光标记、电化学发光标记、生物发光标记、聚合物、聚合物颗粒、金属颗粒、半抗原和染料。

[0395] 荧光标记的实例包含5-(和6)-羧基荧光素、5-或6-羧基荧光素、6-(荧光素)-5-(和6)-甲酰氨基己酸、异硫氰酸荧光素、若丹明、四甲基若丹明和染料(如Cy2、Cy3和Cy5)、任选的取代的香豆素(包含AMCA、PerCP)、藻胆蛋白(包含R-藻红蛋白(RPE)和别藻红蛋白(APC))、德克萨斯红、普林斯顿红(Princeton Red)、绿色荧光蛋白(GFP)和其类似物,以及R-藻红蛋白或别藻红蛋白的缀合物、无机荧光标记,如基于半导体材料的颗粒,如经涂覆的CdSe纳米微晶。

[0396] 聚合物颗粒标记的实例包含可以嵌入荧光染料或含有染料、酶或底物的聚合物胶束或胶囊的聚苯乙烯、PMMA或二氧化硅的微粒或胶乳颗粒。

[0397] 金属颗粒标记的实例包含可以通过银染转化的金颗粒和经涂覆的金颗粒。半抗原的实例包含DNP、异硫氰酸荧光素(FITC)、生物素和洋地黄毒苷。酶标记的实例包含辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP或AP)、β-半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶、β-葡萄糖醛酸苷酶、转化酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶和葡萄糖氧化酶(GO)。辣根过氧化物酶的常用底物实例包含3,3’-二氨基联苯胺(DAB)、具有镍增强作用的二氨基联苯胺、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、联苯胺二盐酸盐(BDHC)、汉克耶茨(Hanker-Yates)试剂(HYR)、靛蓝(IB)、四甲基联苯胺(TMB)、4-氯-1-萘酚(CN)、α-萘酚派洛宁(α-NP)、邻联茴香胺(OD)、5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯(BCIP)、硝基蓝四唑(NBT)、2-(对碘苯基)-3-对硝基苯基-5-苯基氯化四唑(INT)、四硝基蓝四唑(TNBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚基-

β-D-半乳糖苷/铁-铁氰化物(BCIG/FF)。

[0398] 碱性磷酸酶的常用底物的实例包含萘酚-AS-B1-磷酸酯/坚牢红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸酯/坚牢红TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸酯/-坚牢红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸酯/坚牢TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸酯/新品红(NABP/NF)、溴氯吲哚磷酸酯/硝基蓝四唑(BCIP/NBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚基-b-d-吡喃半乳糖苷(BCIG)。

[0399] 发光标记的实例包含鲁米诺、异鲁米诺、吖啶酯、1,2-二氧杂环丁烷和吡啶并哒嗪。电化学发光标记的实例包含钌衍生物。放射性标记的实例包含碘、钴、硒、氚、碳、硫和磷的放射性同位素。

[0400] 可检测标记可以与本文所述的抗体或特异性结合关注的生物标志物的任何其它分子,例如抗体、核酸探针或聚合物连接。此外,本领域普通技术人员将理解,可以检测标记也可以与第二和/或第三和/或第四和/或第五和/或第五结合剂或抗体等缀合。此外,技术人员将理解用于表征目标生物学标记的每种其它结合剂或抗体都可以用作信号放大步骤。可以使用例如光学显微镜、荧光显微镜、电子显微镜在视觉上检测生物标记,其中可检测物质是例如染料、胶体金颗粒、发光试剂。还可以使用分光光度计检测结合到生物标志物的视觉上可检测物质。当可以检测物质是放射性同位素时,可以通过放射自显影在视觉上进行检测,或使用闪烁计数器在视觉上进行检测。参见例如Larsson,1988,《免疫细胞化学:理论与实践(Immunocytochemistry:Theory and Practice)》(佛罗里达州波卡拉顿的CRC出版社(CRC Press,Boca Raton,Fla.));《分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)》,第80卷1998,John D.Pound(编)(新泽西州托托瓦的胡玛纳出版社(Humana Press,Totowa,N.J.))。

[0401] 本发明进一步提供了用于检测样品中一种或多种Fzd或LRP5/6受体或表达一种或多种Fzd或LRP5/6受体的细胞或组织的试剂盒,其中试剂盒含有至少一种本文所述的抗体、多肽、多核苷酸、载体或宿主细胞。在某些实施例中,试剂盒可以包括与本发明的抗体关联的缓冲液、酶、标记、底物、珠或其它表面等以及使用说明书。

[0402] 本说明书中提及的和/或在申请数据表中列出的所有上述美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过全文引用的方式并入本文中。

[0403] 根据前文应当理解,尽管出于说明的目的已经在本文中描述了本发明的具体实施例,但是可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下进行各种修改。因此,本发明仅由所附权利要求书限制。

[0404] 实施例

[0405] 实例1

[0406] 说明性Wnt替代分子形式

[0407] 制备了具有本文公开的各种不同形式的Wnt替代物。这些Wnt替代物包含以下说明性形式,每种形式包括与一种或多种Fzd受体结合的结合结构域(“结合体”)以及与LRP5和/或LRP6受体结合的结合结构域(“结合体”)。

[0408] 如图1的A所示,如果一种受体的结合体是Fab并且另一种受体的结合体是Nab或scFv,则可以以若干种不同的构型将它们合并在一起。在某些情况下,首先可以将Fab结合体重新形式化为完整IgG形式,然后可以将Nab结合体与IgG的4个可用端中的任一个融合。

例如,Nab可以与IgG轻链(LC)的N端融合(融合将被称为NL,在顶部左边示出)、与IgG重链(HC)的N端融合(融合将被称为NH,在顶部右边示出)、与LC的C端融合(融合将被称为CL,在中间右边示出)以及与HC的C端融合(融合将被称为CH,在中间左边示出)。IgG与Nab之间的接头和接头的长度可以改变。这四种形式是双特异性且二价的,其对于受体中的每种受体是二价结合体。用于将两种结合体合并在一起的替代方法是杂Ig形式,其中Fab结合体以半抗体形式存在,并且Nab与Fc的N端融合(在下部中间示出)。可以通过CH3结构域中的有利于异二聚体的形成的突变(如,臼包杵)将这两个半部合并在一起。Nab结合体与Fc之间的接头和其长度可以改变。此形式对于每种受体将是双特异性但单价的。在此实例中描述的形式中的任一种的Nab部分也可以被结合体的scFv片段替换。

[0409] 如图1的B所示,如果一种受体的结合体是Fab并且另一种受体的结合体也是Fab,则可以以若干种不同的构型将它们合并在一起。在一种方法中,首先将一个Fab结合体重新形式化为完整IgG形式(在顶部示出)。第二个Fab结合体可以与IgG的N端融合。两个HC可以通过其之间的接头融合在一起。LC可以融合或不融合。接头和其长度可以改变。此形式是双特异性且二价的形式。可替代地,第二个Fab结合体LC可以通过其之间各种长度的接头与IgG的HC融合。第二个Fab结合体HC可以与IgG的LC融合或不融合。此形式的变体被称为串联Fab IgG(或FIT-Ig)。在另一种方法中,可以通过CH3结构域中的有利于异二聚体组装的突变将两个结合体以杂Ig的形式合并在一起,两个臂将各自与一种受体结合(在底部示出)。此形式是双特异性且单价的结合体。

[0410] 如图1的C所示,如果一种受体的结合体是Nab并且另一种受体的结合体也是Nab,则可以以若干种不同的构型将它们合并在一起。在双特异性二价形式中,在某些情况下,两个Nab结合体可以串联融合在一起(在顶行示出),或者与Fc的两个不同端融合(在中间行示出)。Nab与Nab之间或Nab与Fc之间的接头和其长度可以改变。可替代地,可以将两个Nab以杂Ig的形式组装在一起,以产生双特异性且单价的形式(在底行示出)。与图1的A类似,此处的Nab结构域也可以被结合体的scFv结构域替换。在所有实例中,Nab和scFv也可以以某些组合混合。

[0411] 如图1的D所示,针对Fzd和LRP的结合体也可以以双功能抗体(或DART)构型连接在一起。双功能抗体也可以呈单链构型。如果双功能抗体与Fc融合,则将产生二价双特异性形式。在不与Fc融合的情况下,这将是单价双特异性形式。

[0412] 产生了表现出不同构型的许多Wnt替代物。这些包含表3中描述的Wnt替代物。这些说明性Wnt替代物包含一个、两个或三个多肽,所述一个、两个或三个多肽的序列被提供为序列1、序列2和/或序列3。序列可以包含前导肽序列、Nab序列、接头和/或重链或轻链序列。图19中提供了带注释的序列,其中前导肽序列被斜体化,接头序列被加下划线,Nab序列以粗体示出,并且其余序列为重链或轻链序列。Fzd结合体ID和LRP结合体ID对应于表1A-B和2A-B中提供的针对各种Fzd结合抗体或LRP5/6结合抗体或其抗原结合片段的克隆号。

[0413] 以“R2M3”开头的Wnt替代物包含与命名为001S-A04的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的轻链区的N端融合的不同LRP6结合结构域。表3中以“18R5”开头的前六种Wnt替代物包含与命名为18R5的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的N端融合的不同的LRP6结合结构域。以“1R”开头的Wnt替代物包含与不同的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的N端融合的命名为“009S-E04”的抗LRP6抗体或其抗原结合片段。对于“R2M3-26CH”,LRP6结合区与Fzd结合区

的C端融合。对于“R2M3-26NH”,LRP6结合区与Fzd结合区的N端融合。对于“R2M3-26CL”,LRP6结合区与Fzd结合区的C端融合。对于“R2M3-26NL”,LRP6结合区与Fzd结合区的N端融合。对于“R2M3-26Fab”和“R2M3-32Fab”,LRP6结合区与Fzd结合区的N端融合。对于“杂Ig”,LRP6结合区与人Fc_臼的N端融合并且与Fzd结合体轻链和重链人IgG1_杵配对。以“17SB9”开头的Wnt替代物包含与命名为017S-B09的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的轻链区的N端融合的不同LRP6结合结构域。以“1R-C07”开头的Wnt替代物包含与命名为001S-B03的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的轻链区的N端融合的不同LRP6结合结构域。以“R2M13”开头的Wnt替代物包含与命名为004S-G06的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的轻链区的N端融合的不同LRP6结合结构域。以“3SD10”开头的Wnt替代物包含与命名为003S-D10的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的轻链区的N端融合的不同LRP6结合结构域。以“4SD1”开头的Wnt替代物包含与命名为004S-D01的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的轻链区的N端融合的不同LRP6结合结构域。以“14SB6”开头的Wnt替代物包含与命名为014S-B06的抗Fzd抗体或其抗原结合片段的轻链区的N端融合的不同LRP6结合结构域。

[0414] 表3.Wnt替代物序列

[0415]

名称	Fzd 结合体 ID	LRP 结合体 ID	序列 1 SEQ ID NO	序列 2 SEQ ID NO	序列 3 SEQ ID NO
R2M3-23	001S-A04	009S-B04	89	95	不适用
R2M3-26	001S-A04	009S-E04	90	95	不适用
R2M3-28	001S-A04	009S-G04	91	95	不适用
R2M3-29	001S-A04	009S-H04	92	95	不适用
R2M3-31	001S-A04	013S-G04	93	95	不适用

[0416]

R2M3-32	001S-A04	013S-H04	94	95	不适用
18R5-5	18R5	008S-G01	96	104	不适用
18R5-7	18R5	008S-C02	97	104	不适用
18R5-8	18R5	008S-D02	98	104	不适用
18R5-9	18R5	008S-E02	99	104	不适用
18R5-26	18R5	009S-E04	100	104	不适用
18R5-28	18R5	009S-G04	101	104	不适用
18R5-31	18R5	013S-G04	102	104	不适用
18R5-32	18R5	013S-H04	103	104	不适用
1R-B05-26	001S-E02	009S-E04	105	111	不适用
1R-C01-26	001S-B01	009S-E04	106	112	不适用
1R-C07-26	001S-B03	009S-E04	107	113	不适用
1R-E06-26	001S-H02	009S-E04	108	114	不适用
1R-G05-26	001S-G02	009S-E04	109	115	不适用
1R-G06-26	001S-A03	009S-E04	110	116	不适用
R2M3-26 CH	001S-A04	009S-E04	125	117	不适用
R2M3-26 NH	001S-A04	009S-E04	125	118	不适用
R2M3-26 CL	001S-A04	009S-E04	119	2254	不适用
R2M3-26 NL	001S-A04	009S-E04	120	2254	不适用
R2M3-26 Fab	001S-A04	009S-E04	120	122	不适用
R2M3-26F(ab')2	001S-A04	009S-E04	120	2252	
R2M3-32 Fab	001S-A04	013S-H04	123	122	不适用
R2M3-26 杂 Ig	001S-A04	009S-E04	125	126	127
26-17SB9	017S-B09	009S-E04	128	不适用	不适用
26:Fc:17SB9-交叉杂交（26:Fc:17SB9-criss-cross）	017S-B09	009S-E04	2192	2193	不适用
26:5:17SB9:Fc	017S-B09	009S-E04	2194	不适用	不适用
26:10:17SB9:Fc	017S-B09	009S-E04	2195	不适用	不适用
26:15:17SB9:Fc	017S-B09	009S-E04	2196	不适用	不适用
17SB9:Fc:26	017S-B09	009S-E04	2197	不适用	不适用
26:Fc:26+17SB9:Fc:17SB9	017S-B09	009S-E04	2198	2199	不适用
1R-C07-3	001S-B03	008S-D01	134	113	不适用
1R-C07-36	001S-B03	013S-D05	135	113	不适用
R2M13-3	004S-G06	008S-D01	136	153	不适用
R2M13-26	004S-G06	009S-E04	137	153	不适用

[0417]

R2M13-36	004S-G06	013S-D05	138	153	不适用
R2M3-3	001S-A04	008S-D01	139	2254	不适用
R2M3-36	001S-A04	013S-D05	140	2254	不适用
3SD10-3	003S-D10	008S-D01	141	154	不适用
3SD10-26	003S-D10	009S-E04	142	154	不适用
3SD10-36	003S-D10	013S-D05	143	154	不适用
4SD1-3	004S-D01	008S-D01	144	155	不适用
4SD1-26	004S-D01	009S-E04	145	155	不适用
4SD1-36	004S-D01	013S-D05	146	155	不适用
14SB6-3	014S-B06	008S-D01	147	156	不适用
14SB6-26	014S-B06	009S-E04	148	156	不适用
14SB6-36	014S-B06	013S-D05	149	156	不适用
R2M9-3	003S-E07	008S-D01	150	157	不适用
R2M9-26	003S-E07	009S-E04	151	157	不适用
R2M9-36	003S-E07	013S-D05	152	157	不适用
18R5:5:1115.3:Fc	18R5	1115.3	2200	不适用	不适用
18R5:10:1115.3:Fc	18R5	1115.3	2201	不适用	不适用
18R5:15:1115.3:Fc	18R5	1115.3	2202	不适用	不适用
1115.3:5:18R5:Fc	18R5	1115.3	2203	不适用	不适用
1115.3:10:18R5:Fc	18R5	1115.3	2204	不适用	不适用
1115.3:15:18R5:Fc	18R5	1115.3	2205	不适用	不适用
18R5:5: YW211.31.57:Fc	18R5	YW211.31.57	2206	不适用	不适用
18R5:10: YW211.31.57:Fc	18R5	YW211.31.57	2207	不适用	不适用
18R5:15: YW211.31.57:Fc	18R5	YW211.31.57	2208	不适用	不适用
YW211.31.57:5:18R5:Fc	18R5	YW211.31.57	2209	不适用	不适用
YW211.31.57:10:18R5:Fc	18R5	YW211.31.57	2210	不适用	不适用
YW211.31.57:15:18R5:Fc	18R5	YW211.31.57	2211	不适用	不适用
18R5:Fc:1115.3	18R5	1115.3	2212	不适用	不适用
1115.3:Fc:18R5	18R5	1115.3	2213	不适用	不适用
18R5:Fc:YW211.31.57	18R5	YW211.31.57	2250	不适用	不适用
YW211.31.57:Fc:18R5	18R5	YW211.31.57	2267	不适用	不适用
421.1-R2M3 cp	001S-A04	421.1	2214	2215	2216
1RC07:5:10SA7 cp	1RC07	10SA7	2217	2218	2219
1RC07:10:10SA7 cp	1RC07	10SA7	2217	2218	2222
1RC07:15:10SA7 cp	1RC07	10SA7	2217	2218	2225
1RC07:5:10SG7 cp	1RC07	10SG7	2217	2227	2228
1RC07:10:10SG7 cp	1RC07	10SG7	2217	2227	2231
1RC07:15:10SG7 cp	1RC07	10SG7	2217	2227	2234
10SG7:5:1RC07 cp	1RC07	10SG7	2227	2217	2237
10SG7:10:1RC07 cp	1RC07	10SG7	2227	2217	2240
10SG7:15:1RC07 cp	1RC07	10SG7	2227	2217	2243

[0418]

1RC07:5:10SA7 L->H	1RC07	10SA7	2244	2245	2246
1115.3:5:R2M3 L->H	001S-A04	1115.3	2247	125	2248
1115.3:10:R2M3 L->H	001S-A04	1115.3	2247	125	2249
10SG11-1RC07	1RCO7	10SG11	2252	2253	不适用
18R5:5:1115.3:His	18R5	1115.3	2255	不适用	不适用
18R5:10:1115.3:His	18R5	1115.3	2256	不适用	不适用
18R5:15:1115.3:His	18R5	1115.3	2257	不适用	不适用
1115.3:5:18R5:His	18R5	1115.3	2258	不适用	不适用
1115.3:10:18R5:His	18R5	1115.3	2259	不适用	不适用
1115.3:15:18R5:His	18R5	1115.3	2260	不适用	不适用
18R5:5: YW211.31.57:His	18R5	YW211.31.57	2261	不适用	不适用
18R5:10: YW211.31.57:His	18R5	YW211.31.57	2262	不适用	不适用
18R5:15: YW211.31.57:His	18R5	YW211.31.57	2263	不适用	不适用
YW211.31.57:5:18R5:His	18R5	YW211.31.57	2264	不适用	不适用
YW211.31.57:10:18R5:His	18R5	YW211.31.57	2265	不适用	不适用
YW211.31.57:15:18R5:His	18R5	YW211.31.57	2266	不适用	不适用

[0419] 实例2

[0420] Wnt替代分子R2M3-26的表征

[0421] R2M3-26分子由Fzd结合体(R2M3)和LRP6结合体(26)组成。如图2的A所描绘的，LRP6结合体26通过5-氨基酸接头与R2M3 LC的N端融合。R2M3呈IgG形式。蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行尺寸排阻色谱(SEC)步骤来纯化。图2的B中示出了来自SEC的吸光度迹线和SEC洗脱份的SDS-PAGE凝胶。在Wnt响应性293报告细胞系(293STF)中测试R2M3-26激活典型的Wnt信号传导的能力。图2的B中示出了跨SEC洗脱份的293STF报告基因活性迹线，报告基因活性的峰与蛋白质的峰相关。在不存在和存在R-脊椎蛋白的情况下，通过293STF细胞中的剂量响应来进一步表征峰洗脱份(图2的D)。R2M3-26以剂量依赖性方式诱导报道基因活性，并且通过类似于天然Wnt配体的R-脊椎蛋白的存在而增强，而未附接LRP结合臂的单独的R2M3IgG不诱导报告基因活性。在Octet相互作用测定法中执行R2M3-26与靶标Fzd1 ECD相互作用的能力(图2的C)，并且结果表明LRP6结合臂26的融合不影响R2M3与其靶标Fzd的相互作用。

[0422] 实例3

[0423] Wnt替代分子R2M3-32的表征

[0424] R2M3-32分子由Fzd结合体(R2M3)和LRP6结合体(32)组成。如图3的A所描绘的，LRP6结合体32通过5-氨基酸接头与R2M3 LC的N端融合。R2M3呈IgG形式。蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行尺寸排阻色谱(SEC)步骤来纯化。图3的B中示出了来自SEC的吸光度迹线和SEC洗脱份的SDS-PAGE凝胶。在Wnt响应性293报告细胞系(293STF)中测试R2M3-32激活典型的Wnt信号传导的能力。图3的B中示出了跨SEC洗脱份的293STF报告基因活性迹线，报告基因活性的峰与蛋白质的峰相关。在不存在和存在R-脊椎蛋白的情况下，通过293STF细胞中的剂量响应来进一步表征峰洗脱份(图3的D)。R2M3-32以剂量依赖性方式诱导报道基因活性，并且通过R-脊椎蛋白的存在而增强，而未附接LRP结合臂的单独的R2M3 IgG不诱导报告基因活性。在Octet相互作用测定法中执行R2M3-32与其靶标Fzd1细胞外结构域(ECD)相互作用的能力(图3的C)。结果表明LRP6结合臂32的融合不影响R2M3与其靶标Fzd的相互作用。

[0425] 实例4

[0426] R2M3-26和R2M3-32的活性可以被可溶性Fzd ECD和不具有LRP结合臂的单独的R2M3 IgG抑制

[0427] 使用293STF报告基因测定法确定可溶性Fzd细胞外结构域(ECD)或单独的R2M3IgG抑制Wnt替代物的能力。R2M3-26或R2M3-32的浓度固定的情况下,将Fzd1ECD-Fc或R2M3 IgG滴定到293STF报告基因测定法中。Fzd1ECD-Fc和R2M3 IgG均以剂量依赖性方式抑制R2M3-26(图4的A)和R2M3-32(图4的B)诱导的报告基因信号传导,而阴性对照分子Fc单独没有影响。

[0428] 实例5

[0429] 在293、Huh7、A375、BNL.CL2 Wnt依赖性报告基因测定法中R2M3-LRP6结合体融合物的表征

[0430] Fzd结合体R2M3与另外的LRP6结合体23、25、26、27、28、29、31、32、33和36融合。LRP6结合体是Nab,并且通过5-氨基酸接头与R2M3 LC的N端融合。这些蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行SEC步骤来纯化。在293、Huh7、A375和BNL.CL2细胞系中、在Wnt依赖性报告基因测定法中测试融合蛋白,并且所述融合蛋白将Wnt信号传导激活到各种水平。R2M3还以与Lrp6结合体相同的形式与两个非LRP6结合体Nab 24和34融合。这两种非结合体在Wnt依赖性293报告基因测定法中未显示出活性(图5),这表明用R2M3与23、25、26、27、28、29、31、32、33和36的融合物观察到的Wnt活性取决于模拟自然配体功能的Fzd和Lrp两者的存在。

[0431] 实例6

[0432] 在293、A375和BNL.CL2 Wnt依赖性报告基因测定法中18R5-LRP6结合体融合物的表征

[0433] Fzd结合体18R5与LRP6结合体26、28、31、32融合。LRP6结合体是Nab,并且通过5-氨基酸接头与18R5 LC的N端融合。这些蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行SEC步骤来纯化。在293、A375和BNL.CL2细胞系中、在Wnt依赖性报告基因测定法中测试融合蛋白,并且所述融合蛋白展现了激活Wnt信号传导的能力(图6)。

[0434] 实例7

[0435] 在293Wnt依赖性报告基因测定法中18R5-LRP5结合体融合物的表征

[0436] Fzd结合体18R5与LRP5结合体5、7、8、9融合。LRP5结合体是Nab,并且通过5-氨基酸接头与18R5 LC的N端融合。这些蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行SEC步骤来纯化。在293细胞中、在Wnt依赖性报告基因测定法中测试融合蛋白,并且所述融合蛋白能够激活Wnt信号传导(图7)。

[0437] 实例8

[0438] 在293Wnt依赖性报告基因测定法中各种Fzd结合体-LRP6结合体26融合物的表征

[0439] 呈IgG形式的各种Fzd结合体1R-B05、1R-C01、1R-C07、1R-E01、1R-E06、1R-G05、1R-G06、1R-H04与LRP6结合体26融合。LRP6结合体Nab通过5-氨基酸接头与各种Fzd结合体LC的N端融合。这些蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行SEC步骤来纯化。SEC峰洗脱份的SDS-PAGE凝胶分析在图8的A中示出。在存在Rspo的情况下,在293细胞中、在Wnt依赖性报告基因测定法中测试融合蛋白,并且所述融合蛋白能够激活Wnt信号传导(图8的B)。

[0440] 实例9

[0441] IgG-Nab融合物形式的SAR分析

[0442] 通过旋转如图1的A所描绘的Nab与IgG HC或LC的不同端的附接位置来执行IgG-Nab融合物的SAR分析。CH指示将Nab附接到重链的C端;NH指示将Nab附接到重链的N端;CL指示将Nab附接到轻链的C端;NL指示将Nab附接到轻链的N端。示出了三对IgG-Nab融合物SAR,所述对是R2M3与26之间的对、R2M3与32之间的对以及18R5与26之间的对。测定法在存在Rspo的情况下针对Wnt响应性293报告基因细胞执行并且将Wnt信号传导激活到各种水平(图9)。这些结果证明,融合的附接位置以及Fzd与LRP结合结构域之间的几何结构在Wnt替代物激活Wnt信号传导的能力中发挥作用。

[0443] 实例10

[0444] 呈Fab形式的R2M3-26的表征

[0445] 分子R2M3-26 Fab由Fzd结合体(R2M3)和LRP6结合体(26)组成。如图10的A所描绘的,LRP6结合体26通过5-氨基酸接头与R2M3 LC的N端融合。R2M3呈Fab形式。蛋白质通过Ni-NTA亲和柱、然后进行尺寸排阻色谱(SEC)步骤来纯化。图10的B中示出了来自SEC的吸光度迹线和SEC洗脱份的SDS-PAGE凝胶。在Wnt响应性293报告细胞(293STF)中测试Fab形式的R2M3-26激活典型的Wnt信号传导的能力。图10的B中示出了跨SEC洗脱份的293STF报告基因活性迹线。与图2中所示的R2M3呈IgG形式时不同,呈Fab形式的R2M3的报告基因活性的峰与蛋白质的峰不相关。这些结果表明,如通过报告基因测定法所检测的,呈Fab形式的R2M3-26融合物在诱导典型的Wnt信号传导方面无效。

[0446] 实例11

[0447] 呈Fab形式的R2M3-32的表征

[0448] 分子R2M3-32 Fab由Fzd结合体(R2M3)和LRP6结合体(32)组成。如图11的A所描绘的,Lrp6结合体32通过5-氨基酸接头与R2M3 LC的N端融合。R2M3呈Fab形式。蛋白质通过Ni-NTA亲和柱、然后进行尺寸排阻色谱(SEC)步骤来纯化。图11的B中示出了来自SEC的吸光度迹线和SEC洗脱份的SDS-PAGE凝胶。在Wnt响应性293报告细胞(293STF)中测试Fab形式的R2M3-32激活典型的Wnt信号传导的能力。图11的B中示出了跨SEC洗脱份的293STF报告基因活性迹线。与图3中所示的R2M3呈IgG形式时不同,呈Fab形式的R2M3的报告基因活性的峰与蛋白质的峰不相关。这些结果表明,如通过报告基因测定法所检测的,呈Fab形式的R2M3-32融合物在诱导典型的Wnt信号传导方面无效。

[0449] 实例12

[0450] 呈杂Ig形式的R2M3-26的表征

[0451] 如图12的A和图1的A所描绘的,分子R2M3-26杂Ig由Fzd结合体(R2M3)和LRP6结合体(26)组成。蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行尺寸排阻色谱(SEC)步骤来纯化。在不存在或存在R-脊椎蛋白的情况下,在Wnt响应性293STF报告细胞中以剂量响应方式测试了来自SEC柱的峰洗脱份(图12的B)。如在293报告基因测定法中检测的,与呈IgG形式的R2M3-26(如图2所描绘)相比,R2M3-26杂Ig在诱导典型的Wnt信号传导方面无效。

[0452] 实例13

[0453] 呈Nab-Nab形式的26-17SB9的表征

[0454] 如图13的A和图1的C所描绘的,分子26-17SB9 Nab-Fc-Nab由LRP6结合体(26)和Fzd结合体(17SB9)组成。蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行尺寸排阻色谱(SEC)步骤来纯

化。在不存在或存在R-脊椎蛋白的情况下,在Wnt响应性293STF报告细胞中以剂量响应方式测试了来自SEC柱的峰洗脱份(图13的B)。如在293报告基因测定法中检测的,呈Nab-Fc-Nab形式的26-17SB9诱导了典型的Wnt信号传导。

[0455] 还构建了26与17SB9的另外的组合(图13的C),并且在293报告基因测定法中测试所述另外的组合。如图13的D和图13的E所示,在存在20nM R-脊椎蛋白的情况下,其中26和17SB9以不同的串联形式或在Fc片段的不同端上排列的这些不同的组合全部将Wnt信号传导激活到不同水平。

[0456] 实例14

[0457] 呈串联scFv形式的18R5-LRP6结合体融合物的表征

[0458] 将Fzd结合体18R5、LRP6E1E2结合体1115.3(如PCT公布WO2009/064944中所述)和LRP6E3E4结合体YW211.31.57(如PCT公布WO2011/119661中所述)转换为scFv形式。将1115.3_scFv或YW211.31.57_scFv通过5、10或15-氨基酸接头组装到18R5_scFv的N端,并且18R5_scFv C端与人Fc结构域融合。在另一组实例中,将1115.3_scFv或YW211.31.57_scFv通过5、10或15-氨基酸接头组装到18R5 scFv的C端,并且将人Fc结构域与LRP结合体的C端融合。这些形式在图14的G左侧图区中描绘。在另一个实例中,18R5_scFv和LRP结合体1115.3_scFv或LRP结合体YW211.31.57_scFv与人Fc结构域的两端融合(如图14的G右侧图区所描绘)。这些蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行SEC步骤来纯化。

[0459] 在293细胞中、在Wnt依赖性报告基因测定法中测试融合蛋白。具有5、10或15聚体接头的18R5_scFv-1115.3_scFv-Fc和1115.3_scFv-18R5_scFv-Fc能够激活Wnt信号传导(图14的A和图14的B)。具有不同接头的18R5_scFv-YW211.31.57_scFv-Fc和YW211.31.57_scFv-18R5_scFv-Fc激活了Wnt信号传导(图14的C和图14的D)。另外,与Fc的两端融合的18R5_scFv和1115.3_scFv或YW211.31.57也激活了Wnt信号传导(图14的E和F)。尽管所有这些scFv形式均激活了Wnt信号传导,但是效力和总体最大功效可能根据结合体组合、接头长度和相对朝向而不同。

[0460] 在另一个实例中,在不与Fc进一步融合的情况下将1115.3_scFv或YW211.31.57_scFv通过5、10或15-氨基酸接头组装到18R5_scFv的N端或C端,以产生与Fzd或LRP中的每个的双特异性但单价结合。如图14的H所示,在293报告细胞中在存在20nM R-脊椎蛋白的情况下,1115.3_scFv和18R5_scFv融合物在激活Wnt信号传导方面有效。

[0461] 实例15

[0462] 呈Fab-IgG形式的Wnt替代分子的产生

[0463] 当FZD结合体和LRP结合体均为Fab时,Wnt模拟或替代分子可以以各种形式产生。可以采用如电荷配对、“臼包杵”、Fab的重链和轻链的交叉等各种方法来确保适当的重链和轻链配对。下面给出两个实例。

[0464] 1.Fab-on-IgG形式的电荷配对(cp)方法:抗LRP6 Fab的重链(VH-CH1)结构域通过5、10或15聚体氨基酸接头与抗FZD结合体的重链(VH-CH1-CH2-CH3)的N端以串联形式融合。抗LRP6和抗FZD的VH-CH1结构域均含有各自用于与其自己的配偶体轻链正确配对的三个氨基酸突变(抗LRP6 Fab中的Q39D、Q105D、S183K;抗FZD Fab中的Q39K、Q105K、S183E),其还含有三个互补氨基酸突变(抗LRP6轻链中的Q38K、A/S43K、S176E;抗FZD轻链中的Q38D、A/S43D、S176K)。抗LRP6和抗FZD Fab的顺序可以相反,其中抗FZD结合体是Fab并且与呈IgG形

式的抗LRP结合体融合(图15的A)。

[0465] 2.用于Fab-on-IgG形式的HC-LC交叉方法:抗LRP6结合体的轻链(VL-CL)结构域通过5、10或15聚体氨基酸接头与抗FZD结合体的重链(VH-CH1-CH2-CH3)的N端以串联形式融合。第二构建体是抗LRP6结合体的VH-CH1,并且第三构建体是抗FZD结合体的VL-CL。与上面的实例类似,抗LRP6结合体和抗FZD结合体的顺序可以相反,其中抗FZD结合体Fab与呈IgG形式的抗LRP结合体的N端融合(图15的A)。

[0466] 若干不同的LRP和FZD结合体对以这些形式进行组装并且在Wnt响应性293报告细胞系(293STF)中进行测试。作为实例,使用电荷配对方法将抗LRP6E1E2结合体421.1(如PCT公布WO2009/064944中所述)与抗FZD结合体R2M3的N端融合,以产生421.1-R2M3 cp。在293报告基因测定法中,421.1-R2M3 cp剂量依赖性地激活了Wnt信号传导(图15的B)。抗FZD结合体1RC07通过5、10或15聚体接头与抗LRP结合体10SA7的N端融合。所有三种融合蛋白均激活了Wnt信号传导(图15的C)。通过5、10或15聚体氨基酸接头将抗FZD结合体1RC07与抗LRP结合体10SG7进一步融合,其中将呈Fab形式的1RC07与呈IgG形式的10SG7的N端融合或者按相反的顺序将Fab形式的10SG7与IgG形式的1RC07的N端融合。所有融合分子均激活了Wnt信号传导,同时观察到一些朝向和接头长度的偏好(图15的D和E)。

[0467] 还测试了HC-LC交叉Fab-IgG形式。将抗FZD结合体1RC07 LC与抗LRP6结合体10SA7 HC的N端融合以产生1RC07-5:10SA7 L->H。通过5或10聚体接头将抗LRP6E1E2结合体1115.3的LC(如PCT公布WO2009/064944中所述)与抗FZD结合体R2M3 HC的N端融合以分别产生1115.3:5:R2M3 L->H或1115.3:10:R2M3 L->H。这些分子还激活了Wnt信号传导(图15的F和G)。

[0468] 实例16

[0469] 呈F(ab')2形式的R2M3-26的表征

[0470] 通过IDES(威斯康星的普洛麦格(Promega,WI))在37℃下降R2M3-26 IgG1消化2小时。大部分消化产物为R2M3-26F(ab')2(图16的A),还检测到一些部分消化产物,其中一个Fab仍与Fc附接(此处称为R2M3-26F(ab')2-Fc),并且未检测到未切割的R2M3-26。切割的产物通过抗Lambda树脂纯化以去除Fc片段,然后进行SEC精制以将R2M3-26F(ab')2与R2M3-26F(ab')2-Fc分离。最终纯化的蛋白质的SDS-PAGE凝胶在图16的B中示出。在HEK293细胞中、在STF测定法中测量R2M3-26F(ab')2活性。R2M3-26F(ab')2能够激活Wnt信号传导(图16的C)。

[0471] 实例17

[0472] 另外的Wnt替代分子的表征

[0473] 将FZD结合体与LRP结合体融合。LRP5或6结合体在此实例中是Nab(或VHH),并且通过5-氨基酸接头与FZD结合体LC的N端融合(如图17的A所表示)。这些蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行SEC步骤来纯化。在存在20nM R-脊椎蛋白的情况下,在293细胞(图17的B、C、D、H)、用FZD4表达构建体共转染的293细胞(图17的E、F)或用FZD9表达构建体共转染的293细胞(图17的G)中、在Wnt依赖性报告基因测定法中测试纯化的蛋白质。这些分子以不同的效力和功效水平激活了Wnt信号传导。

[0474] 实例18

[0475] 呈2Fv-Ig形式的10SG11-1RC07的表征

[0476] 分子10SG11-1RC07由N端LRP结合体(10SG11)和Fzd结合体(1RC07)组成。如图18的A所描绘的,10SG11的Fv通过5-氨基酸接头与1RC07的N端融合。1RC07呈具有Fc突变L234A/L235A/P329G的IgG1形式。蛋白质通过蛋白A亲和柱、然后进行SEC步骤来纯化。在293细胞系中、在Wnt依赖性报告基因测定法中测试融合蛋白,并且所述融合蛋白展现了激活Wnt信号传导的能力(图18的B-C)。

[0477] 实例19

[0478] R2M3-26的体内PK/PD表征

[0479] 六周龄的C57B1/6J雄性小鼠获自杰克逊实验室(美国缅因州巴港)(Jackson Laboratories(Bar Harbor,ME,USA)),并且每笼容纳3只。所有动物实验均符合国家科学院(National Academy of Sciences)制定的“实验室动物的护理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)”的标准。用于动物实验的方案已由Surrozen机构动物护理和使用委员会批准。在开始实验之前至少两天使小鼠适应环境。小鼠无限制地使用纯化的实验室级酸化水,并且随意喂养(2018Teklad全球18%蛋白质啮齿动物饮食)。使小鼠处于30%到70%的湿度环境和20℃到26℃范围内的室温下的12/12小时光照/黑暗循环中。

[0480] 对于药代动力学(PK)研究(图20的A),每组使用n=3。使用静脉内(IV)或腹膜内(i.p.)注射,以1mg/kg(盐水中的10ml/kg)向小鼠给药R2M3-26(具有无效应子的Fc突变)。在注射后10分钟、30分钟、1小时、4小时、24小时、72小时或144小时,用异氟烷麻醉小鼠,并且从眼眶后血管丛、尾静脉或心脏中取出血液。在室温下使血液凝结,然后在8,000g下离心7分钟。去除血清并将其储存在-20℃下直至通过ELISA用抗人IgG Fc片段(杰克逊免疫研究实验室(Jackson Immuno Research Labs)NC9747692)测量血清R2M3-26浓度。

[0481] 对于药效(PD)研究(图20的B),每组使用n=6。向小鼠腹膜内注射指示剂量的R2M3-26(盐水中的10ml/kg)。对照小鼠仅接受盐水。在八小时后,用异氟烷麻醉小鼠,并且通过心脏穿刺收集血液。在室温下使血液凝结,然后在10,000g下离心7分钟。去除血清并将其储存在-20℃下直至通过ELISA测量血清R2M3-26浓度。将左肝叶的一部分在液氮中速冻并储存在-80℃下以供RNA分析。使用MagMAX™mirVana™总RNA分离试剂盒(赛默飞世尔(ThermoFisher),A27828)从肝脏样品中提取RNA。使用高容量cDNA反转录试剂盒(赛默飞世尔,43-688-14)产生cDNA。通过使用TaqMan®快速高级主混合物(Fast Advanced Master Mix)(赛默飞世尔,4444963)和Mm00443610_m1 Axin2探针(赛默飞世尔,4331182)来测量Axin2 mRNA表达。

[0482] 这些研究表明,如通过Axin2 mRNA表达的诱导所示的,R2M3-26在体内是稳定的、高度生物可利用和活性的。

[0483] 实例20

[0484] 体内骨模型和AAV递送的Wnt替代物的表征

[0485] 通过用表达带有Flag和His标签的18R5-DKK1c蛋白(AAV-18R5-DKK1c-FlagHis)的AAV载体感染小鼠来进行体内实验。如PCT公布WO2016/040895中(例如图5)所述,18R5-DKK1c是含有与DKK1c融合的呈scFv形式的卷曲蛋白结合抗体18R5的融合蛋白。对照小鼠用单独的媒剂、罗莫珠单抗、表达绿色荧光蛋白(GFP)的AAV载体(AAV-CAG-GFP)或表达包括与突变体DKK1c融合的抗GFP scFv的融合蛋白的AAV载体(AAV-ScFv(抗GFP)-DKK1cF234K-

Flag-His)进行处理。在感染后28天,处死动物并且测量骨矿物质密度、骨体积和其它特性。如图21A至图21E所示,如通过双X射线吸光测定法(DEXA)扫描确定的,18R5-DKK1c的全身性表达早在14天的18R5-DKK1c全身性表达中就使骨矿物质密度显著增加。18R5-DKK1c的全身性表达增加了通过DEXA扫描测量的骨矿物质密度(BMD)(图21A),并且增加了未处理组小鼠中血清P1NP骨形成标志物的水平(图21C)。在血清中检测到AAV-ScFv(抗GFP)-DKK1cF234K和18R5-DKK1c的血清水平,并且发现所述血清水平远高于体外测定的EC50(图21B)。AAV-CAG-GFP和AAV-ScFv(抗GFP)-DKK1cF234K是阴性对照。罗莫珠单抗是阳性对照,并且单独的媒剂是阴性对照。如图20的D和图20的E所示,18R5-DKK1c还增加了腰椎和全身的骨密度,其中*指示P值＜0.05,并且**指示P值＜0.0001。如图22A至图22D所示,如通过微CT测量的,在未处理组小鼠处理后28天,通过AAV进行的18R5-DKK1c表达还增加了胫骨和股骨的骨体积以及股骨中骨干中的皮质厚度,其中****指示P值<0.0001。

[0486] 如图23A和图23B所示,18R5-DKK1c的全身性表达在过去8天中使矿物质沉积速率相对于基线显著增加到单个标记。

[0487] 如图24A至图24D所示,18R5-DKK1c的全身性表达还使成骨细胞数目增加和破骨细胞数目减少。

[0488] 如图25A至图25C所示,在生物力学测试中,18R5-DKK1c处理增加了骨刚度和骨折的极限负荷,这表明改善了对骨折的抵抗力。

[0489] 这些研究证明,如通过DEXA测量的,使用AAV进行的18R5-DKK1c的全身性表达增加了骨矿物质密度(BMD),并且如通过微CT测量的,还表明18R5-DKK1c早在处理14天时就增加了骨体积。在处理后28天,18R5-DKK1c还增加了皮质厚度。18R5-DKK1c的全身性表达使矿物质沉积速率显著增加,

[0490] 使成骨细胞数量增加,并且使破骨细胞数量减少。18R5-DKK1c的全身性表达还增加了骨刚度和骨折的极限负荷,这表明改善了对骨折的抵抗力。

[0491] 实例21

[0492] 体内骨模型和作为重组蛋白产生的Wnt替代物的表征

[0493] 通过腹膜内注射各种剂量的重组产生的R2M3-26蛋白处理小鼠来进行体内实验。对照小鼠用单独的媒剂(阴性对照)、罗莫珠单抗(阳性对照)、抗β-半乳糖苷酶(阴性对照)或IgG2-抗GFP(阴性对照)进行处理。在指定时间点纵向监测通过DEXA测量的骨矿物质密度(BMD)和通过微CT测量的骨体积。在处理后四周,处死动物并且测量骨特性。对于R2M3-26的单次注射,监测实验数据并针对处理后两周示出。

[0494] 如26A-26D所示,用重组R2M3-26进行的处理诱导未处理组小鼠的骨矿物质密度(BMD)和骨体积快速且持续增加。骨体积和BMD均快速增加,这表明对骨折具有抵抗力。

[0495] 卵巢切除术诱导的骨质疏松症模型是用于确定合成代谢疗法克服与激素消融相关的骨流失的能力的确立已久的高障碍模型(Zhou,S.等人,《细胞生物化学杂志(Journal of Cellular Biochemistry)》,PMID:11455579)。如图27A至图27C所示,用重组R2M3-26处理进行的处理在卵巢切除术诱导的骨质疏松症小鼠模型中逆转了骨流失。在骨小梁区观察到皮质厚度增加,这表明压缩强度增加。如通过微CT测量的,R2M3-26处理在42天后增加了股骨中骨干皮质骨厚度。如通过DEXA测量的,R2M3-26也使BMD增加。

[0496] 如图28A至图28C所示,R2M3-26的单次注射足以在一周内诱导快速的骨形成和骨

体积,其中*指示P值＜0.05。

[0497] 如图29A至图29D所示,用R2M3-26和1R-C07-26进行的高剂量处理快速且显著地增加了骨体积和骨矿物质密度,并且改善了骨的生物力学强度(失效极限负荷和刚度)。1R-C07-26表现出对持续28天的骨自然增长的强大且显著的作用。通过生物力学测试,在处理28天后,R2M3-26和1R-C07-26均显著增加了对骨折的抵抗力。

[0498] 如图30的A-E所示,用R2M3-26和1R-C07-3进行的高剂量处理仅在处理14天后就快速且显著地增加了骨体积、骨矿物质密度和皮质厚度。10mpk的1R-C07-3似乎在增加骨量方面比在此临床前模型中测试的任何其它处理更有效。

[0499] 这些研究证明,重组蛋白处理可以在未处理组小鼠和小鼠骨质疏松症模型中诱导骨矿物质密度和骨体积的快速且持续的增加。骨体积和骨矿物质密度(BMD)均快速增加,这表明对骨折具有抵抗力。IgG2-抗GFP是阴性对照。抗β半乳糖苷酶(抗βgal)是阴性对照。

[0500] 为了确定Wnt替代分子在卵巢切除术诱导的骨质疏松症模型中的全身性骨骼作用,进行了另外的实验。将卵巢切除术时4周龄的C57BL/6雌性(n＝8/组)与假处理组以及年龄匹配的未处理组小鼠进行比较。在手术后7个月并且当确认骨质疏松症发作时向动物腹膜内注射重组Wnt替代分子。实验组包含R2M3-26、1RC07-3、抗Bgal(Ab对照)和媒剂(PBS)。对另一组小鼠进行了皮下注射罗莫珠单抗以进行比较。每周两次对动物进行处理,并且随后进行4周。

[0501] 如图31所示,使用双能X射线吸光测定法(DEXA)每周测量全身骨矿物质密度(BMD),并且用Wnt替代分子处理不仅可以逆转,甚至可以超过未处理组动物或非手术动物中可见的总BMD。在处理4周后,评定动物对压缩性骨折的椎体抵抗力。

[0502] 用Wnt替代分子进行的处理显著增加了对压缩性骨折的椎体抵抗力,如骨折分析(图32)所示。1RC07-3最有力地增加了使椎骨压缩性断裂所需的最大力。

[0503] 用Wnt替代分子进行延迟处理的Einhorn骨折模型(Bonnarens F,Einhorn TA.《矫形外科研究杂志(J Orthop Res.)》1984;2(1):97-101.PMID:6491805)用于确定此疗法诱导骨折愈合的能力。测试了用1RC07-3或R2M3-26进行的延迟处理,以确定任一分子在中横贯股骨骨折后是否能够促进骨折愈合增加。使用骨折时16周龄的C57BL/6雌性(n＝8/组)。在开始处理前,在所有动物中确认在骨折后2周软骨愈伤组织的存在。在允许愈伤组织形成的延迟处理的情况下,可以通过快速矿化已经存在的愈伤组织诱发纯成骨信号。

[0504] 相对于以下实验组,向动物腹膜内注射重组Wnt替代分子:R2M3-26、1RC07-3、抗Bgal(Ab对照)和媒剂(PBS)。对另一组小鼠进行了皮下注射罗莫珠单抗以进行比较。每周两次对动物进行处理,并且随后进行6周。放射线照相术用于在整个实验中可视化愈伤组织矿化的变化(图33A和图33B)。在处理1周和6周时,利用Wnt替代物处理的所得愈伤组织的矿化和大小的增加显而易见。一周足以诱导快速矿化,这预示着快速的骨折愈合和对骨折的抵抗力。1RC07-3似乎比R2M3-26更大程度地诱导矿化。在处理6周后拍摄的射线照片示出1RC07-3组中高度矿化的愈伤组织持续存在,而R2M3-26组中的一些骨折愈伤组织已减少(图33B和图33D)。

[0505] 在整个实验中测量了全身DEXA,以不仅检查骨折股骨中的骨矿物质密度,而且还检查对侧非骨折股骨中的骨矿物质密度,其中在处理之后,骨矿物质密度预期增加(图33C和图33D)。这降低了已经骨折的肢体和附肢骨骼中继发性骨折的风险。图33C示出了在42天

时对侧股骨的BMD。

[0506] 在愈伤组织确认后经过6周的处理后,用微计算机断层扫描对股骨进行扫描并且确定多个参数,所述参数与愈合后对骨折的抵抗力增加相关。在检查的关注区内,愈伤组织组织体积、所述愈伤组织内的骨体积,尤其是骨矿物质含量均显著增加(图33D)。定性地,重建示出了在处理的骨折中普遍存在厚的类骨质和矿物质。这些参数表明对骨折具有很强的抵抗力,并且指示在自发性软骨愈伤组织形成后,用Wnt替代分子进行的延迟处理可以引起骨形成的快速且显著的增加。

[0507] 在另一个实验中,对给药方案进行了测试,以确定Wnt替代分子疗法是否可以诱导显著的骨合成代谢作用,所述作用持续多长时间,以及在冲洗(washout)后确定骨对另外的处理的响应。在建立基线后,将全身骨骼作用与针对合成代谢作用的1RCO7-3的可变剂量、冲洗和重新给药进行比较。相对于以下实验组向12周龄的C57BL/6雌性(n=8/组)腹膜内注射重组Wnt替代分子:利用1RCO7-3的两个组,在实验的第0天,一组利用抗βgal(Ab对照),并且另一组利用媒剂(PBS)。在第0天向另一组小鼠皮下注射罗莫珠单抗以进行比较(罗莫珠单抗是一种抗硬化蛋白抗体(Saag等人,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med.)》2017Oct 12;377(15):1417-1427;PMID:28892457),其可以逆转与骨质疏松症相关的骨流失。1RCO7-3处理组中的动物在14天之前具有显著且快速的骨形成诱导(图34)。一组在第14天接受第二次注射以确定是否可以进一步增强骨合成代谢作用。有趣的是,无论处理如何,所有处理效果在35天后都可以逆转并恢复正常。在第二轮处理之前,允许2周的时段以返回到基线水平。在第49天,对所有实验组进行了第二轮处理。Wnt替代物处理的动物响应迅速,但是与初始处理的程度不同(图34)。对于所有组,在最后一次注射后5周,新的骨形成停止。这指示单次注射能够显著增加骨形成,但是合成代谢作用迅速丧失。这表明可能需要与Wnt替代物疗法组合使用抗吸收剂以维持合成代谢作用。

[0508] 罗莫珠单抗的作用机制依赖于通过去除内源性Wnt信号传导的抑制剂(硬化蛋白)来刺激骨形成。在组合研究中,进行了一项用Wnt替代分子加罗莫珠单抗处理动物的实验,以确定Wnt替代分子处理是否能够与罗莫珠单抗协同作用。

[0509] 在以下实验组中,向10周龄的C57BL/6雄性(n=8/组)腹膜内注射重组Wnt替代分子与罗莫珠单抗的组合:1RCO7-3(0.1mpk)、1RCO7-3(1mpk)、1RCO7-3(10mpk)、1RCO7-3(0.1mpk)+罗莫珠单抗(25mpk)、1RCO7-3(1mpk)+罗莫珠单抗(25mpk)、1RCO7-3(10mpk)+罗莫珠单抗(25mpk)、单独的罗莫珠单抗(25mpk)、抗Bgal(Ab对照)和媒剂(PBS)。每周两次对动物进行处理并且随后进行3周。

[0510] 每周测量全身BMD,并且结果呈现在图35中。此研究的结论是,内源性罗莫珠单抗在高剂量1RCO7-3的存在下可以刺激另外的骨生长。这些数据进一步表明,用10mpk1RCO7-3处理尚未达到峰值合成代谢作用。这些数据还表明,即使存在1RCO7-3,罗莫珠单抗也可以刺激骨形成。总体而言,此研究表明,在仅21天的每周两次的处理后,Wnt替代分子处理可以与罗莫珠单抗协同作用,以增强骨合成代谢作用。

[0511] 在小鼠进行Wnt替代分子疗法后的整个时间进程中,测量了整个骨骼中基因表达的变化,以评定这种疗法如何调节与增殖和骨生成相关的遗传标志物的表达。向13周龄的C57BL/6雌性(n=5/组)腹膜内注射1RCO7-3或抗Bgal(Ab对照)一次。对另一组小鼠进行了皮下注射罗莫珠单抗以进行比较。在处理后8小时、24小时、48小时和120小时处死动物群,

并且分离胫骨和血清并快速冷冻以提取RNA。如上所述,在整个实验进程中,ELISA用于测量血清中治疗分子的水平(图36)。

[0512] 为了从骨中纯化RNA,按以下处理从刚处死的动物切除的胫骨:将胫骨的端部剪断以暴露骨髓腔,并且用冰冷的盐水通过30号针头冲洗骨髓腔,采取步骤以确保所有肌肉组织和软骨已被去除;骨看上去完全是白色的,其中无残留的红色骨髓组分。将胫骨置于1.5mL Eppendorf管中并在液氮中快速冷冻。为了裂解,将单个组织裂解器珠与骨一起置于管中,并将Trizol直接添加到冷冻的骨和珠中。在高速下的组织裂解器用于完全匀浆。然后使匀浆物进行氯仿萃取以分离核酸相。使用RNeasy迷你试剂盒(凯杰(Qiagen))进行进一步分离和纯化。

[0513] 测试从胫骨中分离的RNA相对于以下的相对转录水平:Runt相关转录因子2(RunX2)、I型胶原α1链(Col1A1)、牙本质基质酸性磷蛋白1(Dmp1)、碱性磷酸酶(Alp)、核因子κ-B配体的受体激活剂(RankL)、Dickkopf WNT信号传导通路抑制剂1(Dkk1)、硬化蛋白(Sost)、细胞周期蛋白D1(Ccnd1)、Axin2和Ki67。

[0514] 表4.在小鼠中利用Wnt替代分子(1RC07-3)和罗莫珠单抗(Rxmab)疗法的骨中基因表达的变化

[0515]

基因	时间（小时）	相对于 Bgal 平均值的诱导倍数+/-SEM		
		Bgal	Rzmab	1RC073
RunX2	24	1.0+/-0.3	8.8+/-4.4	9.6+/-3.6 **
	48	1.0+/-0.7	1.9+/-1.0	1.5+/-0.5
ColA1	24	1.0+/-0.2	3.9+/-2.0	3.0+/-1.0
	48	1.0+/-0.5	7.0+/-3.3	2.7+/-1.5
Dmp1	24	1.0+/-0.2	2.7+/-1.1	4.8+/-2.9
	48	1.0+/-0.6	1.6+/-0.7	3.8+/-1.8
Alp	24	1.0+/-0.4	18.3+/-11.7	16.5+/-6.4 *
	48	1.0+/-0.6	4.0+/-1.8	5.0+/-1.9
RankL	24	1.0+/-0.3	8.6+/-4.5	8.7+/-3.3
	48	1.0+/-0.7	1.5+/-0.6	4.3+/-1.4
Dkk1	24	1.0+/-0.2	10.5+/-5.1	17.9+/-6.0 **
	48	1.0+/-0.5	4.3+/-2.5	2.8+/-1.3
Sost	24	1.0+/-0.2	2.1+/-1.0	2.5+/-0.9
	48	1.0+/-0.6	5.1+/-2.3	9.0+/-4.2 **
Ccnd1	24	1.0+/-0.4	3.3+/-0.8	3.4+/-1.8
	48	1.0+/-0.6	2.5+/-1.2	2.4+/-1.2
Axin2	24	1.0+/-0.5	3.2+/-1.1	6.1+/-1.8 **
	48	1.0+/-0.8	3.6+/-2.3	4.6+/-1.6 *
Ki67	24	1.0+/- 0.3	7.7+/-4.3	10.0+/-3.2
	48	1.0 +/-0.5	1.0+/-0.5	25.5+/-12.2 ***

[0516] *p<0.05,**p<0.005,与Bgal对照进行比较的2因素方差分析

[0517] ***p<0.001,与Bgal和罗莫珠单抗两者进行比较的2因素方差分析

[0518] 与抗硬化蛋白抗体(罗莫珠单抗)相比,Wnt替代分子疗法在时间点上的基因表达特征不同,其诱导的Axin2和Ki67表达比通过罗莫珠单抗处理引起的Axin2和Ki67表达更强。

[0519] 实例22

[0520] 体内肝再生模型和AAV递送的Wnt替代物的表征

[0521] 通过用表达带有Flag和His标签的18R5-DKK1c蛋白(AAV-18R5-DKK1c-FlagHis)的

AAV载体感染大约8周龄的C57BL/6J小鼠来进行体内实验。如PCT公布WO2016/040895中(例如图5)所述,18R5-DKK1c是含有与DKK1c融合的呈scFv形式的卷曲蛋白结合抗体18R5的融合蛋白。向对照小鼠皮下注射单独的磷酸盐缓冲盐水(PBS)或罗莫珠单抗(10mg/kg),或者向对照小鼠静脉内(IV)注射表达绿色荧光蛋白(GFP)的AAV载体(AAV-CAG-GFP)或表达包括与突变体DKK1c融合的抗GFP scFv的融合蛋白的AAV载体(AAV-ScFv(抗GFP)-DKK1cF234K-Flag-His)。在感染后28天,将动物称重并处死。将肝脏称重,并且计算肝脏重量与体重的比率。小肠和结肠的内容物通过用磷酸盐缓冲盐水冲洗并用适度的压力排出内容物来去除。然后将小肠和结肠称重。

[0522] 18R5-DKK1c-FlagHis的全身性表达使肝脏重量显著增加(图37的A)。阴性对照eGFP或抗eGFP-Dkk1cF234K的全身性表达不影响肝脏重量与体重的比率。施用罗莫珠单抗重组蛋白或媒剂对照不影响肝脏重量与体重的比率。

[0523] 处理均不影响小肠重量(图37的B)或结肠重量(图37的C)与体重比率。

[0524] 这些研究表明18R5-DKK1c-FlagHis增加了肝脏重量,但不增加小肠或大肠的重量。这表明18R5-DKK1c-FlagHis可以促进肝再生。

[0525] 20

[0526] 实例23

[0527] 体内肝再生模型和重组产生的Wnt替代物的表征

[0528] 通过用各种剂量的重组产生的抗eGFP、R2M3-26、1R-C07-26、罗莫珠单抗或Rspo2蛋白处理小鼠来进行体内实验。Rspo2蛋白是Rspo2基因的短剪接变体与人Fc片段之间的融合蛋白。

[0529] 在一项研究中,每笼容纳4只小鼠,并且每个处理组使用n=8。持续四周向大约8周龄的C57BL6/J小鼠每周两次腹膜内(i.p.)施用重组蛋白、抗eGFP(1mg/kg)、R2M3-26(1mg/kg或10mg/kg)或1R-C07-26(1mg/kg、5mg/kg或10mg/kg)。另外,向各组小鼠皮下施用罗莫珠单抗(30mg/kg)或PBS媒剂对照。

[0530] 在开始时和整个处理过程中将小鼠称重。用重组蛋白进行的处理均不显著影响总体重(图38的A)。在第28天,将肝脏称重,并且计算肝脏重量与体重的比率(图38的B)。R2M3-26的最高剂量(10mg/kg)使肝脏重量与体重的比率显著增加。其它处理均不显著影响肝脏重量。

[0531] 响应于R2M3-26的肝脏重量增加表明此重组蛋白可以促进肝再生。

[0532] 在另一项研究中,每笼容纳5只小鼠,并且每个处理组使用n=10。大约8周龄的C57BL/6J小鼠接受了含有单独的抗eGFP(0.56mg/kg)、R2M3-26(0.3mg/kg)或Rspo2(0.46mg/kg)或者具有R2M3-26(0.1mg/kg)与Rspo2(0.46mg/kg)的组合的单次腹膜内注射。

[0533] 在注射后24小时或48小时,使小鼠安乐死。将左肝叶的一部分在液氮中速冻并储存在-80℃下以供RNA分析。通过使用Mm00432359_m1 Ccnd1探针和Mm01278617_m1Ki67探针(赛默飞世尔,4331182)执行qPCR来测量细胞周期蛋白D1和Ki67表达。将左肝叶的另外的部分固定在福尔马林中并包埋在石蜡中以进行免疫组织化学分析。将切片用抗增殖细胞核抗原(PCNA)(艾博抗(Abcam),ab18197)或抗磷酸化组蛋白H3(pH3)兔抗体(艾博抗,ab47297)染色。使用图像处理软件Image J对阳性细胞核的数量进行计数。

[0534] 单独的Rspo2增加了Ki67(图39的A)和细胞周期蛋白D1(图39的B)mRNA表达。在用

重组蛋白处理后24小时和48小时,与R2M3-26组合的Rspo2比使用单独的Rspo2进一步增加了Ki67和细胞周期蛋白D1表达。单独的Rspo2增加了肝脏切片中PCNA(图39的C)和pH3(图39的D)阳性细胞核的数量。在用重组蛋白处理后48小时,与R2M3-26组合的Rspo2比使用单独的Rspo2进一步增加了PCNA和pH3阳性细胞核的数量。

[0535] 这些研究表明,R2M3-26和Rspo2重组蛋白可以诱导增殖标志物Ki67 mRNA、细胞周期蛋白D1 mRNA和PCNA阳性细胞核以及pH3有丝分裂标志物,并且表明这些重组蛋白可以促进肝再生。

[0536] 实例24

[0537] 体内慢性肝损伤模型和AAV递送的Wnt替代物的表征

[0538] 在两种硫代乙酰胺(TAA)和CC14诱导的肝硬化小鼠模型中进行两项体内实验,以测试表达18R5-DKK1c-FlagHis或Rspo2蛋白的AAV载体对慢性肝损伤的作用。在整个TAA处理持续时间期间,将TAA以300mg/L的浓度添加到6周龄的C57BL/6J小鼠的饮用水中。每笼容纳5只小鼠,并且除了无TAA处理的对照组(其中每组使用n=5)外,每组使用n=10。

[0539] 在研究1(图40的A、C、E、G-H)中,将有(n=10)或无(n=5)TAA处理的小鼠称重并且在饮用水中添加TAA 9周后处死,以进行测量基线值。将肝脏称重并且收集肝脏样品以用于mRNA和组织学分析。在其余小鼠的饮用水中维持TAA补充,并且向它们静脉内注射AAV载体,所述AAV载体表达增强的绿色荧光蛋白(eGFP)(3e10基因组颗粒(GC))、18R5-DKK1c-FlagHis(3e10或1e11 GC)或Rspo2蛋白(1e11 GC)或18R5-DKK1c-FlagHis(3e10 GC)与Rspo2(1e11 GC)的组合。保留5只年龄相匹配的未处理组动物(无TAA)作为阴性对照。在AAV注射后三周,将所有小鼠称重并使其安乐死。将肝脏称重并且收集肝脏样品以用于mRNA和组织学分析。

[0540] 在经历连续暴露于TAA的小鼠中,用18R5Dkk1FH或Rspo2进行的处理使肝脏重量(图40的C)和肝脏重量与体重的比率(图40的E)显著增加。利用18R5Dkk1FH和Rspo2的组合进行的处理使肝脏重量和肝脏重量与体重的比率进一步增加,超过了使用任一种单独的处理所观察到的。18R5Dkk1FH和Rspo2的组合处理使纤维化标志物Col1a1 mRNA表达下降(图40的G)。将组织学肝脏切片用天狼星红染色以可视化胶原在纤维化区域中的积累(图40的H)。使用Image J分析软件对红色百分比进行的定量示出TAA处理的小鼠中纤维化区域显著增加。当与用eGFP阴性对照处理的小鼠相比,18R5Dkk1FH和Rspo2的组合使纤维化区域增加逆转。用单独的Rspo2进行的处理也引起明显但与组合处理相比较小的逆转。

[0541] 在研究2(图40的B、D、F)中,使小鼠暴露于补充有TAA的水中11周,并且然后在AAV处理前两天返回到标准饮水。在AAV处理开始时,将暴露于TAA(n=10)或未暴露于TAA(n=5)的小鼠称重并处死以收集肝脏样品用于基线测量。向其余的小鼠注射AAV载体,所述AAV载体表达增强的绿色荧光蛋白(eGFP)(1.3e11基因组颗粒(GC))、18R5-DKK1c-FlagHis(3e10或1e11 GC)或Rspo2蛋白(1e11 GC)或18R5-DKK1c-FlagHis(3e10 GC)与Rspo2(1e11 GC)的组合。保留5只年龄相匹配的未处理组动物(无TAA)作为阴性对照。在AAV注射后三周,将所有小鼠称重并使其安乐死。将肝脏称重并且收集肝脏样品以用于mRNA和组织学分析。

[0542] 与研究1中观察到的相比,在单独或组合使用18R5-Dkk1c-FlagHis和Rspo2处理的小鼠中观察到类似的肝脏重量增加和肝脏重量与体重的比率增加(图40的D、图40的F)。

[0543] 这些研究表明18R5-Dkk1c-FlagHis和Rspo2可以在TAA诱导的肝硬化模型中增加

肝脏重量并且减少纤维化标志物。这些结果表明18R5-Dkk1c-FlagHis和Rspo2可以促进慢性肝损伤后的肝组织修复。

[0544] 实例25

[0545] 体内慢性肝损伤模型和重组生产的Wnt替代物的表征

[0546] 通过用重组产生的抗eGFP、R2M3-26和Rspo2蛋白处理小鼠,在硫代乙酰胺(TAA)诱导和CCl4诱导的肝硬化小鼠模型中进行体内实验。

[0547] 在TAA诱导的肝硬化模型中,将六周龄的雄性小鼠暴露于补充有TAA的饮用水(300mg/L)中大约22周(图41的A)。在开始用重组蛋白处理前两天去除TAA暴露,并且为小鼠提供新鲜的饮用水。每笼容纳5只小鼠,并且每个处理组使用n=10。在单一处理研究(图41的B、D、F、H、J、L)中,每周两次向小鼠腹膜内注射抗eGFP(1mg/kg)或Rspo2(1mg/kg)。在组合处理研究(图41的C、E、G、I、K、M)中,每周两次向小鼠腹膜内注射抗eGFP(1.3mg/kg)或R2M3-26(0.3mg/kg)与Rspo2(1mg/kg)的组合。然后在开始处理后的第3天、第7天或第14天将小鼠称重并处死。在两项研究中,在第0天和第14天使未暴露于TAA的对照组小鼠(每组n=5)安乐死。

[0548] 用单独的或与R2M3-26组合的Rspo2蛋白进行的处理使肝脏重量与体重的比率增加(图41的B和图41的C),并且短暂刺激了Wnt信号传导通路,如Axin2表达的增加所表明的(图41的D和E)。用单独的或与R2M3-26组合的Rspo2蛋白进行的处理诱导了以下增殖标志物:细胞周期蛋白D1(图41的F、图41的G)和Ki67(图41的H和图41的I)mRNA表达、PCNA(图41的J、图41的K)和pH3(图41的L、图41的M)阳性细胞核。

[0549] 在另外的研究中,收集血浆用于凝血酶原时间测量。当与无TAA暴露的正常小鼠相比时,如通过暴露于TAA的小鼠中凝血酶原(PT)测试值与正常值比率的增加所例证的,TAA诱导的肝硬化模型中的凝结时间受损(图41的N)。用Rspo2(1mg/kg)和R2M3-26(0.3mg/kg)进行的处理逆转了PT时间的延长,如每两周一次Rspo2和R2M3-26处理后第7天和第14天$PT_{测试}/PT_{正常}$比率的降低所示出的。

[0550] 这些研究表明,在TAA诱导的肝硬化模型中,Rspo2和R2M3-26可以刺激肝细胞增殖并改善肝细胞功能活性,如凝血酶原时间。这些结果表明Rspo2和R2M3-26可以促进慢性肝病中的肝组织修复。

[0551] 在CCl4诱导的肝硬化模型中,持续8周每周两次向六周龄的C57BL/6J雄性小鼠腹膜内注射2ml/kg CCl4的矿物油溶液(图42的A)。在最后一次CCl4注射后3天,每周两次向小鼠腹膜内注射以下重组蛋白:抗β-半乳糖苷酶(10mg/kg)、Rspo2(1mg/kg或10mg/kg)或R2M3-26(0.3mg/kg)与Rspo2(1mg/kg)的组合。包含三个另外的对照组:注射了CCl4但未注射蛋白质的一个组、注射了矿物油的一个组,以及一个未处理的年龄相匹配的未处理组。每个组使用n=8。用重组蛋白处理两周后,将小鼠称重并处死。收集血浆以用于凝血酶原时间测量。将肝脏称重并且收集肝脏样品以用于组织学分析。

[0552] 当与用抗β-半乳糖苷酶阴性对照进行的处理相比时,用R2M3-26和Rspo2进行的处理使肝脏重量与体重的比率显著增加(图42的B)。用Rspo2(10mg/kg)或R2M3-26与Rspo2的组合进行的处理使凝血酶原时间显著减少(图42的C)。用Rspo2(10mg/kg)或R2M3-26与Rspo2的组合进行的处理使由CCl4诱导的纤维化区域显著逆转(图42的D)。

[0553] 此研究表明,在CCl4诱导的肝硬化模型中,Rspo2和R2M3-26可以诱导肝脏重量增

加,改善肝细胞功能活性(如凝血酶原时间)并减少纤维化标志物。这些结果表明Rspo2和R2M3-26可以促进慢性肝病中的肝组织修复。

[0554] 实例26

[0555] 体内急性肝损伤模型和重组产生的Wnt替代物的表征

[0556] 通过用重组产生的抗eGFP、R2M3-26和Rspo2蛋白处理小鼠,使用对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤小鼠模型进行体内实验。

[0557] 每笼容纳5只八周龄的C57BL/6雄性小鼠。每组使用n=10。将小鼠禁食过夜12小时。以亚致死剂量(300mg/kg)腹膜内施用对乙酰氨基酚(APAP)。

[0558] 在第一项研究中,在APAP注射后立即或在APAP注射后3小时或6小时腹膜内注射抗eGFP(0.3mpk)或R2M3-26(0.3mpk)(图43)。在注射APAP后24小时和48小时收集血清样品以用于ALT测量。在APAP注射后48小时将小鼠处死,并且收集肝脏样品以进行mRNA分析。

[0559] R2M3-26处理不显著影响ALT水平(图43的B)。用R2M3-26进行的处理显著地诱导了细胞周期蛋白D1(图43的C)和Ki67(图43的D)mRNA,超过了通过单独的APAP处理诱导的水平。

[0560] 在第二项研究中,在APAP注射后立即或在APAP注射后3小时或6小时腹膜内注射人Fc(0.46mg/kg)或Rspo2(0.46mg/kg)(图44)。在APAP注射后24小时和48小时收集血清样品。在APAP注射后48小时收集肝脏样品。Rspo2处理不显著影响ALT血清水平(图44的B)。用Rspo2进行的处理显著地诱导了细胞周期蛋白D1(图44的C)和Ki67(图43的D)mRNA,超过了通过单独的APAP处理诱导的水平。

[0561] 在第三项研究中,在APAP施用后3小时腹膜内注射抗eGFP(0.56mg/kg)或R2M3-26(0.1mg/kg)与Rspo2(0.46mg/kg)的组合。在APAP注射后24小时、36小时、48小时和60小时收集血清和肝脏样品以用于ALT测量和mRNA分析。

[0562] R2M3-26和Rspo2组合处理不显著影响ALT水平(图45的B)。用R2M3-26和Rspo2进行的处理显著地诱导了细胞周期蛋白D1(图45的C)和Ki67(图45的D)mRNA,超过了通过单独的APAP处理诱导的水平。

[0563] 执行另外的研究以评估Rspo2和R2M3-26对用600mg/kg剂量的对乙酰氨基酚处理的小鼠的存活率的影响(图46)。在APAP施用后3小时腹膜内注射抗eGFP(0.3mg/kg)、R2M3-26(0.3mg/kg)、Rspo2(0.46mg/kg)或R2M3-26(0.1mg/kg)与Rspo2(0.46mg/kg)的组合。在接下来的96小时内,每天对小鼠进行若干次监测。在用R2M3-26(图46的B)、Rspo2(图46的C)或R2M3-26与Rspo2的组合(图46的D)处理的组中观察到提高存活率的一致趋势。

[0564] 这些研究表明,Rspo2和R2M3-26可以诱导的增殖标志物超过了APAP诱导的急性损伤模型中自发性诱导的增殖标志物。这些结果表明Rspo2和R2M3-26可以增强急性肝损伤后的肝组织修复。

[0565] 可以将以上所描述的各个实施例进行组合以提供另外的实施例。本说明书中提及的和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过全文引用的方式并入本文中。如果需要,则可以修改实施例的方面以采用各个专利、申请和出版物的概念来提供又另外的实施例。鉴于以上详细描述,可以对实施例进行这些以和其它改变。

[0566] 总之,在以下权利要求书中,所使用的术语不应当被解释为将权利要求书限制于

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

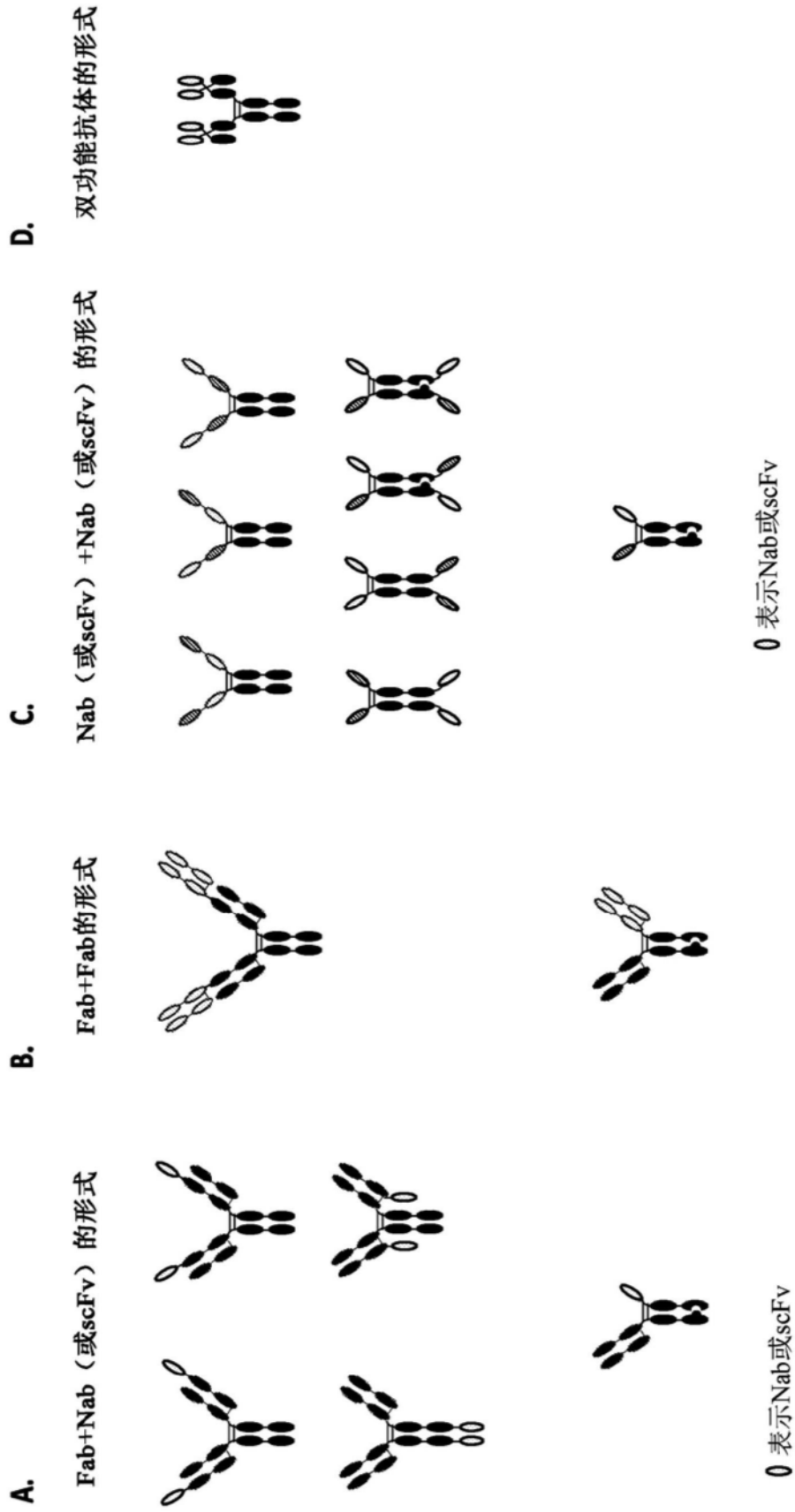

A.
Fab+Nab（或scFv）的形式
0 表示Nab或scFv
B.
Fab+Fab的形式
C.
Nab（或scFv）+Nab（或scFv）的形式
0 表示Nab或scFv
D.
双功能抗体的形式

图1

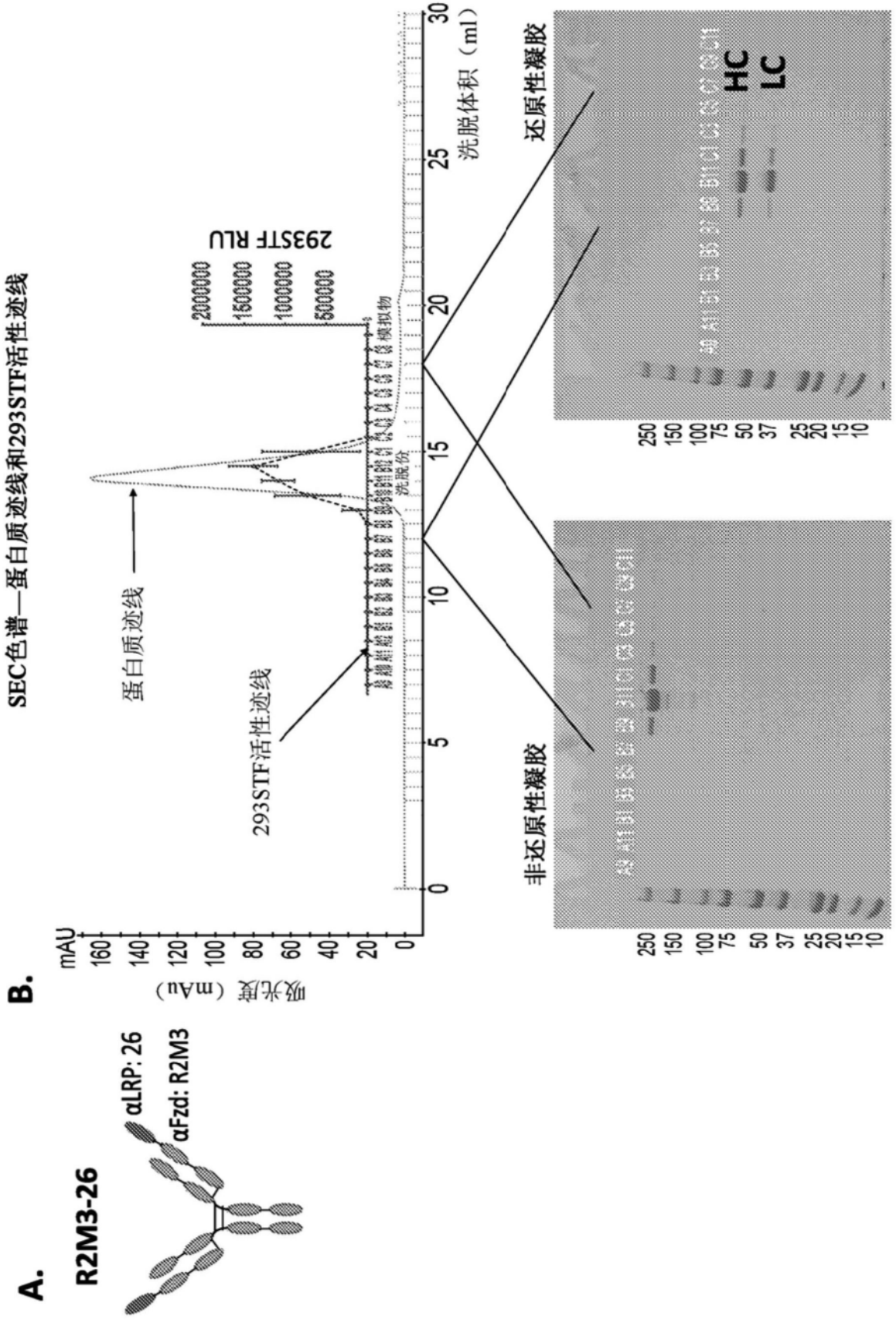

A.
R2M3-26
αLRP: 26
αFzd: R2M3
B.
SEC色谱—蛋白质迹线和293STF活性迹线
吸光度（mAu）
mAU
蛋白质迹线
293STF活性迹线
293STF RLU
洗脱体积（ml）
还原性凝胶
非还原性凝胶
HC
LC

图2

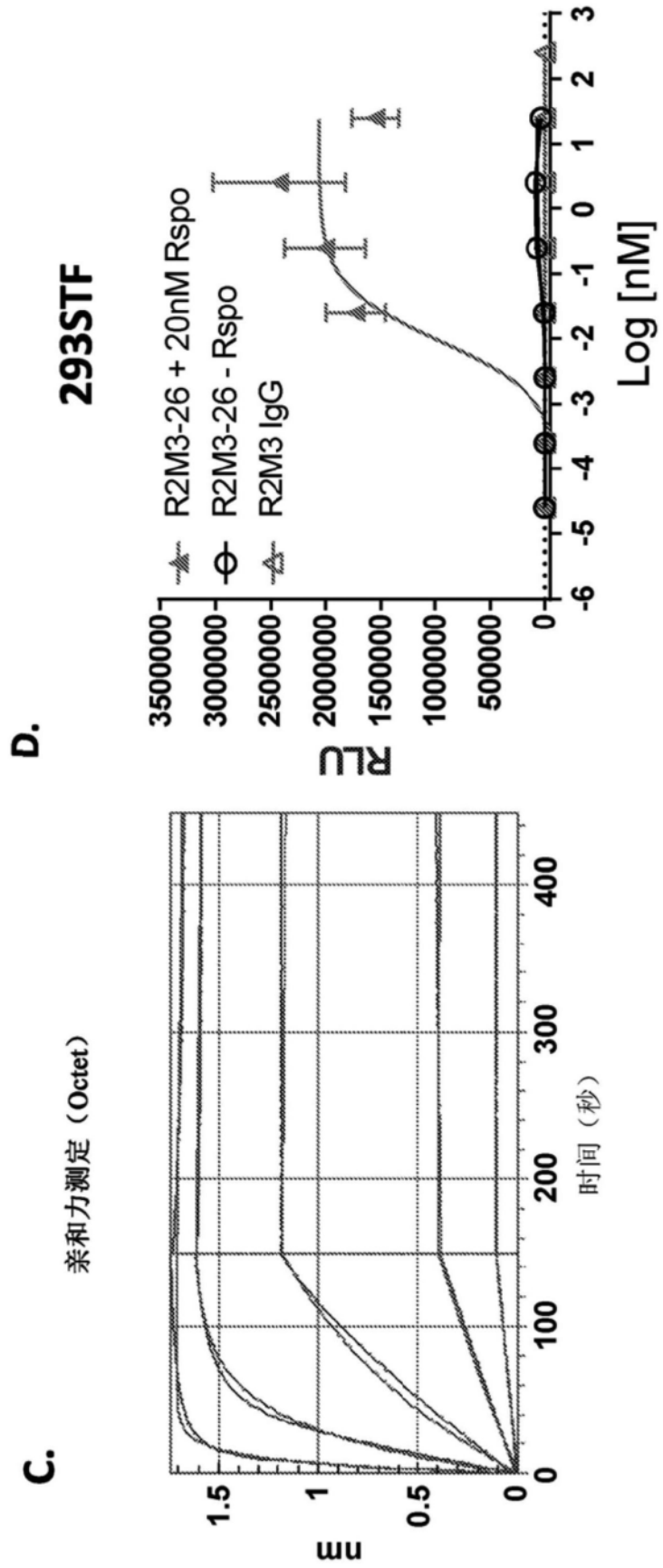

C.
亲和力测定（Octet）
nm
1.5
1
0.5
0
0
100
200
300
400
时间（秒）
D.
293STF
R2M3-26 + 20nM Rspo
R2M3-26 - Rspo
R2M3 IgG
RLU
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log [nM]

图2(续)

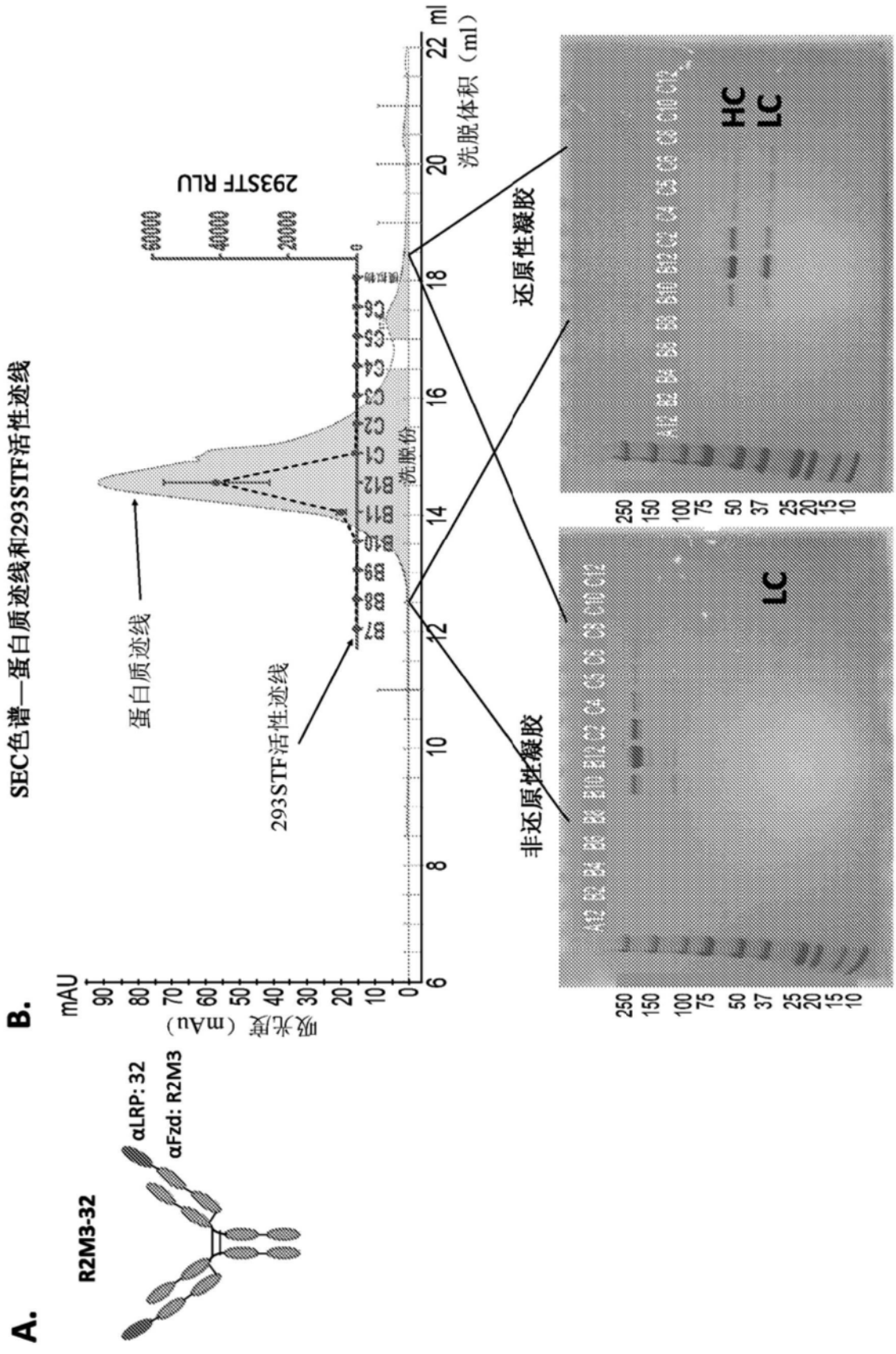

A.
R2M3-32
αLRP: 32
αFzd: R2M3
B.
SEC色谱—蛋白质迹线和293STF活性迹线
mAU
吸光度（mAu）
蛋白质迹线
293STF活性迹线
293STF RLU
洗脱份
洗脱体积（ml）
ml
还原性凝胶
非还原性凝胶
HC
LC
LC

图3

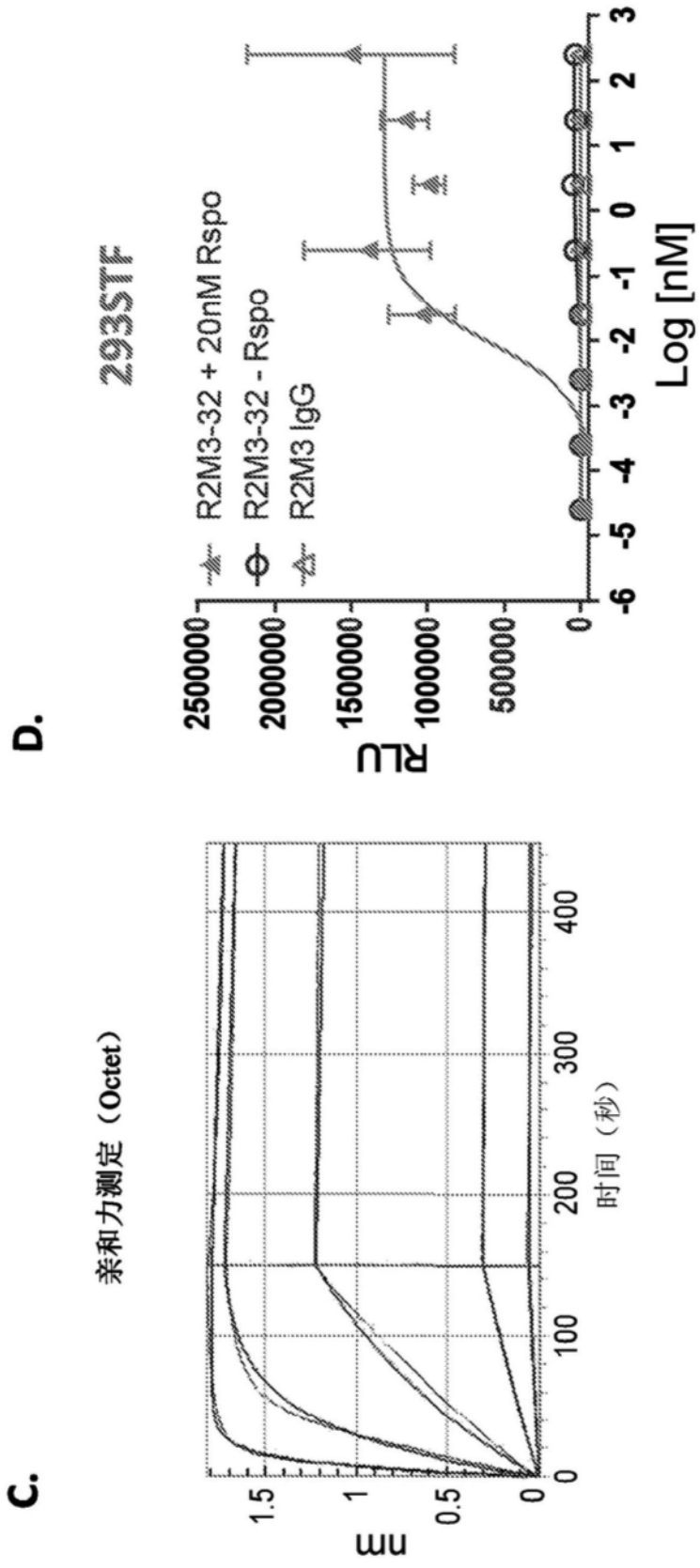

C.
亲和力测定（Octet）
nm
1.5
1
0.5
0
0
100
200
300
400
时间（秒）
D.
293STF
R2M3-32 + 20nM Rspo
R2M3-32 - Rspo
R2M3 IgG
RLU
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log [nM]

图3(续)

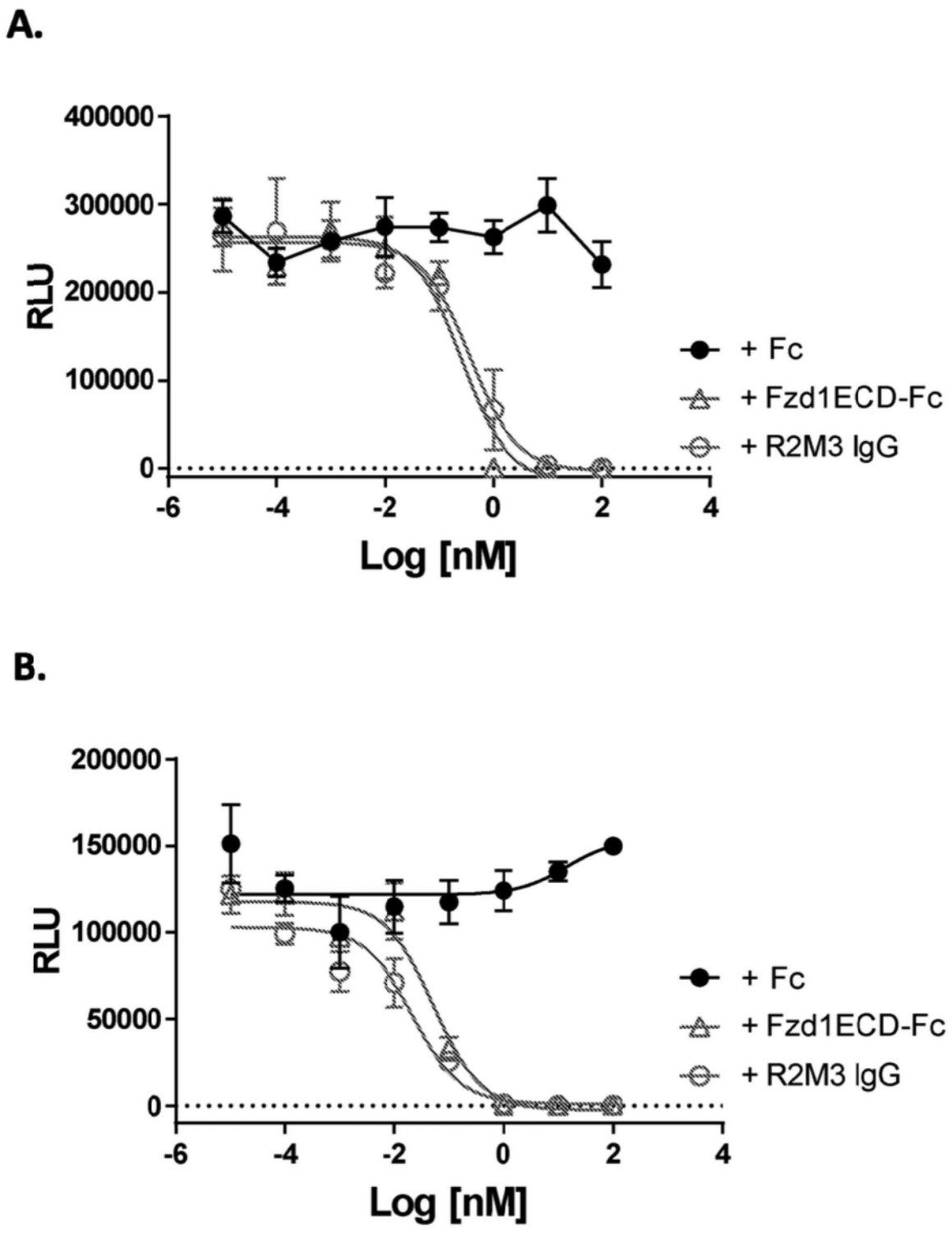

A.
400000
300000
200000
100000
0
RLU
-6
-4
-2
0
2
4
Log [nM]
+ Fc
+ Fzd1ECD-Fc
+ R2M3 IgG
B.
200000
150000
100000
50000
0
RLU
-6
-4
-2
0
2
4
Log [nM]
+ Fc
+ Fzd1ECD-Fc
+ R2M3 IgG

图4

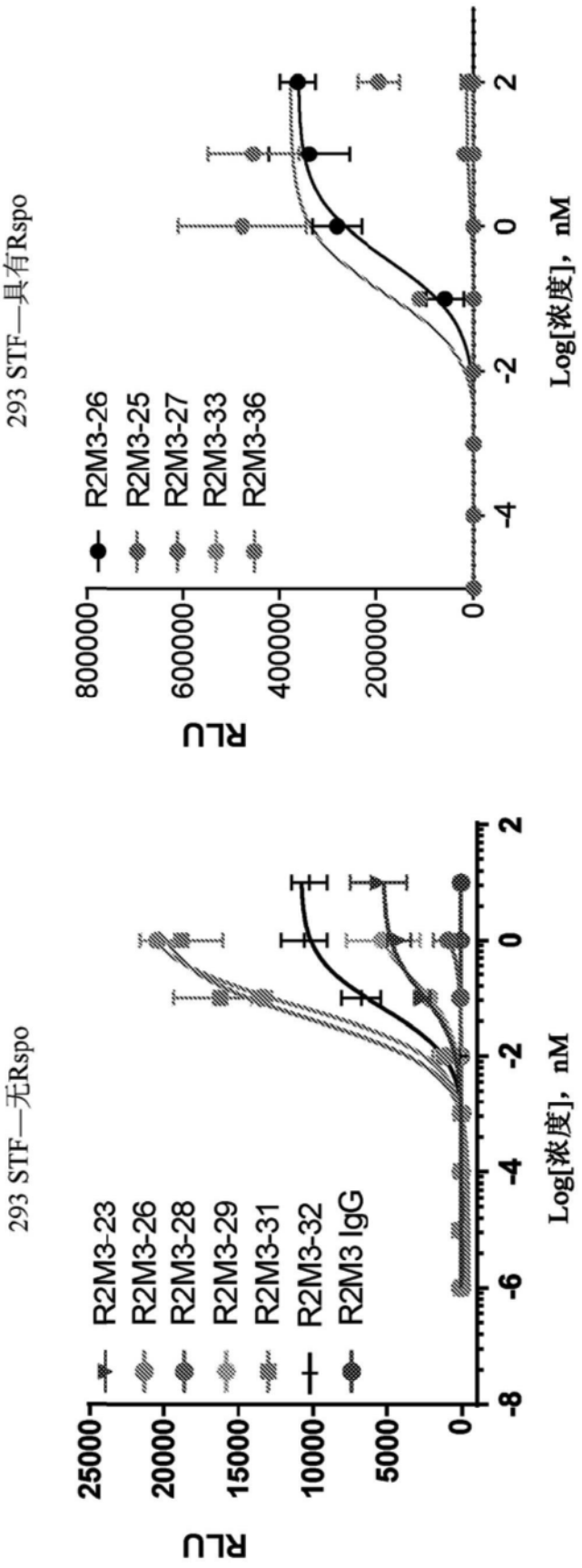

293 STF—具有Rspo
R2M3-26
R2M3-25
R2M3-27
R2M3-33
R2M3-36
RLU
800000
600000
400000
200000
0
-4
-2
0
2
Log[浓度]，nM
293 STF—无Rspo
R2M3-23
R2M3-26
R2M3-28
R2M3-29
R2M3-31
R2M3-32
R2M3 IgG
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
Log[浓度]，nM

图5

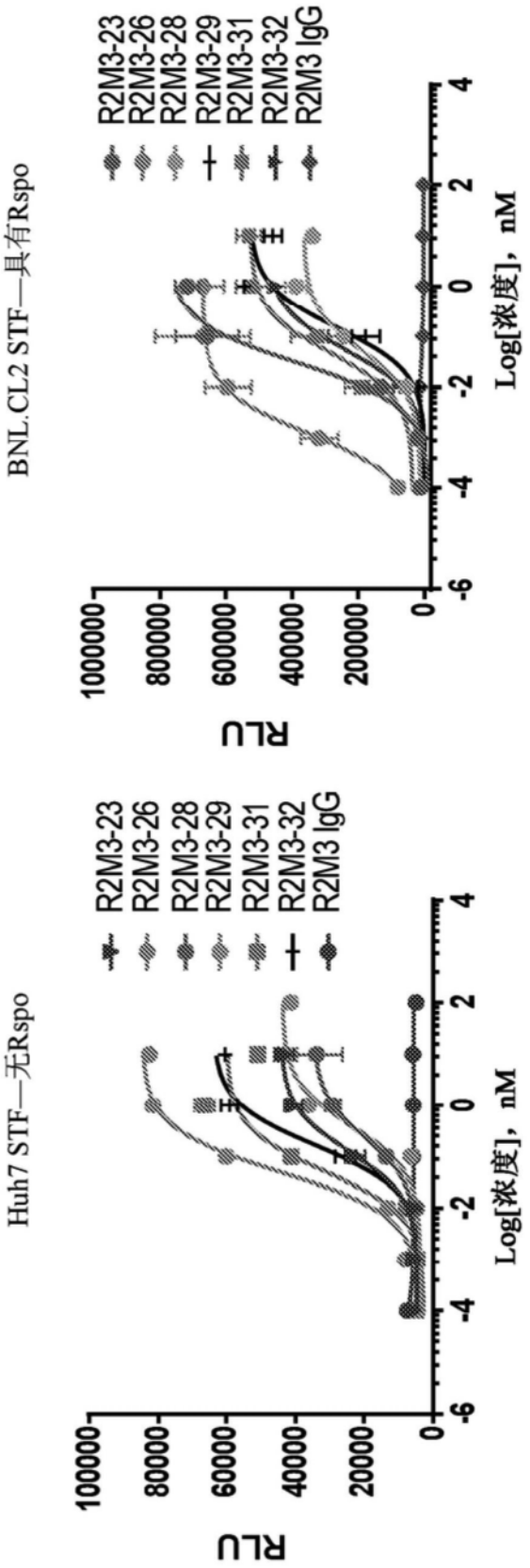

BNL.CL2 STF—具有Rspo
R2M3-23
R2M3-26
R2M3-28
R2M3-29
R2M3-31
R2M3-32
R2M3 IgG
RLU
1000000
800000
600000
400000
200000
0
-6
-4
-2
0
2
4
Log[浓度]，nM
Huh7 STF—无Rspo
R2M3-23
R2M3-26
R2M3-28
R2M3-29
R2M3-31
R2M3-32
R2M3 IgG
RLU
100000
80000
60000
40000
20000
0
-6
-4
-2
0
2
4
Log[浓度]，nM

图5(续)

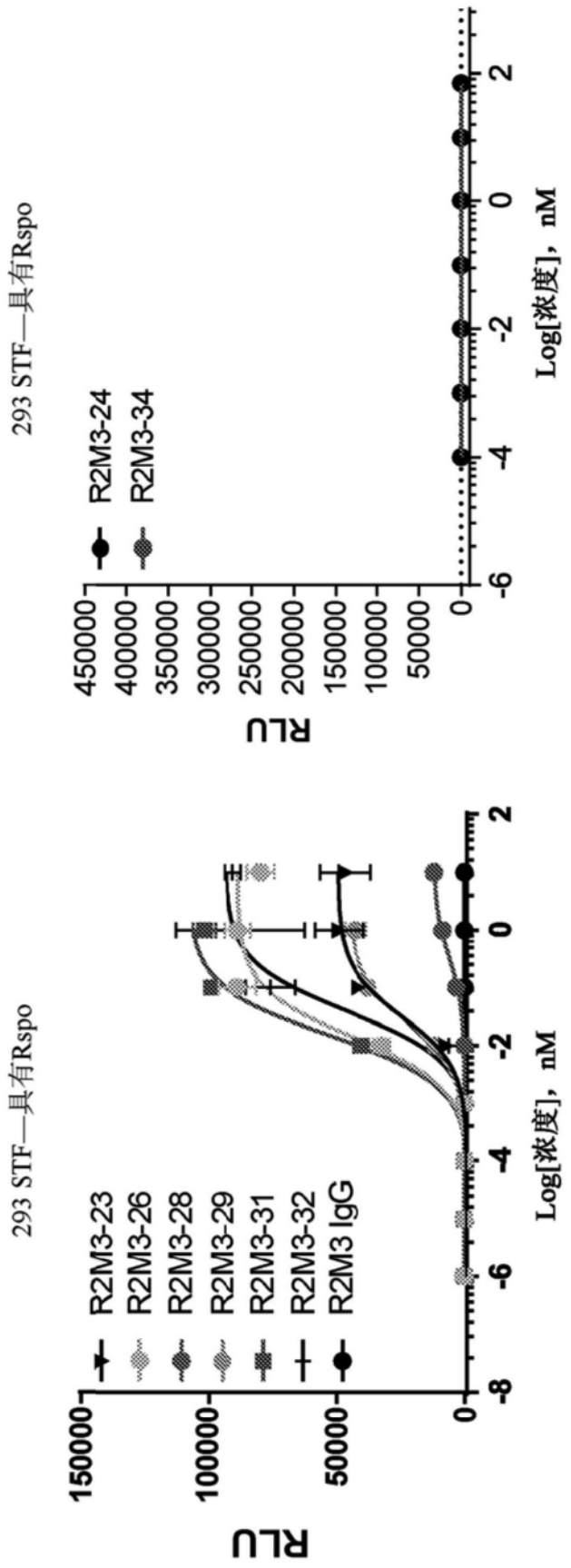

293 STF—具有Rspo
R2M3-24
R2M3-34
RLU
Log[浓度]，nM
293 STF—具有Rspo
R2M3-23
R2M3-26
R2M3-28
R2M3-29
R2M3-31
R2M3-32
R2M3 IgG
RLU
Log[浓度]，nM

图5(续)

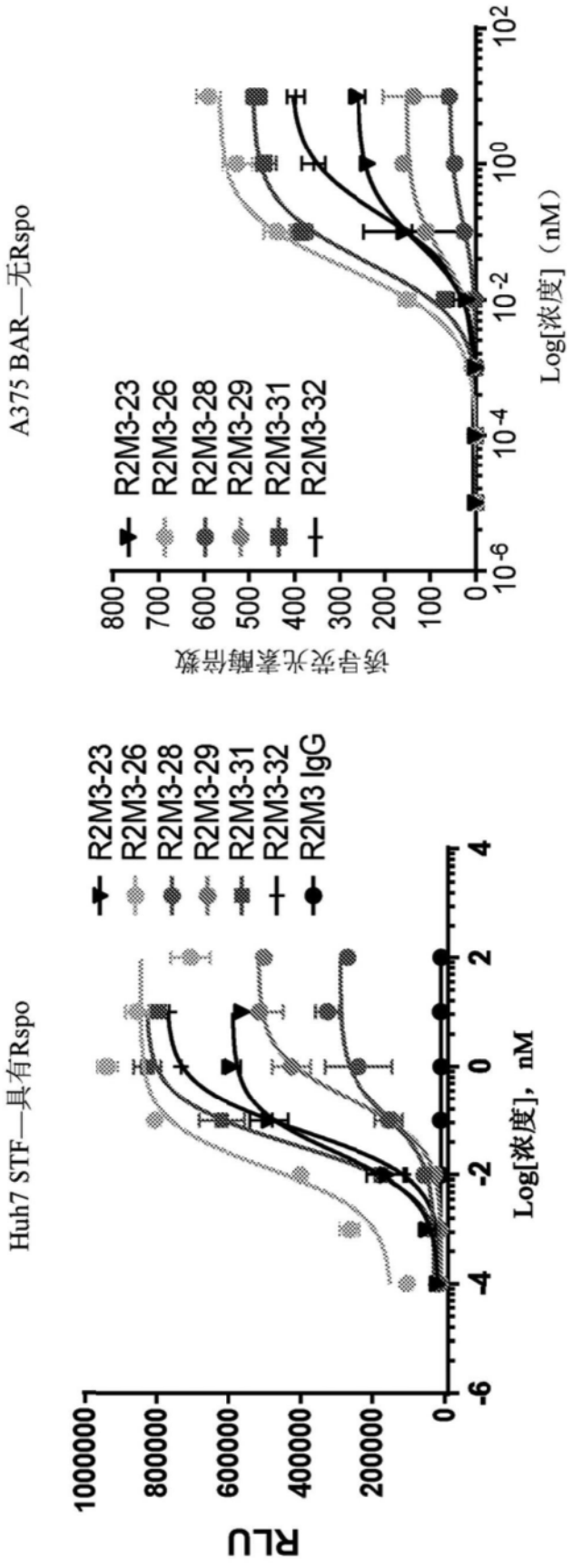

A375 BAR—无Rspo
诱导荧光素酶倍数
R2M3-23
R2M3-26
R2M3-28
R2M3-29
R2M3-31
R2M3-32
Log[浓度]（nM）
Huh7 STF—具有Rspo
RLU
R2M3 IgG
Log[浓度]，nM

图5(续)

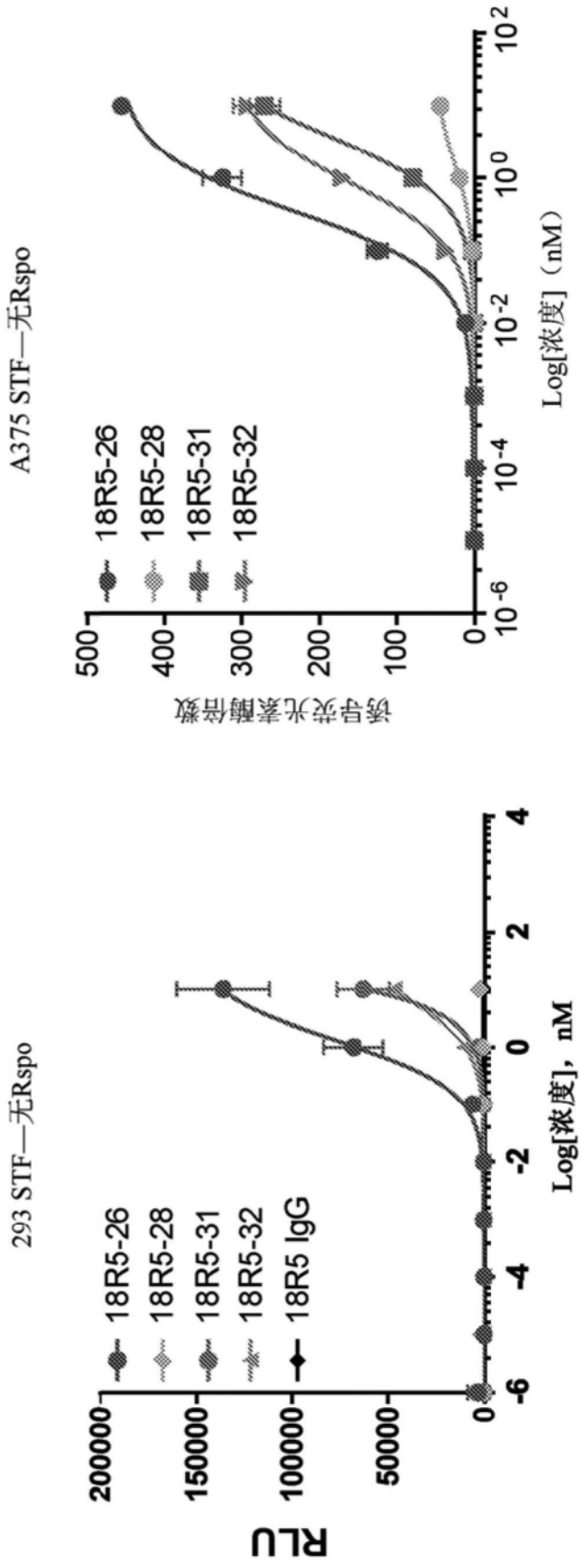

293 STF—无Rspo
RLU
200000
150000
100000
50000
0
18R5-26
18R5-28
18R5-31
18R5-32
18R5 IgG
-6
-4
-2
0
2
4
Log[浓度]，nM
A375 STF—无Rspo
诱导荧光素酶倍数
500
400
300
200
100
0
18R5-26
18R5-28
18R5-31
18R5-32
10^{-6}
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
Log[浓度]（nM）

图6

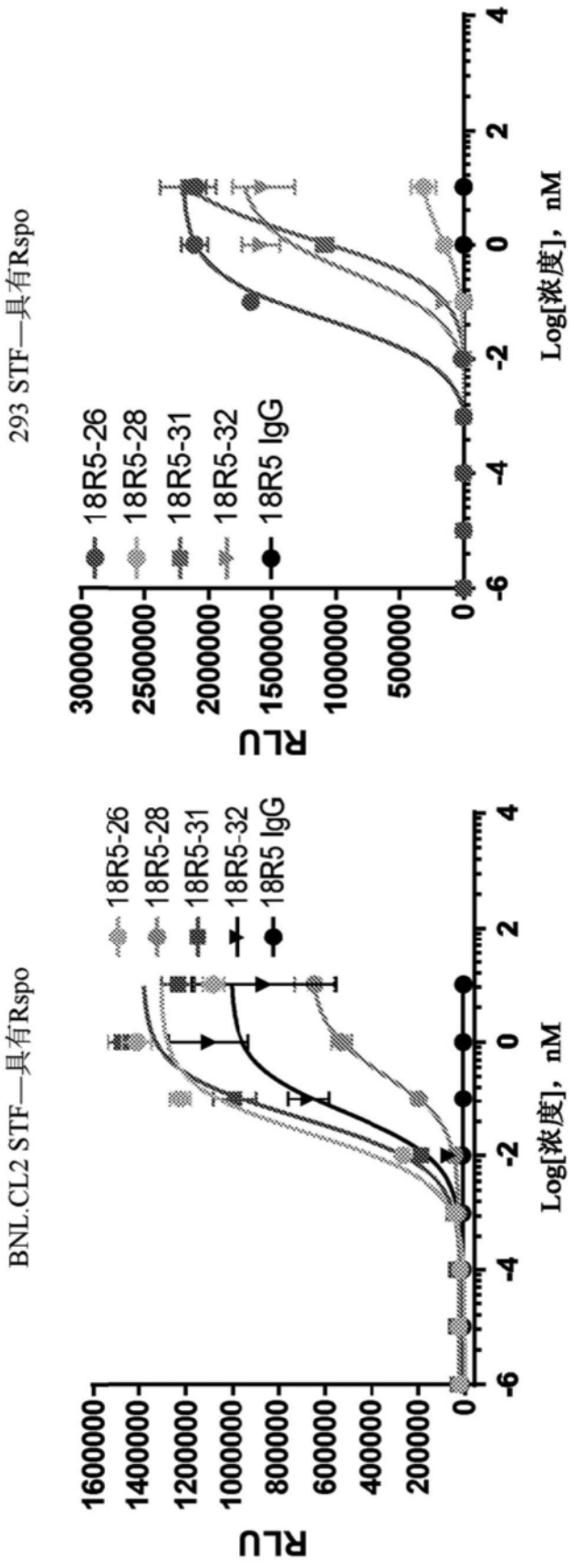

293 STF—具有Rspo
18R5-26
18R5-28
18R5-31
18R5-32
18R5 IgG
RLU
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4
Log[浓度]，nM
BNL.CL2 STF—具有Rspo
18R5-26
18R5-28
18R5-31
18R5-32
18R5 IgG
RLU
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
-6
-4
-2
0
2
4
Log[浓度]，nM

图6(续)

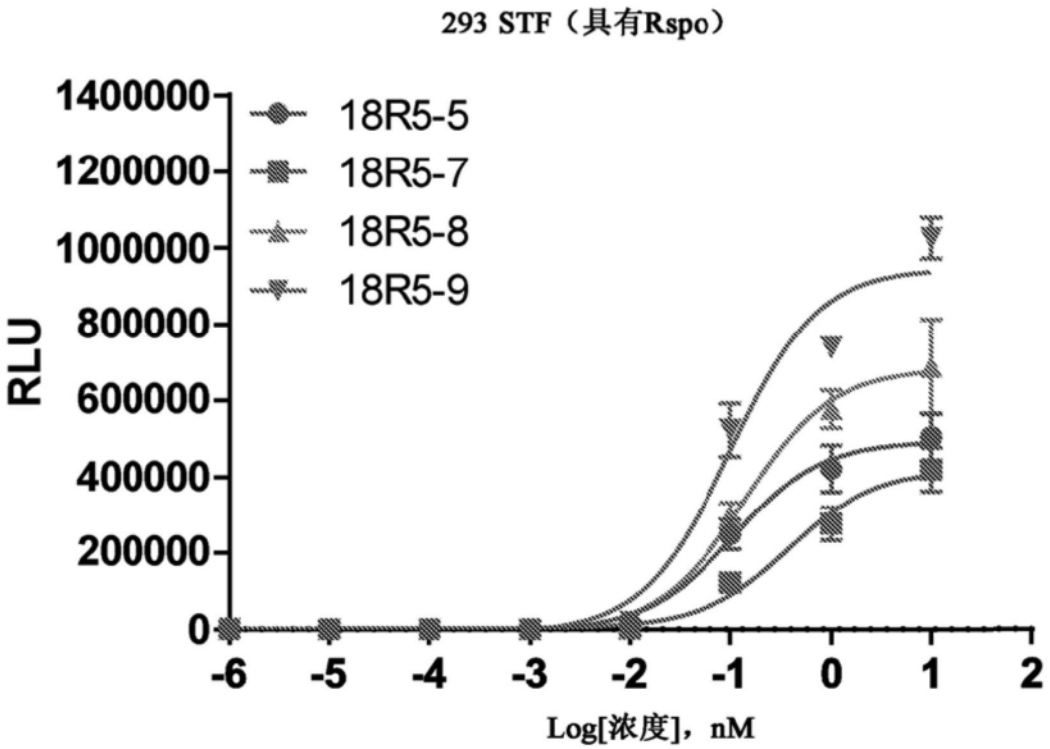

293 STF（具有Rspo）
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
RLU
18R5-5
18R5-7
18R5-8
18R5-9
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log[浓度]，nM

图7

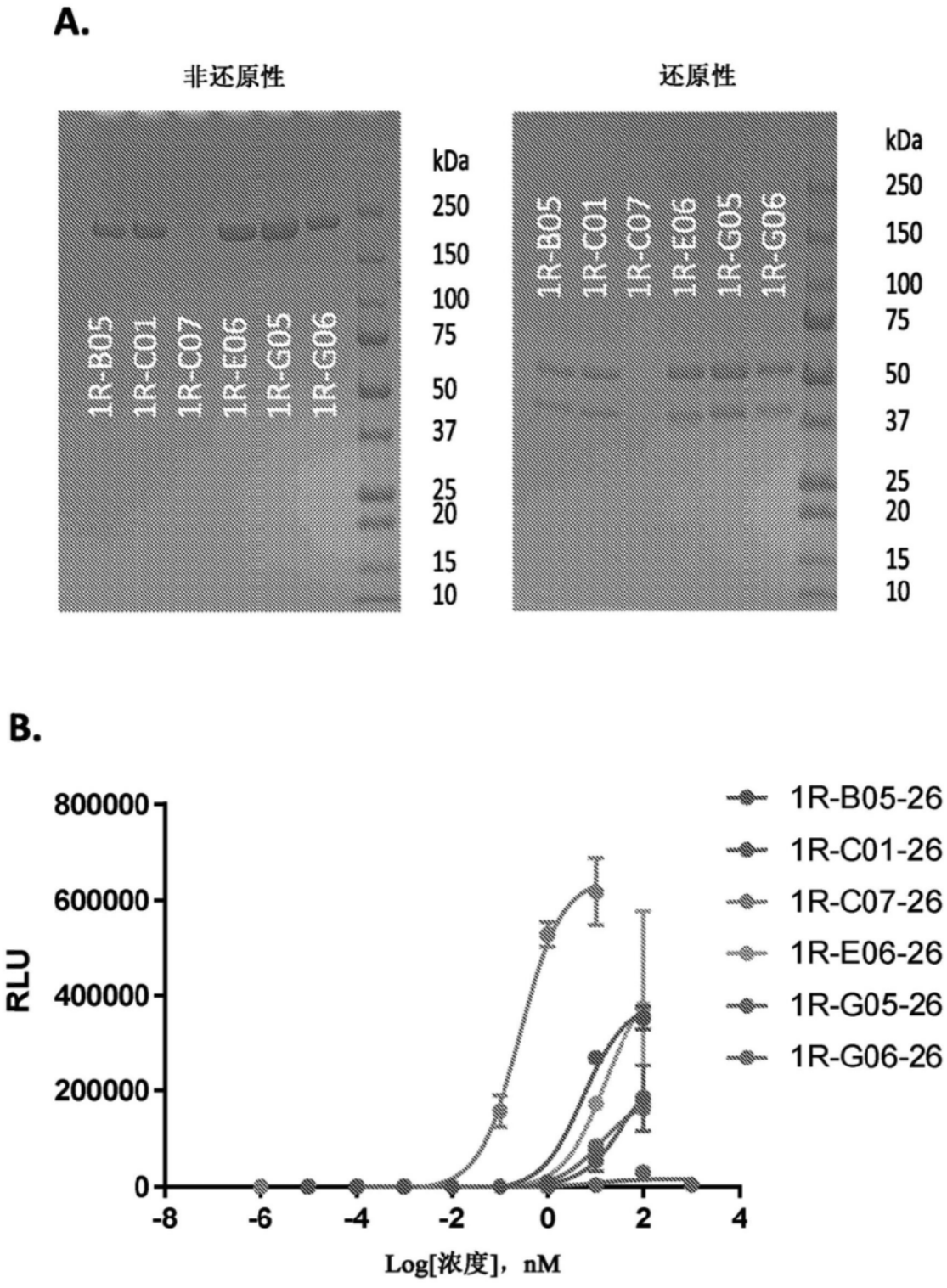

A.
非还原性
还原性
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
1R-B05
1R-C01
1R-C07
1R-E06
1R-G05
1R-G06
B.
RLU
800000
600000
400000
200000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
4
Log[浓度]，nM
1R-B05-26
1R-C01-26
1R-C07-26
1R-E06-26
1R-G05-26
1R-G06-26

图8

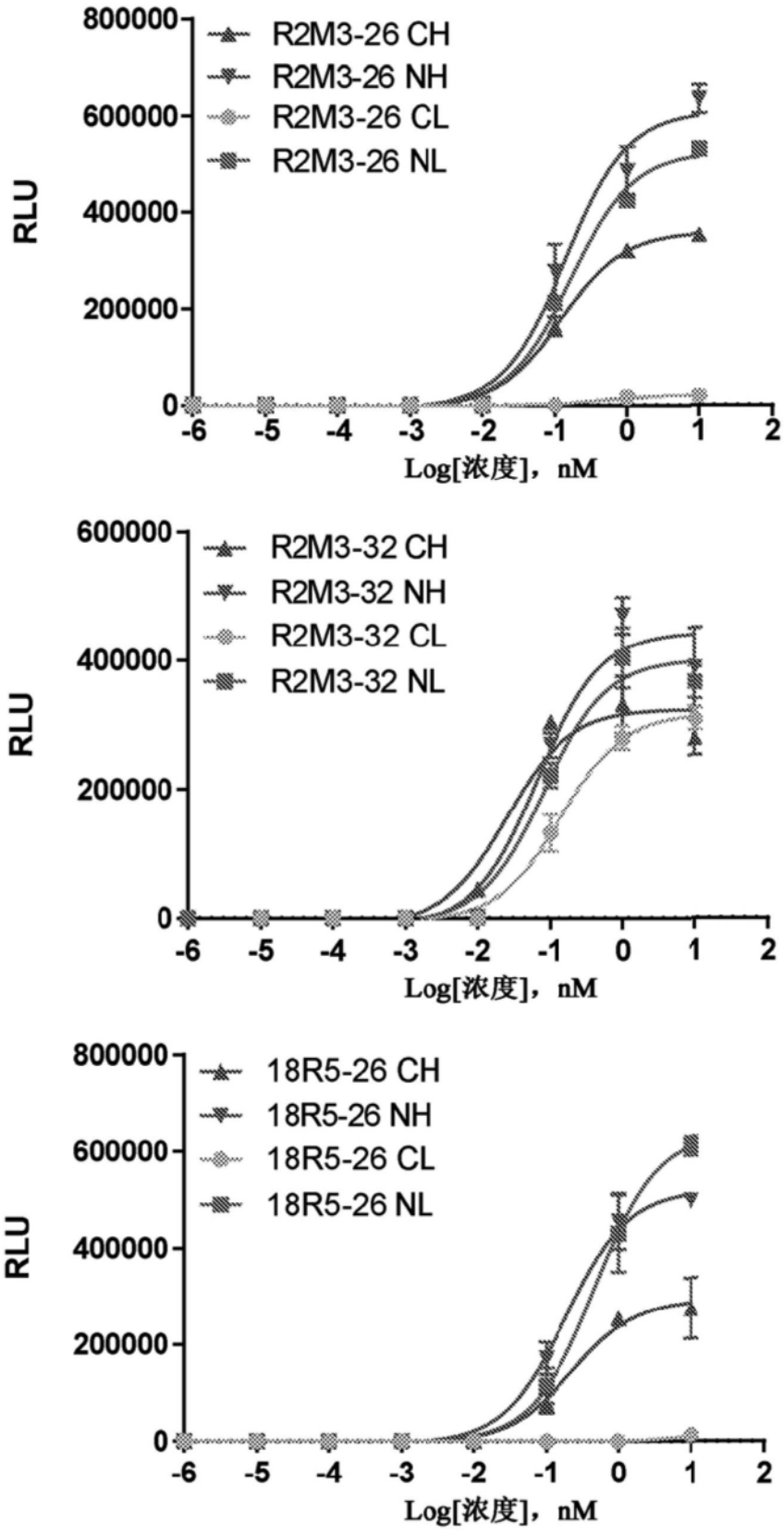

800000
600000
400000
200000
0
RLU
R2M3-26 CH
R2M3-26 NH
R2M3-26 CL
R2M3-26 NL
-6 -5 -4 -3 -2 -1 0 1 2
Log[浓度]，nM
600000
400000
200000
0
RLU
R2M3-32 CH
R2M3-32 NH
R2M3-32 CL
R2M3-32 NL
-6 -5 -4 -3 -2 -1 0 1 2
Log[浓度]，nM
800000
600000
400000
200000
0
RLU
18R5-26 CH
18R5-26 NH
18R5-26 CL
18R5-26 NL
-6 -5 -4 -3 -2 -1 0 1 2
Log[浓度]，nM

图9

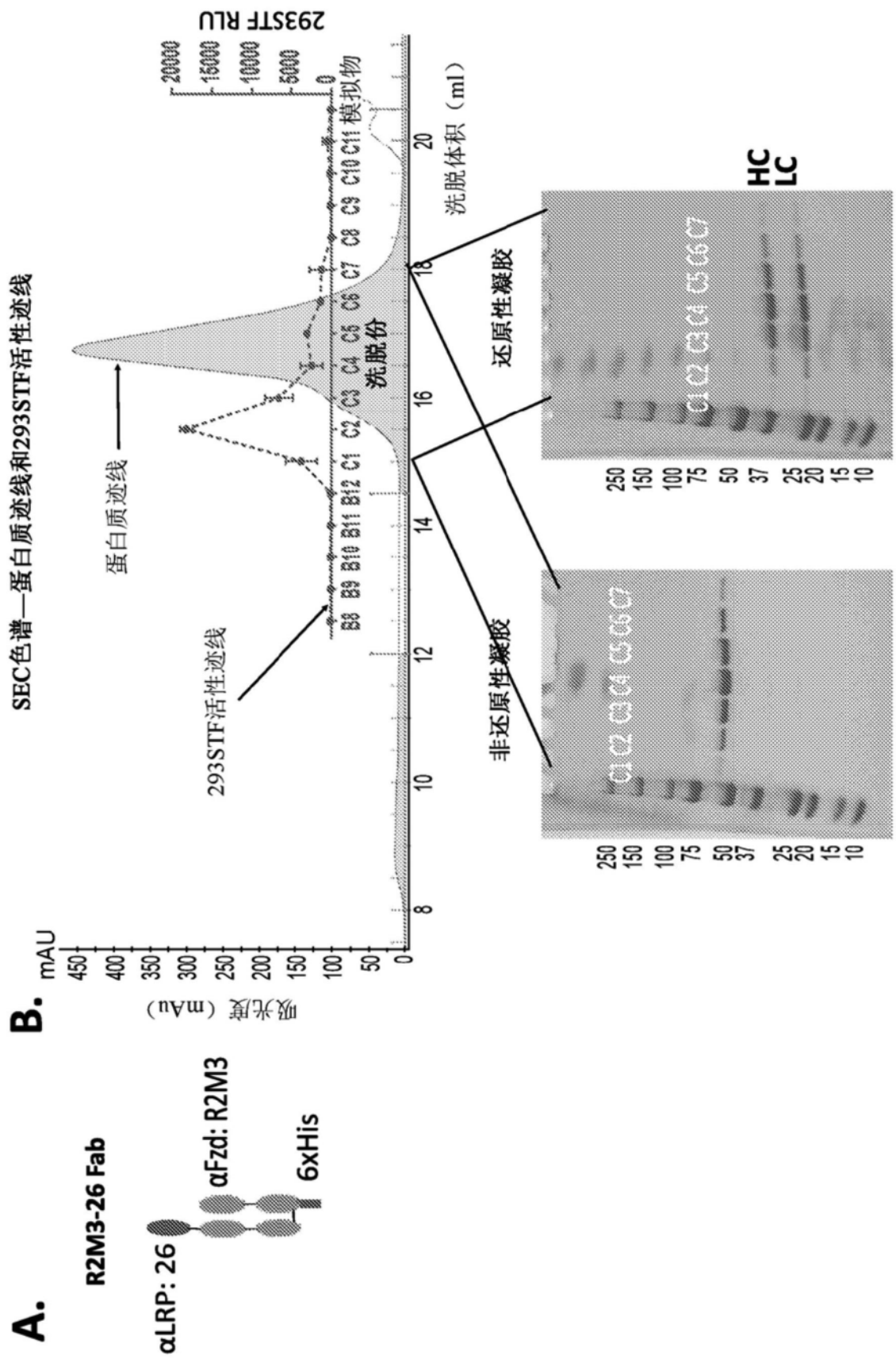

A.
R2M3-26 Fab
αLRP: 26
αFzd: R2M3
6xHis
B.
SEC色谱—蛋白质迹线和293STF活性迹线
mAU
吸光度（mAu）
蛋白质迹线
293STF活性迹线
洗脱份
洗脱体积（ml）
293STF RLU
模拟物
非还原性凝胶
还原性凝胶
HC
LC

图10

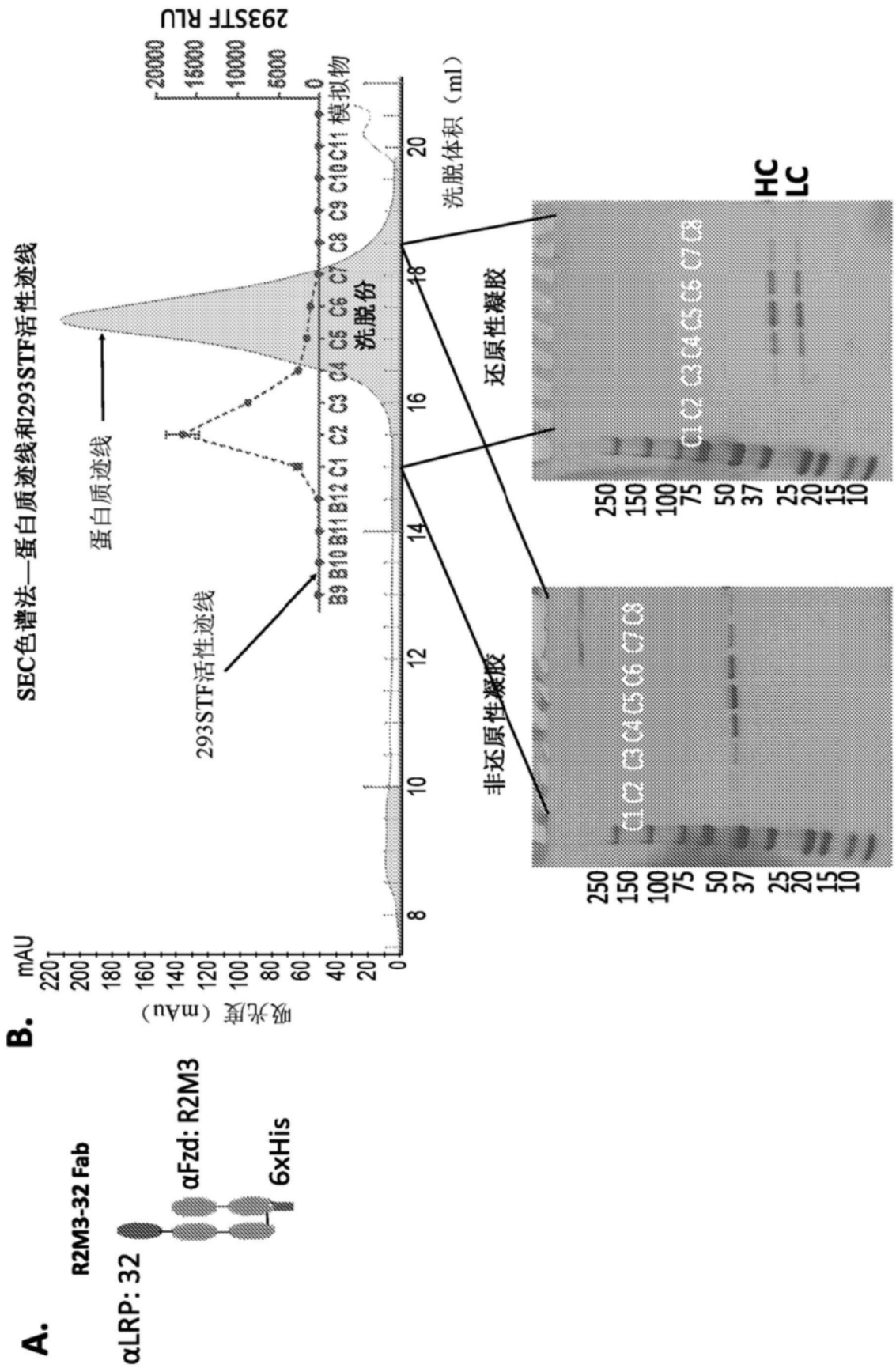

A.
αLRP: 32
R2M3-32 Fab
αFzd: R2M3
6xHis
B.
SEC色谱法—蛋白质迹线和293STF活性迹线
mAU
吸光度（mAu）
蛋白质迹线
293STF活性迹线
293STF RLU
洗脱份
洗脱体积（ml）
模拟物
非还原性凝胶
还原性凝胶
HC
LC
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

图11

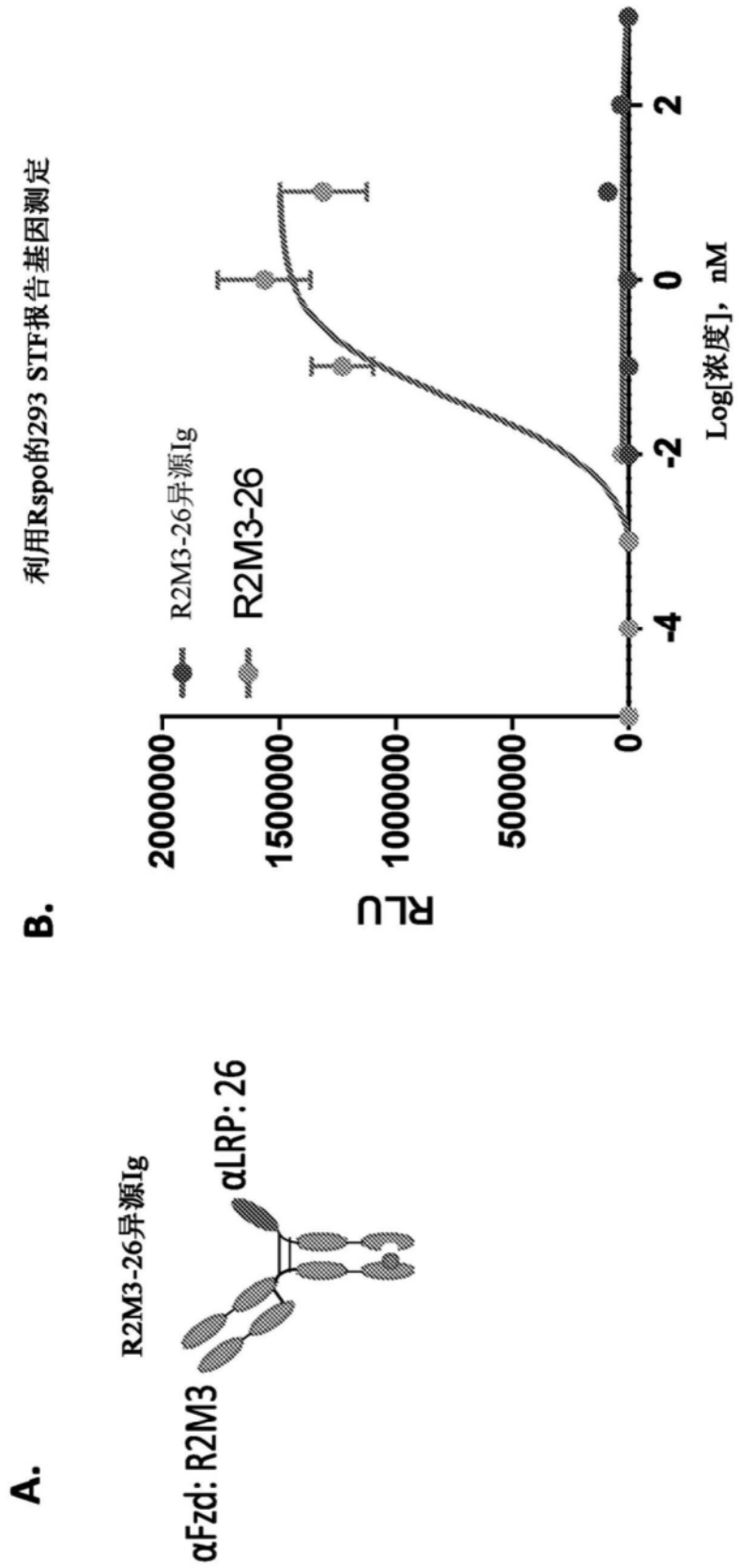

A.
R2M3-26异源Ig
αLRP: 26
αFzd: R2M3
B.
利用Rspo的293 STF报告基因测定
R2M3-26异源Ig
R2M3-26
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
-4
-2
0
2
Log[浓度], nM

图12

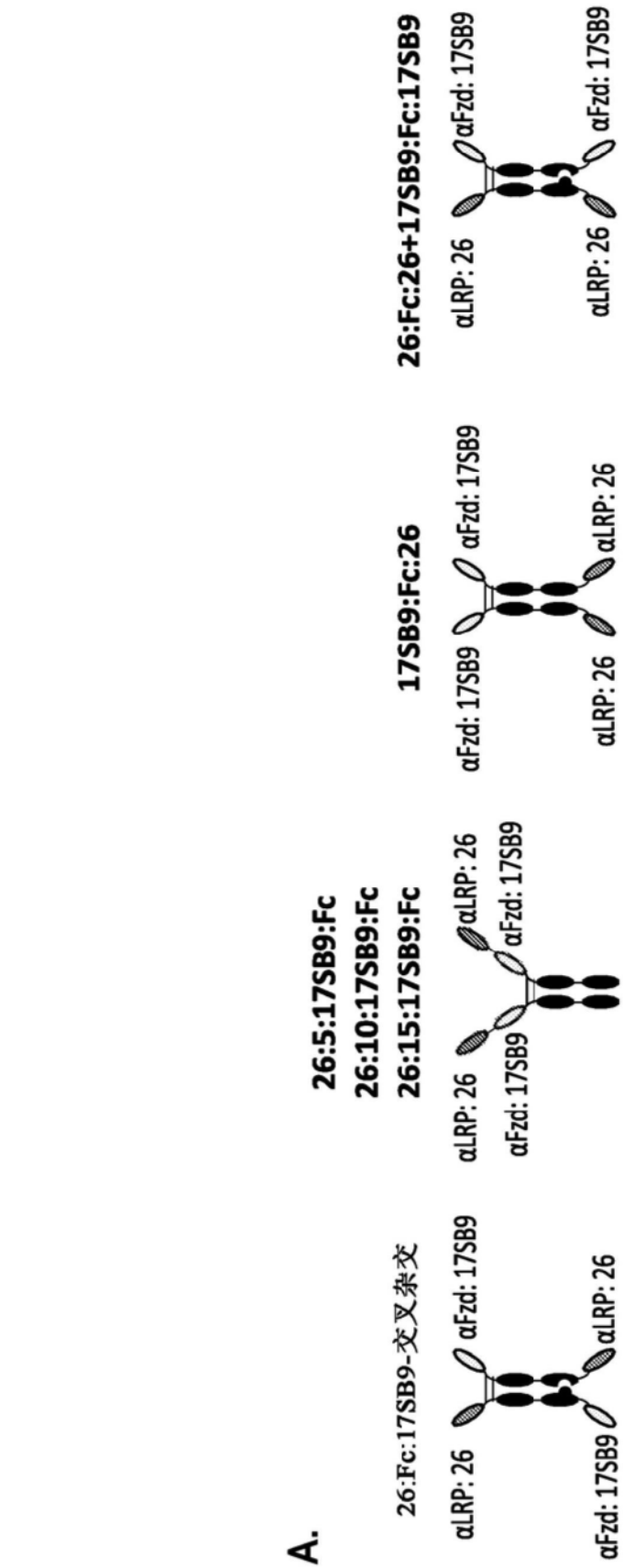

A.
26:Fc:17SB9-交叉杂交
αLRP: 26
αFzd: 17SB9
αFzd: 17SB9
αLRP: 26
26:5:17SB9:Fc
26:10:17SB9:Fc
26:15:17SB9:Fc
αLRP: 26
αFzd: 17SB9
αFzd: 17SB9
αLRP: 26
17SB9:Fc:26
αFzd: 17SB9
αLRP: 26
αLRP: 26
αFzd: 17SB9
26:Fc:26+17SB9:Fc:17SB9
αLRP: 26
αFzd: 17SB9
αFzd: 17SB9
αLRP: 26

图13

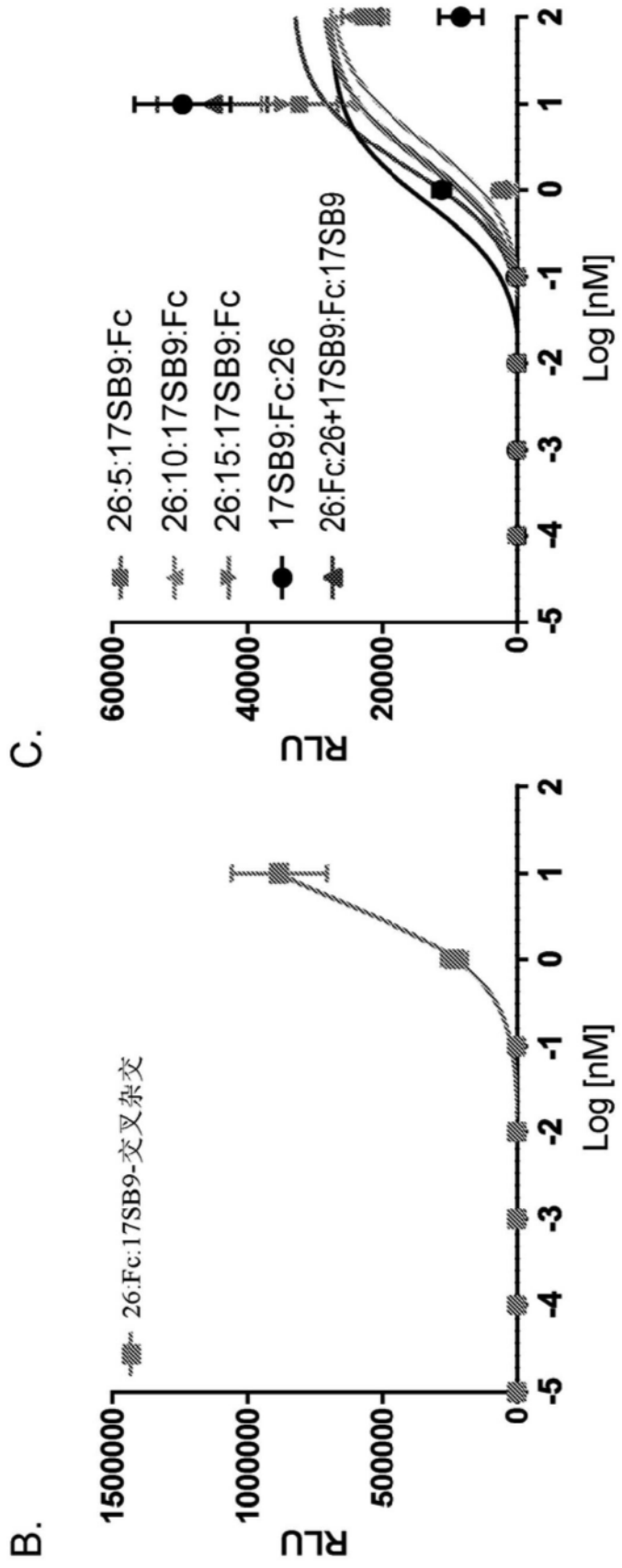

C.
RLU
60000
40000
20000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log [nM]
26:5:17SB9:Fc
26:10:17SB9:Fc
26:15:17SB9:Fc
17SB9:Fc:26
26:Fc:26+17SB9:Fc:17SB9
B.
RLU
1500000
1000000
500000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log [nM]
26:Fc:17SB9-交叉杂交

图13(续)

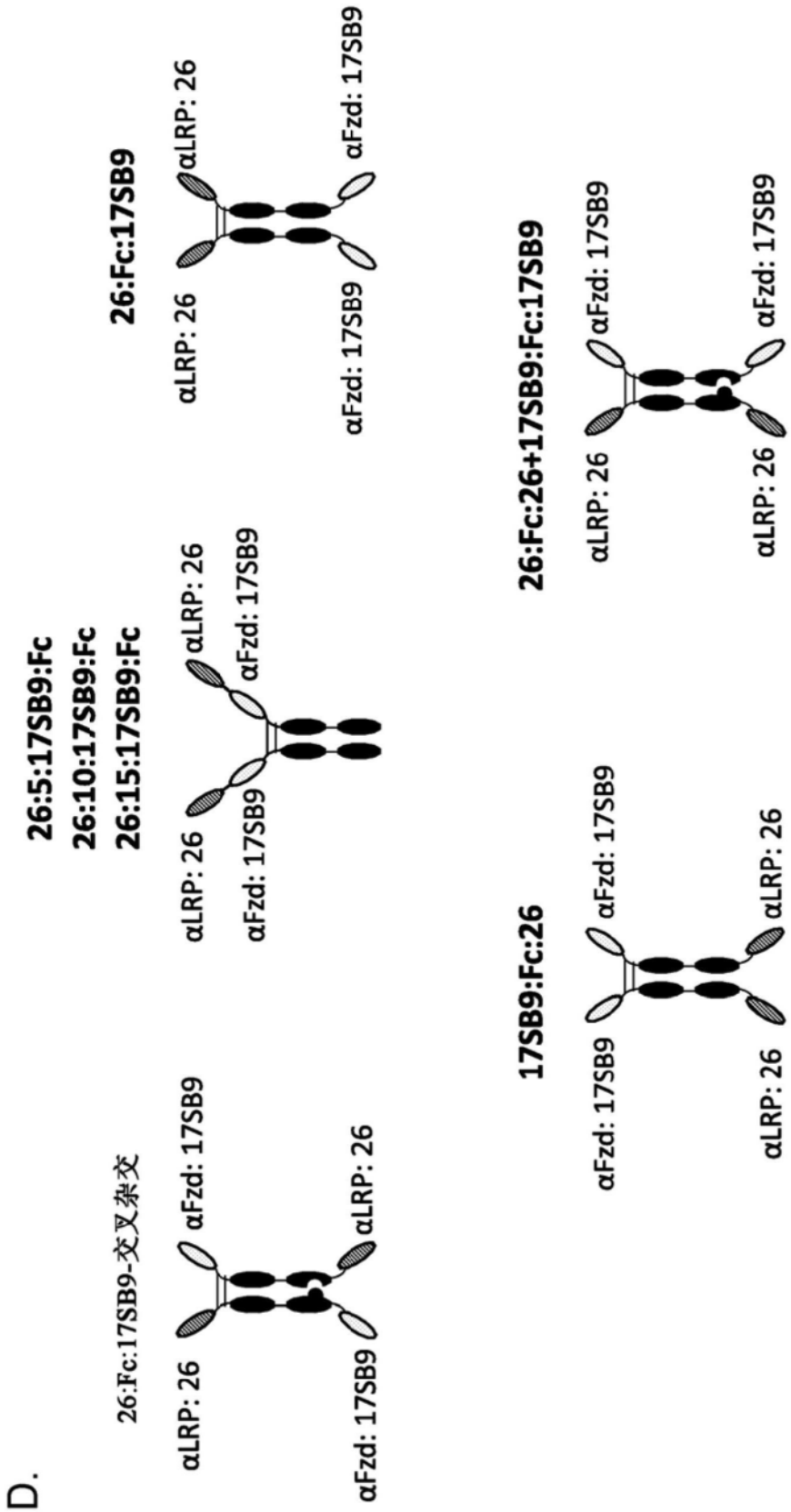

D.
26:Fc:17SB9-交叉杂交
αLRP: 26
αFzd: 17SB9
αFzd: 17SB9
αLRP: 26
26:5:17SB9:Fc
26:10:17SB9:Fc
26:15:17SB9:Fc
αLRP: 26
αFzd: 17SB9
αFzd: 17SB9
αLRP: 26
26:Fc:17SB9
αLRP: 26
αFzd: 17SB9
αFzd: 17SB9
αLRP: 26
17SB9:Fc:26
αFzd: 17SB9
αLRP: 26
αLRP: 26
αFzd: 17SB9
26:Fc:26+17SB9:Fc:17SB9
αLRP: 26
αFzd: 17SB9
αFzd: 17SB9
αLRP: 26

图13(续)

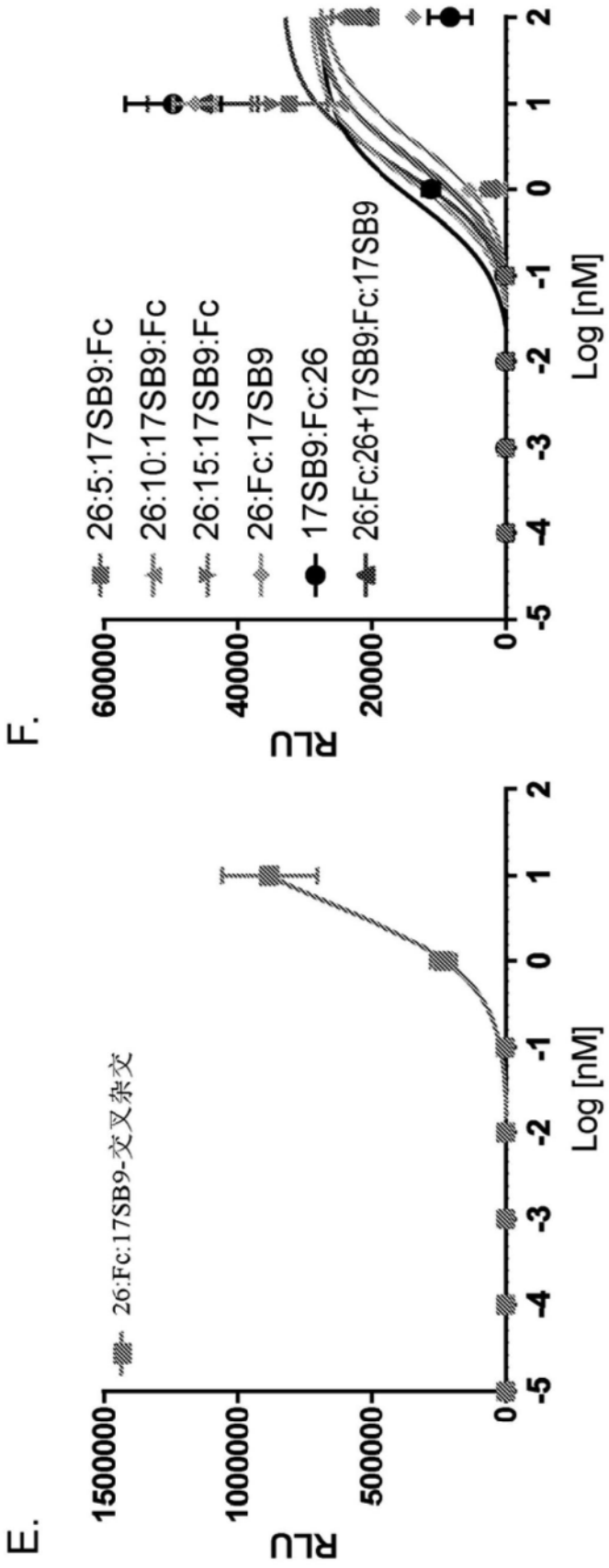

F.
RLU
60000
40000
20000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log [nM]
26:5:17SB9:Fc
26:10:17SB9:Fc
26:15:17SB9:Fc
26:Fc:17SB9
17SB9:Fc:26
26:Fc:26+17SB9:Fc:17SB9
E.
RLU
1500000
1000000
500000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log [nM]
26:Fc:17SB9-交叉杂交

图13(续)

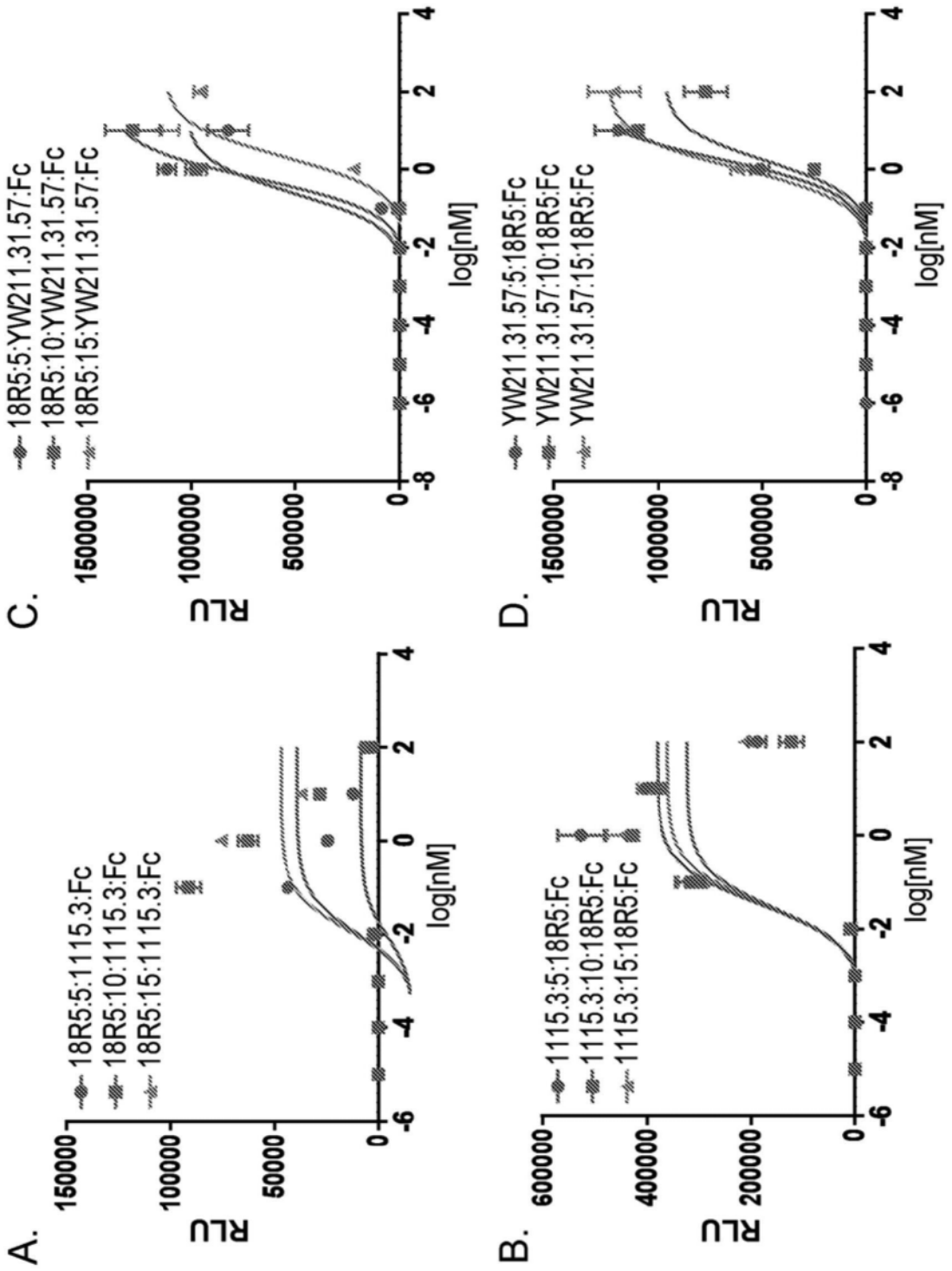

A.
18R5:5:1115.3:Fc
18R5:10:1115.3:Fc
18R5:15:1115.3:Fc
RLU
log[nM]
B.
1115.3:5:18R5:Fc
1115.3:10:18R5:Fc
1115.3:15:18R5:Fc
RLU
log[nM]
C.
18R5:5:YW211.31.57:Fc
18R5:10:YW211.31.57:Fc
18R5:15:YW211.31.57:Fc
RLU
log[nM]
D.
YW211.31.57:5:18R5:Fc
YW211.31.57:10:18R5:Fc
YW211.31.57:15:18R5:Fc
RLU
log[nM]

图14

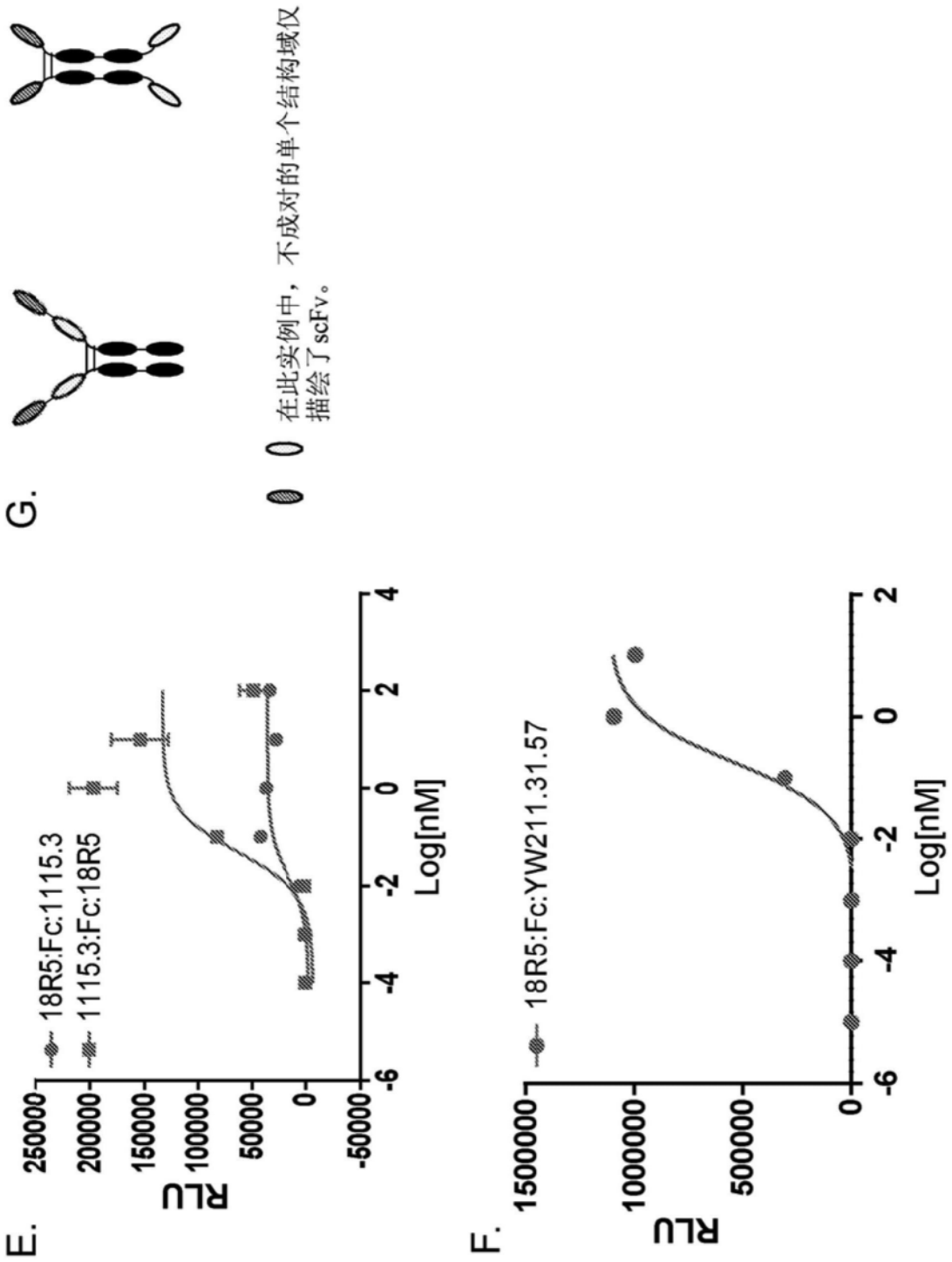

G.
在此实例中，不成对的单个结构域仅描绘了scFv。
E.
18R5:Fc:1115.3
1115.3:Fc:18R5
RLU
Log[nM]
F.
18R5:Fc:YW211.31.57
RLU
Log[nM]

图14(续)

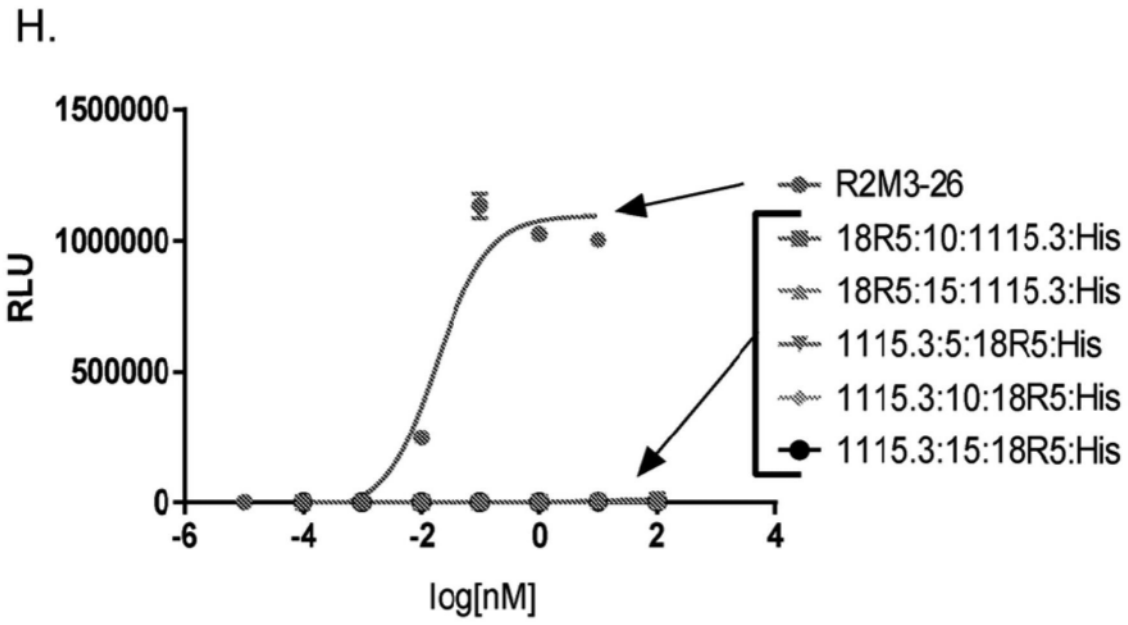

H.
1500000
1000000
500000
0
RLU
-6
-4
-2
0
2
4
log[nM]
R2M3-26
18R5:10:1115.3:His
18R5:15:1115.3:His
1115.3:5:18R5:His
1115.3:10:18R5:His
1115.3:15:18R5:His

图14(续)

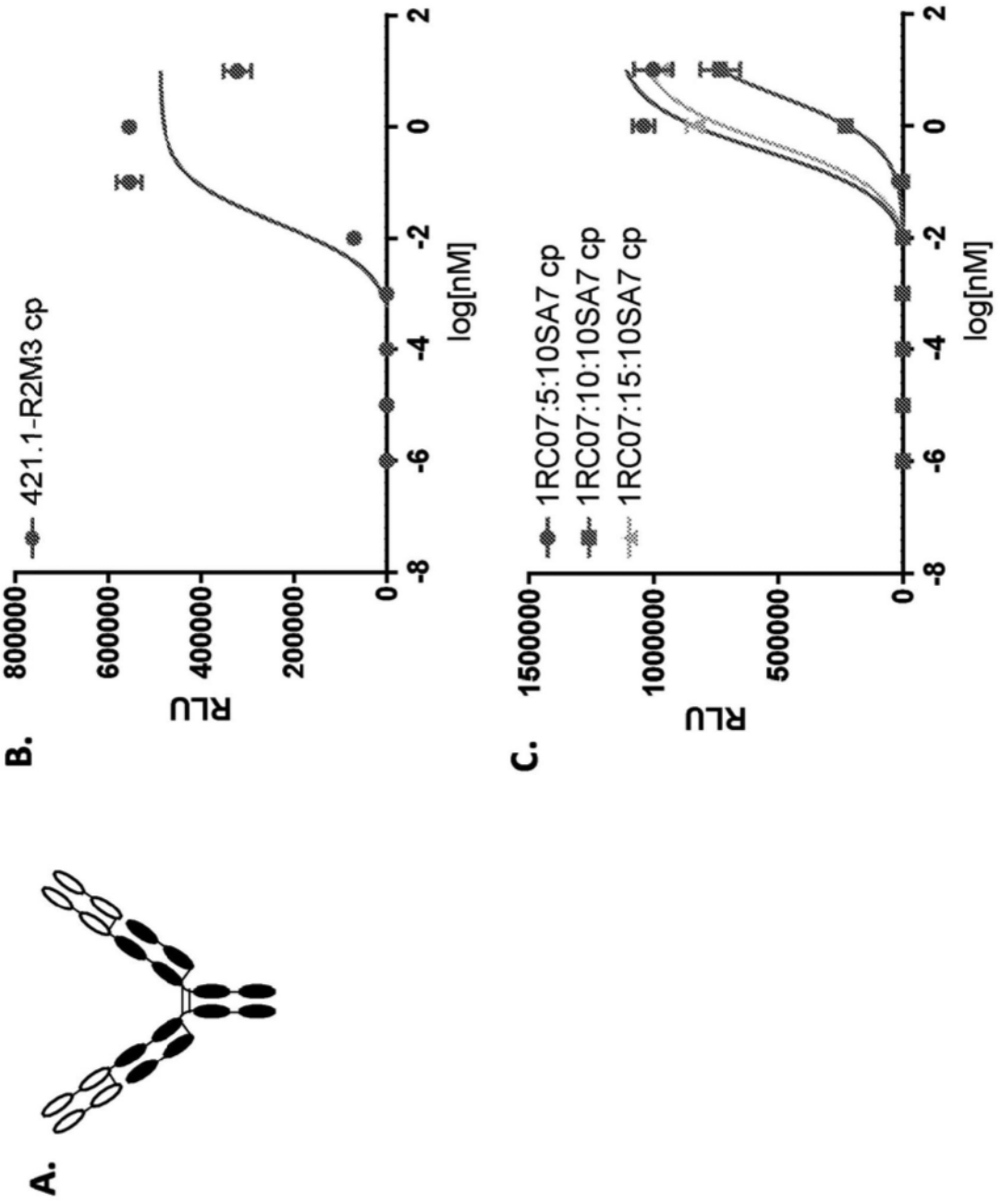

A.
B.
421.1-R2M3 cp
RLU
800000
600000
400000
200000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
log[nM]
C.
1RC07:5:10SA7 cp
1RC07:10:10SA7 cp
1RC07:15:10SA7 cp
RLU
1500000
1000000
500000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
log[nM]

图15

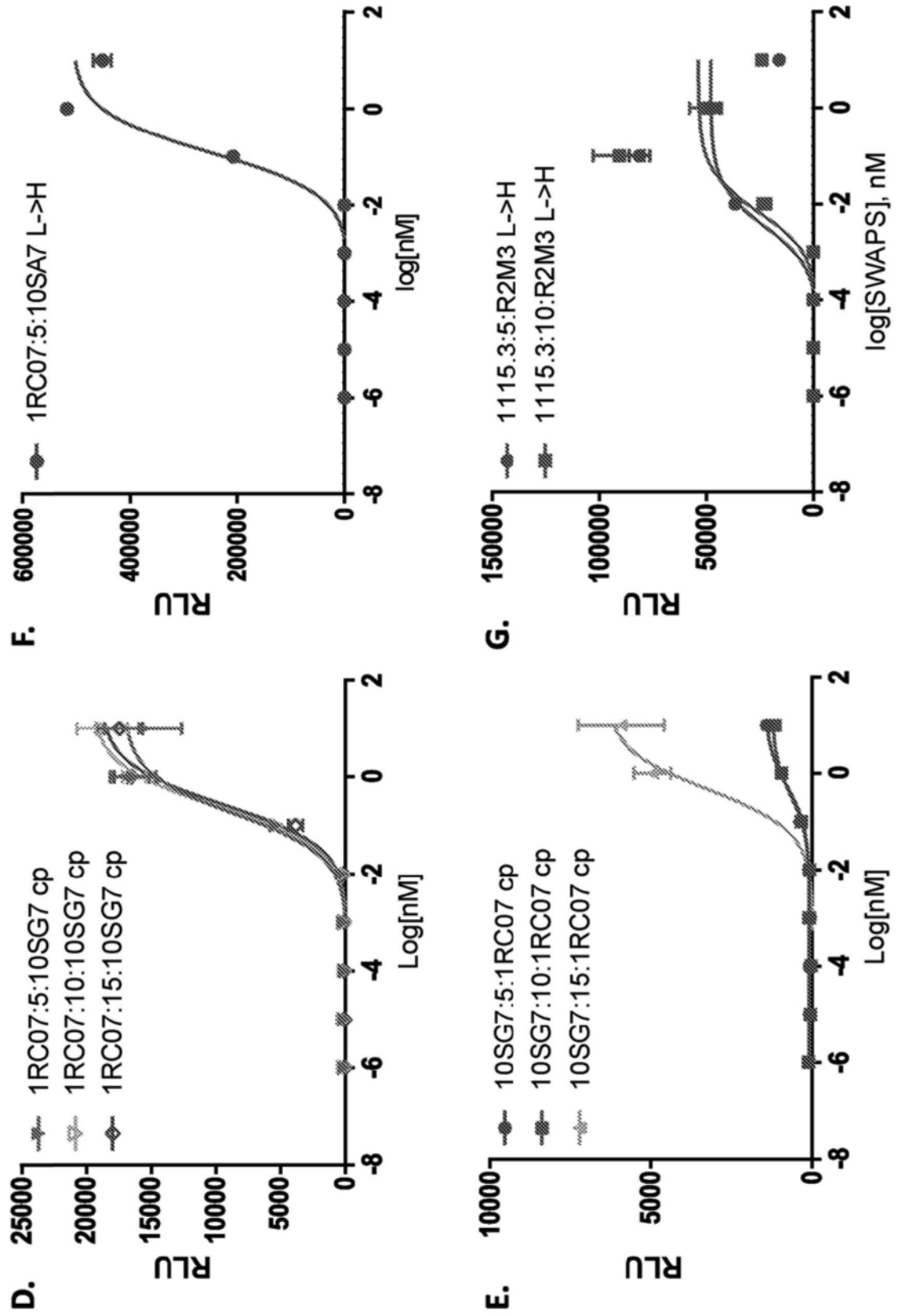

D.
1RC07:5:10SG7 cp
1RC07:10:10SG7 cp
1RC07:15:10SG7 cp
RLU
Log[nM]
F.
1RC07:5:10SA7 L->H
RLU
log[nM]
E.
10SG7:5:1RC07 cp
10SG7:10:1RC07 cp
10SG7:15:1RC07 cp
RLU
Log[nM]
G.
1115.3:5:R2M3 L->H
1115.3:10:R2M3 L->H
RLU
log[SWAPS], nM

图15(续)

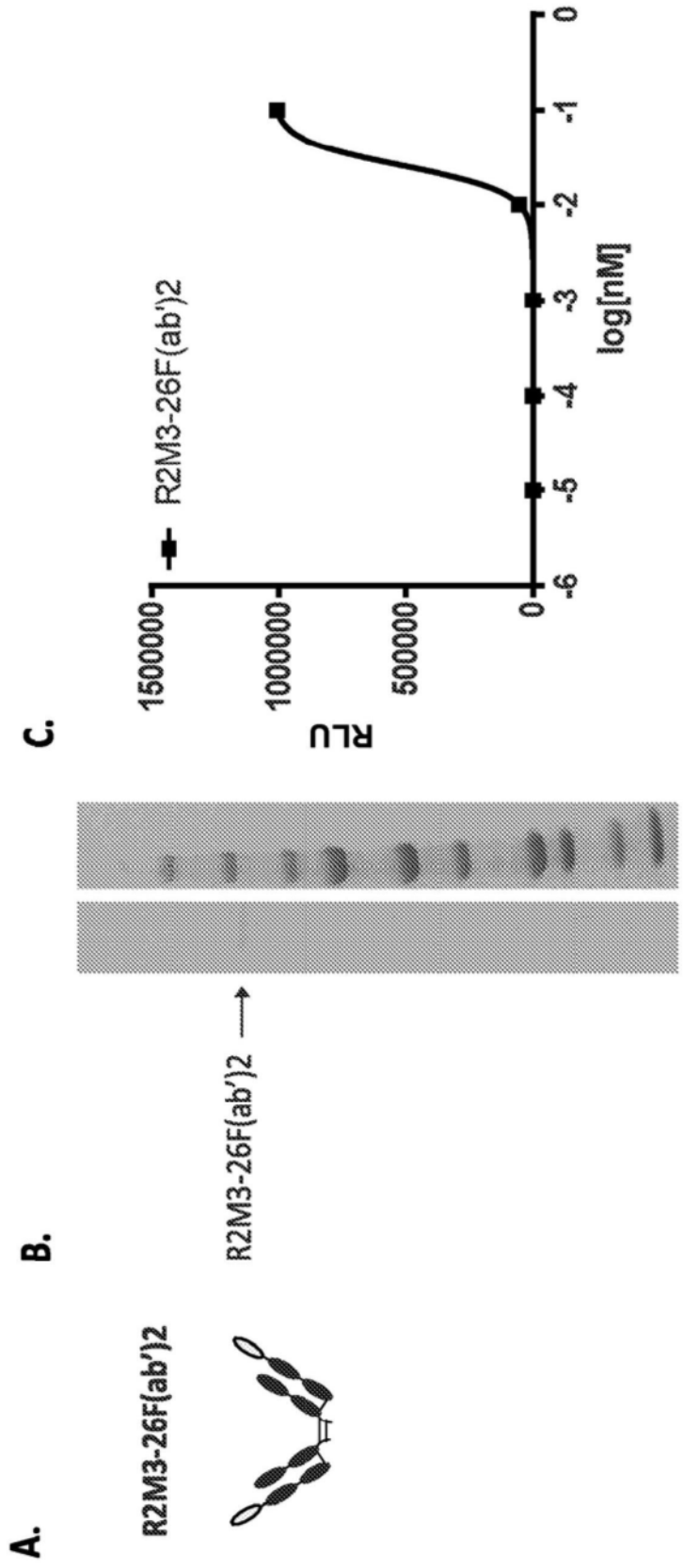

A.
R2M3-26F(ab')2
B.
R2M3-26F(ab')2
C.
R2M3-26F(ab')2
RLU
1500000
1000000
500000
0
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
log[nM]

图16

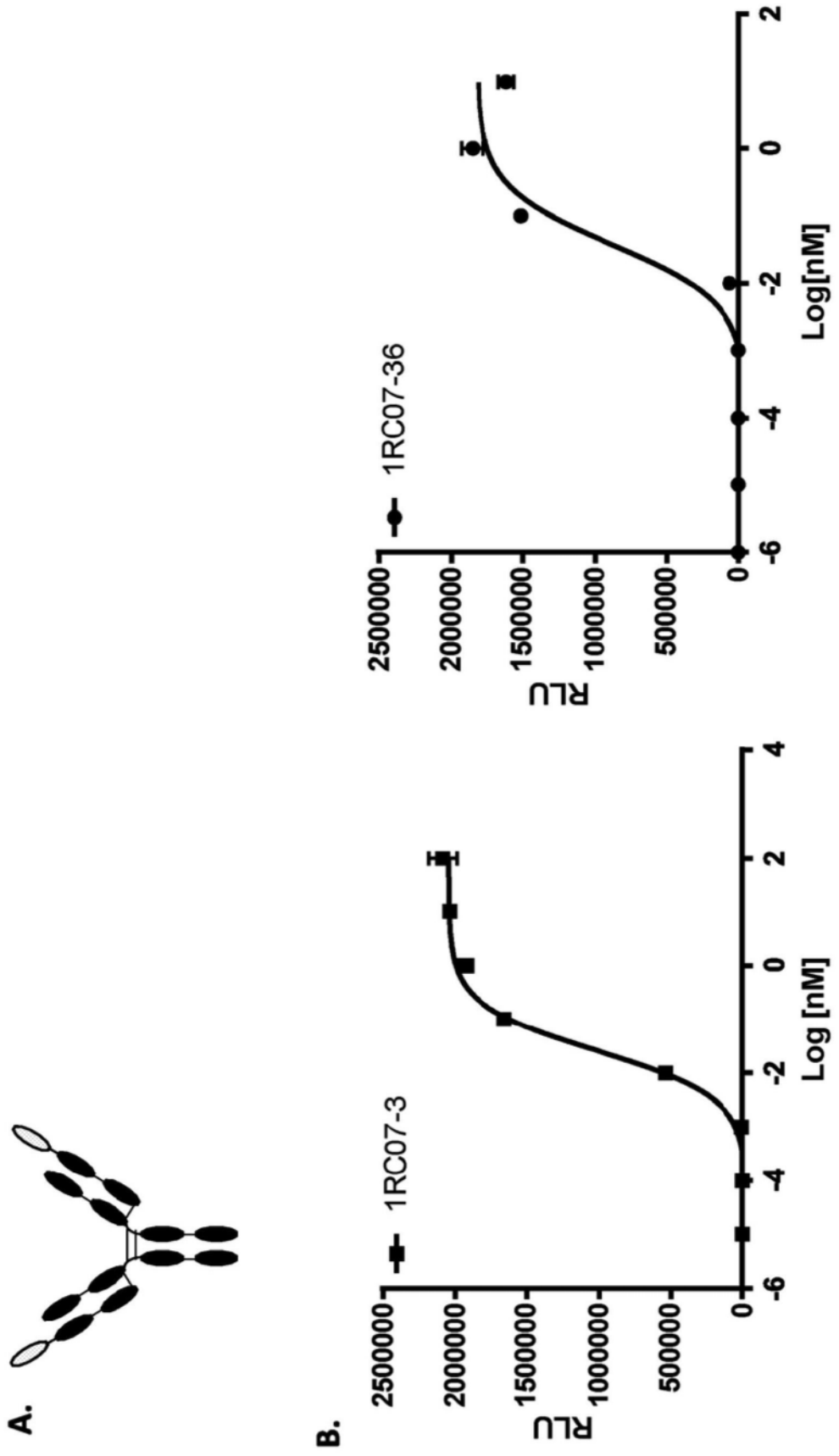

A.
B.
1RC07-3
1RC07-36
RLU
Log [nM]
Log[nM]
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
-6
-4
-2
0
2
4

图17

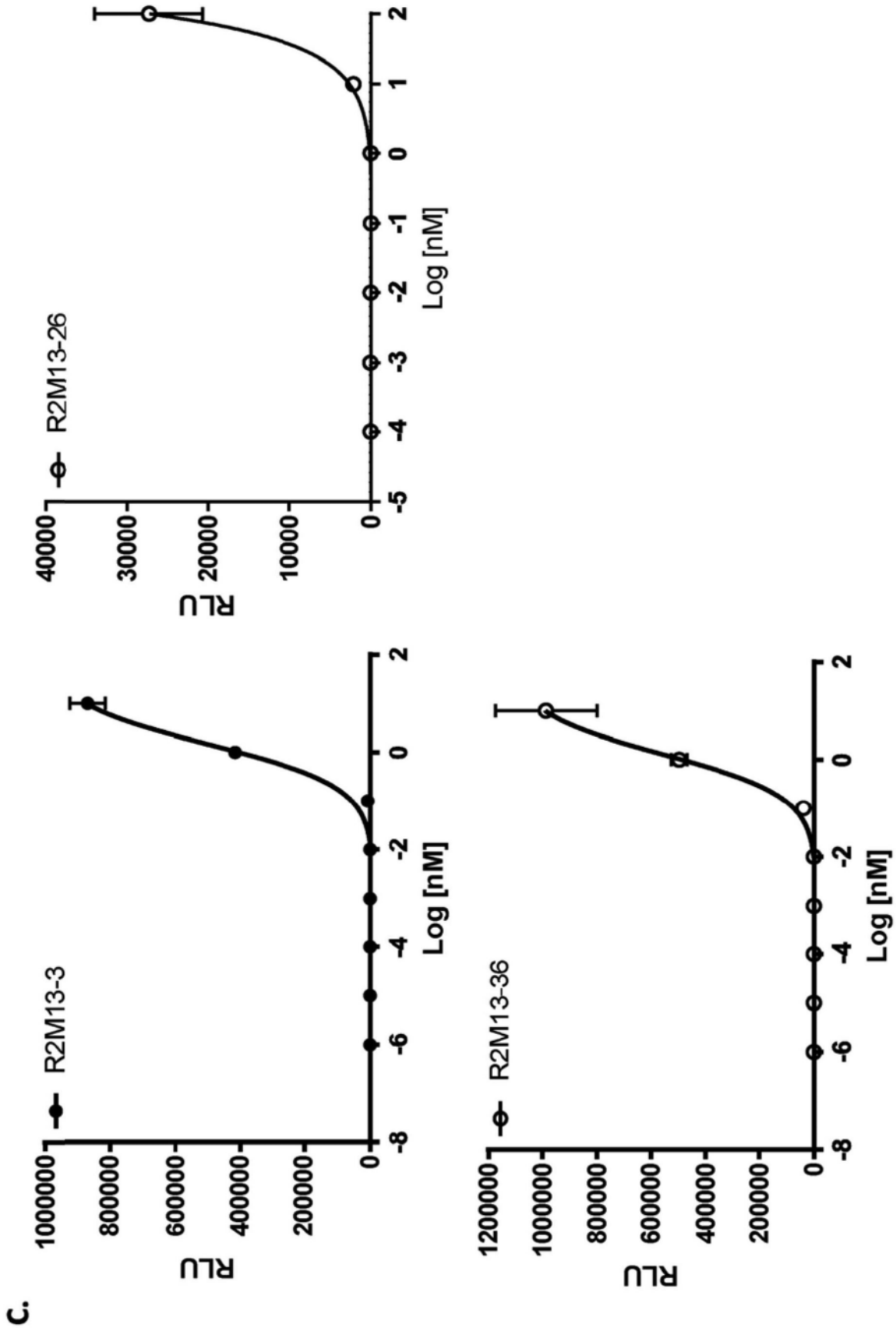


图17(续)

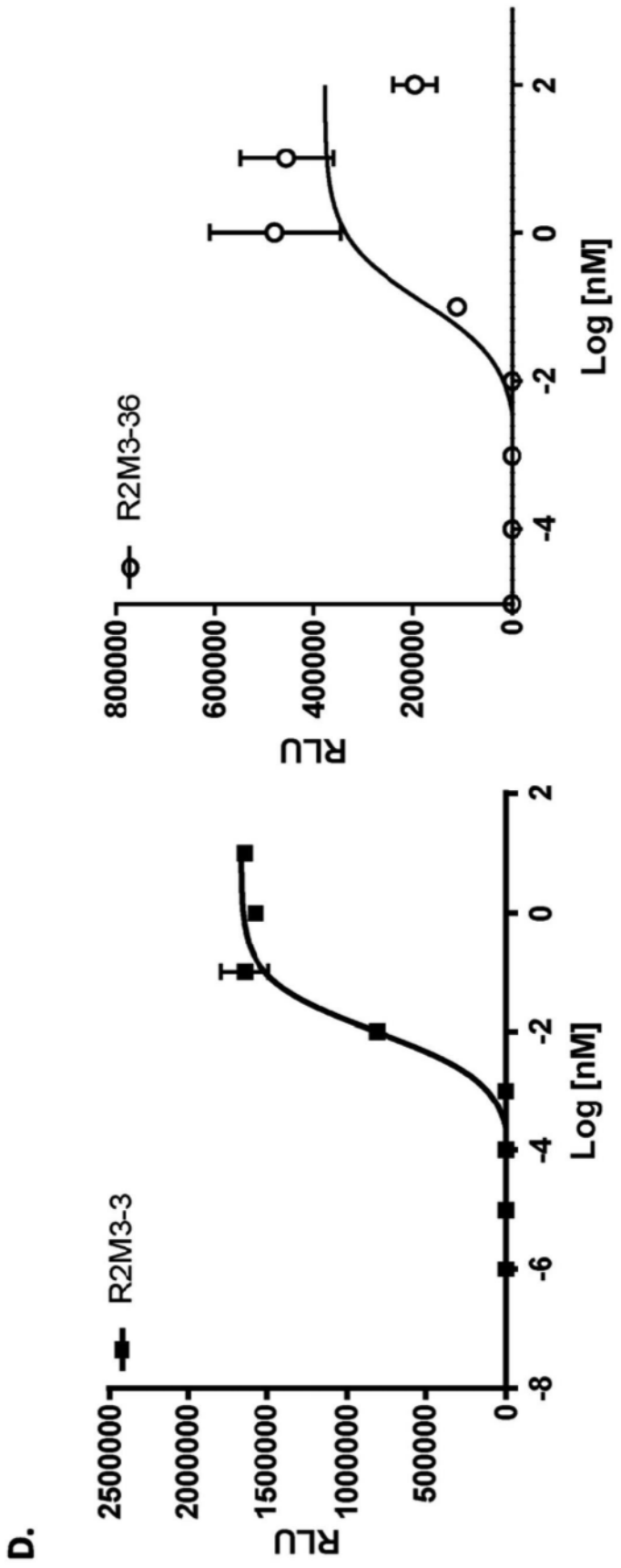

D.
R2M3-3
RLU
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
Log [nM]
R2M3-36
RLU
800000
600000
400000
200000
0
-4
-2
0
2
Log [nM]

图17(续)

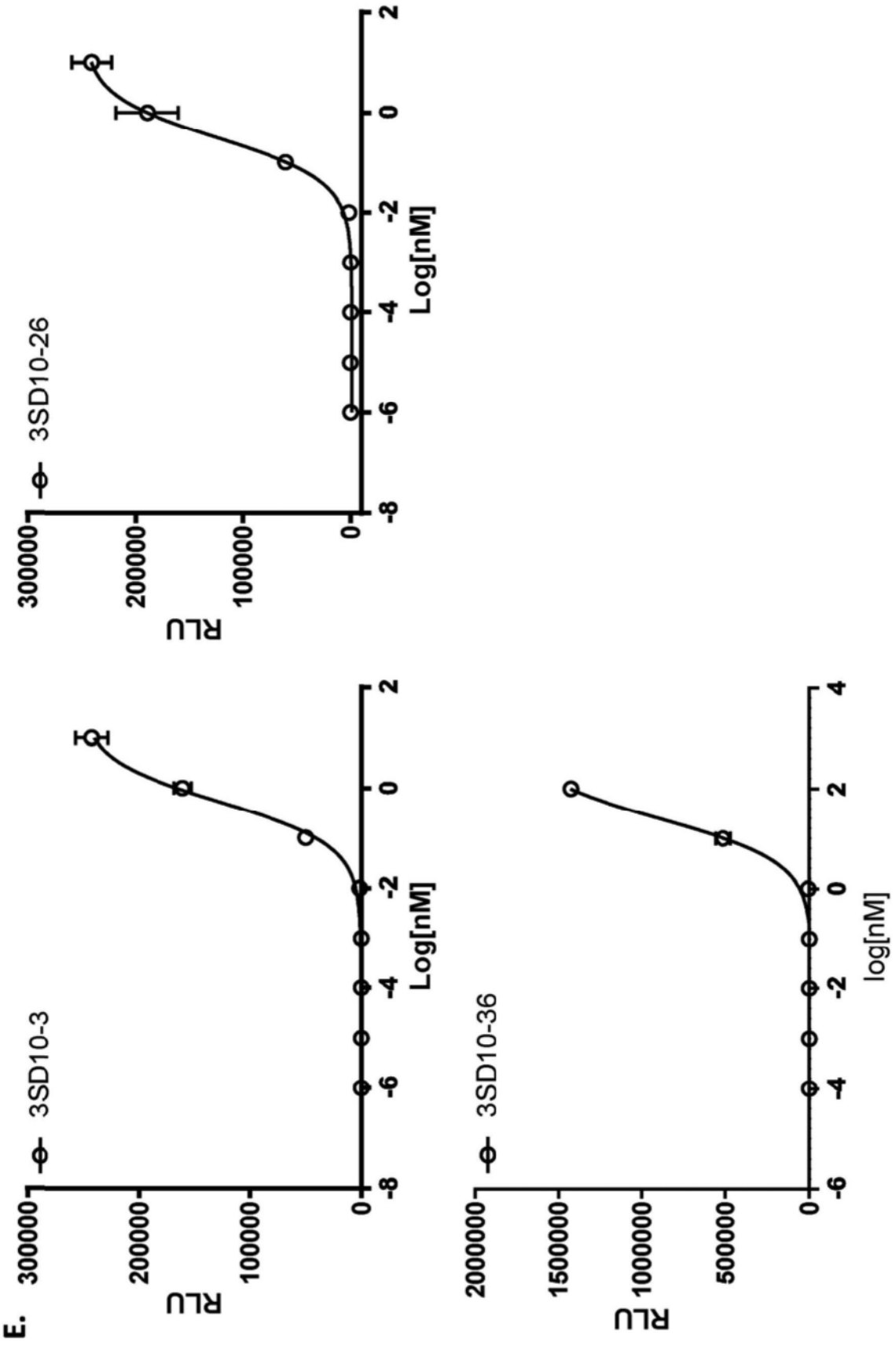

E.
3SD10-3
3SD10-26
3SD10-36
RLU
Log[nM]
log[nM]
300000
200000
100000
0
2000000
1500000
1000000
500000
2
0
-2
-4
-6
-8
4

图17(续)

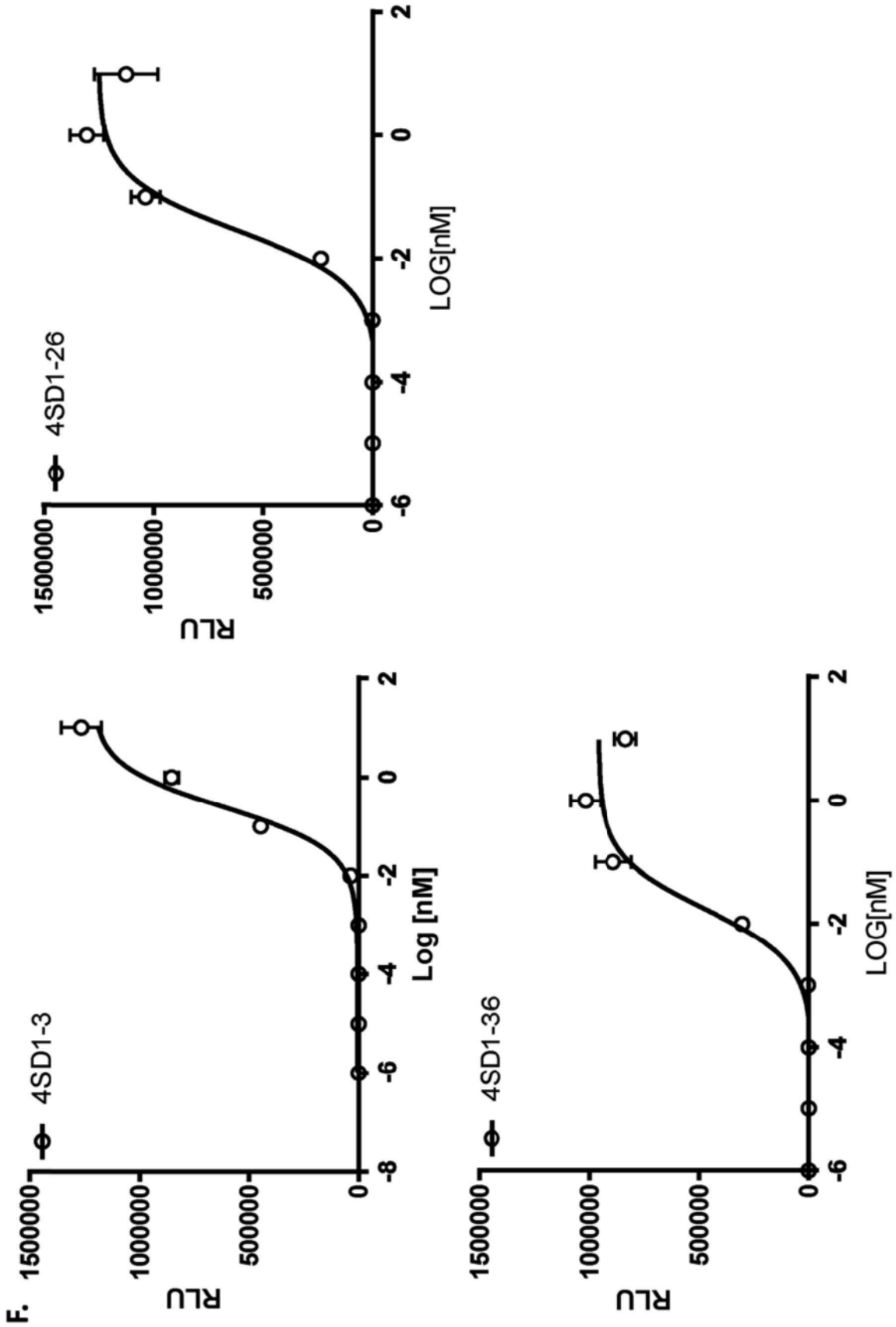

F.
4SD1-3
4SD1-26
4SD1-36
RLU
Log [nM]
LOG[nM]
1500000
1000000
500000
0
2
0
-2
-4
-6
-8

图17(续)

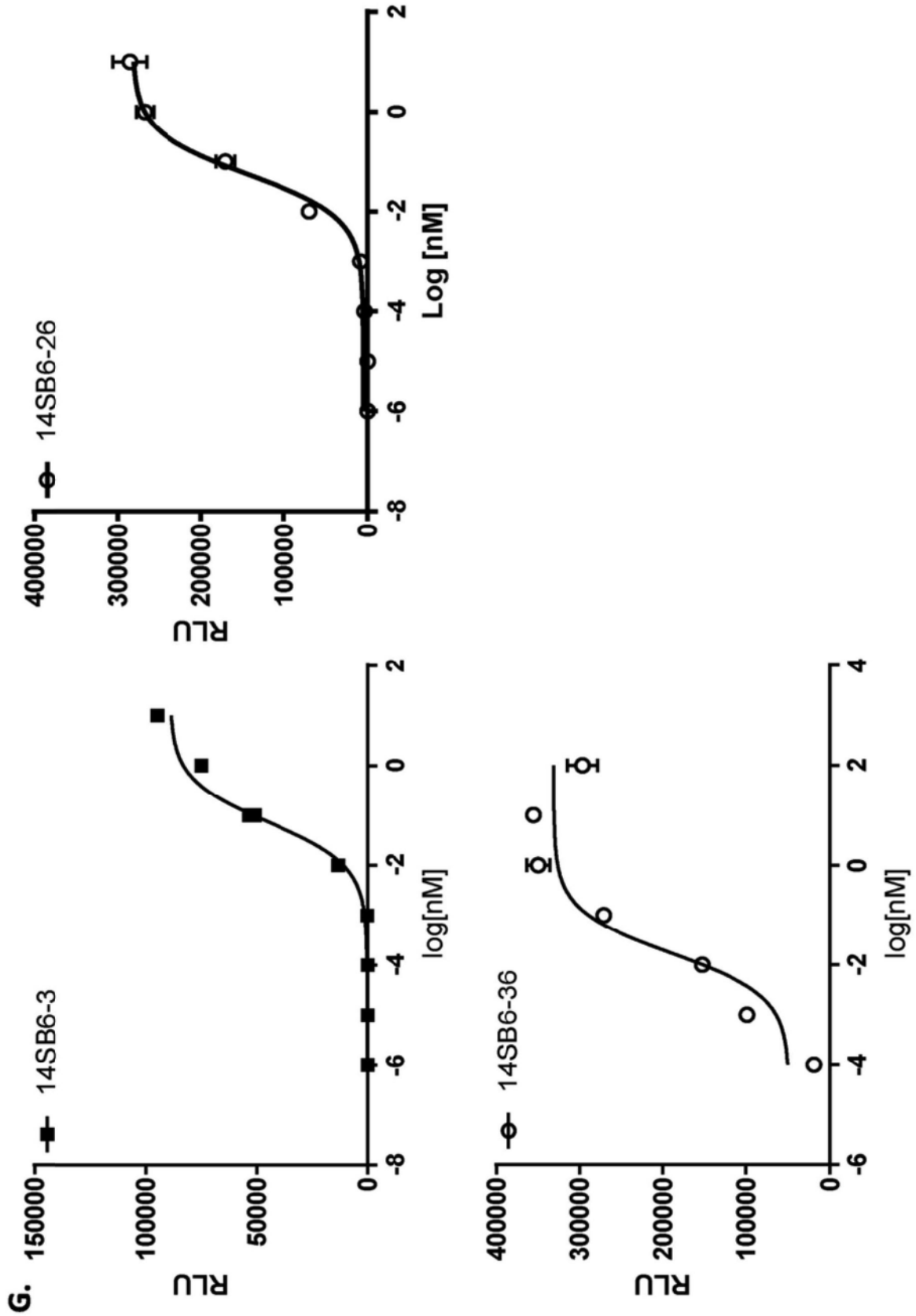

G.
14SB6-3
RLU
150000
100000
50000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
log[nM]
14SB6-26
RLU
400000
300000
200000
100000
0
-8
-6
-4
-2
0
2
Log [nM]
14SB6-36
RLU
400000
300000
200000
100000
0
-6
-4
-2
0
2
4
log[nM]

图17(续)

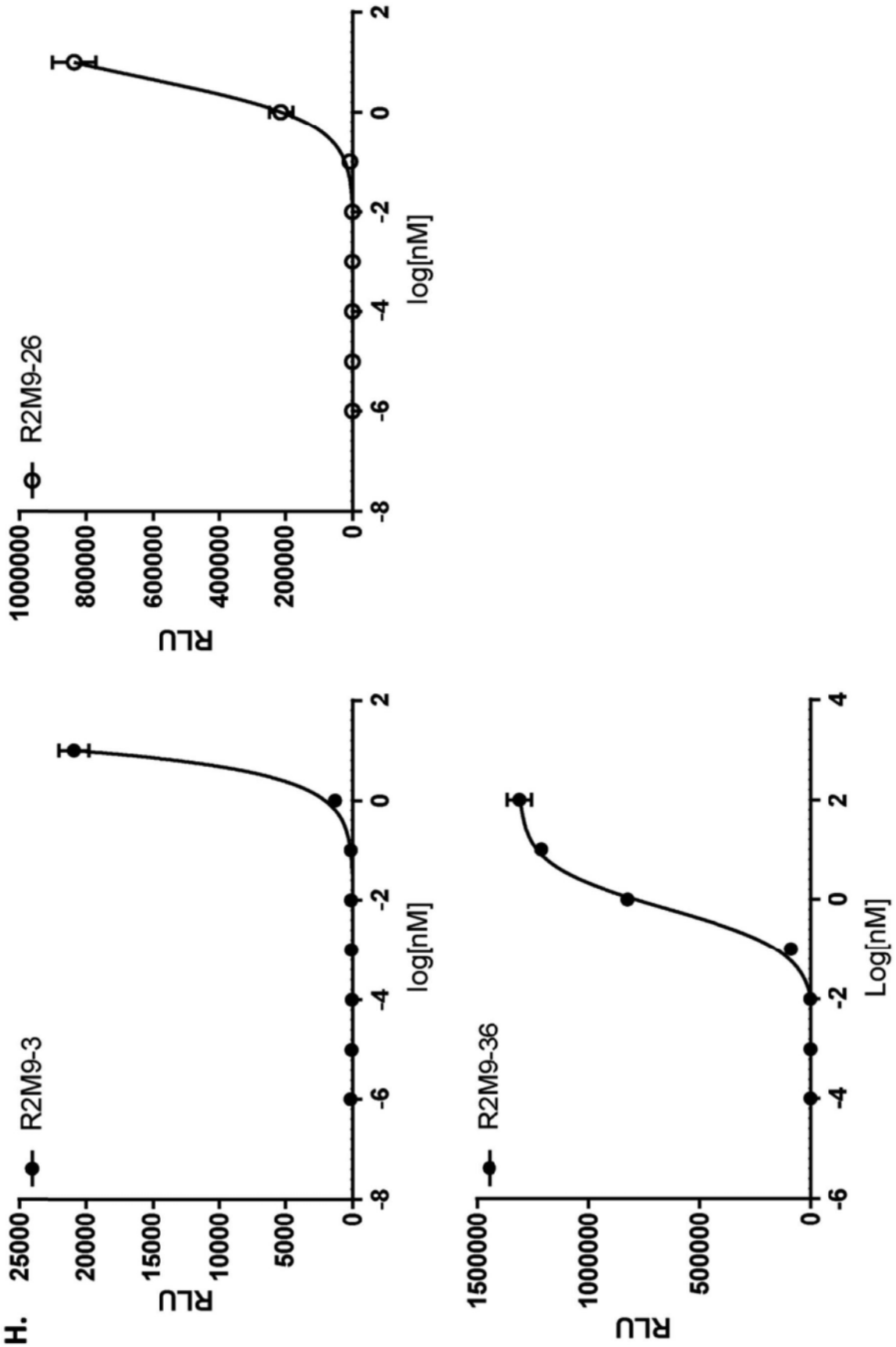


图17(续)

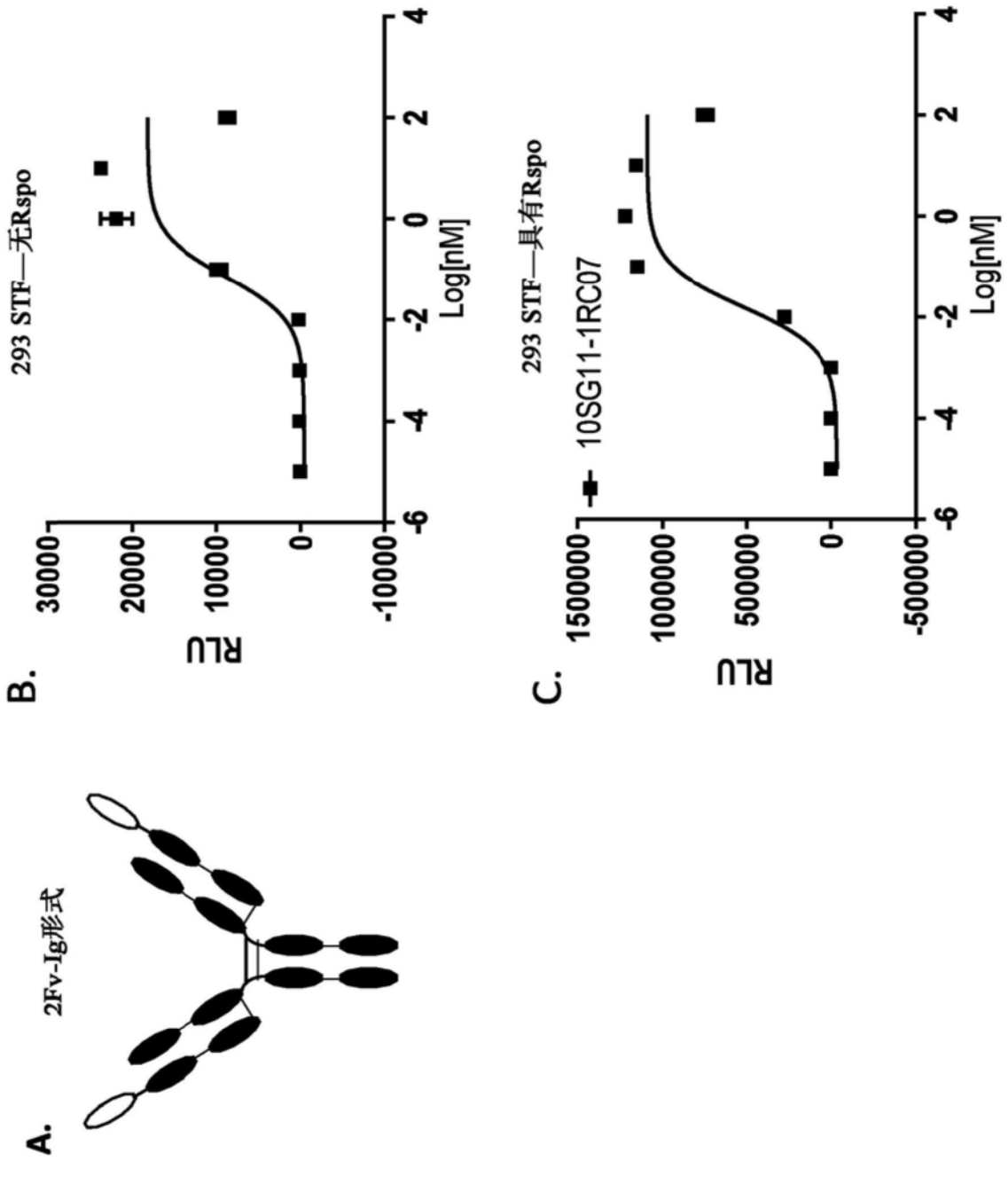

A.
2Fv-Ig形式
B.
293 STF—无Rspo
RLU
30000
20000
10000
0
-10000
-6
-4
-2
0
2
4
Log[nM]
C.
293 STF—具有Rspo
10SG11-1RC07
RLU
1500000
1000000
500000
0
-500000
-6
-4
-2
0
2
4
Log[nM]

图18

前导=斜体
接头=加下划线
VHH/sdAb或VH或VL=粗体

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFMINTMAWYRQAPGNQRE**
LVATIRPVVSETTYADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAIYYCNAKRPWGTRDEYWGQG
TLVTVSSGSGGSQTVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNT
RSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:89)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQREL**
VAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWGQG
TQVTVSSGSGGSQTVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNT
RSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQID NO:90)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***EVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCAASGGTFSRYHMGWFRQAPGKER**
EFVSAITWSGGRTYYADFVKGRFTISRDDARNTVYLQMSSLKPEDTAVYYCALTWAPTPTNRRSDY
AYWGQGTQVTVSSGSGGSQTVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPR
TLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAA
PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL
TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:91)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***EVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDMAWYRQAPGNQRE**
LVATIRPVVSETTYADAVKGRFTISRSNAMKTVYLQMNSLKSEDTAIYYCNAKRPWGTRDEYWGQG
TLVTVSSGSGGSQTVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNT
RSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:92)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***AVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRQAPGNQREL**
VATIRPVVSETTYADAVKGRFTISRSNAMKTVYLQMNSLKSEDTAIYYCNAKRPWGTRDEYWGQGT
LVTVSSGSGGSQTVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTR
SSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS
HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:93)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSMYDMGWFRQAPGKER**
EFVASIRWSSGNTWYADSMKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANIYYTRRAPEEYW
GQGTLVTVSSGSGGSQTVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIY
YTNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV
TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE
QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:94)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS*EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEW
MGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYGMDVW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK* (SEQ ID NO:95)

图19

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELI ANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTQRMGVVNSYWGQ GTLVTVSS**GSGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPS SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:96)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQREL IANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYFCNAVTYDGYTIRGQGTLVT VSS**GSGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:97)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQRELI ANMRGGGYMKYADSVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAQFRNDYGLRYQSTNN YWGQGTLVTVSS**GSGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDK SNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:98)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQREL IANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTVYLQMNSLKPEDSAVYYCNANYRGNRYWGQGTLV TVSS**GSGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:99)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQREL VAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWGQG TQVTVSS**GSGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:100)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***EVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCAASGGTFSRYHMGWFRQAPGKER EFVSAITWSGGRTYYADFVKGRFTISRDDARNTVYLQMSSLKPEDTAVYYCALTWAPTPTNRRSDY AYWGQGTQVTVSS**GSGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIY DKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:101)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***AVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRQAPGNQREL VATIRPVVSETTYADAVKGRFTISRSNAMKTVYLQMNSLKSEDTAIYYCNAKRPWGTRDEYWGQGT LVTVSS**GSGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGI PERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:102)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSMYDMGWFRQAPGKER EFVASIRWSSGNTWYADSMKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANIYYTRRAPEEYW GQGTLVTVSS**GSGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSN RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:103)

图19(续)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLE**
WVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K* (SEQ ID NO:104)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGDVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI
YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:105)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGDIVMTHTPLSLSVTPGEPASISCRSSRSLLDTDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLI
HTLSHRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:106)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSQ
RPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW
KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:107)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGQSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTRSSSNIGAGYDVHWYQQHPGTAPKLLIFG
NSIRPSGVPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVLGQPKAAPS
VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTP
EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:108)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGEIVLTQSPATLSLSPGEGATLSCRASQSVGTYLTWYRQKPGQAPRLLIYDASN
RATGIPARFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:109)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRSISSYFNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQADTFPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:110)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISGNNYYWGWIRQPPG**
KGLEWIGSIYFTGGTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVMLITDAFDIWGQ
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

图19(续)

EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGSGSGHHHHHH** (SEQ ID NO:111)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGYSWSWIRQPP**
GKGLEWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARFYYDILTGYSYF
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK153HHHHHH** (SEQ ID NO:112)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRQPPGK**
GLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYH
GLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGKGSGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:113)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQHPG**
KGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARATYGGDAFDIWG
QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGKGSGSGHHHHHH** (SEQ ID NO:114)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGAISGTSYFWGWIRQPPG**
KGLEWIGSIYYTGNTYYNPSLKSRLTVSVDTSKNQFSLNLNSVTAADTATYYCARIGIAVAAPVDHW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGSGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:115)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QLQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPG**
KGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVRDYYDSSGYYY
DYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKGSGSGHHHHHH** (SEQ ID NO:116)

图19(续)

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQG
LEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYGMD
VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGSGSG**DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRP
VVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWGQGTQVTVS
S*** (SEQ ID NO:117)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWI
SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYGMDVWGQGTT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
(SEQ ID NO:118)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*QAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQ
APRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQP
KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY
LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSGSGSG**DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGS
GRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAV
YYCNAKRPWGSRDEYWGQGTQVTVSS*** (SEQ ID NO:119)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYY
TNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT
LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:120)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ
GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYG
MDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH* (SEQ
ID NO:122)

*MYRMQLLSCIALSLALVTNS***AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSMYDMGWFRQAPGKER
EFVASIRWSSGNTWYADSMKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANIYYTRRAPEEYW
GQGTLVTVSSGSGGSQTVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIY
YTNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV
TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE
QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:123)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ
GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYG
MDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH* (SEQ
ID NO:124)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPG**
QAPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLG
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAS
SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:125)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ**
GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYG
MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:126)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:127)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGS**AVQQVESGGGLVQPGGSLRLSCAA**
SGFTLDYYAISWFRQAPGKKRELVADITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTA
VYFCNAVTYNGYTIWGQGTQVTVSS* (SEQ ID NO:128)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQ**
RELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ
GTQVTVSSGSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSQR
PSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:134)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIYDMGWFRQAPGK**
EREFVSGIRWSGGTSYADSVKGRFTISKDNAKNTIYLQMNNLKAEDTAVYYCGSRGYWGQGTLVTV
SSGSGSGSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPSGIPVR
FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ
ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC
QVTHEGSTVEKTVAPTECS* SEQ ID NO:135)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQ**
RELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ
GTQVTVSSGGSGSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA
SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:136)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:137)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIYDMGWFRQAPGK**
EREFVSGIRWSGGTSYADSVKGRFTISKDNAKNTIYLQMNNLKAEDTAVYYCGSRGYWGQGTLVTV
SSGSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:138)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQ**
RELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ
GTQVTVSSGSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYT
NTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:139)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIYDMGWFRQAPGK**
EREFVSGIRWSGGTSYADSVKGRFTISKDNAKNTIYLQMNNLKAEDTAVYYCGSRGYWGQGTLVTV
SSGSGSGQAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQQTPGQAPRTLIYYTNTRSSDV
PERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL
QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS
CQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:140)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQ**
RELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ
GTQVTVSSGGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLL
GGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:141)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNL
LGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:142)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIYDMGWFRQAPGK**
EREFVSGIRWSGGTSYADSVKGRFTISKDNAKNTIYLQMNNLKAEDTAVYYCGSRGYWGQGTLVTV
SSGGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLLGGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:143)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQ**
RELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ
GTQVTVSSGGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:144)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:145)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIYDMGWFRQAPGK**
EREFVSGIRWSGGTSYADSVKGRFTISKDNAKNTIYLQMNNLKAEDTAVYYCGSRGYWGQGTLVTV
SSGGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:146)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQ**
RELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ
GTQVTVSSGGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:147)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:148)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIYDMGWFRQAPGK**
EREFVSGIRWSGGTSYADSVKGRFTISKDNAKNTIYLQMNNLKAEDTAVYYCGSRGYWGQGTLVTV
SSGGSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:149)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSANINSIETLGWYRQAPGKQ**
RELIANMRGGGYMKYAGSLKGRFTMSTESAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVKLRDDDYVYRGQ
GTQVTVSSGSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:150)

M*DMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:151)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIYDMGWFRQAPGK**
EREFVSGIRWSGGTSYADSVKGRFTISKDNAKNTIYLQMNNLKAEDTAVYYCGSRGYWGQGTLVTV
SSGSGSGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:152)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLLQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFTYRYLHWVRQAPGQ**
GLEWMGGIIPIFGTGNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASSMVRVPYYYGMD
VWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK* (SEQ ID NO:153)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNFGIYSMTWVRQAPGK GLEWISYISGDSGYTNYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGPGGWFDPWG QGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK* (SEQ ID NO:154)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTNYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARATGFGTVVFDY WGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK* (SEQ ID NO:155)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSYIENDGSITTYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARAPYYYGSGSLF RLDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:156)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNNFMHWVRQAPG QGLEWMGWINPNSGGTKYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGEVGATM LGIGVWYWFDPWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:157)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG QGTQVTVSS**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGS**AVQQVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTLDYYAISWFRQAPGKKRELVADITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTA VYFCNAVTYNGYTIWGQGTQVTVSS**GSGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:2192)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGAR***AVQQVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAISWFRQAPGKK RELVADITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYFCNAVTYNGYTIWGQGTQ VTVSS**DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGS**DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIF AIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYC NAKRPWGSRDEYWGQGTQVTVSS*** (SEQ ID NO:2193)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGGSGS**AVQQVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAISWFRQAPGKKRELVADI**
TSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYFCNAVTYNGYTIWGQGTQVTVSSDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2194)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSSGSGGSGS**AVQQVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAISWFRQAPGKKR**
ELVADITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYFCNAVTYNGYTIWGQGTQV
TVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2195)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSGSSGSGGGGSGGSGS**AVQQVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAISWFRQA**
PGKKRELVADITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYFCNAVTYNGYTIWG
QGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2196)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***AVQQVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAISWFRQAPGK**
KRELVADITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYFCNAVTYNGYTIWGQGT
QVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGS**DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGR**
IFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYY
CNAKRPWGSRDEYWGQGTQVTVSS* (SEQ ID NO:2197)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAGSGRIFAIYDIAWYRHPPGNQ**
RELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAKRPWGSRDEYWG
QGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGS**DVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAG**
SGRIFAIYDIAWYRHPPGNQRELVAMIRPVVTEIDYADSVKGRFTISRNNAMKTVYLQMNNLKPEDTA
VYYCNAKRPWGSRDEYWGQGTQVTVSS* (SEQ ID NO:2198)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***AVQQVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAISWFRQAPGK**
KRELVADITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYFCNAVTYNGYTIWGQGT
QVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGS**AVQQVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF**
TLDYYAISWFRQAPGKKRELVADITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYF
CNAVTYNGYTIWGQGTQVTVSSGSGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:2199)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGDVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEKRLELVAAINLNGGSTYYS
DTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYWGQGTLVTVSAGSAASGS
SGGSSSGADIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSISGIPS
RFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGSGSGDKTHTCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2200)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGGSGSGDVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEKRLELVAAINLNGG
STYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYWGQGTLVTVSAGS
AASGSSGGSSSGADIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSI
SGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGSGSGDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2201)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGGSGSGGSSGGDVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEKRLELVAAI
NLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYWGQGTLVT
VSAGSAASGSSGGSSSGADIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSHESPRLLIK
YTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGSGSGDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2202)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEK
RLELVAAINLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYW
GQGTLVTVSAGSAASGSSGGSSSGADIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSH
ESPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGS
GSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGSYTYYAD
SVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPERF
SGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGDKTHTCPPCPAPEAA
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2203)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEK
RLELVAAINLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYW
GQGTLVTVSAGSAASGSSGGSSSGADIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSH
ESPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGS
GSGGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGS
YTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVSSGGGG
SGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGDKTHTCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2204)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEK
RLELVAAINLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYW
GQGTLVTVSAGSAASGSSGGSSSGADIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSH
ESPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGS
GSGGSGSGGSSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVI
SGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYD
KSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2205)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGKGLEWVAEISPYSGSTYYAD
SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRGSVMDYWGQGTLVTVSSGS
AASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKGSGSGDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2206)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGKGLEWVAEISPYSG
STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRGSVMDYWGQGTLV
TVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLL
IYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKGSGSGDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2207)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGGSGSGGSSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGKGLEWVAEI
SPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRGSVMDYWG
QGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPG
KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKGS
GSGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2208)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGK
GLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRG
SVMDYWGQGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVA
WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQG
TKVEIKGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGD
GSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2209)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGK
GLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRG
SVMDYWGQGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVA
WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQG
TKVEIKGSGSGGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVS
VISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIY
DKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2210)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGK
GLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRG
SVMDYWGQGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVA
WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQG
TKVEIKGSGSGGSGSGGGSSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2211)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK**
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS**DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ**
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSG**DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFS
TSYMSWVRQTPEKRLELVAAINLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYC
ASELAGYGTPFAYWGQGTLVTVSAGSAASGSSGGSSSGA**DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQ**
SISYNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWP
LTFGAGTKLEVK* (SEQ ID NO:2212)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEK**
RLELVAAINLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYW
GQGTLVTVSAGSAASGSSGGSSSGA**DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSH**
ESPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGS
GSGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSH**
YTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RNFIKYVFANWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS**DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSF**
YVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLV
FGGGTKLTVL* (SEQ ID NO:2213)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QAVVLQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTNYYPSWYQDTPG**
QDPRTLIYYTNTRSSDVPERFSGSIVGNKAALTITGAQPDDESVYFCLLYLGRGIWVFGGGTKLTVLG
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAK
SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2214)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSANSSVRFMFWYQKKPGSKPK**
PLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSYPWTFGGGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2215)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTTYYIHWLKDRPGQG**
LEWIGWIFPGNVNTKYNAKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREELQYYFDYWGD
GSTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC**GSGSGEVQLVQSGAEVKKPGAS**
VKVSCKASGYTFTSYGISWVRKAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYME
LRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYGMDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2216)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDP**
VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2217)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQKKPGKKP**
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2218)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGK**
GLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYH
GLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSG**EVQLVESGGG**
LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRDAPGKGLEWVASISSTSGSKYYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYSCAKTYYDFWSGYYTFDYWGDGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2219)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDP**
VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2220)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQKKPGKKP**
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2221)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGK**
GLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYH
GLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGGGSGSG**EVQLV**
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRDAPGKGLEWVASISSTSGSKYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYSCAKTYYDFWSGYYTFDYWGDGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2222)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDP**
VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2223)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQKKPGKKP**
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2224)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGK**
GLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYH
GLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGGGSGSGGGSSGG
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRDAPGKGLEWVASISSTSGSKYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYSCAKTYYDFWSGYYTFDYWGDGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2225)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDP**
VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2226)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSAYVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYQKKPGKKP**
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYTIPFTFGPGTKVDIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2227)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGK**
GLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYH
GLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSG**EVQLVESVGG**
LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRDAPGKGLEWISTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGYGRYYYGMDVWGDGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2228)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDP**
VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2229)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSAYVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYQKKPGKKP**
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYTIPFTFGPGTKVDIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2230)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGK**
GLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYH
GLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGGSGSG**EVQLV**
ESVGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRDAPGKGLEWISTISGSGGSTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGYGRYYYGMDVWGDGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2231)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDP**
VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2232)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSAYVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYQKKPGKKP**
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYTIPFTFGPGTKVDIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2233)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGK**
GLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYH
GLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGGSGSGGSSGG
EVQLVESVGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRDAPGKGLEWISTISGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGYGRYYYGMDVWGDGTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2234)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSAYVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYQKKPGKKP**
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYTIPFTFGPGTKVDIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2235)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDP**
VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2236)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESVGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRDAPGK**
GLEWISTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGYGRYYYGMD
VWGDGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSG**QVQLQQWGAGLLK**
PSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSL
NLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2237)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSAYVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYQKKPGKKP**
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYTIPFTFGPGTKVDIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2238)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDP**
VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2239)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESVGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRDAPGK**
GLEWISTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGYGRYYYGMD
VWGDGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGGSGSG**QVQLQQWG**
AGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSK
NQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2240)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSAYVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYQKKPGKKP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYTIPFTFGPGTKVDIK**RTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLESTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2241)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQDKPGQDP VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVL**GQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAKS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (SEQ ID NO:2242)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESVGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRDAPGK GLEWISTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGYGRYYYGMD VWGDGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGGSGSGGSSGG**QVQ LQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRKPPGKGLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTIS VDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGKGTTVTVSS**ASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2243)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRQPPGK GLEWIGEIDHTGSTNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYH GLDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:2244)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK**RTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:2245)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQQKPGQSP VLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVL**GQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSGSGSG**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVASISSTSGSKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYSCAKTYYDFWSGYYTFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2246)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEK RLELVAAINLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYW GQGTLVTVSA**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:2247)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*AAA**DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSHE SPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVK**RTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGS**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCASSKEKATYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GSGSG* HHHHHH* (SEQ ID NO:2248)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*AAA**DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSHE SPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVK**RTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGS**EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GSGSG*HHHHHH* (SEQ ID NO:2249)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG QGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGS**DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVL*G* *SGSG*DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GSGSG***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT SYYISWVRQAPGKGLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ALRARPPIRLHPRGSVMDYWGQGTLVTVSS***GSAASGSSGGSSSGA***DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYTTPPTFGQGTKVEIK*** (SEQ ID 2250)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYG MDVWGQGTTVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA*G*** (SEQ ID 2251)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKGSGSGSY VLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGHKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPSGIPVRFSGSNSGNT ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPTECS* (SEQ ID 2252)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTYRYLHWVRQAPGQ
GLEWMGRIIPVLKITNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAVVDDAFDIWGQGTM
VTVSSGSGSGQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGASFSGHYWTWIRQPPGKGLEWIGEIDHTGS
TNYEPSLRSRVTISVDTSKNQFSLNLKSVTAADTAVYYCARGGQGGYDWGHYHGLDVWGQGTTVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
(SEQID 2253)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ**
GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASSKEKATYYYG
MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK* (SEQ ID NO:2254)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK**
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS**DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ**
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSG**DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEKRLELVAAINLNGGSTYYS**
DTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYWGQGTLVTVSAGSAASGS
SGGSSSGA**DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSISGIPS**
RFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGSGSGHHHHHH* (SEQ ID
NO:225)
5
*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK**
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS**DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ**
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGGSGSG**DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEKRLELVAAINLNGG**
STYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYWGQGTLVTVSAGS
AASGSSGGSSSGA**DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSI**
SGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGSGSGHHHHHH*
(SEQ ID NO:2256)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC***EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK**
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS**DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ**
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGGSGSGGSSGG**DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEKRLELVAAI**
NLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYWGQGTLVT
VSAGSAASGSSGGSSSGA**DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSHESPRLLIK**
YTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGSGSGHHHH
HH* (SEQ ID NO:2257)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEK
RLELVAAINLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYW
GQGTLVTVSAGSAASGSSGGSSSGADIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSH
ESPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGS
GSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGSYTYYAD
SVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPERF
SGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGHHHHHH* (SEQ ID
NO:2258)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEK
RLELVAAINLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYW
GQGTLVTVSAGSAASGSSGGSSSGADIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSH
ESPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGS
GSGGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGS
YTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVSSGGGG
SGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGHHHHHH*
(SEQ ID NO:2259)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*DVKLVESGGGLVKLGGSLRLSCAASGFSFSTSYMSWVRQTPEK
RLELVAAINLNGGSTYYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAFYYCASELAGYGTPFAYW
GQGTLVTVSAGSAASGSSGGSSSGADIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCKASQSISYNLHWYQQKSH
ESPRLLIKYTSQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINNVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLEVKGS
GSGGSGSGGSSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVI
SGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYD
KSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGHHH
HHH* (SEQ ID NO:2260)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGKGLEWVAEISPYSGSTYYAD
SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRGSVMDYWGQGTLVTVSSGS
AASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKGSGSGHHHHHH*
(SEQ ID NO:2261)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGKGLEWVAEISPYSG
STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRGSVMDYWGQGTLV
TVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLL
IYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKGSGSGHHH
HHH* (SEQ ID NO:2262)

图19(续)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGGSGSGGSSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGKGLEWVAEI
SPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRGSVMDYWG
QGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPG
KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKGS
GSGHHHHHH* (SEQ ID NO:2263)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGK
GLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRG
SVMDYWGQGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVA
WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQG
TKVEIKGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGD
GSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGHHHHHH*
(SEQ ID NO:2264)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGK
GLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRG
SVMDYWGQGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVA
WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQG
TKVEIKGSGSGGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVS
VISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIY
DKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLGSGSGHH
HHHH* (SEQ ID NO:2265)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGK
GLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRG
SVMDYWGQGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVA
WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQG
TKVEIKGSGSGGSGSGGSSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYTLSWVRQAPGK
GLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNFIKYVFANWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNIGSFYVHWYQQKPGQ
APVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYANTLSLVFGGGTKLTVLG
SGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:2266)

*MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYISWVRQAPGK
GLEWVAEISPYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALRARPPIRLHPRG
SVMDYWGQGTLVTVSSGSAASGSSGGSSSGADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVA
WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQG
TKVEIKGSGSGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA
ASGFTFSHYTLSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGSYTYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARNFIKYVFANWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQPPSVSVAPGQTARIS
CSGDNIGSFYVHWYQQKPGQAPVLVIYDKSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQ
SYANTLSLVFGGGTKLTVL* (SEQ ID NO:2267)

图19(续)

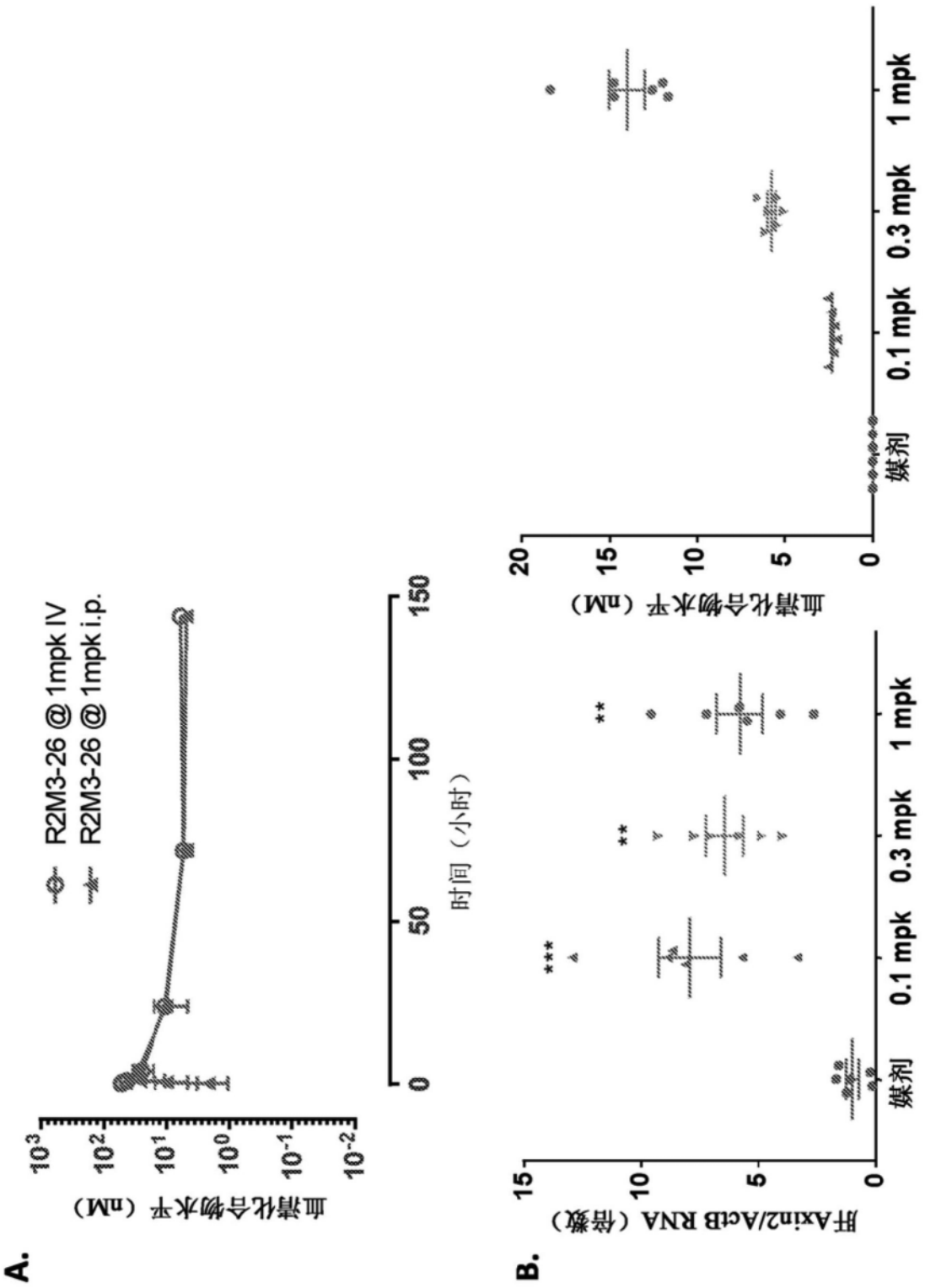

A.
血清化合物水平（nM）
R2M3-26 @ 1mpk IV
R2M3-26 @ 1mpk i.p.
时间（小时）
B.
肝Axin2/ActB RNA（倍数）
媒剂
0.1 mpk
0.3 mpk
1 mpk
血清化合物水平（nM）

图20

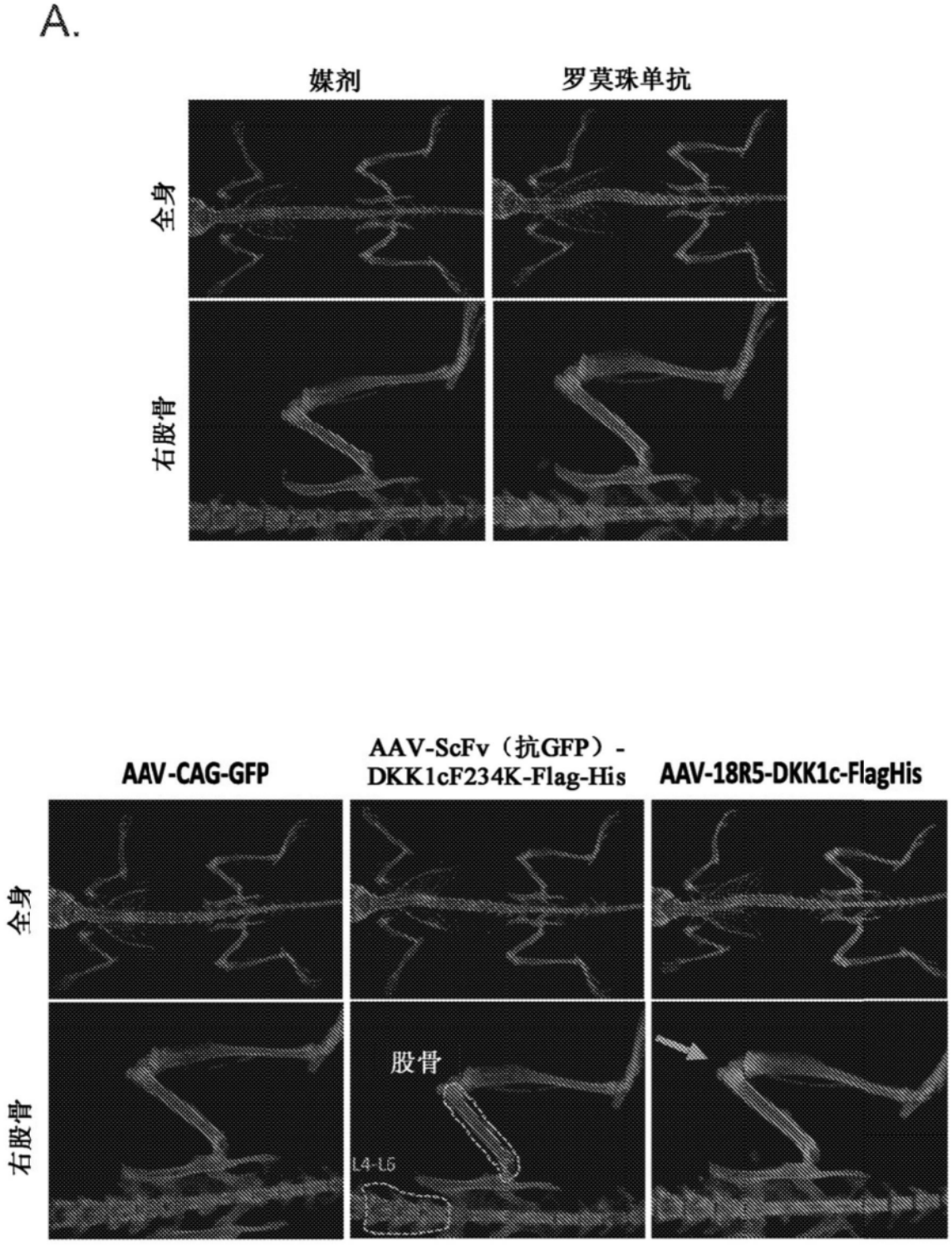

A.
媒剂
罗莫珠单抗
全身
右股骨
AAV-CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-
DKK1cF234K-Flag-His
AAV-18R5-DKK1c-FlagHis
全身
右股骨
股骨
L4-L5

图21A

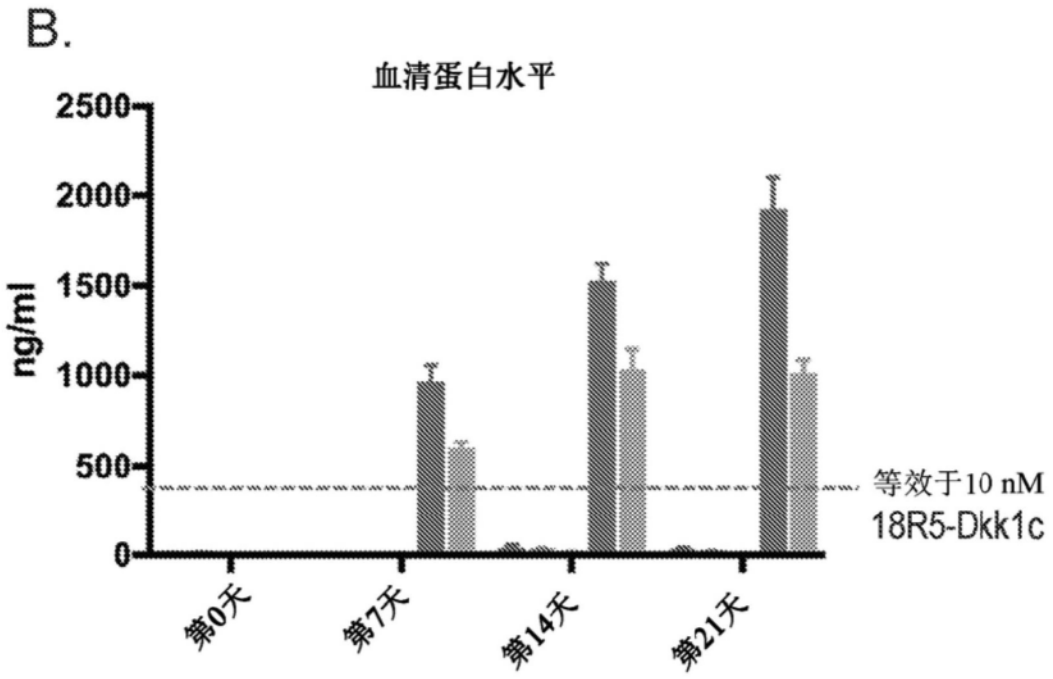

B.
血清蛋白水平
2500
2000
1500
1000
500
0
ng/ml
等效于10 nM
18R5-Dkk1c
第0天
第7天
第14天
第21天

图21B

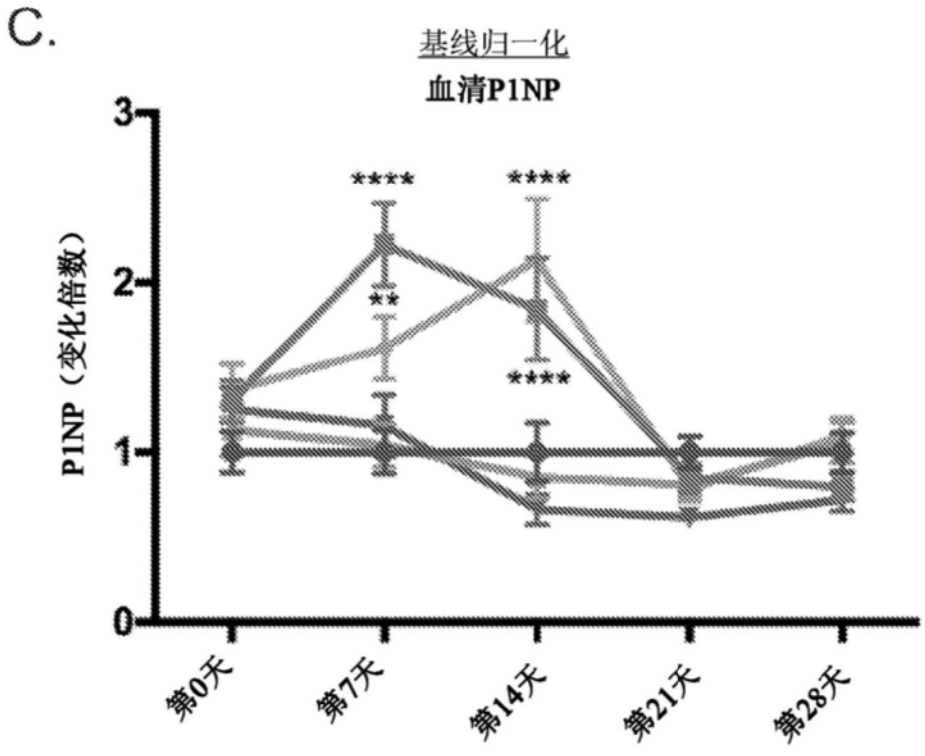

C.
基线归一化
血清P1NP
3
2
1
0
P1NP（变化倍数）
****
****
**
****
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天

图21C

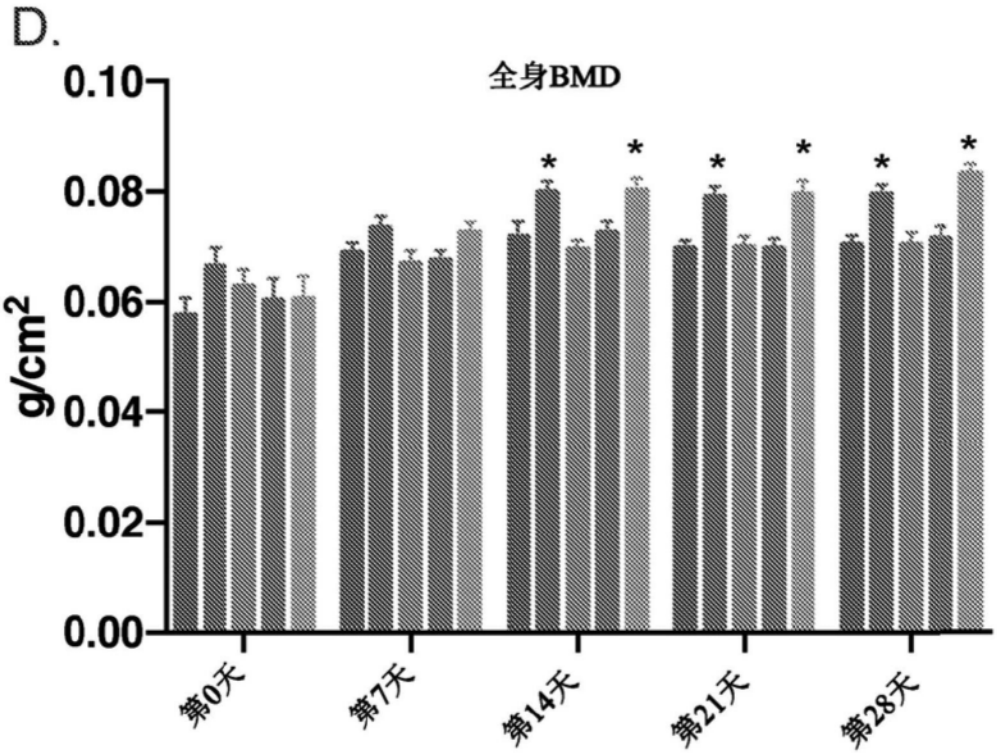


图21D

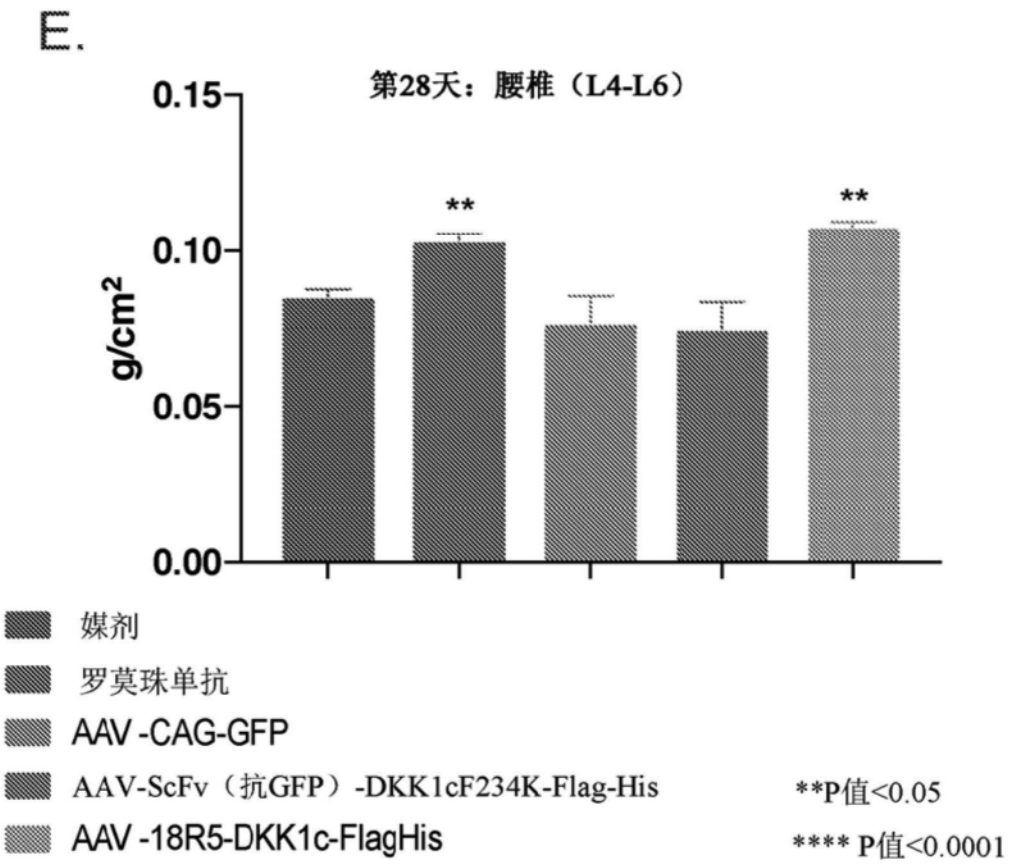

E.
第28天：腰椎（L4-L6）
0.15
0.10
0.05
0.00
g/cm²
**
**
媒剂
罗莫珠单抗
AAV -CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K-Flag-His
AAV -18R5-DKK1c-FlagHis
**P值<0.05
**** P值<0.0001

图21E

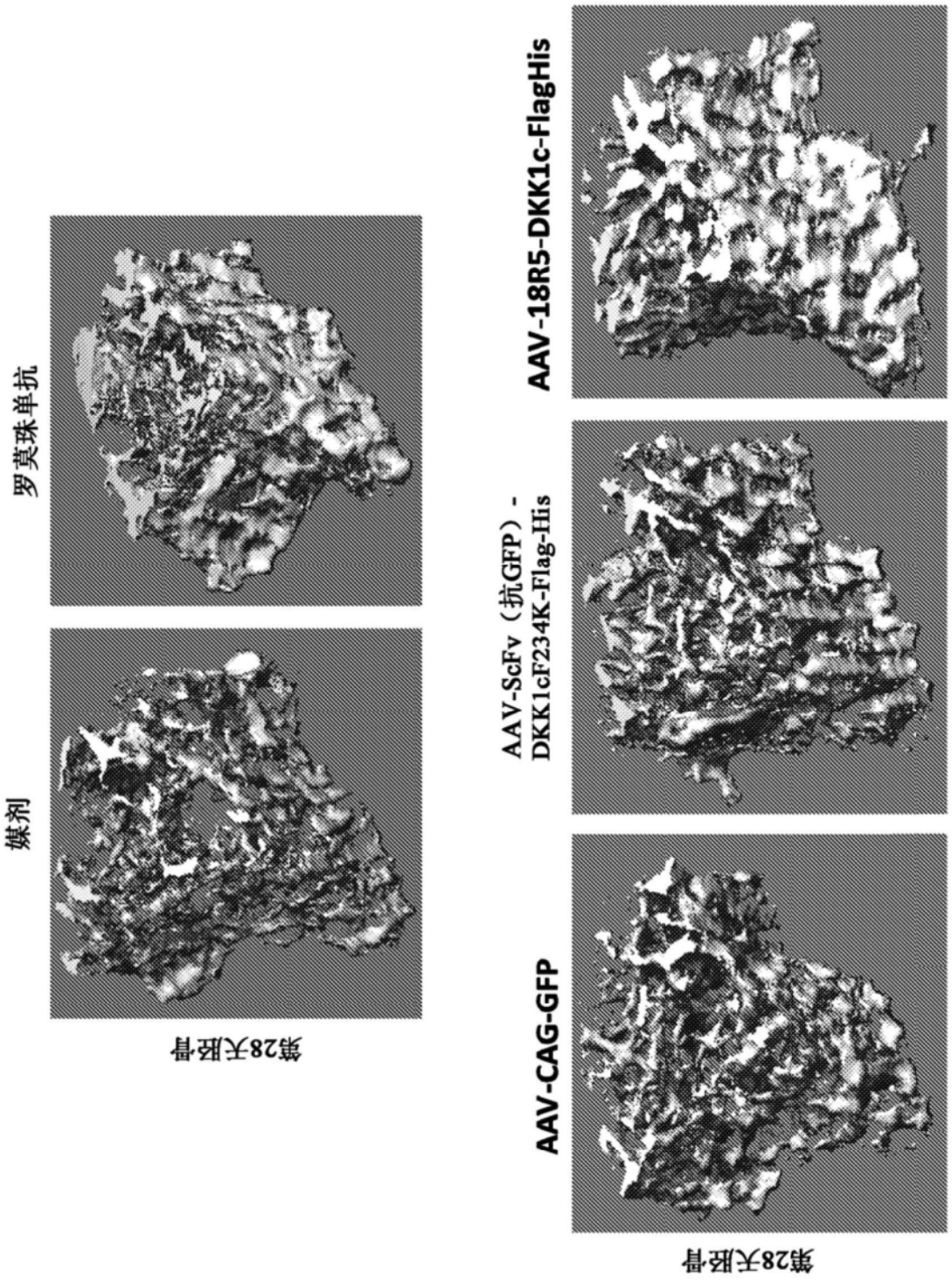

媒剂
罗莫珠单抗
第28天胫骨
AAV-CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K-Flag-His
AAV-18R5-DKK1c-FlagHis
第28天胫骨

图22A

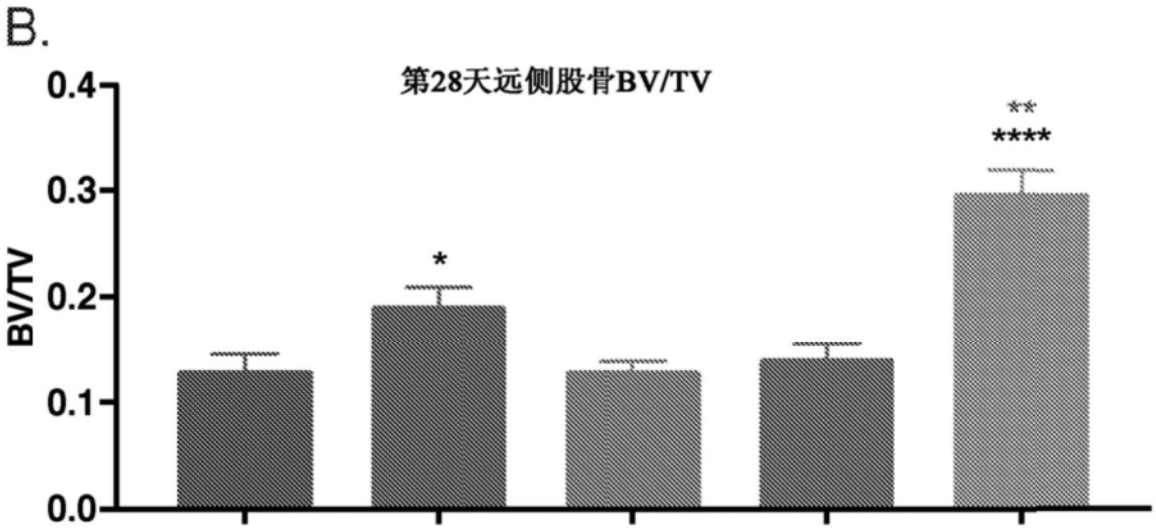

B.
第28天远侧股骨BV/TV
BV/TV
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
**
****

图22B

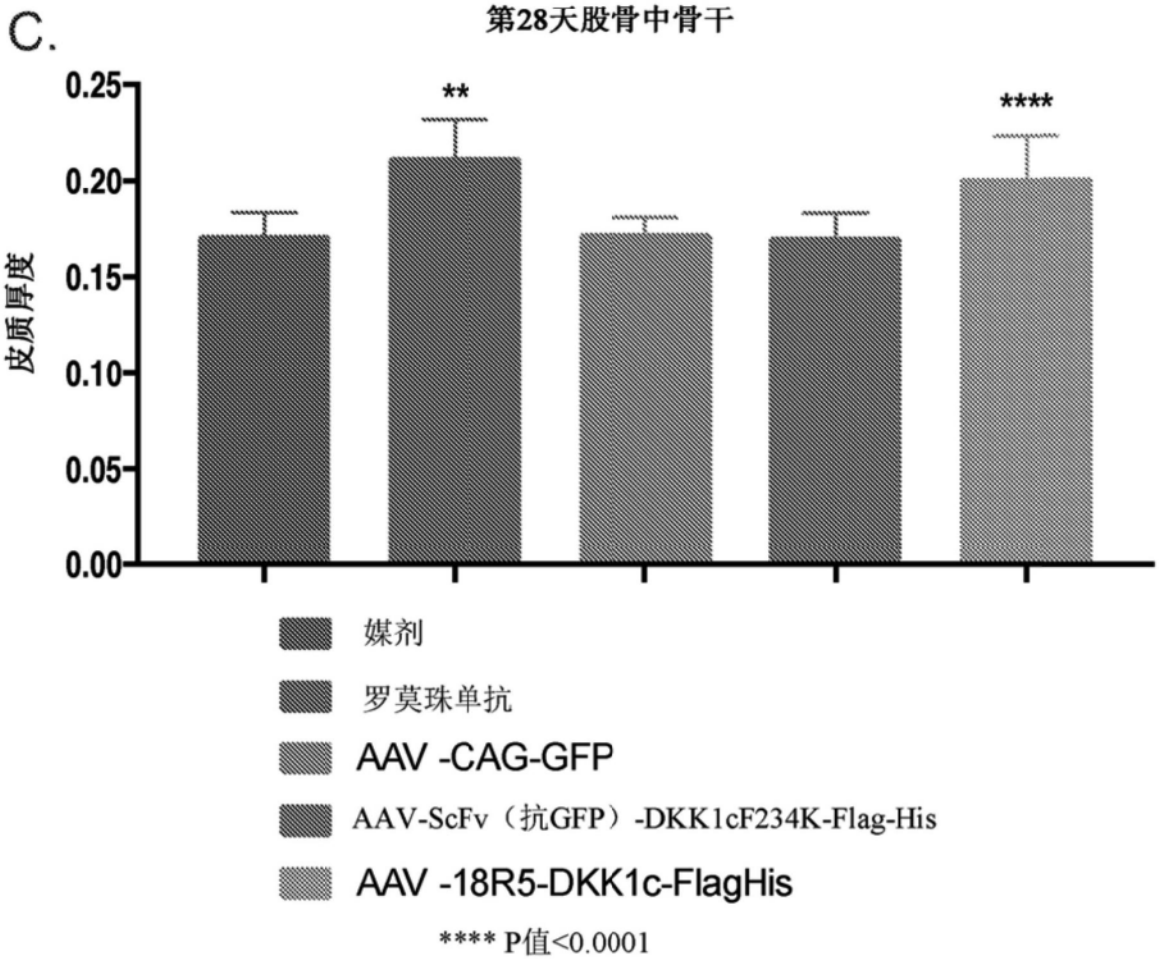

C.
第28天股骨中骨干
皮质厚度
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
**
****
媒剂
罗莫珠单抗
AAV -CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K-Flag-His
AAV -18R5-DKK1c-FlagHis
**** P值<0.0001

图22C

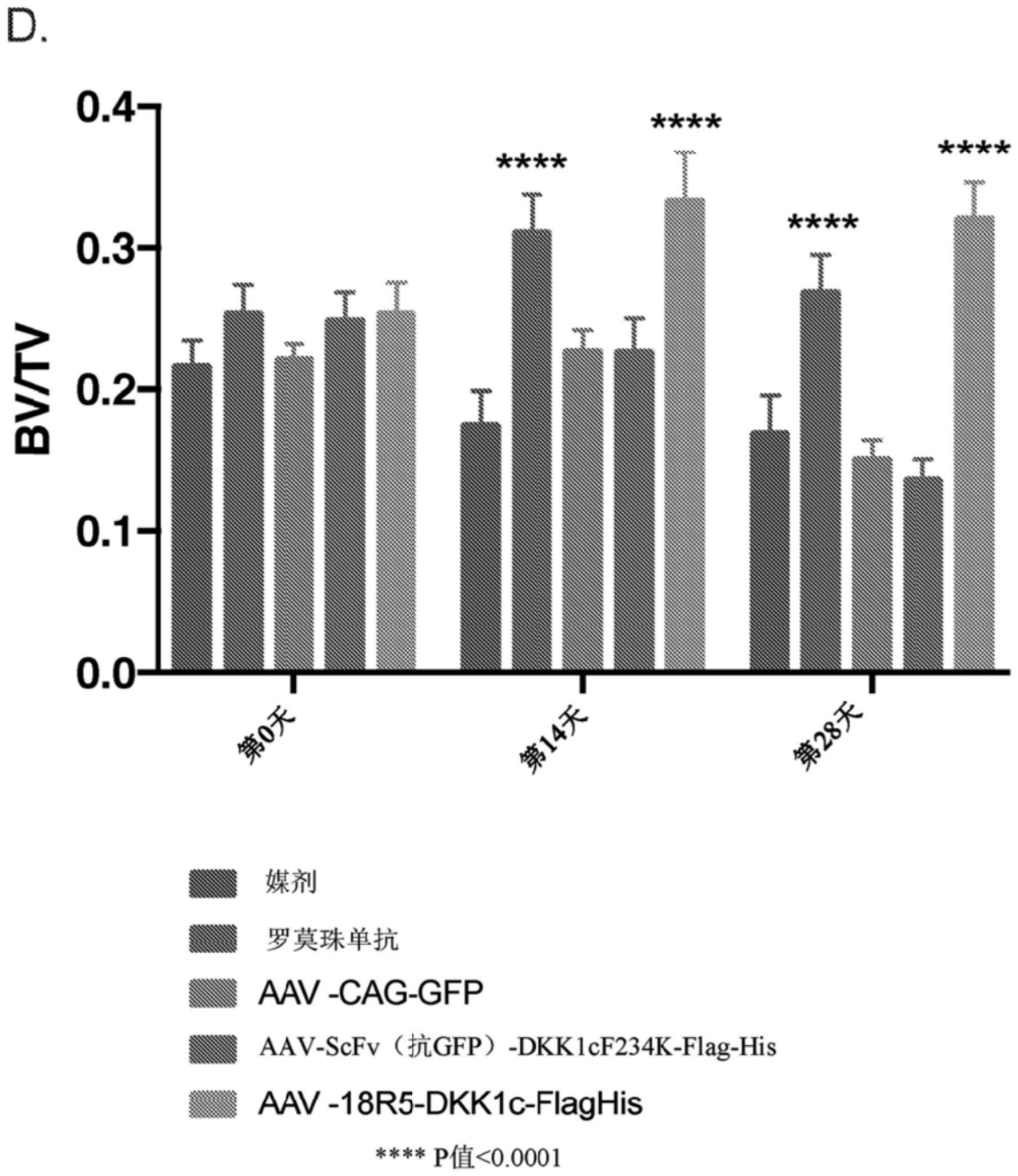

D.
BV/TV
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
****
****
****
****
第0天
第14天
第28天
媒剂
罗莫珠单抗
AAV -CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K-Flag-His
AAV -18R5-DKK1c-FlagHis
**** P值<0.0001

图22D

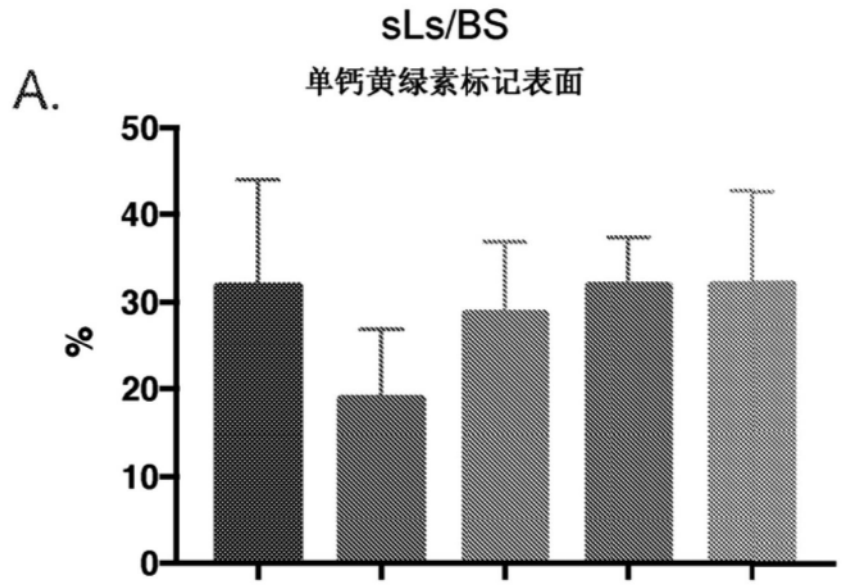

sLs/BS
单钙黄绿素标记表面
A.
50
40
30
20
10
0
%

图23A

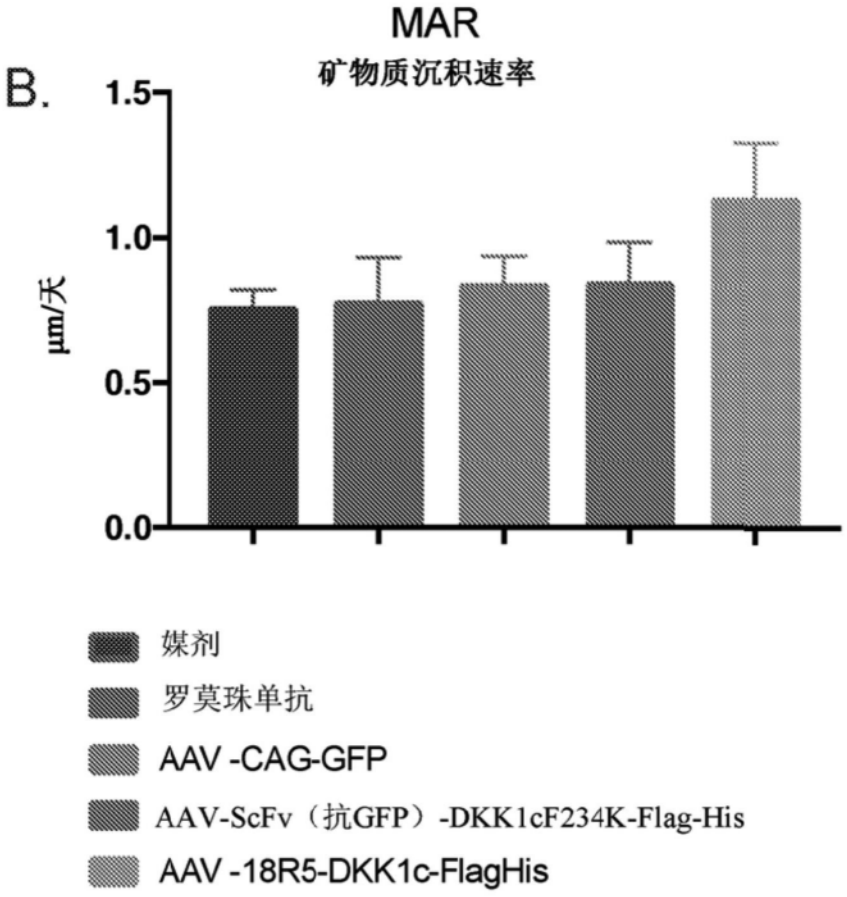

MAR
矿物质沉积速率
B.
1.5
1.0
0.5
0.0
μm/天
媒剂
罗莫珠单抗
AAV -CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K-Flag-His
AAV -18R5-DKK1c-FlagHis

图23B



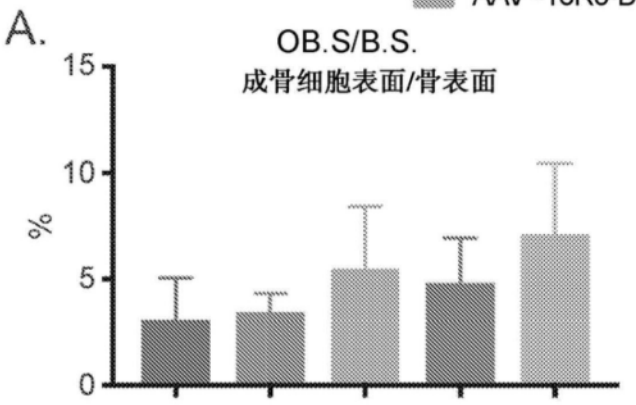


图24A

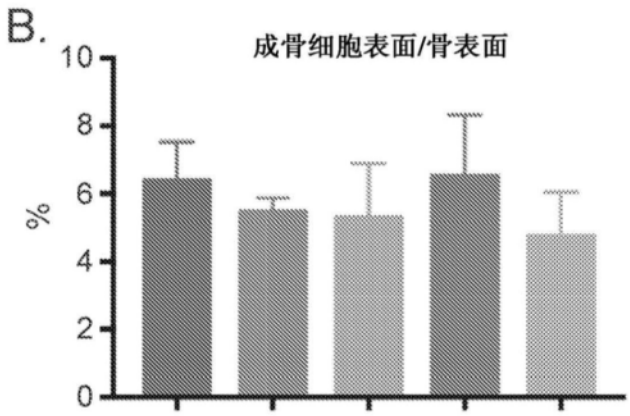


图24B

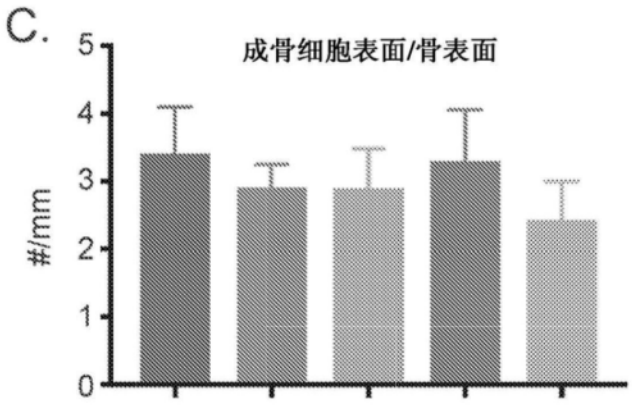


图24C

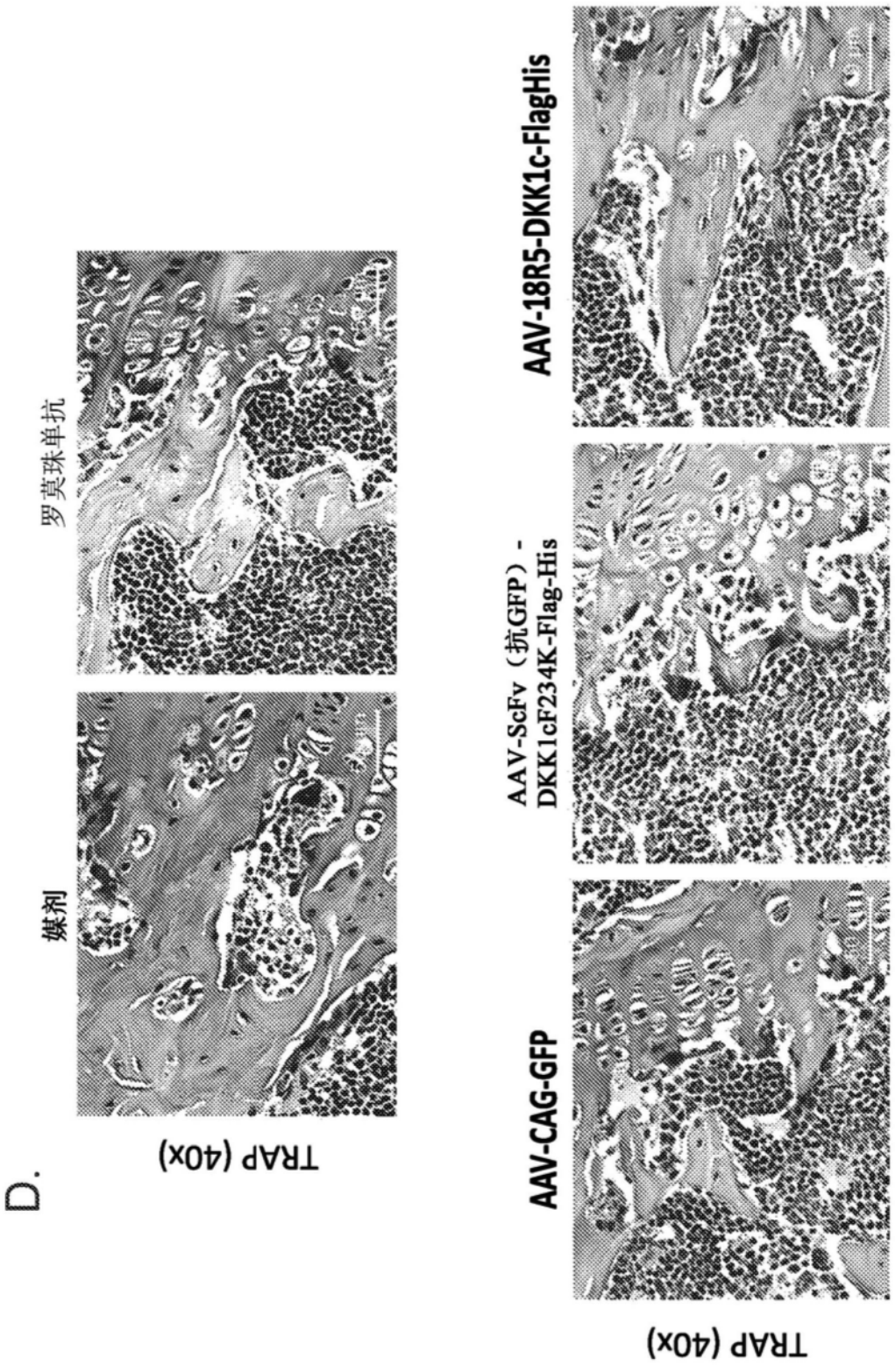

D.
媒剂
罗莫珠单抗
TRAP (40x)
AAV-CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K-Flag-His
AAV-18R5-DKK1c-FlagHis
TRAP (40x)

图24D

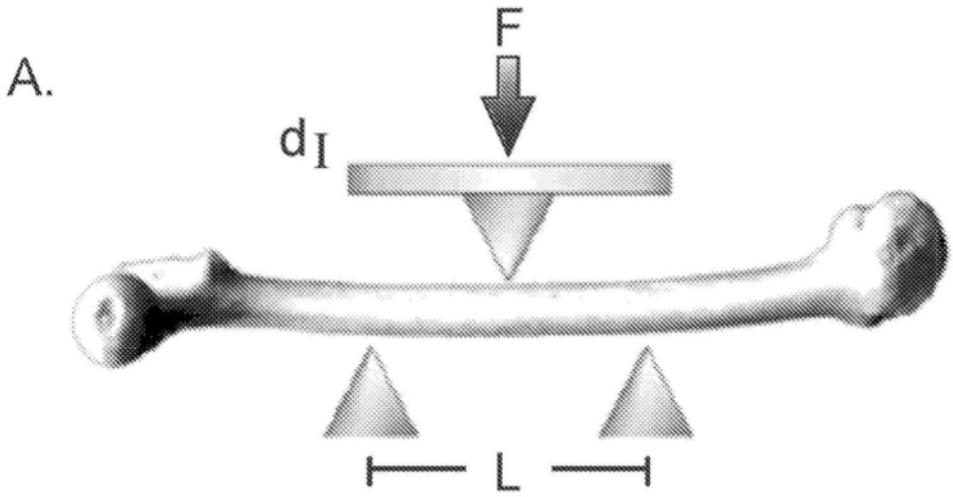

A.
F
dI
L

图25A

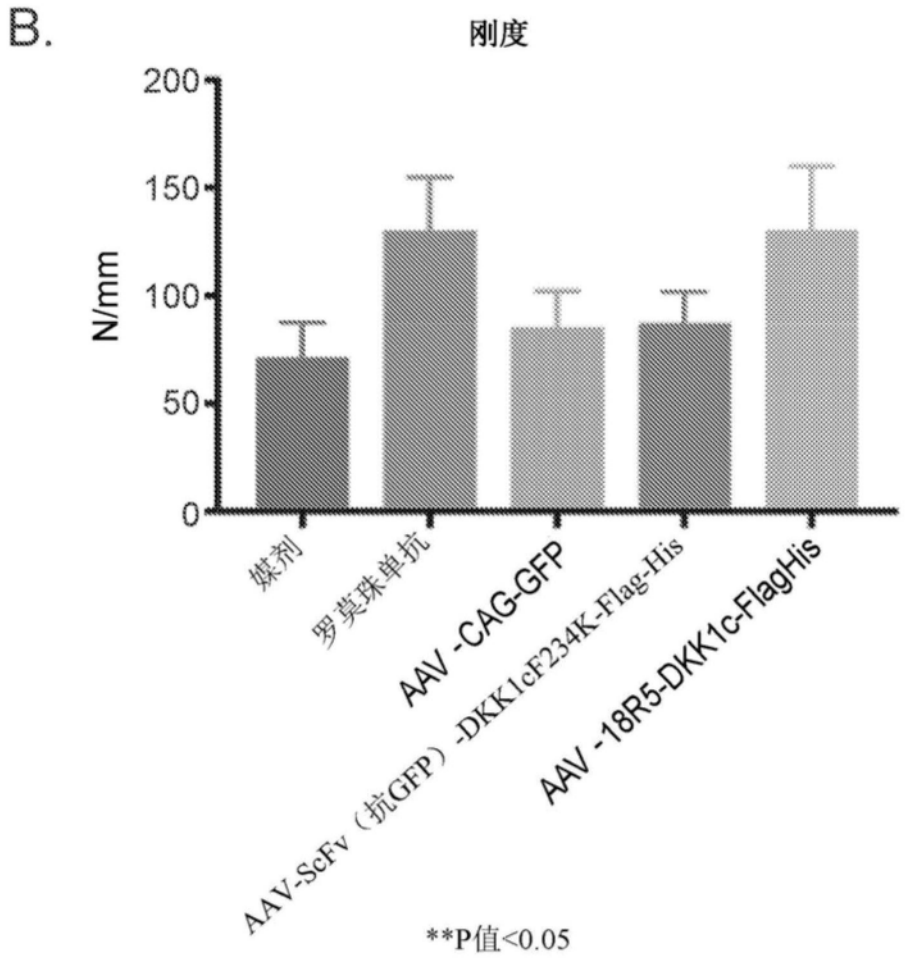

B.
刚度
N/mm
200
150
100
50
0
媒剂
罗莫珠单抗
AAV -CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K-Flag-His
AAV -18R5-DKK1c-FlagHis
**P值<0.05

图25B

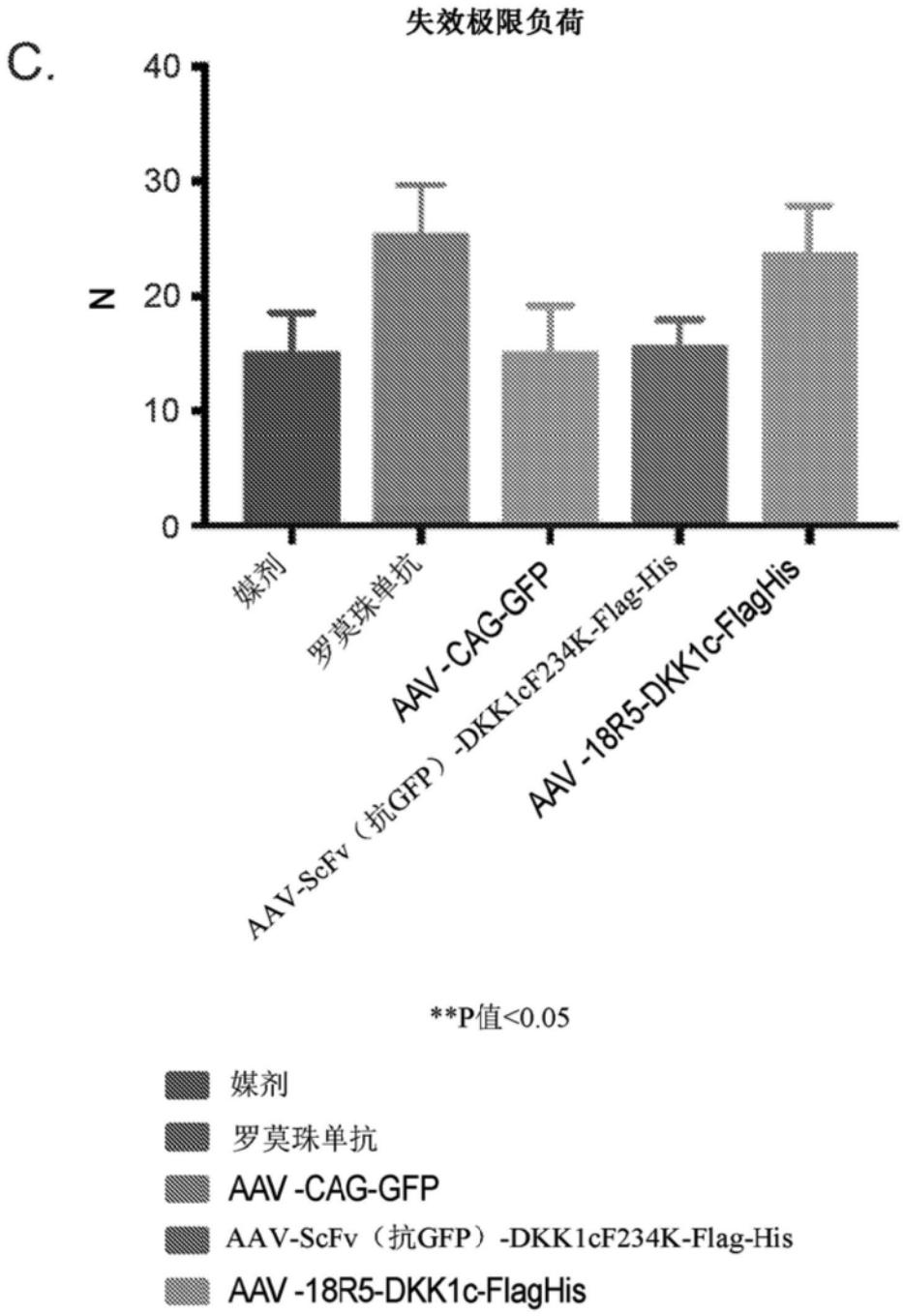

失效极限负荷
C.
40
30
20
10
0
N
媒剂
罗莫珠单抗
AAV -CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K-Flag-His
AAV -18R5-DKK1c-FlagHis
**P值<0.05
媒剂
罗莫珠单抗
AAV -CAG-GFP
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K-Flag-His
AAV -18R5-DKK1c-FlagHis

图25C

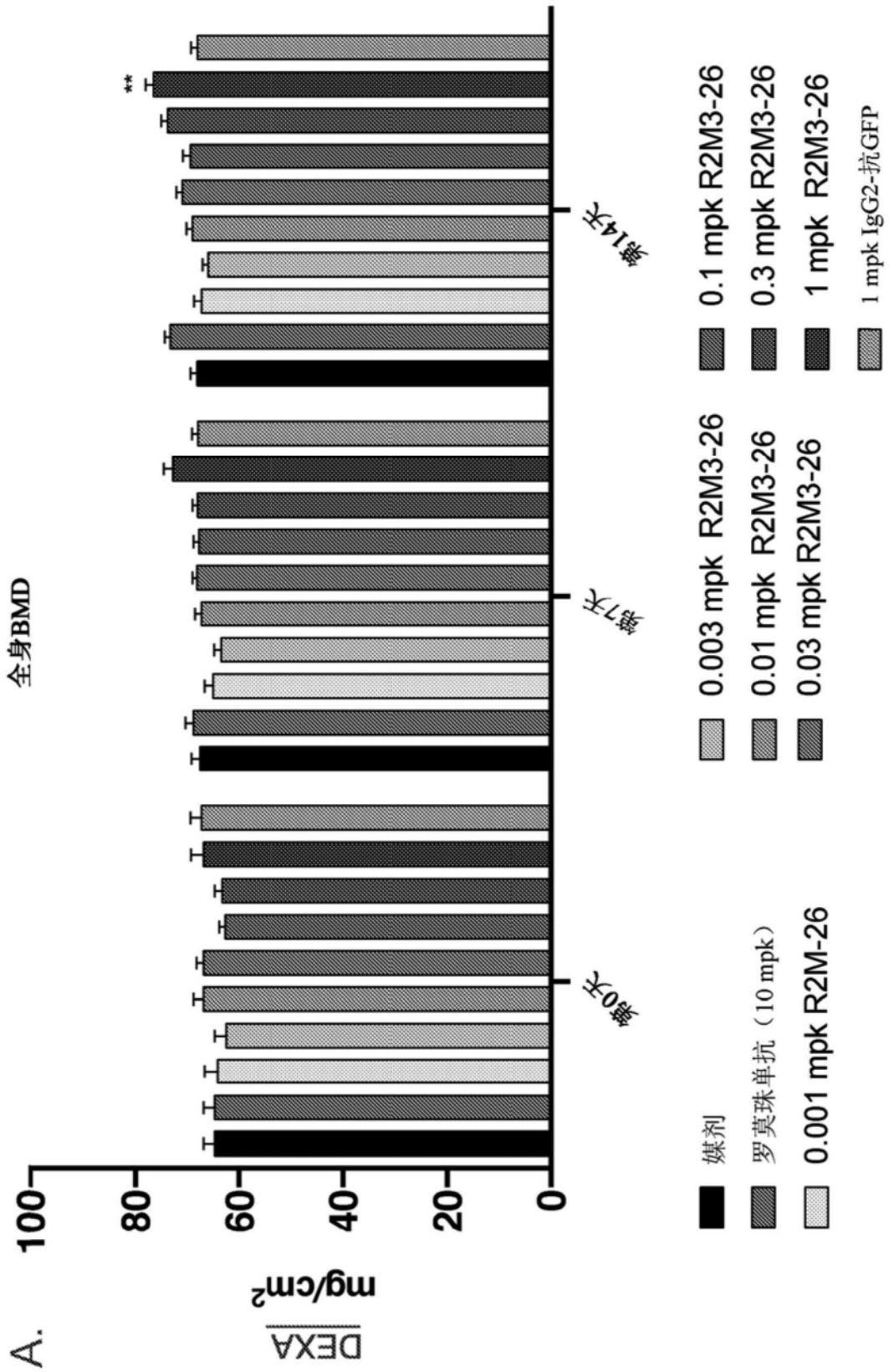

A.
DEXA
mg/cm²
100
80
60
40
20
0
全身BMD
**
第0天
第7天
第14天
媒剂
罗莫珠单抗（10 mpk）
0.001 mpk R2M-26
0.003 mpk R2M-26
0.01 mpk R2M-26
0.03 mpk R2M-26
0.1 mpk R2M3-26
0.3 mpk R2M3-26
1 mpk R2M3-26
1 mpk IgG2-抗GFP

图26A

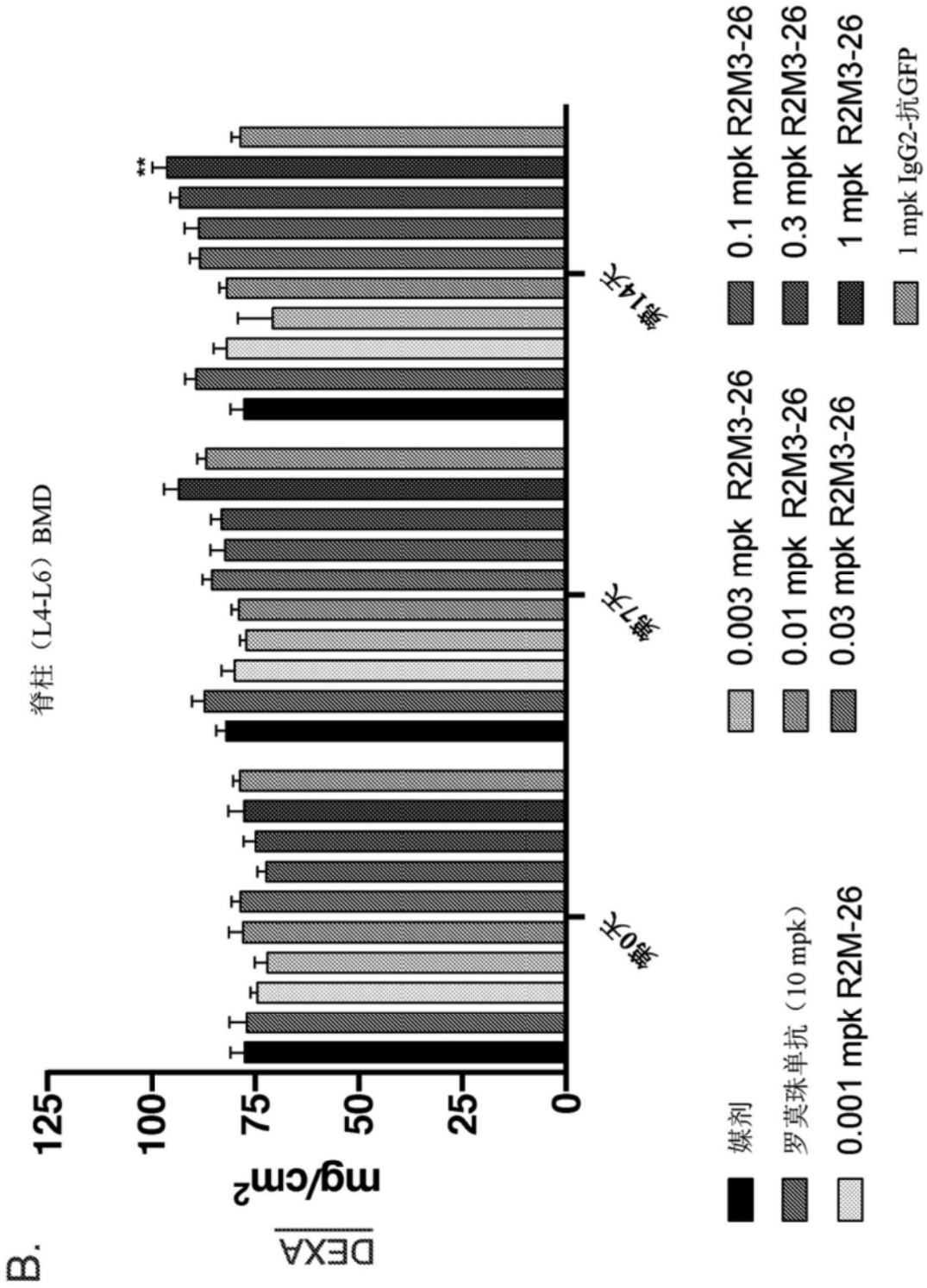

B.
脊柱（L4-L6）BMD
DEXA
mg/cm²
125
100
75
50
25
0
**
第0天
第7天
第14天
媒剂
罗莫珠单抗（10 mpk）
0.001 mpk R2M-26
0.003 mpk R2M3-26
0.01 mpk R2M3-26
0.03 mpk R2M3-26
0.1 mpk R2M3-26
0.3 mpk R2M3-26
1 mpk R2M3-26
1 mpk IgG2-抗GFP

图26B

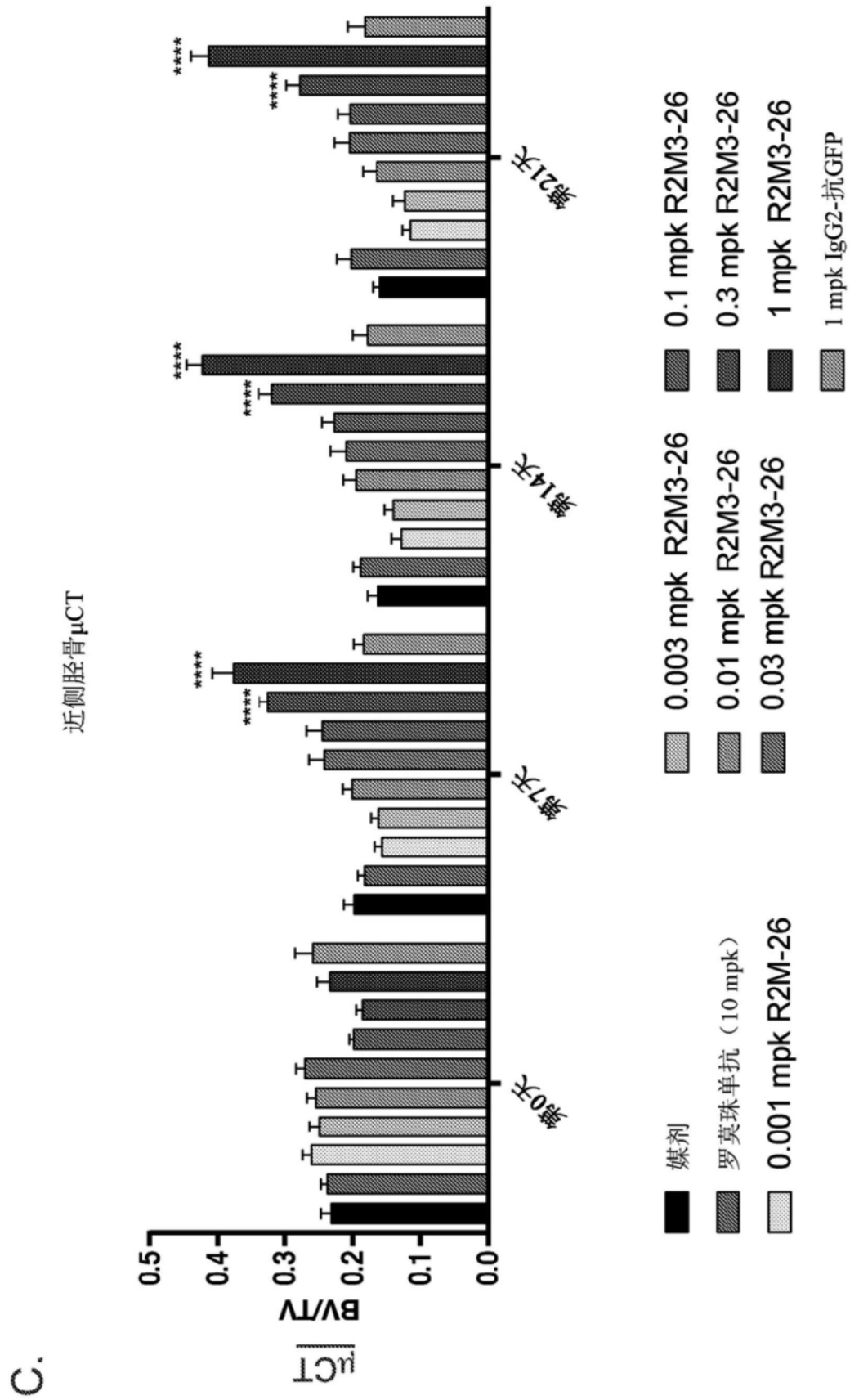

C.
μCT
近侧胫骨μCT
BV/TV
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
第0天
第7天
第14天
第21天
****
媒剂
罗莫珠单抗（10 mpk）
0.001 mpk R2M-26
0.003 mpk R2M3-26
0.01 mpk R2M3-26
0.03 mpk R2M3-26
0.1 mpk R2M3-26
0.3 mpk R2M3-26
1 mpk R2M3-26
1 mpk IgG2-抗GFP

图26C

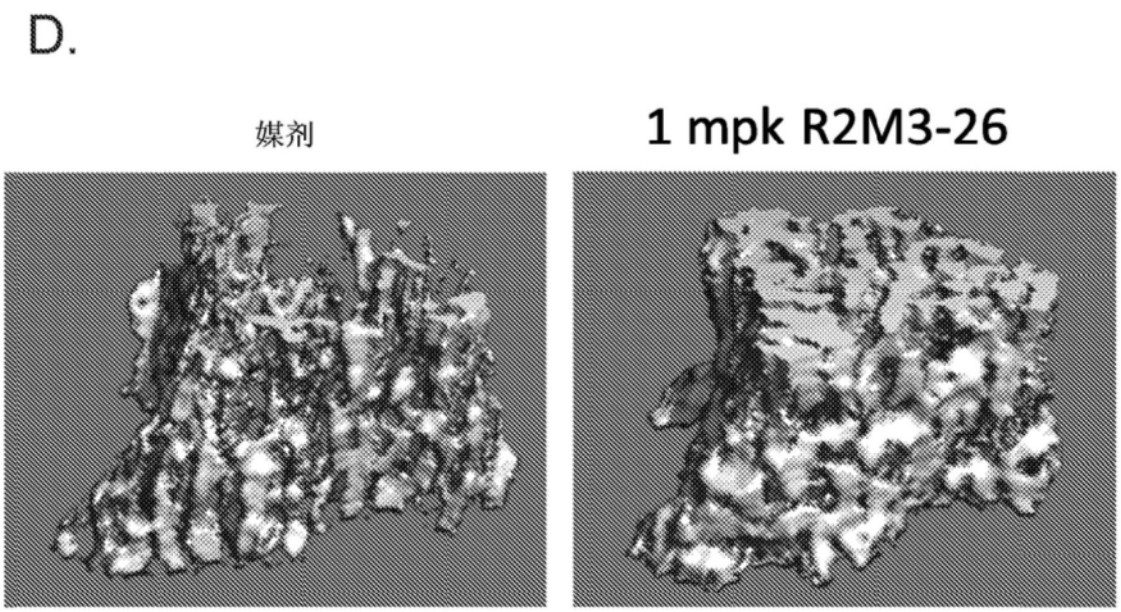


图26D

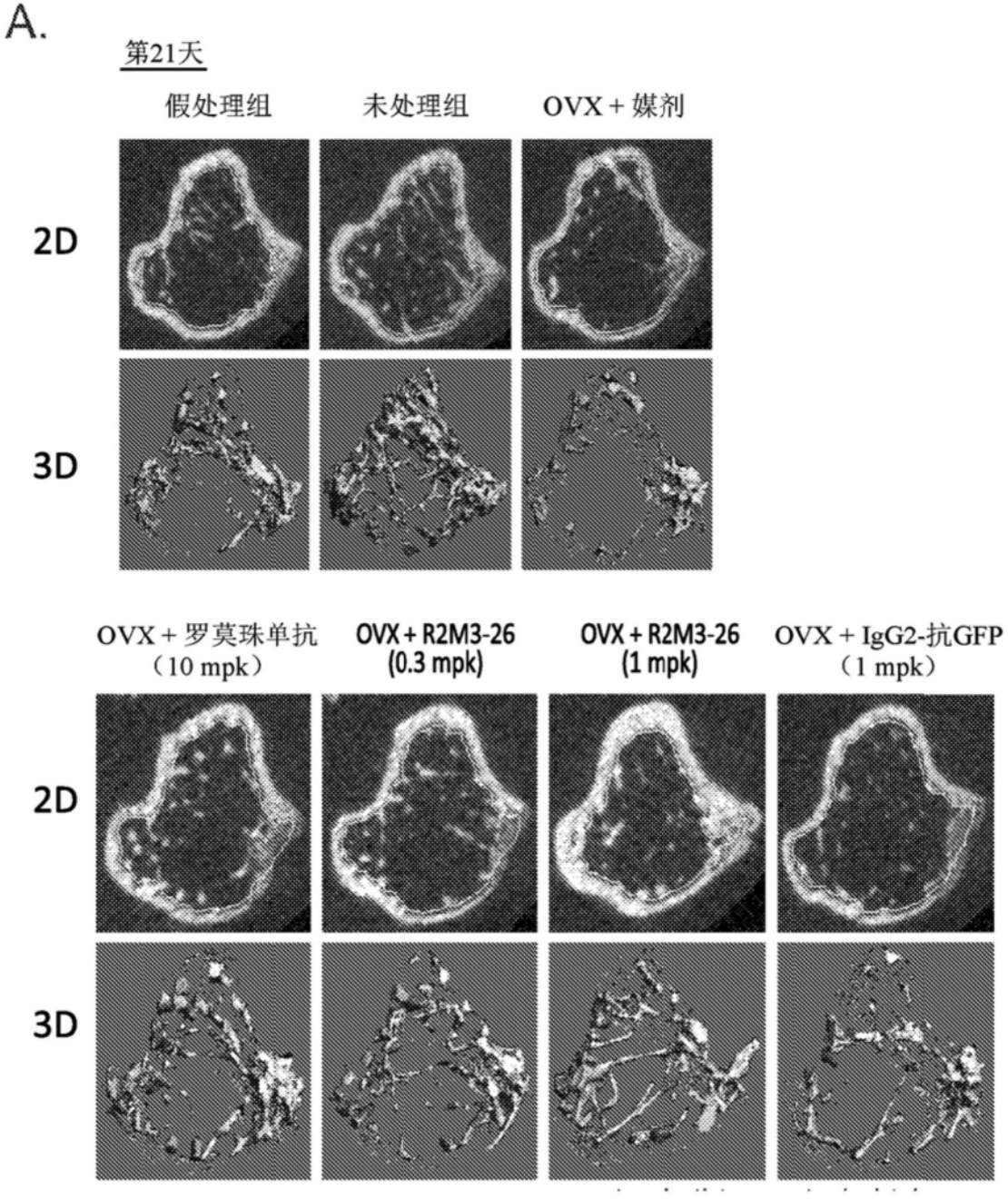

A.
第21天
假处理组
未处理组
OVX + 媒剂
2D
3D
OVX + 罗莫珠单抗
（10 mpk）
OVX + R2M3-26
(0.3 mpk)
OVX + R2M3-26
(1 mpk)
OVX + IgG2-抗GFP
（1 mpk）
2D
3D

图27A

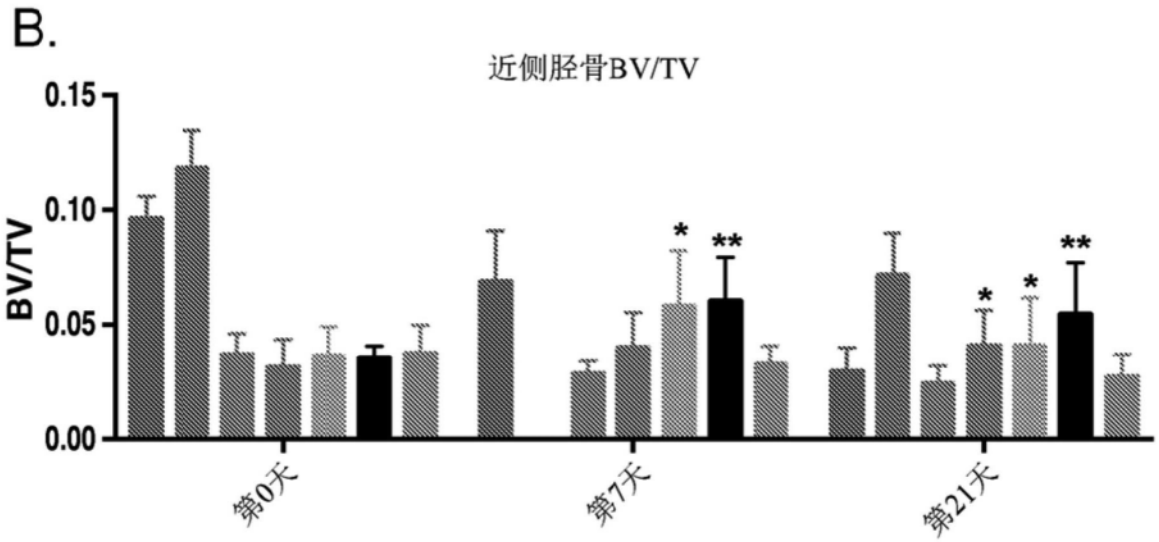


图27B

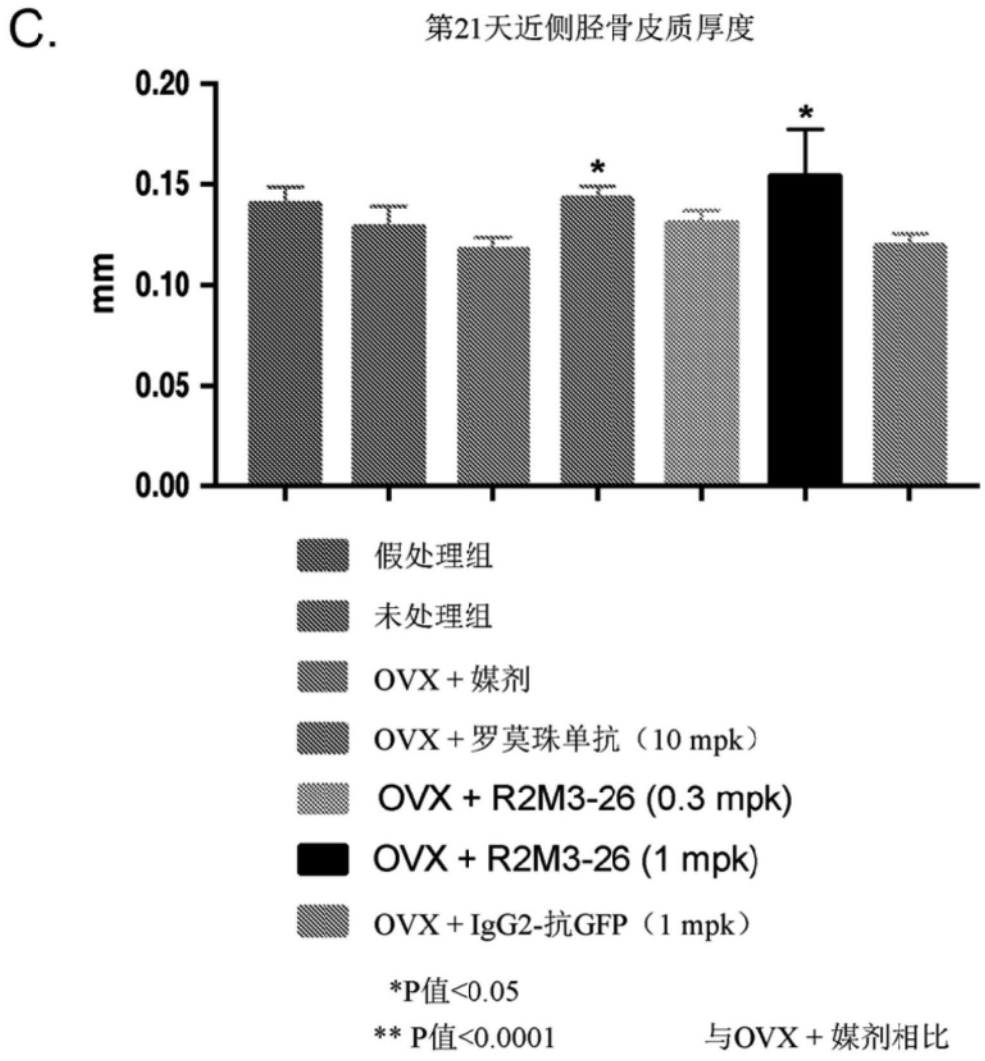

C.
第21天近侧胫骨皮质厚度
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
mm
*
*
假处理组
未处理组
OVX + 媒剂
OVX + 罗莫珠单抗（10 mpk）
OVX + R2M3-26 (0.3 mpk)
OVX + R2M3-26 (1 mpk)
OVX + IgG2-抗GFP（1 mpk）
*P值<0.05
** P值<0.0001
与OVX + 媒剂相比

图27C

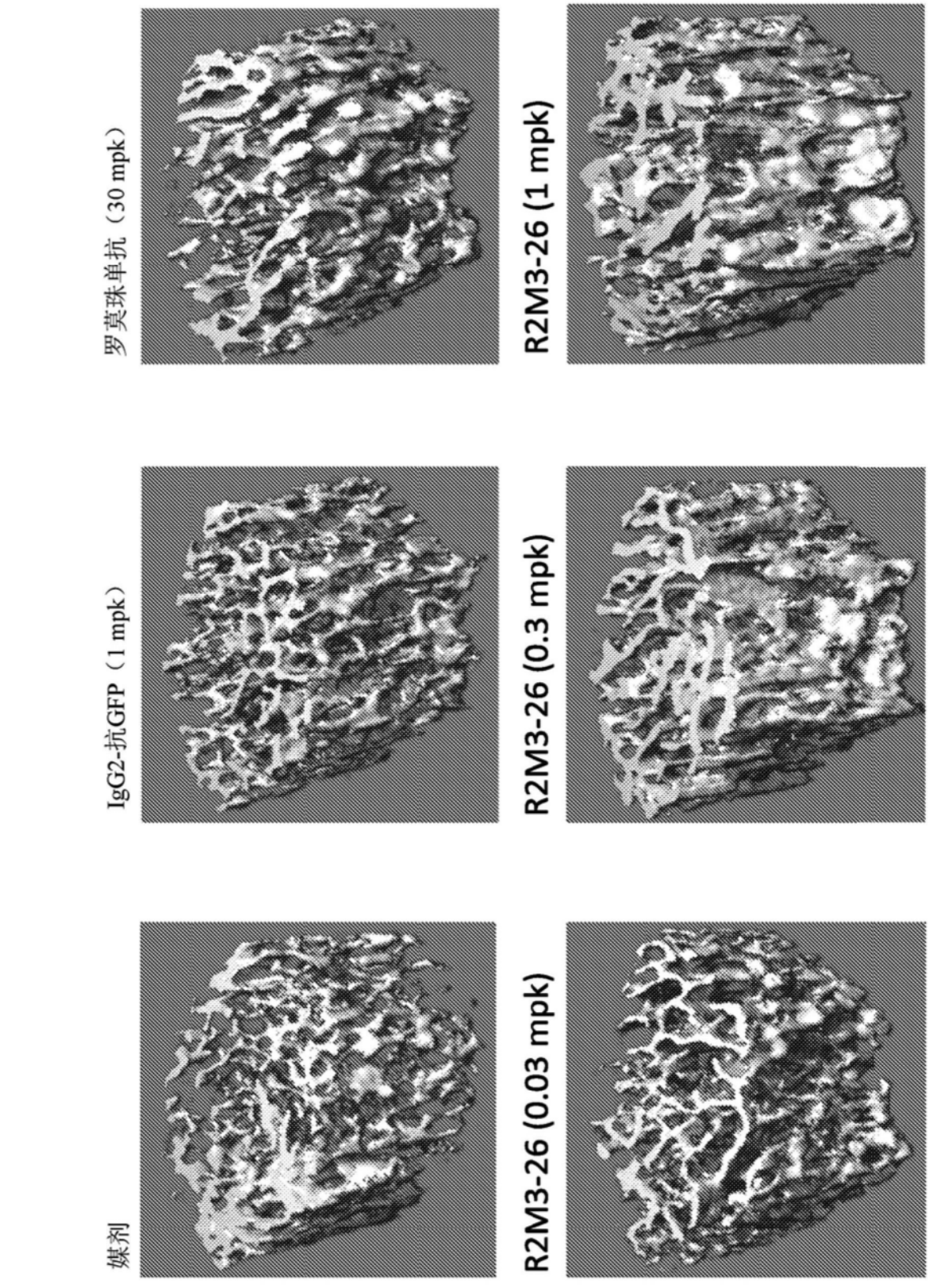

A.
媒剂
IgG2-抗GFP（1 mpk）
罗莫珠单抗（30 mpk）
R2M3-26 (0.03 mpk)
R2M3-26 (0.3 mpk)
R2M3-26 (1 mpk)

图28A

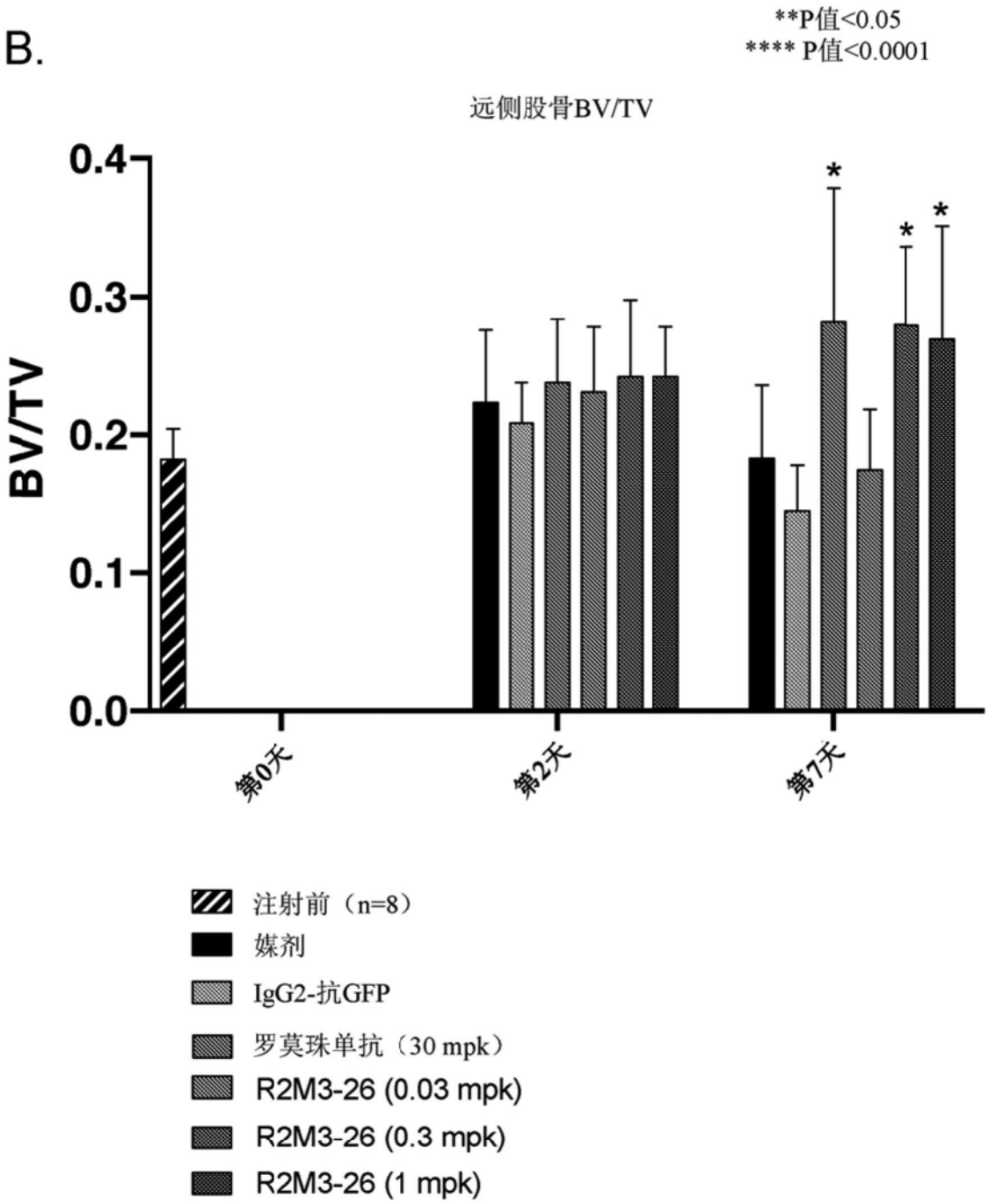

B.
**P值<0.05
**** P值<0.0001
远侧股骨BV/TV
BV/TV
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
*
第0天
第2天
第7天
注射前（n=8）
媒剂
IgG2-抗GFP
罗莫珠单抗（30 mpk）
R2M3-26 (0.03 mpk)
R2M3-26 (0.3 mpk)
R2M3-26 (1 mpk)

图28B

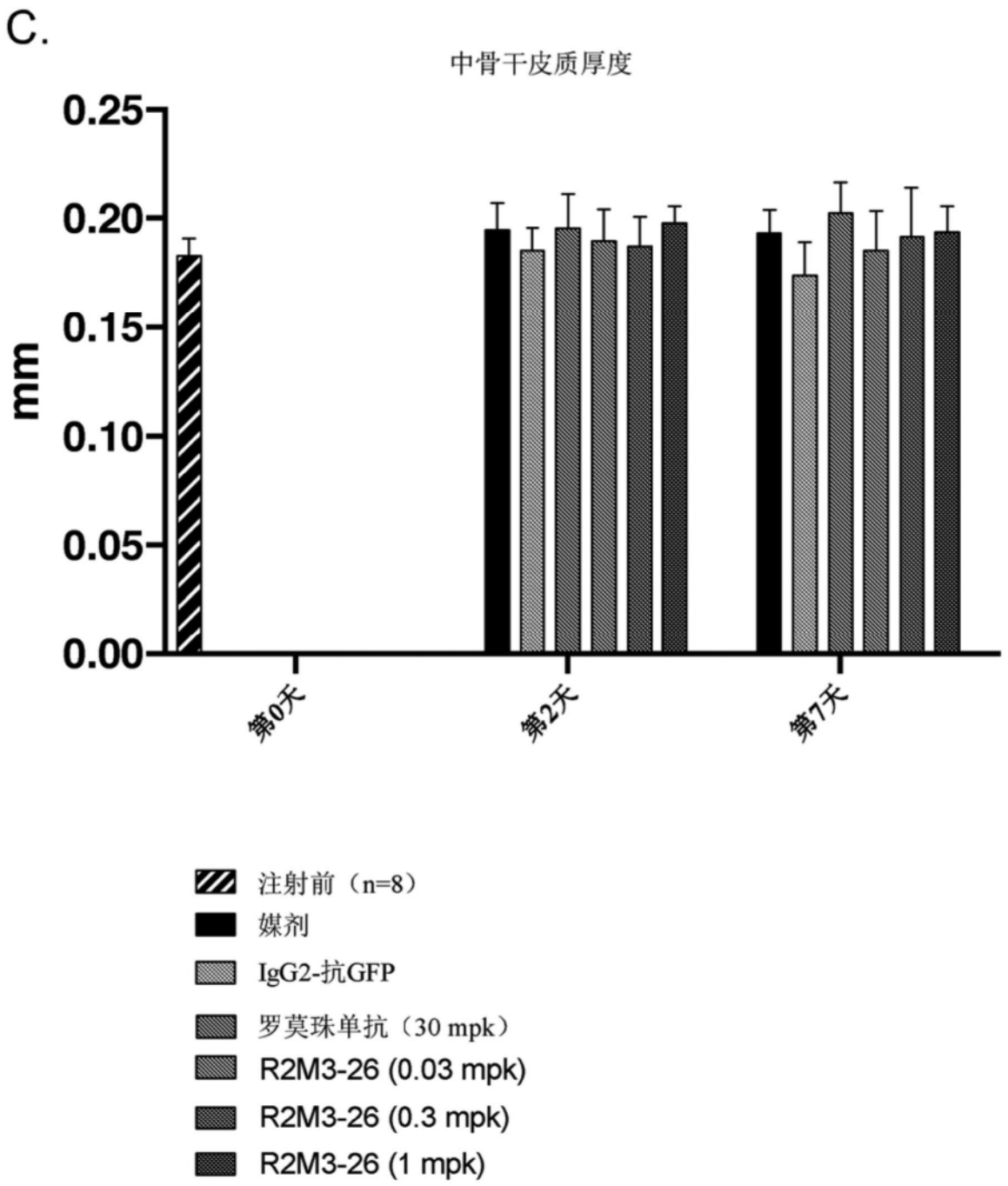

C.
中骨干皮质厚度
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
mm
第0天
第2天
第7天
注射前（n=8）
媒剂
IgG2-抗GFP
罗莫珠单抗（30 mpk）
R2M3-26 (0.03 mpk)
R2M3-26 (0.3 mpk)
R2M3-26 (1 mpk)

图28C

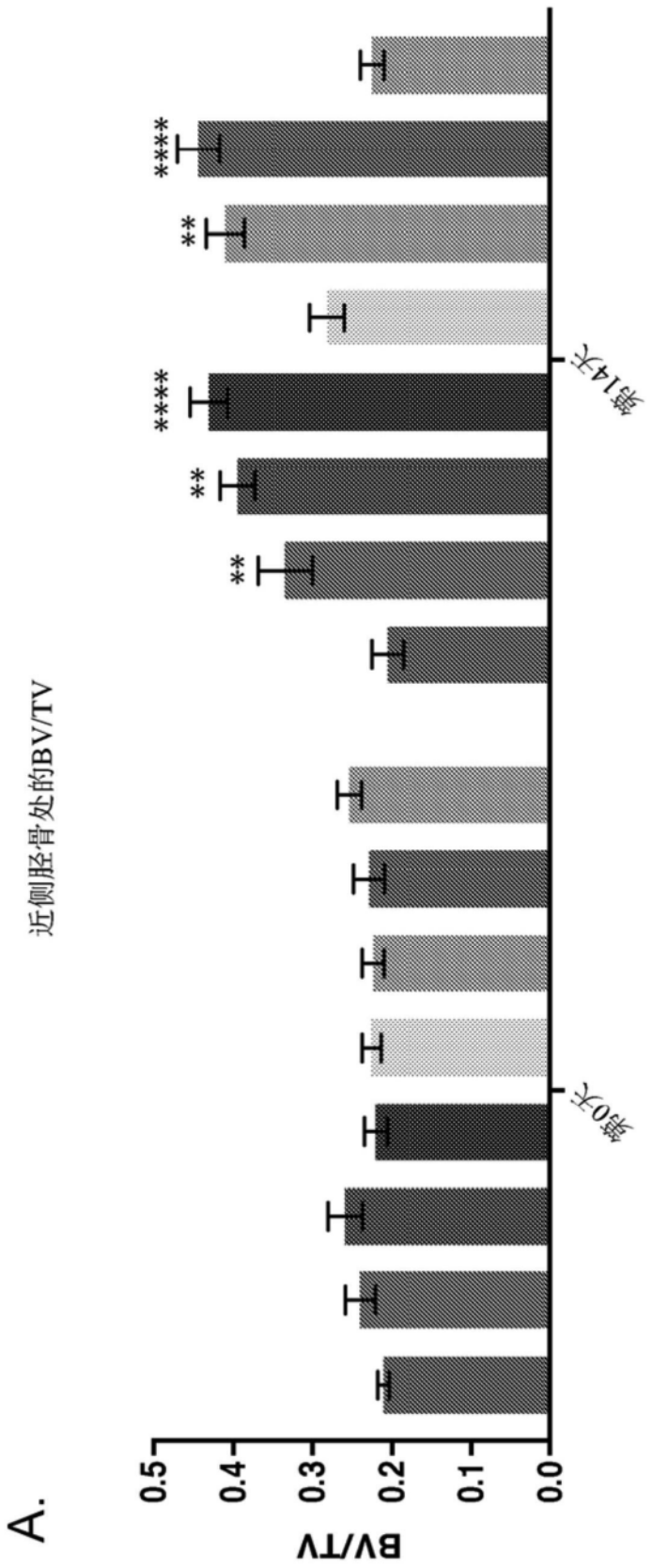


图29A

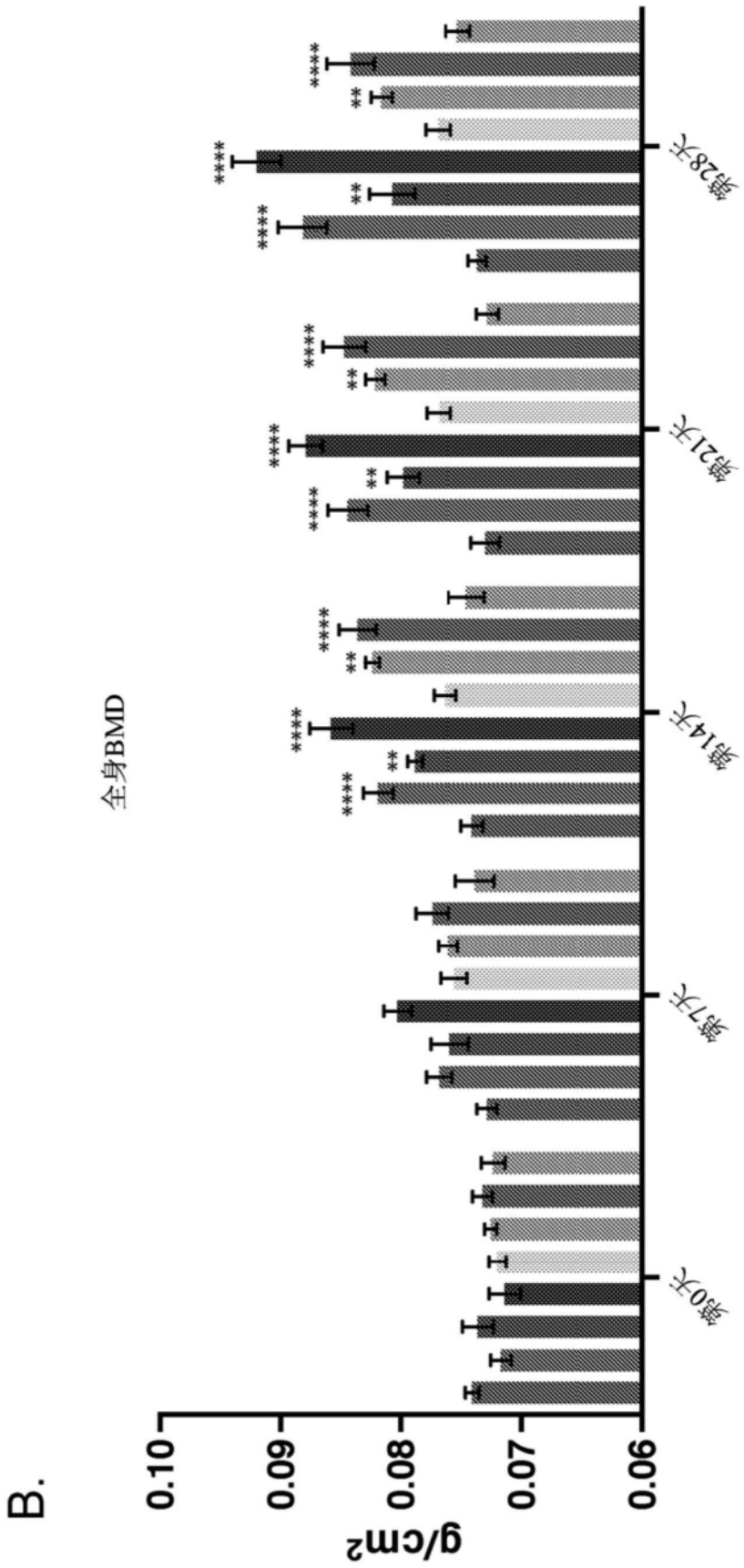


图29B

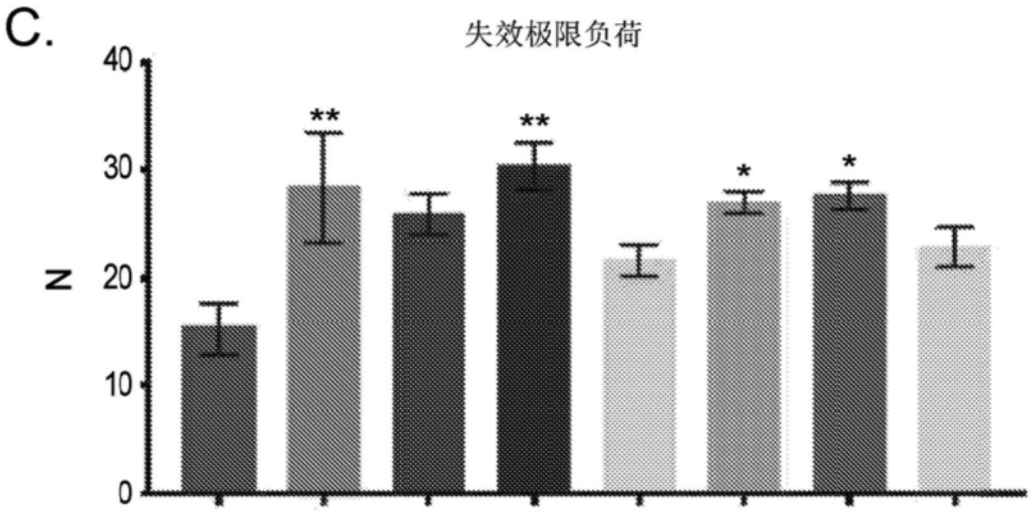

C.
失效极限负荷
N
40
30
20
10
0
**
**
*
*

图29C

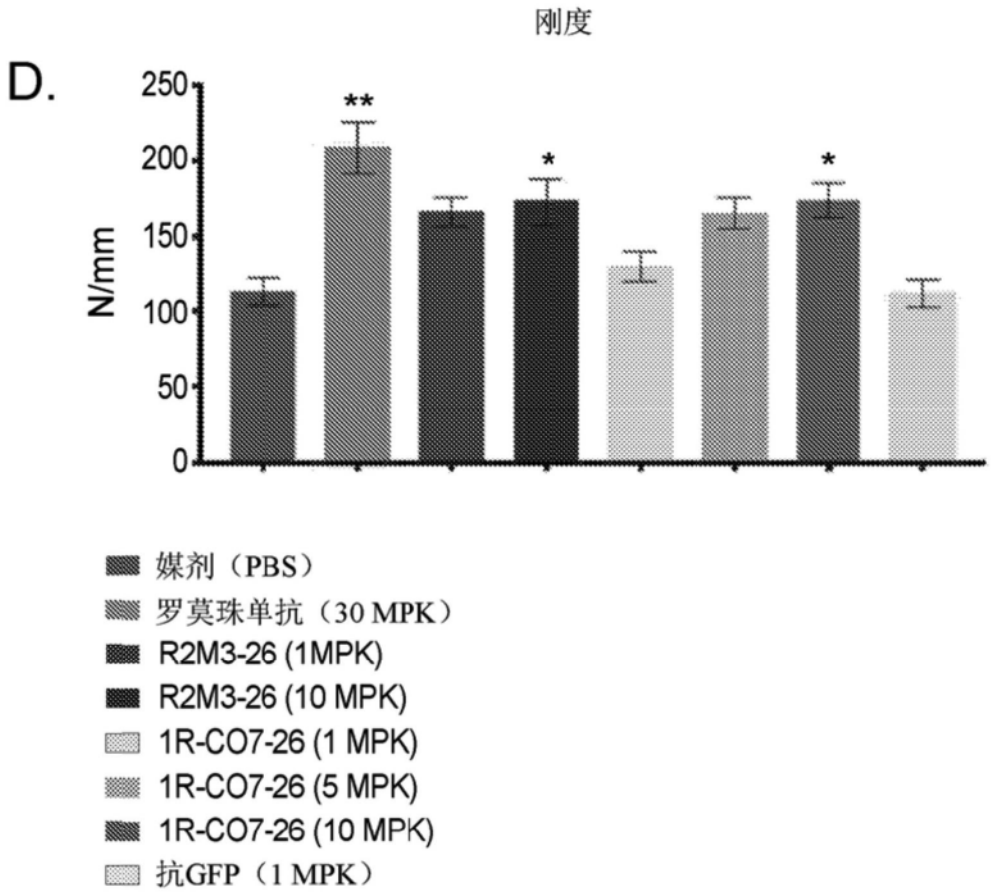

刚度
D.
N/mm
250
200
150
100
50
0
**
*
*
媒剂（PBS）
罗莫珠单抗（30 MPK）
R2M3-26 (1MPK)
R2M3-26 (10 MPK)
1R-CO7-26 (1 MPK)
1R-CO7-26 (5 MPK)
1R-CO7-26 (10 MPK)
抗GFP（1 MPK）

图29D

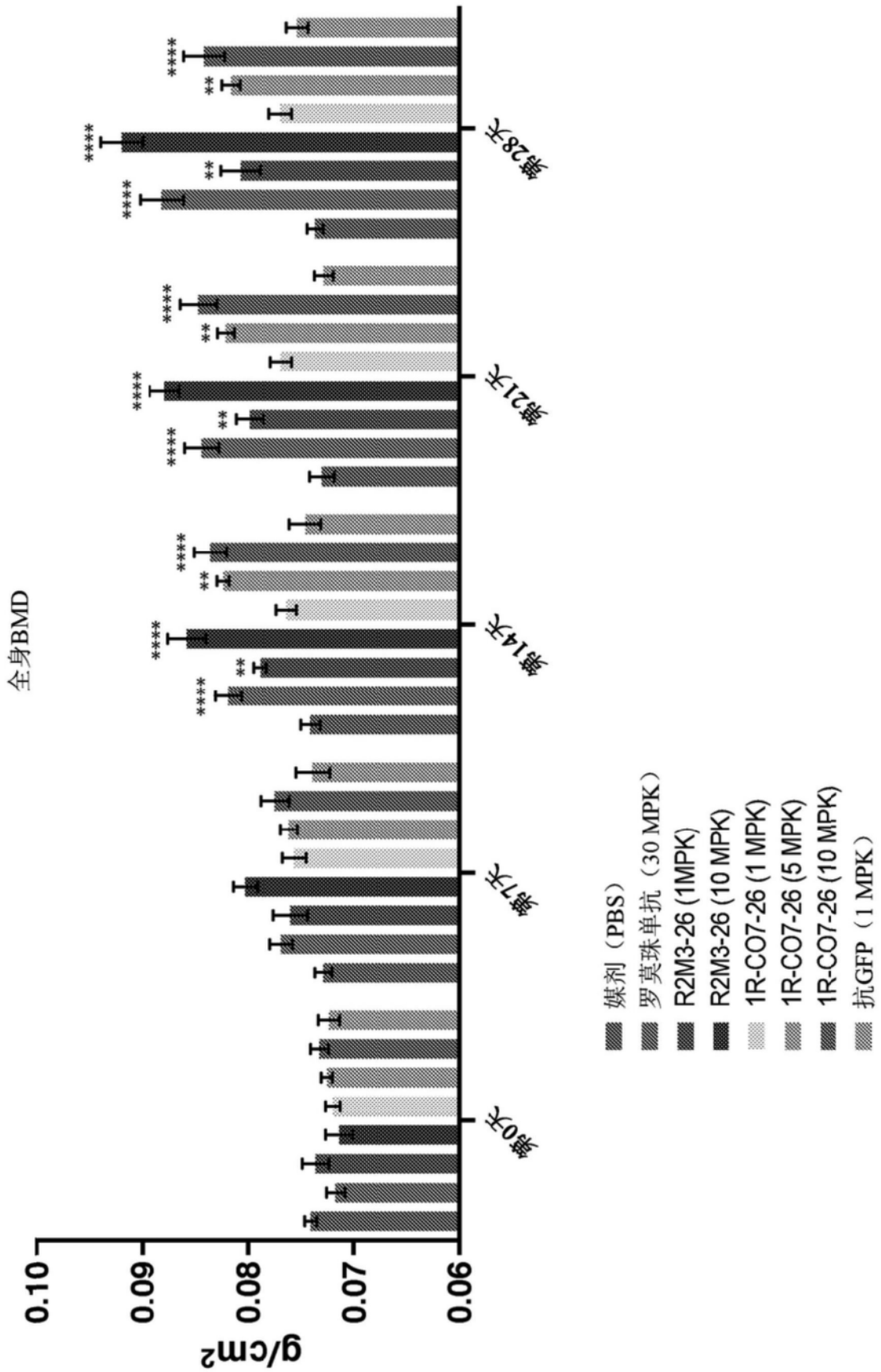

全身BMD
g/cm2
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天
媒剂（PBS）
罗莫珠单抗（30 MPK）
R2M3-26 (1MPK)
R2M3-26 (10 MPK)
1R-CO7-26 (1 MPK)
1R-CO7-26 (5 MPK)
1R-CO7-26 (10 MPK)
抗GFP（1 MPK）

图30

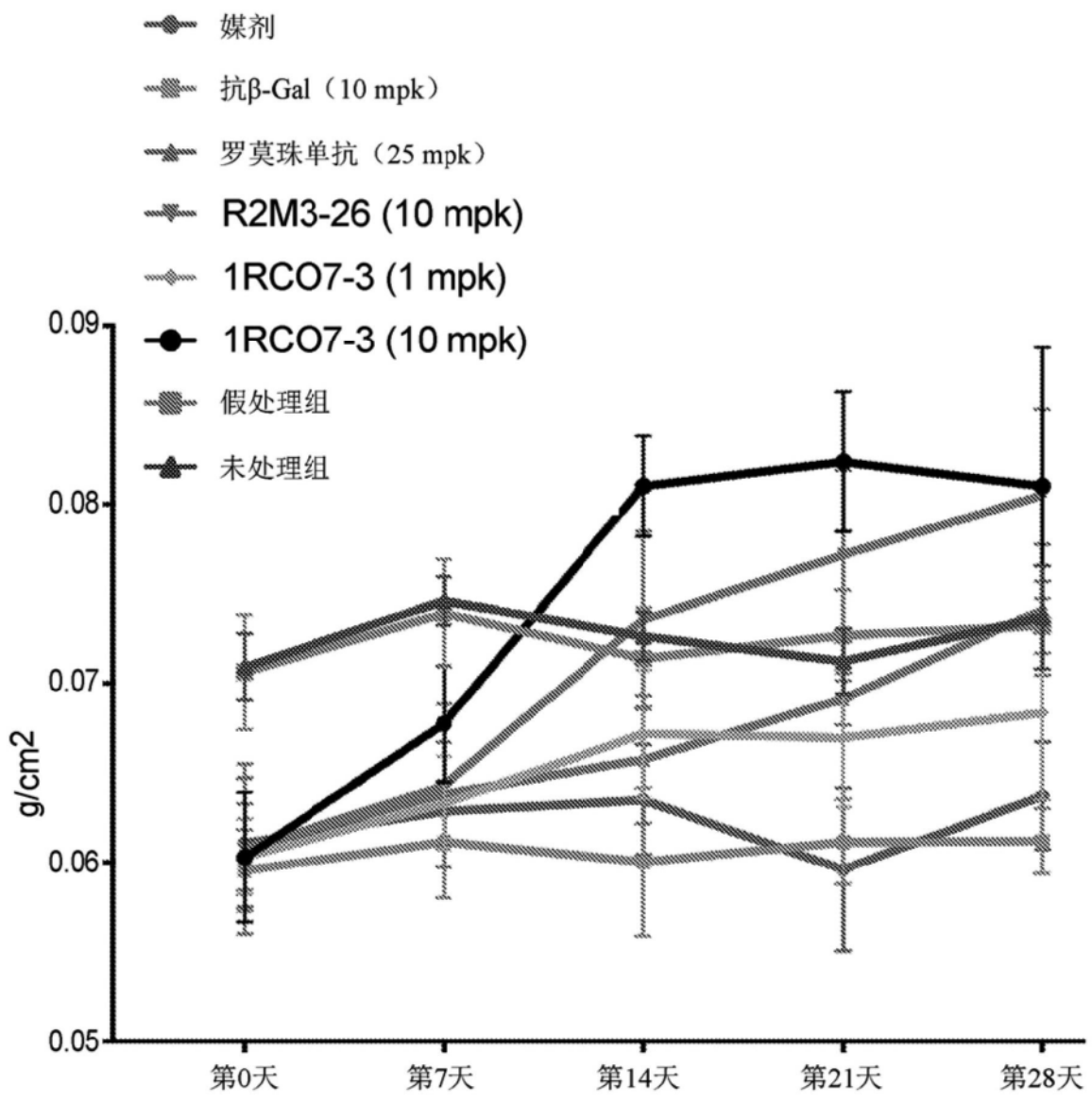

媒剂
抗β-Gal（10 mpk）
罗莫珠单抗（25 mpk）
R2M3-26 (10 mpk)
1RCO7-3 (1 mpk)
1RCO7-3 (10 mpk)
假处理组
未处理组
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
g/cm2
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天

图31

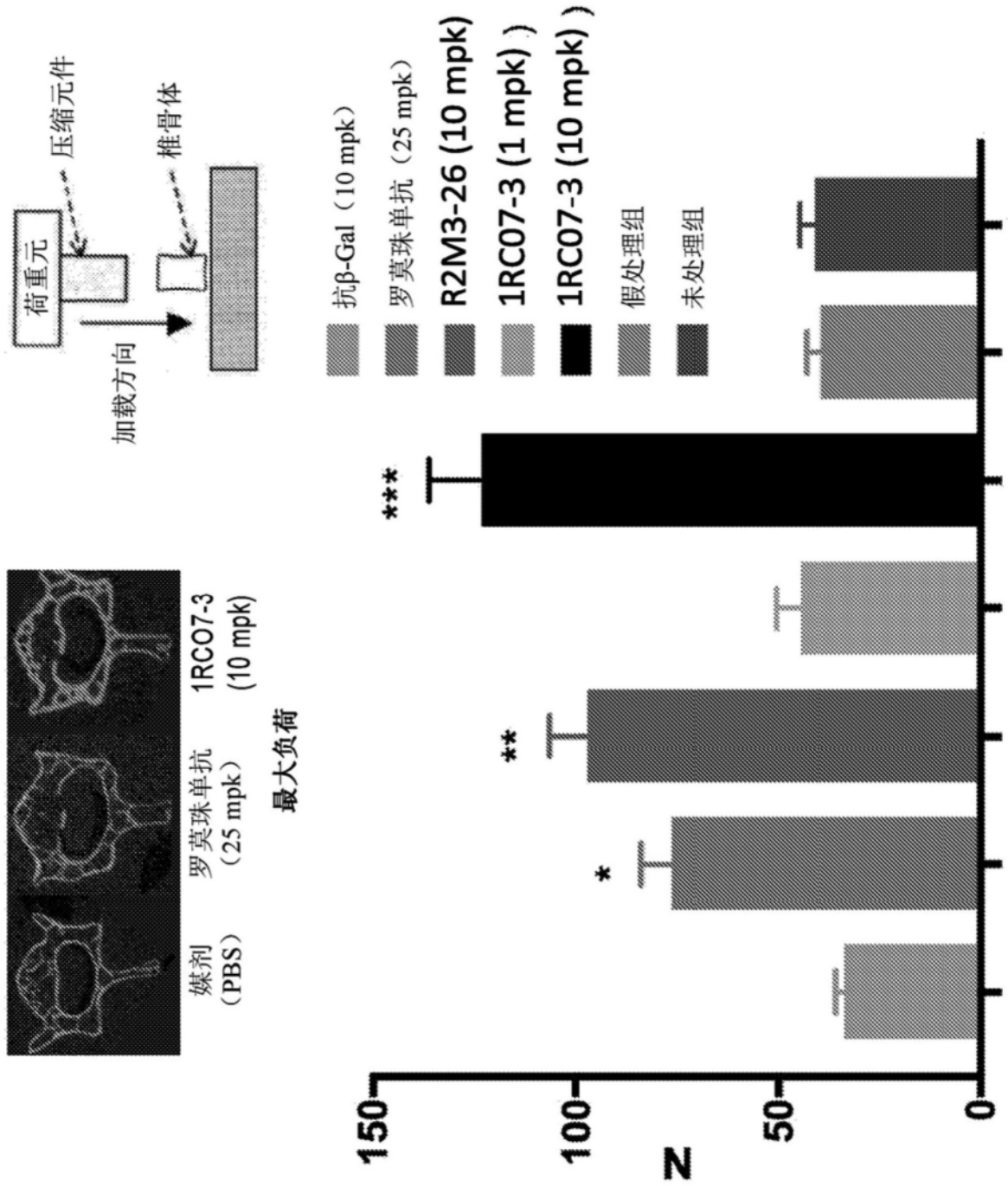

荷重元
压缩元件
加载方向
椎骨体
媒剂（PBS）
罗莫珠单抗（25 mpk）
1RC07-3 (10 mpk)
最大负荷
抗β-Gal（10 mpk）
罗莫珠单抗（25 mpk）
R2M3-26 (10 mpk)
1RC07-3 (1 mpk))
1RC07-3 (10 mpk))
假处理组
未处理组
***
**
*
150
100
50
0
N

图32

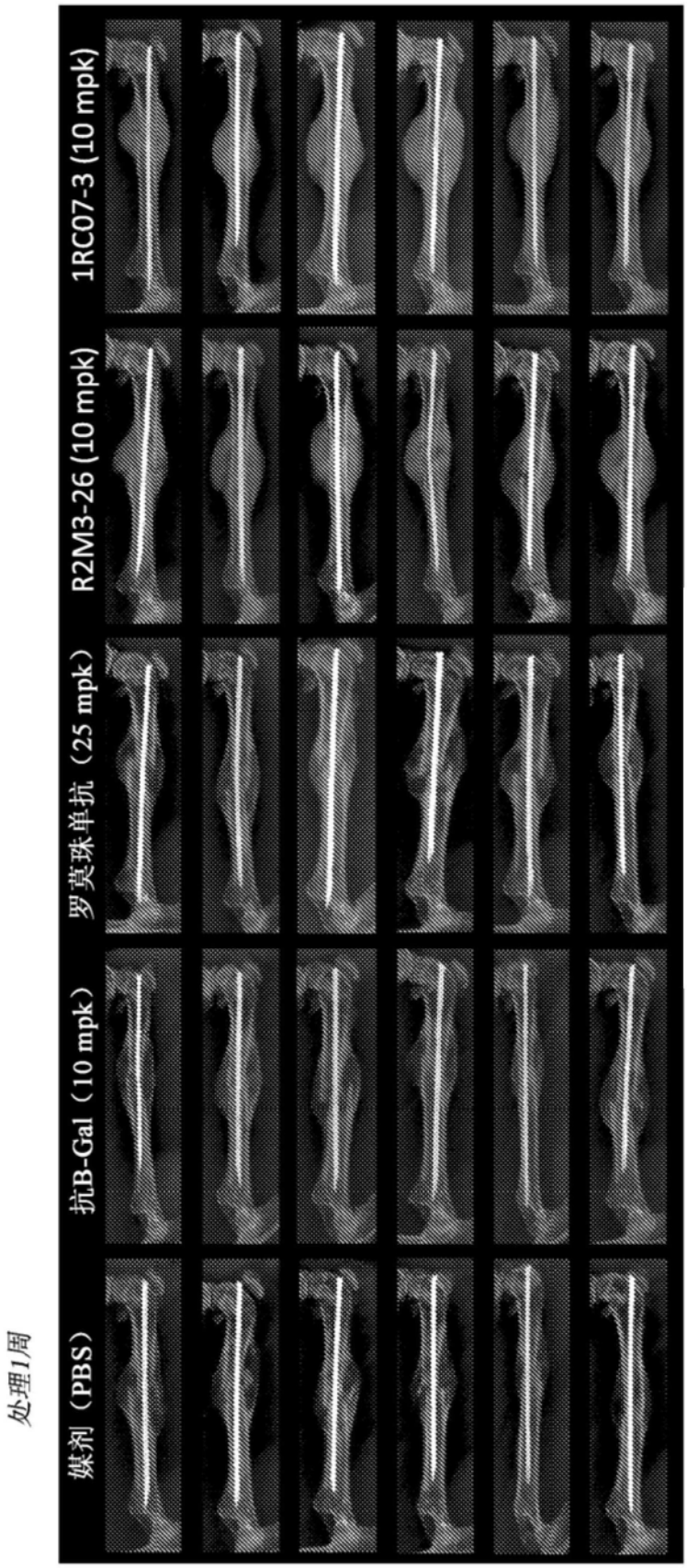

媒剂（PBS）
抗B-Gal（10 mpk）
罗莫珠单抗（25 mpk）
R2M3-26 (10 mpk)
1RC07-3 (10 mpk)
处理1周

图33A

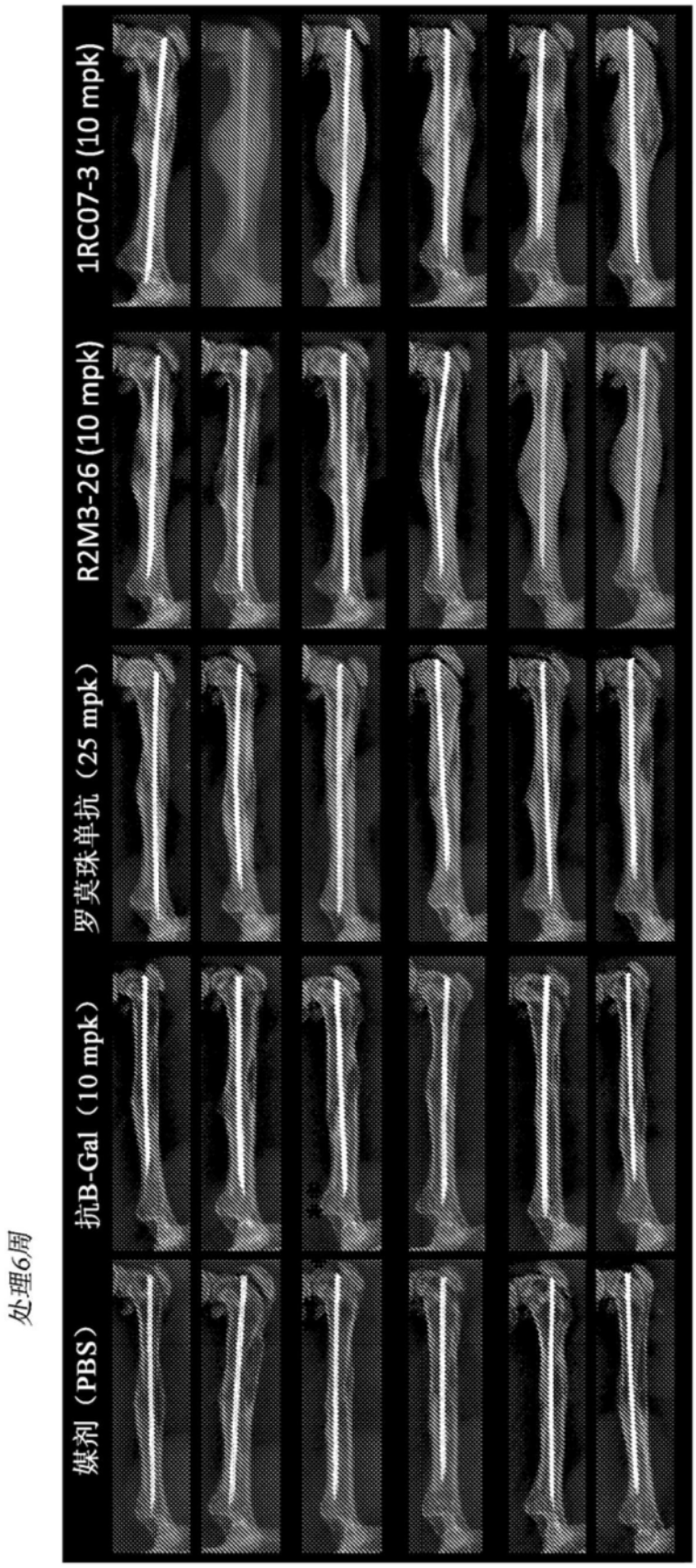

媒剂（PBS）
抗B-Gal（10 mpk）
罗莫珠单抗（25 mpk）
R2M3-26 (10 mpk)
1RC07-3 (10 mpk)
处理6周

图33B

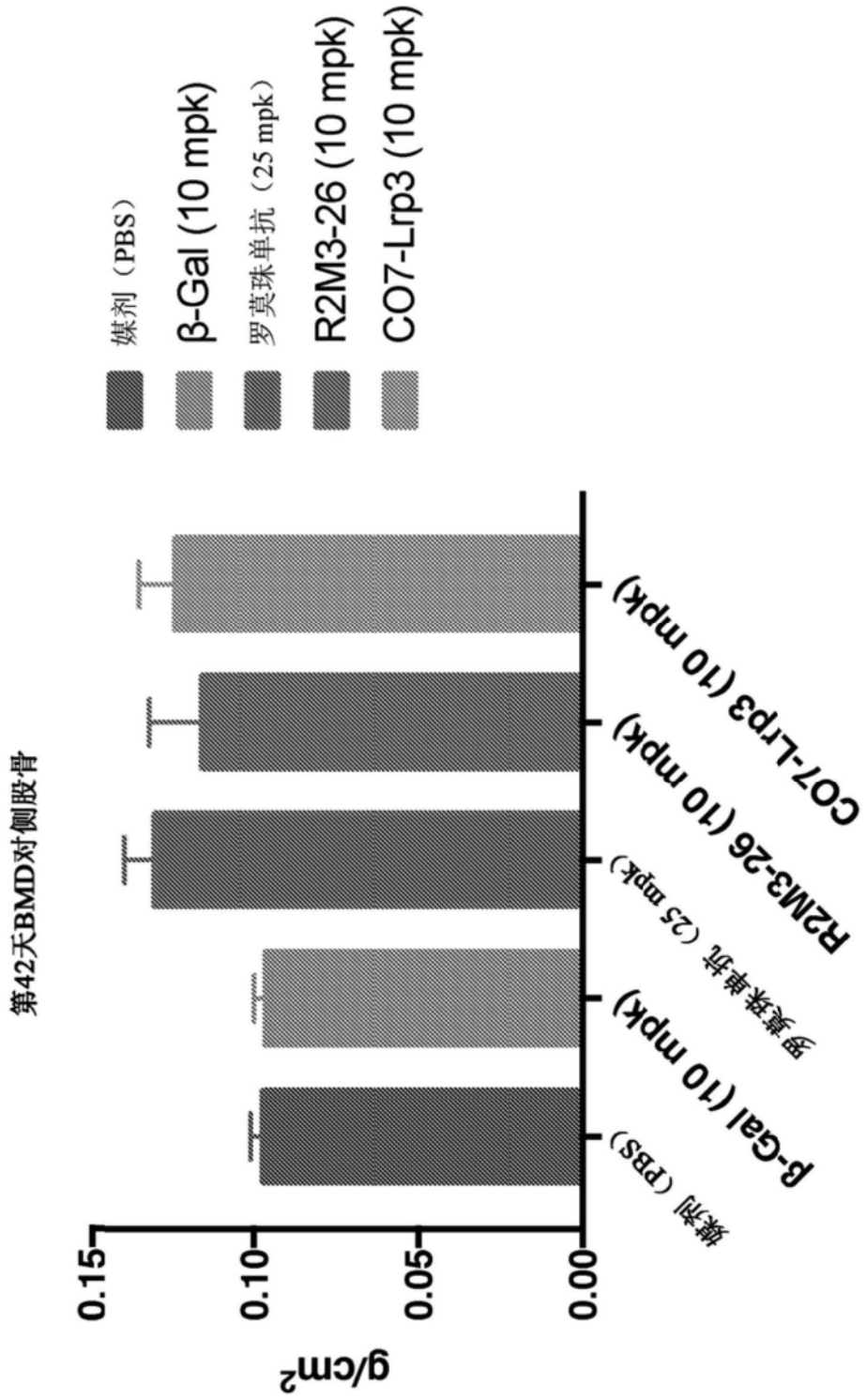

媒剂（PBS）
β-Gal (10 mpk)
罗莫珠单抗（25 mpk）
R2M3-26 (10 mpk)
CO7-Lrp3 (10 mpk)
第42天BMD对侧股骨
0.15
0.10
0.05
0.00
g/cm²
媒剂（PBS）
β-Gal (10 mpk)
罗莫珠单抗（25 mpk）
R2M3-26 (10 mpk)
CO7-Lrp3 (10 mpk)

图33C

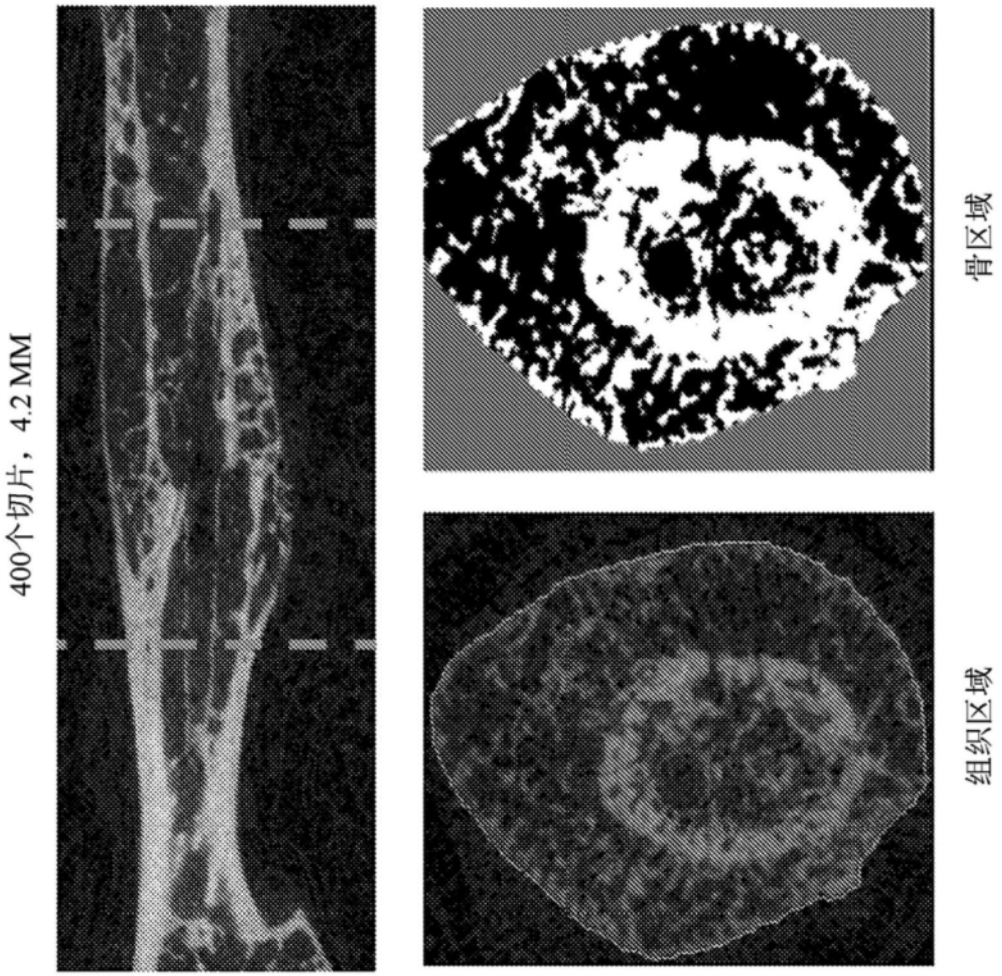
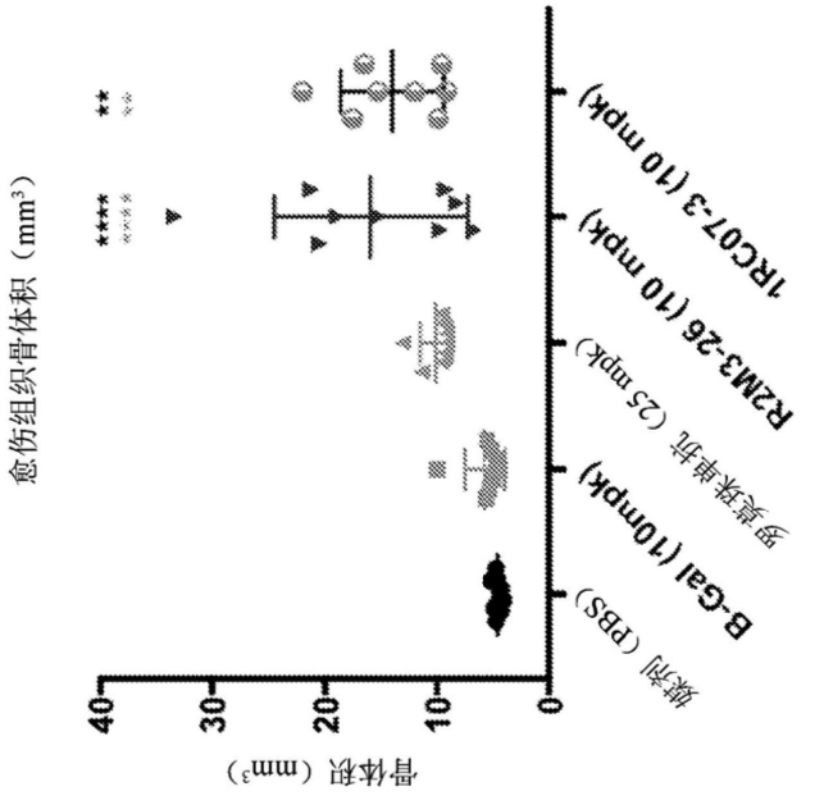


图33D


愈伤组织骨体积（mm³）
骨体积（mm³）
0
10
20
30
40
媒剂（PBS）
B-Gal（10mpk）
罗莫珠单抗（25 mpk）
R2M3-26（10 mpk）
1RC07-3（10 mpk）

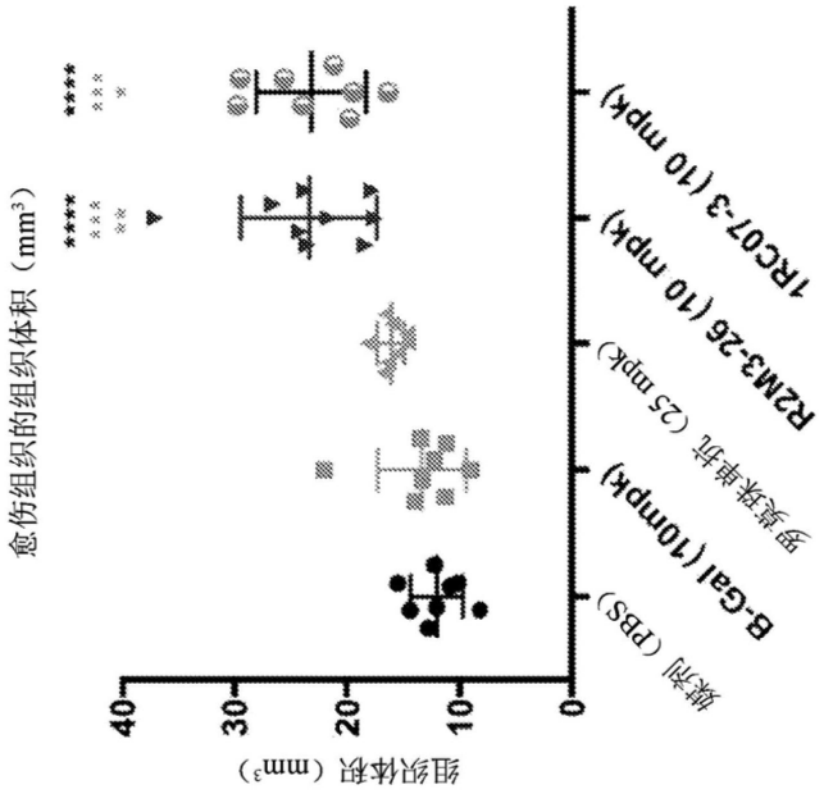

愈伤组织的组织体积（mm³）
组织体积（mm³）
0
10
20
30
40
媒剂（PBS）
B-Gal（10mpk）
罗莫珠单抗（25 mpk）
R2M3-26（10 mpk）
1RC07-3（10 mpk）

图33D(续)

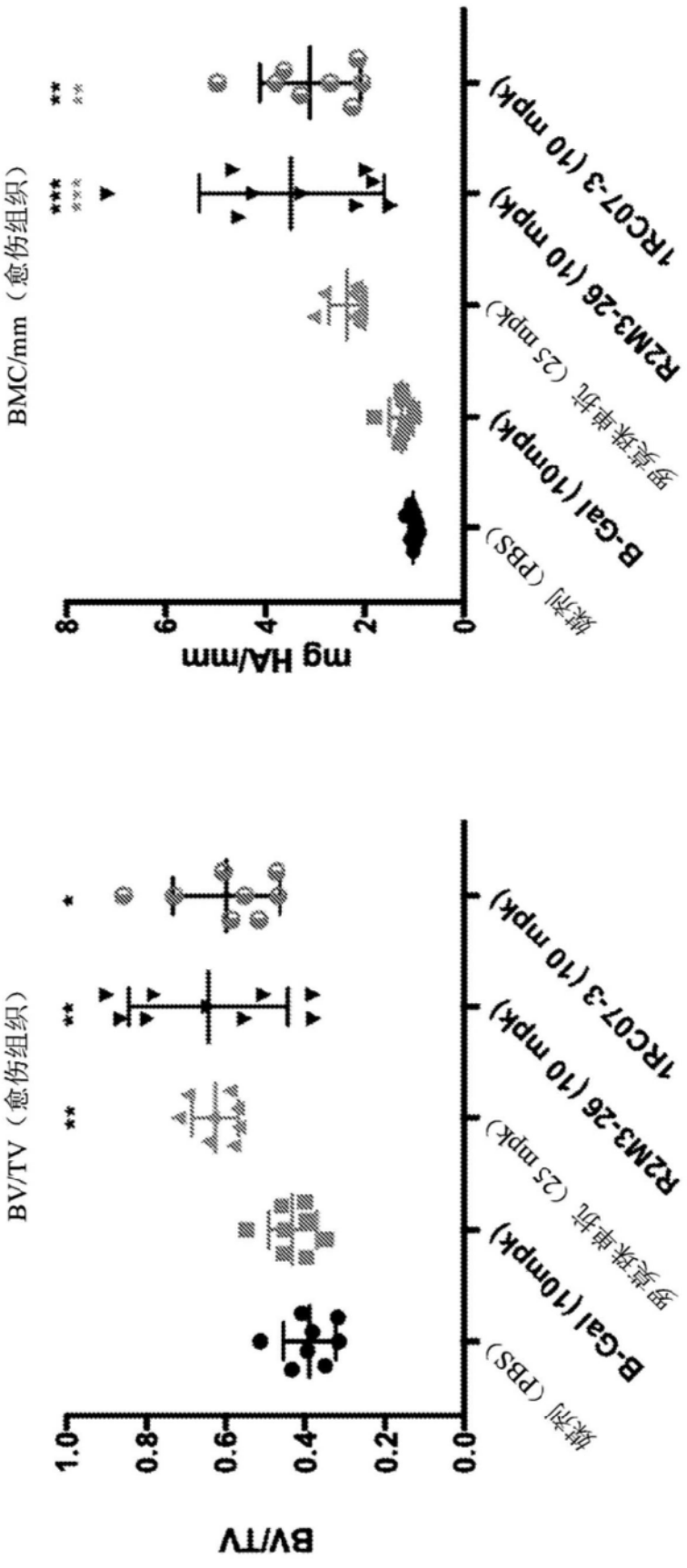

mg HA/mm
BMC/mm（愈伤组织）
BV/TV
BV/TV（愈伤组织）
媒剂（PBS）
B-Gal（10mpk）
罗美珠单抗（25 mpk）
R2M3-26（10 mpk）
1RC07-3（10 mpk）

图33D(续)

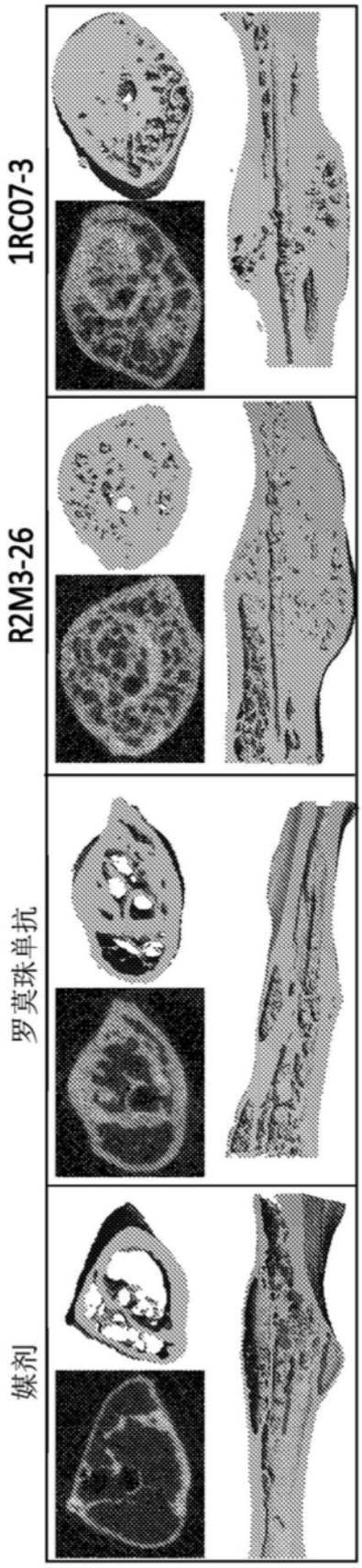


图33D(续)

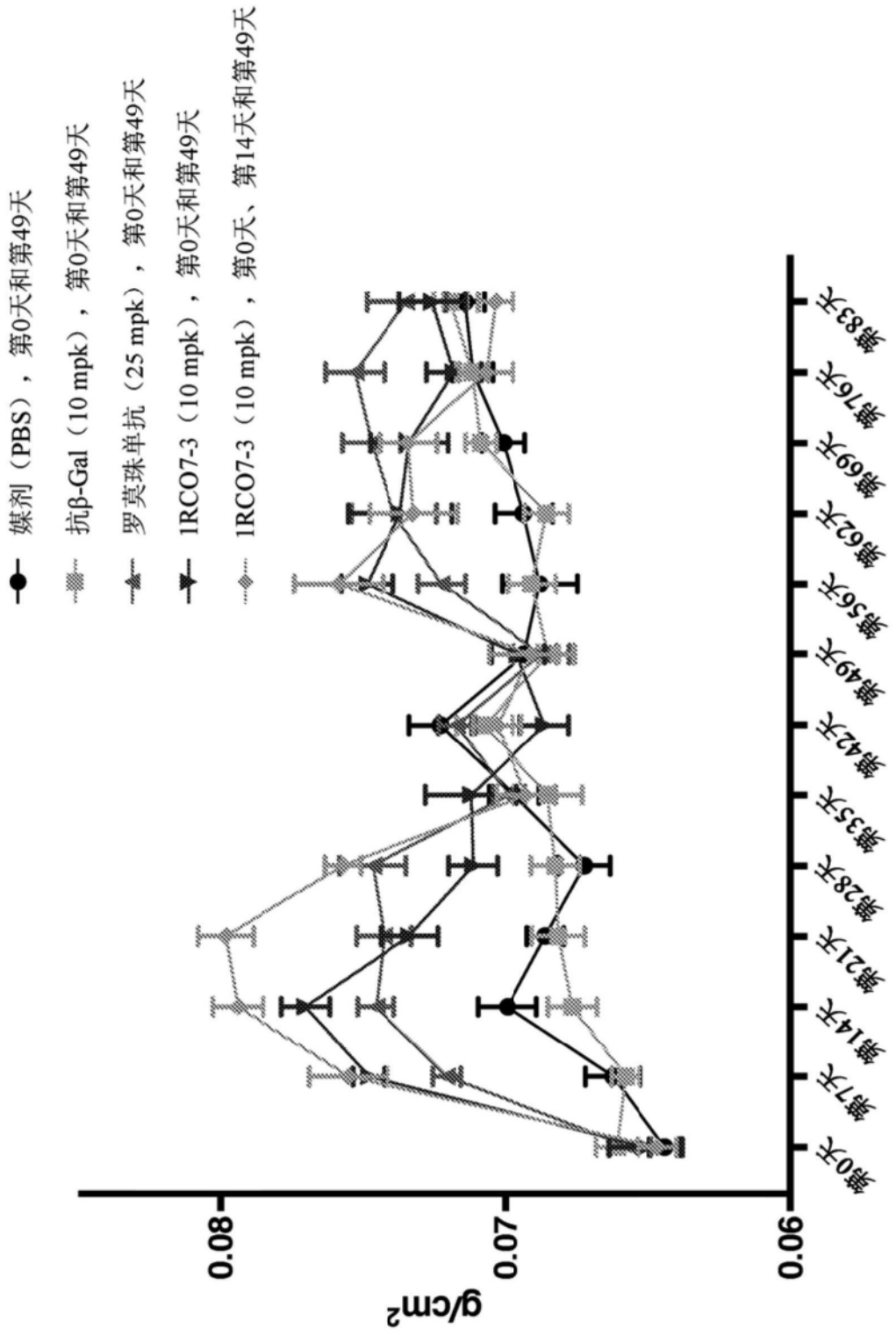

媒剂（PBS），第0天和第49天
抗β-Gal（10 mpk），第0天和第49天
罗莫珠单抗（25 mpk），第0天和第49天
1RCO7-3（10 mpk），第0天和第49天
1RCO7-3（10 mpk），第0天、第14天和第49天
0.08
0.07
0.06
g/cm²
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天
第62天
第69天
第76天
第83天

图34

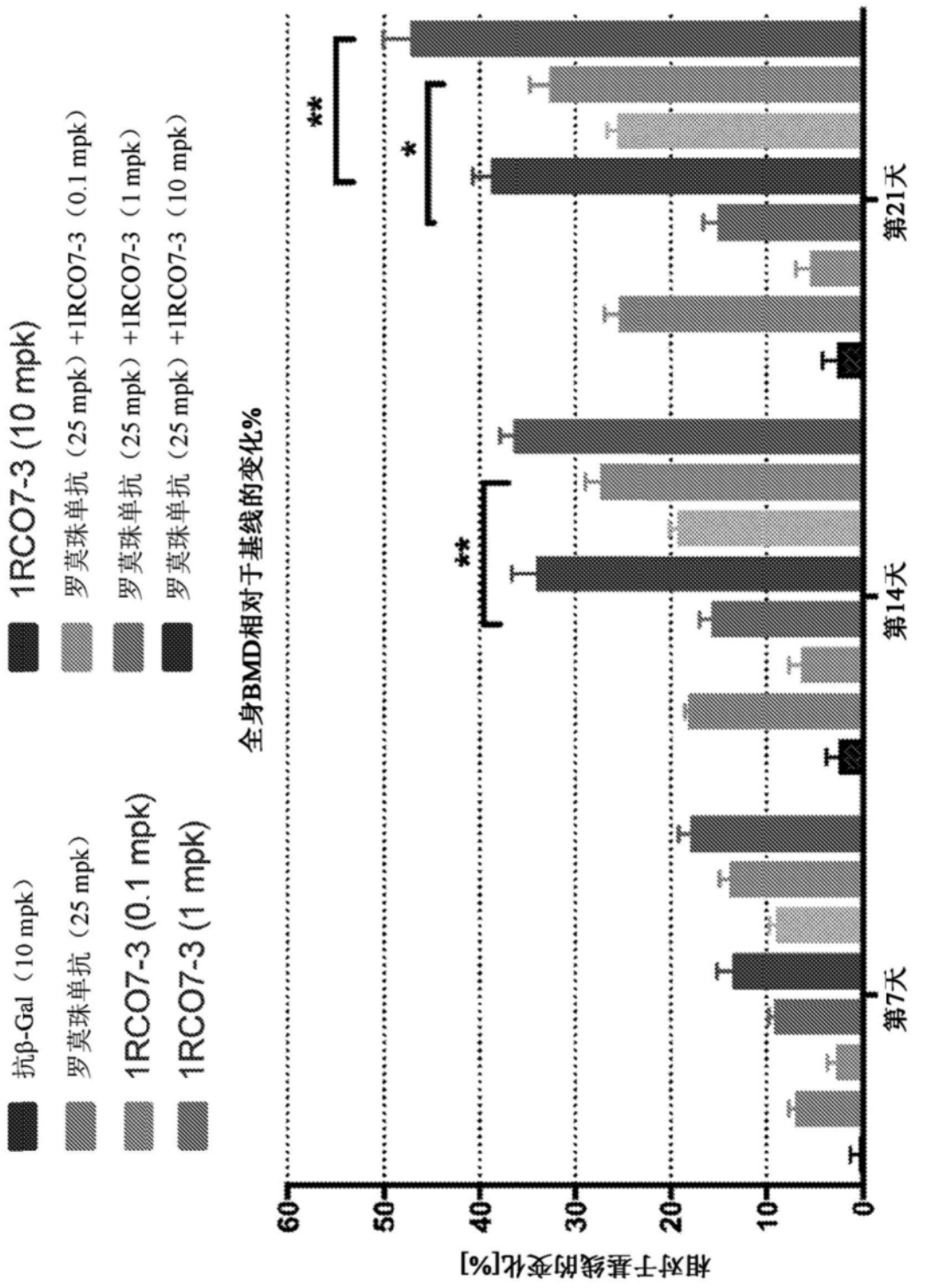

抗β-Gal（10 mpk）
罗莫珠单抗（25 mpk）
1RCO7-3 (0.1 mpk)
1RCO7-3 (1 mpk)
1RCO7-3 (10 mpk)
罗莫珠单抗（25 mpk）+1RCO7-3（0.1 mpk）
罗莫珠单抗（25 mpk）+1RCO7-3（1 mpk）
罗莫珠单抗（25 mpk）+1RCO7-3（10 mpk）
全身BMD相对于基线的变化%
相对于基线的变化[%]
60
50
40
30
20
10
0
第7天
第14天
第21天
**
*
**

图35

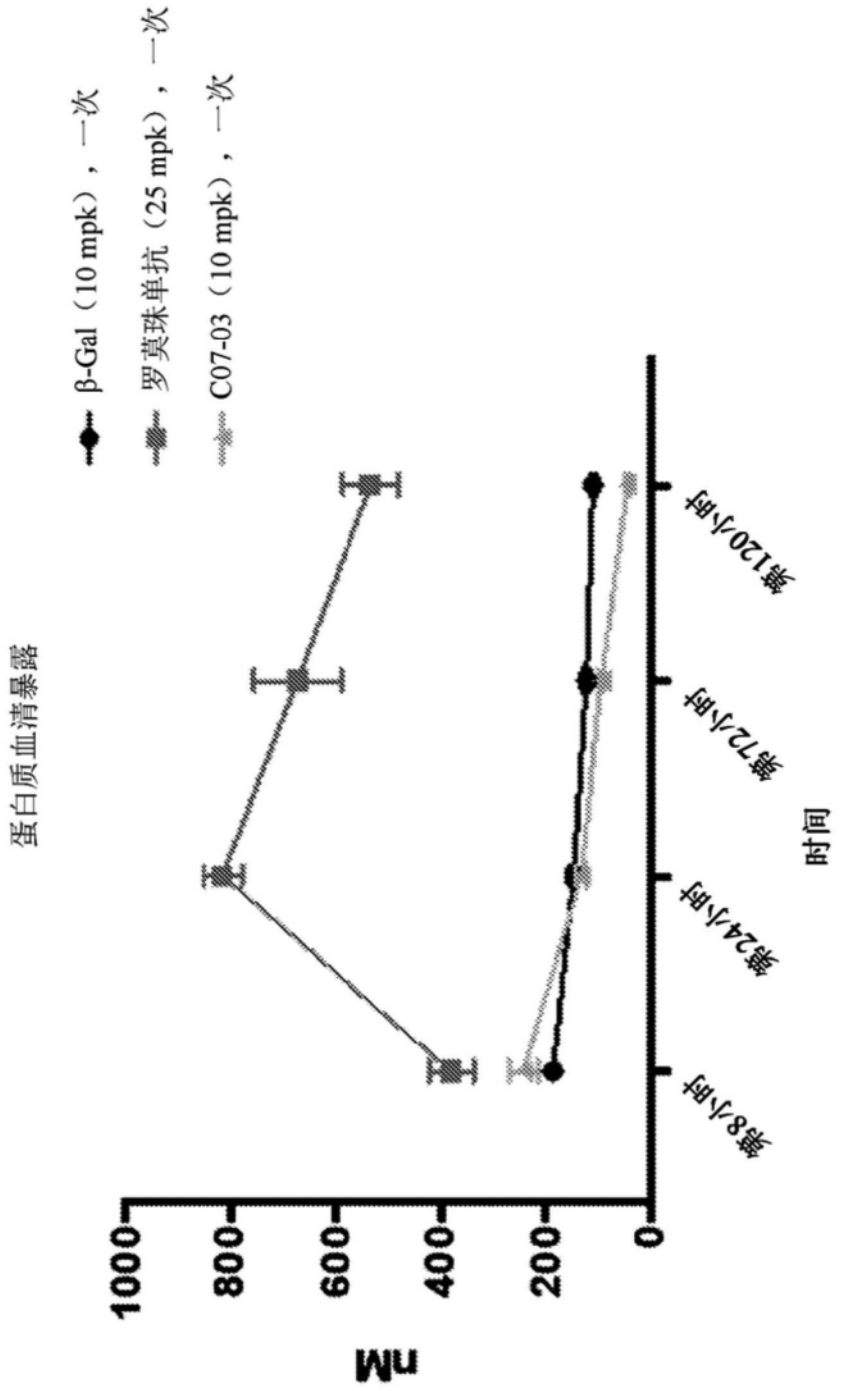

蛋白质血清暴露
β-Gal（10 mpk），一次
罗莫珠单抗（25 mpk），一次
C07-03（10 mpk），一次
nM
1000
800
600
400
200
0
第8小时
第24小时
第72小时
第120小时
时间

图36

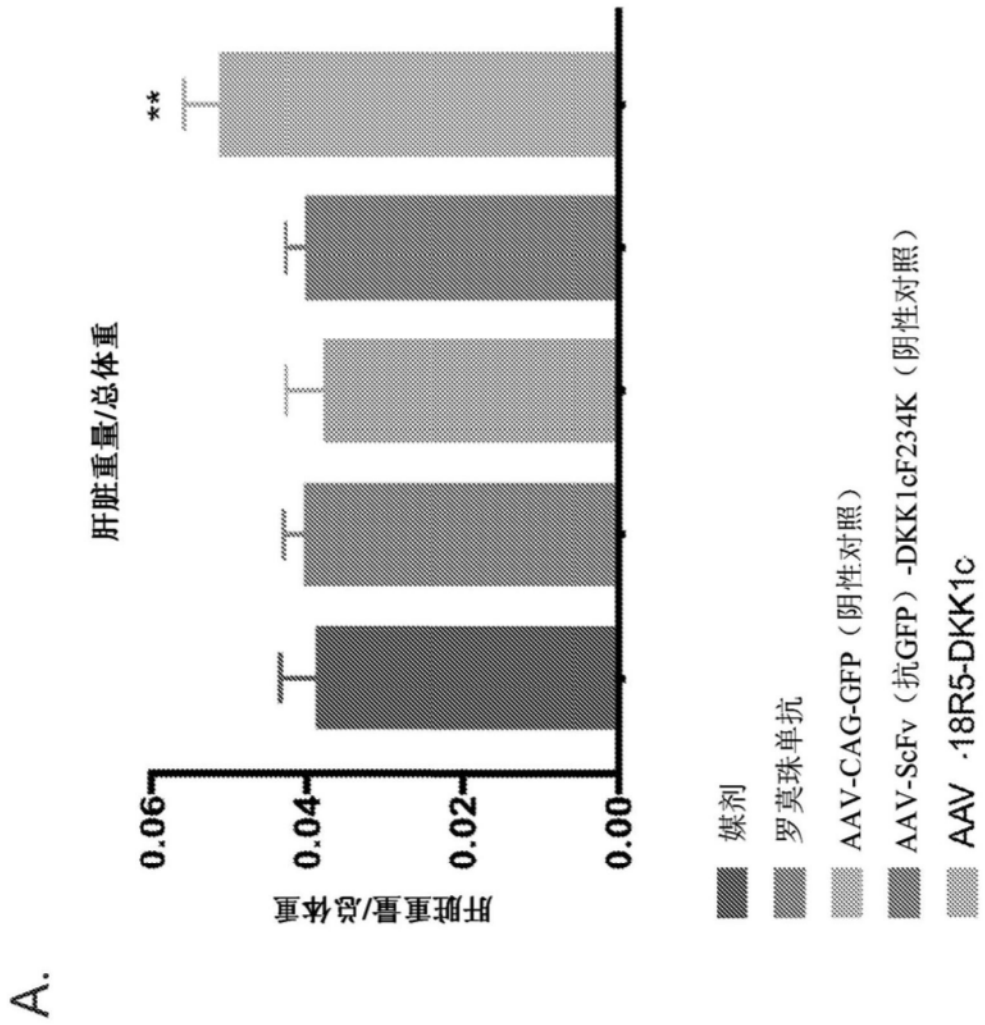

A.
肝脏重量/总体重
0.06
0.04
0.02
0.00
**
媒剂
罗莫珠单抗
AAV-CAG-GFP（阴性对照）
AAV-ScFv（抗GFP）-DKK1cF234K（阴性对照）
AAV -18R5-DKK1c

图37

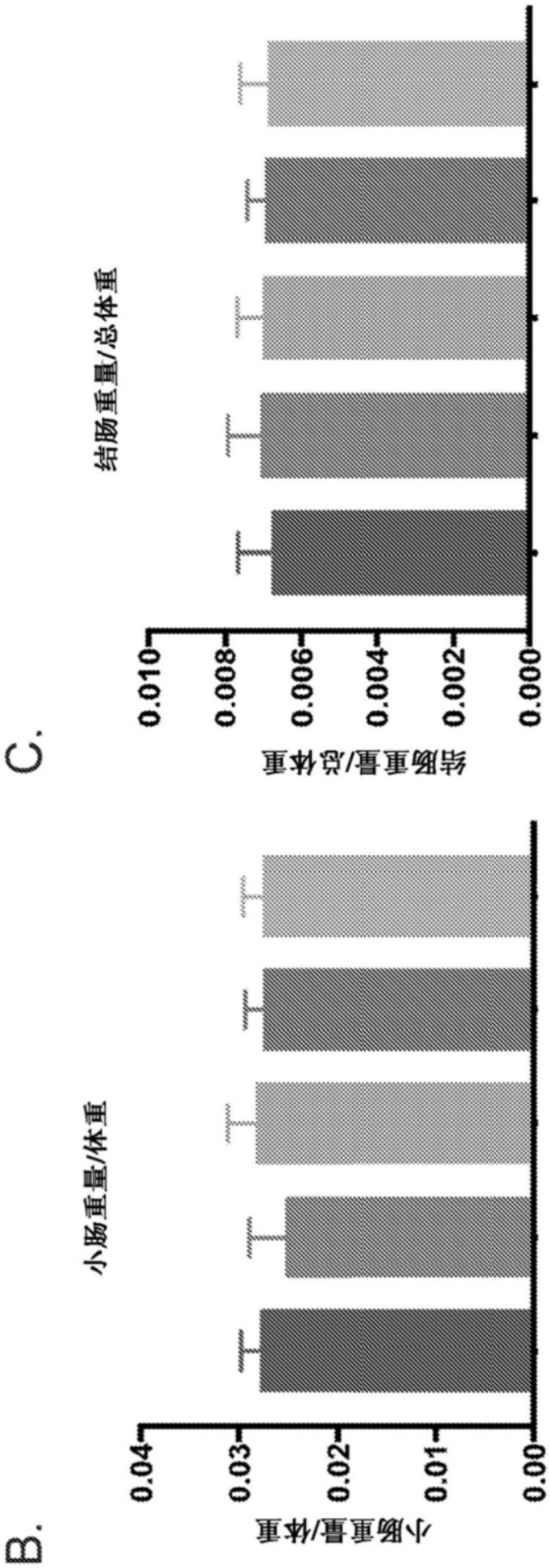

C.
结肠重量/总体重
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
B.
小肠重量/体重
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00

图37(续)

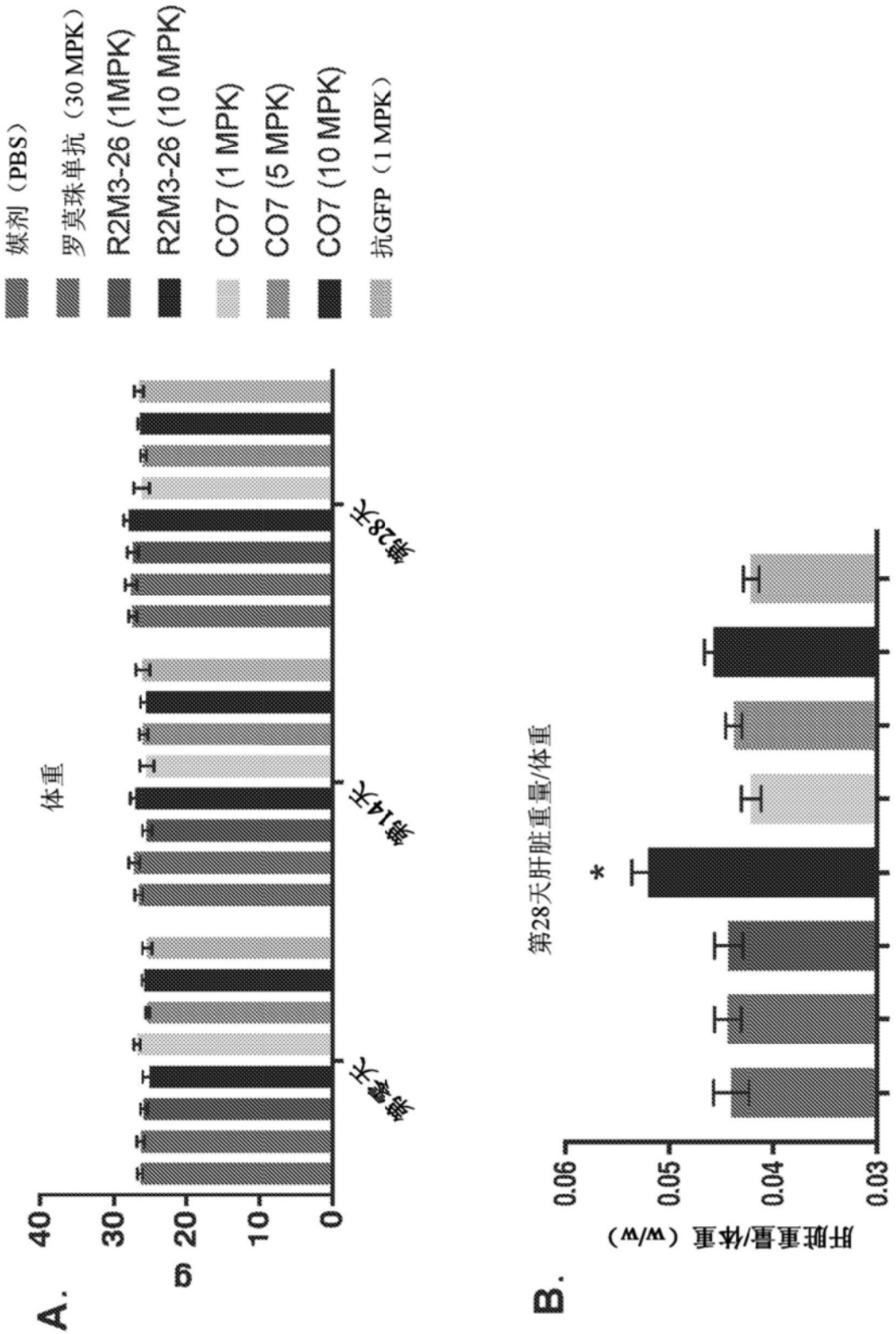

媒剂（PBS）
罗莫珠单抗（30 MPK）
R2M3-26 (1MPK)
R2M3-26 (10 MPK)
CO7 (1 MPK)
CO7 (5 MPK)
CO7 (10 MPK)
抗GFP（1 MPK）
A.
体重
g
40
30
20
10
0
第0天
第14天
第28天
B.
第28天肝脏重量/体重
*
肝脏重量/体重（w/w）
0.06
0.05
0.04
0.03

图38

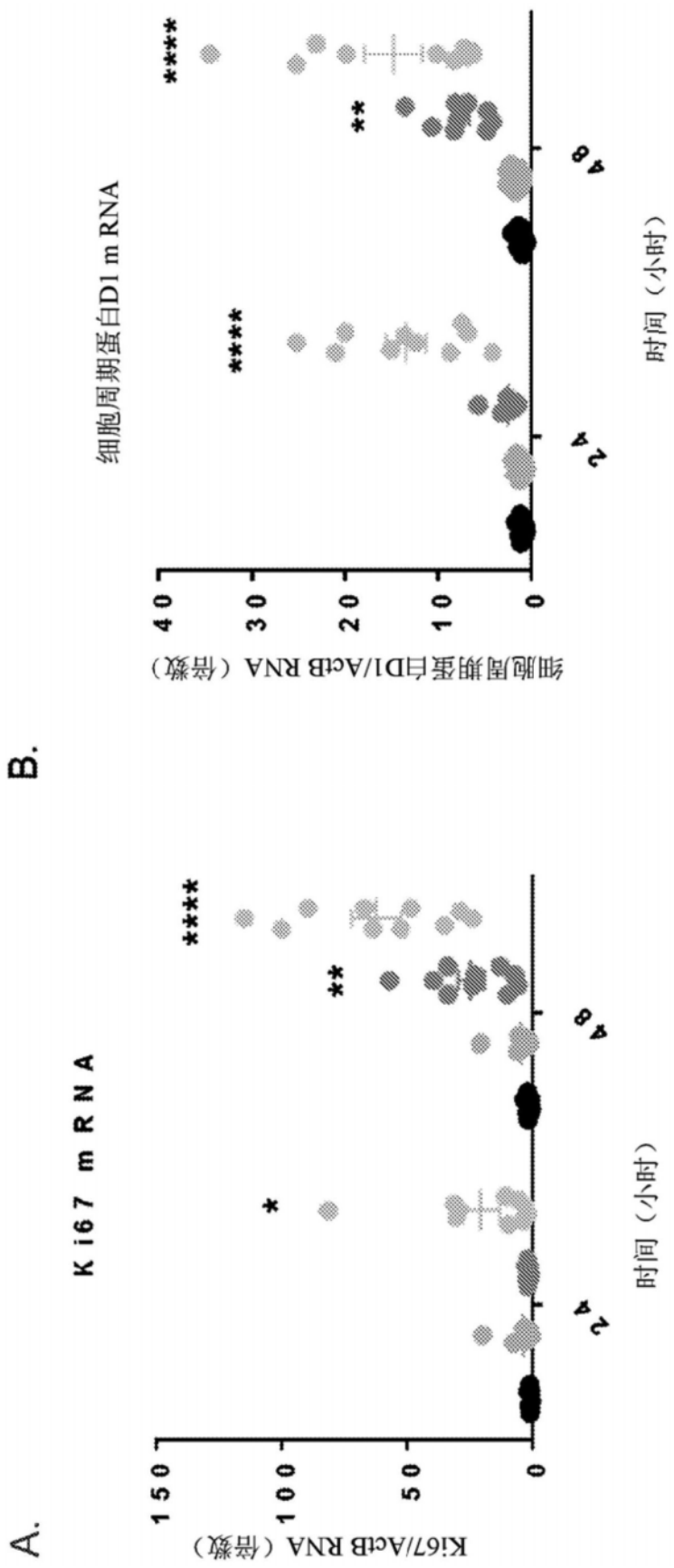

A.
Ki67 mRNA
Ki67/ActB RNA（倍数）
150
100
50
0
*
**
****
4
24
时间（小时）
B.
细胞周期蛋白D1 mRNA
细胞周期蛋白D1/ActB RNA（倍数）
40
30
20
10
0
**
****
****
4
24
时间（小时）

图39

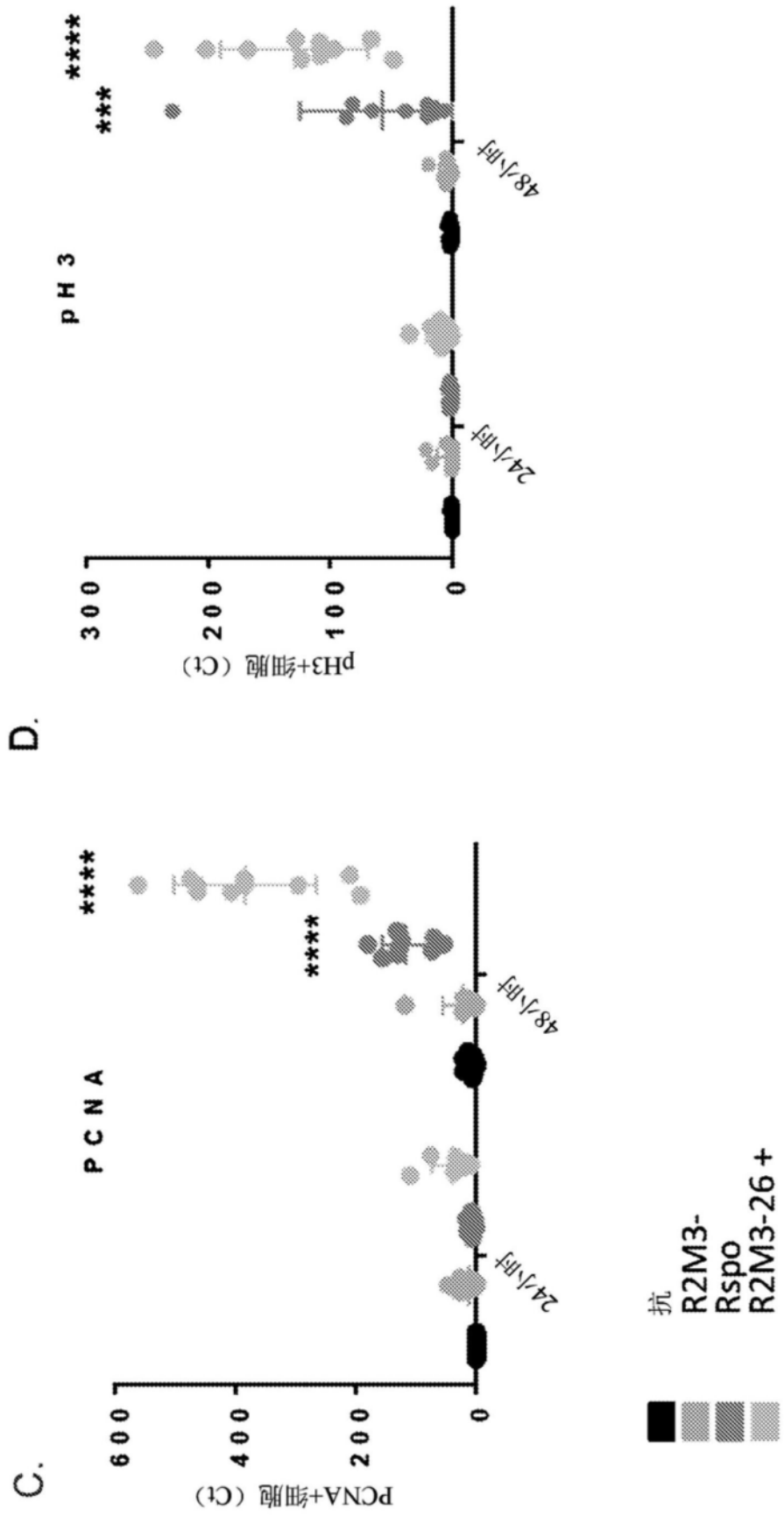
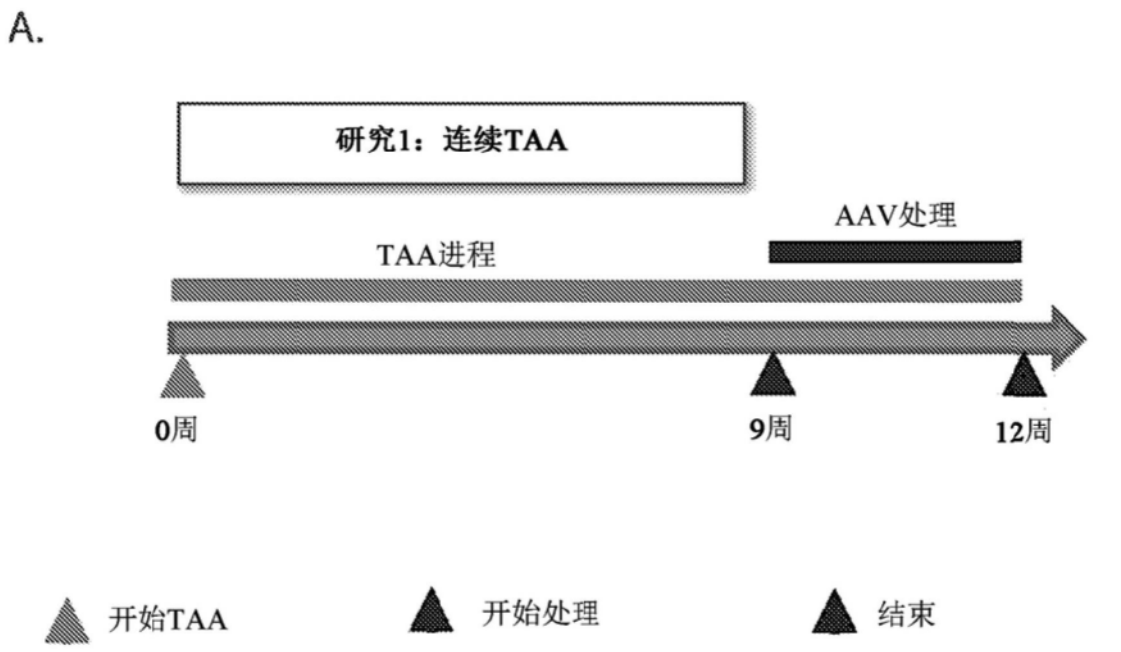

D.
pH3+细胞（Ct）
300
200
100
0
pH3
****
***
48小时
24小时
C.
PCNA+细胞（Ct）
600
400
200
0
PCNA
****
****
48小时
24小时
抗
R2M3-
Rspo
R2M3-26 +

图39(续)


A.
研究1：连续TAA
AAV处理
TAA进程
0周
9周
12周
开始TAA
开始处理
结束

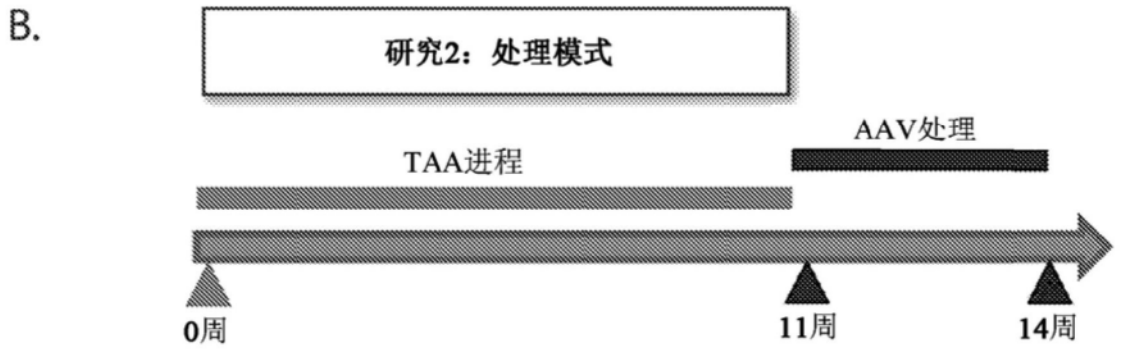
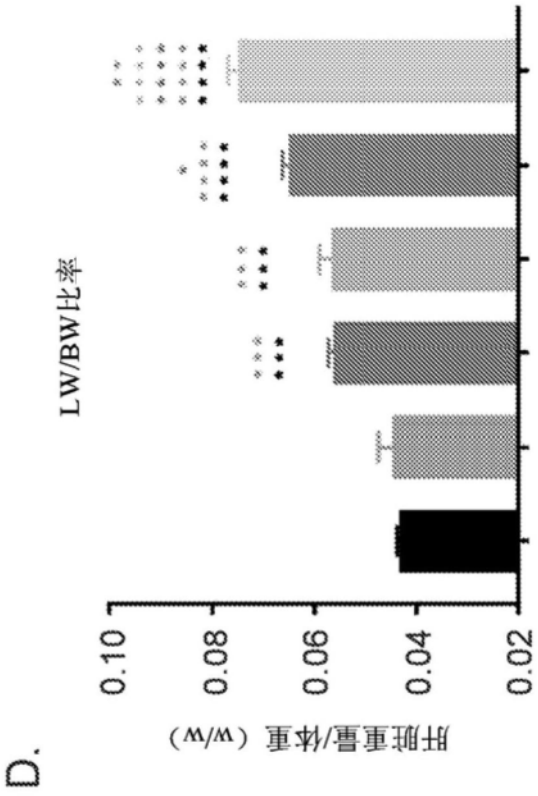

B.
研究2：处理模式
AAV处理
TAA进程
0周
11周
14周

图40


D.
肝脏重量/体重 (w/w)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
LW/BW比率

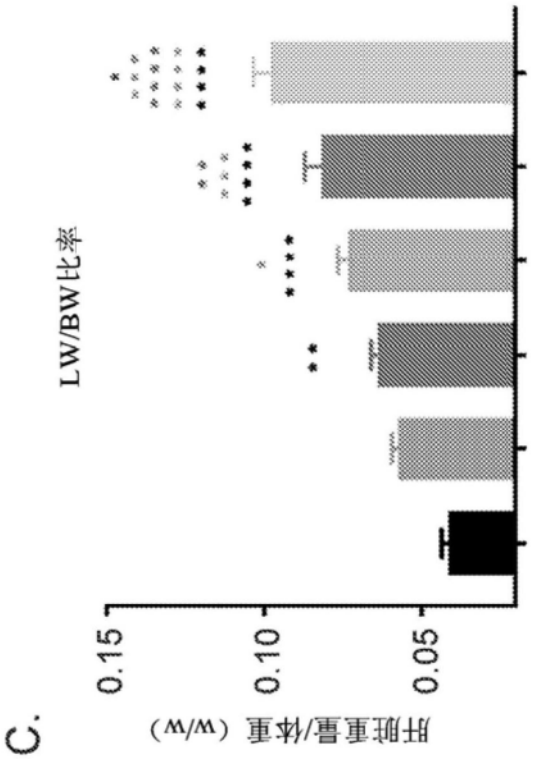
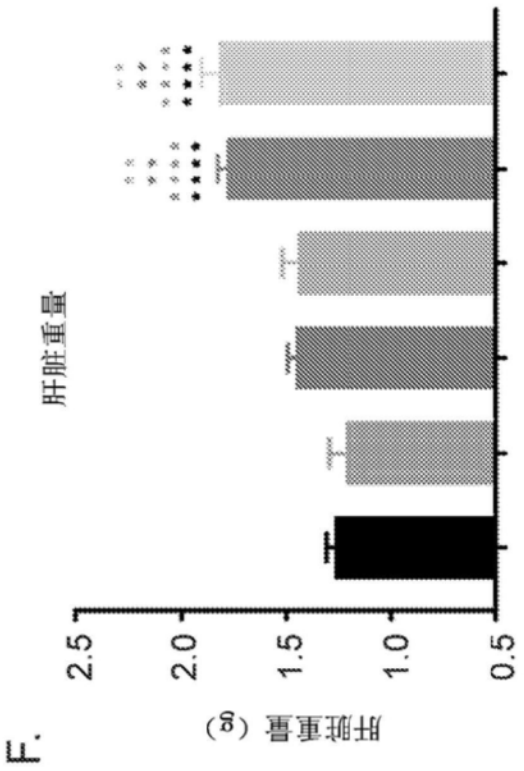

C.
肝脏重量/体重 (w/w)
0.15
0.10
0.05
LW/BW比率

图40(续)



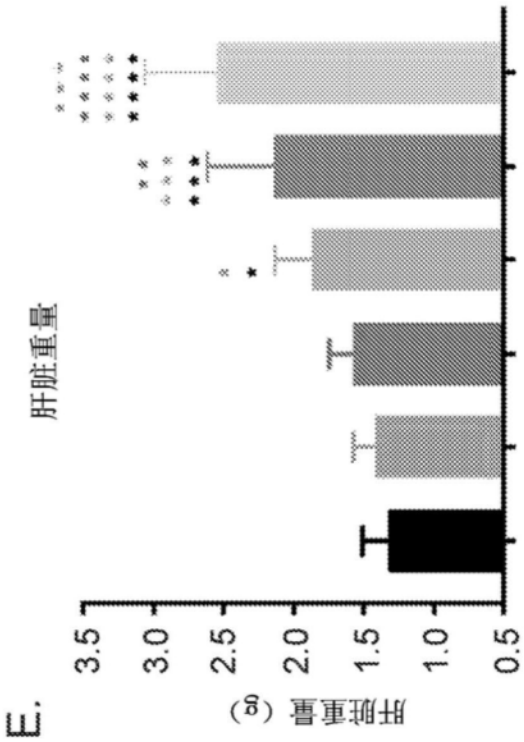


图40(续)

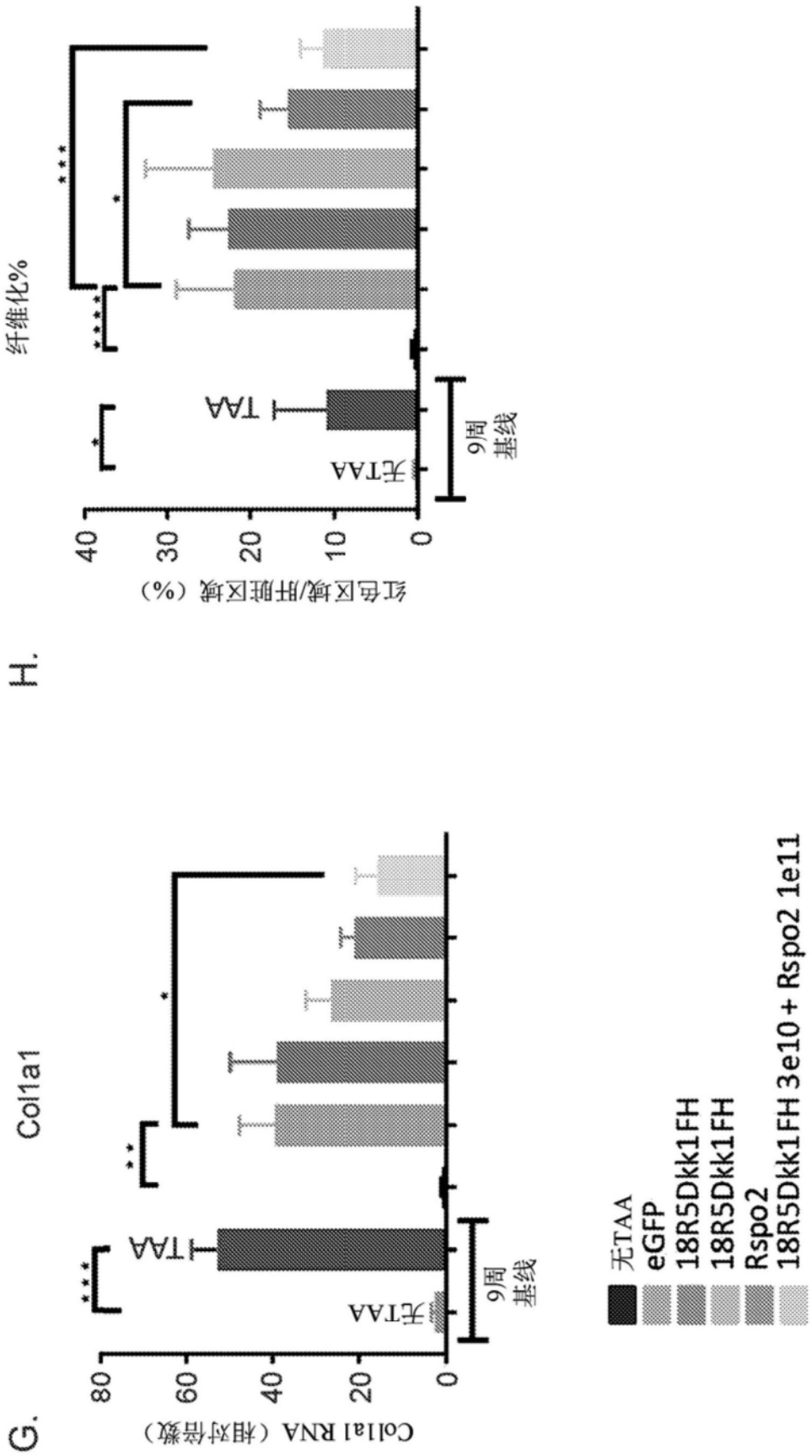

H.
红色区域/肝脏区域（%）
40
30
20
10
0
无TAA
TAA
9周
基线
纤维化%
G.
Col1a1 RNA（相对倍数）
80
60
40
20
0
无TAA
TAA
9周
基线
Col1a1
无TAA
eGFP
18R5Dkk1FH
18R5Dkk1FH
Rspo2
18R5Dkk1FH 3e10 + Rspo2 1e11

图40(续)

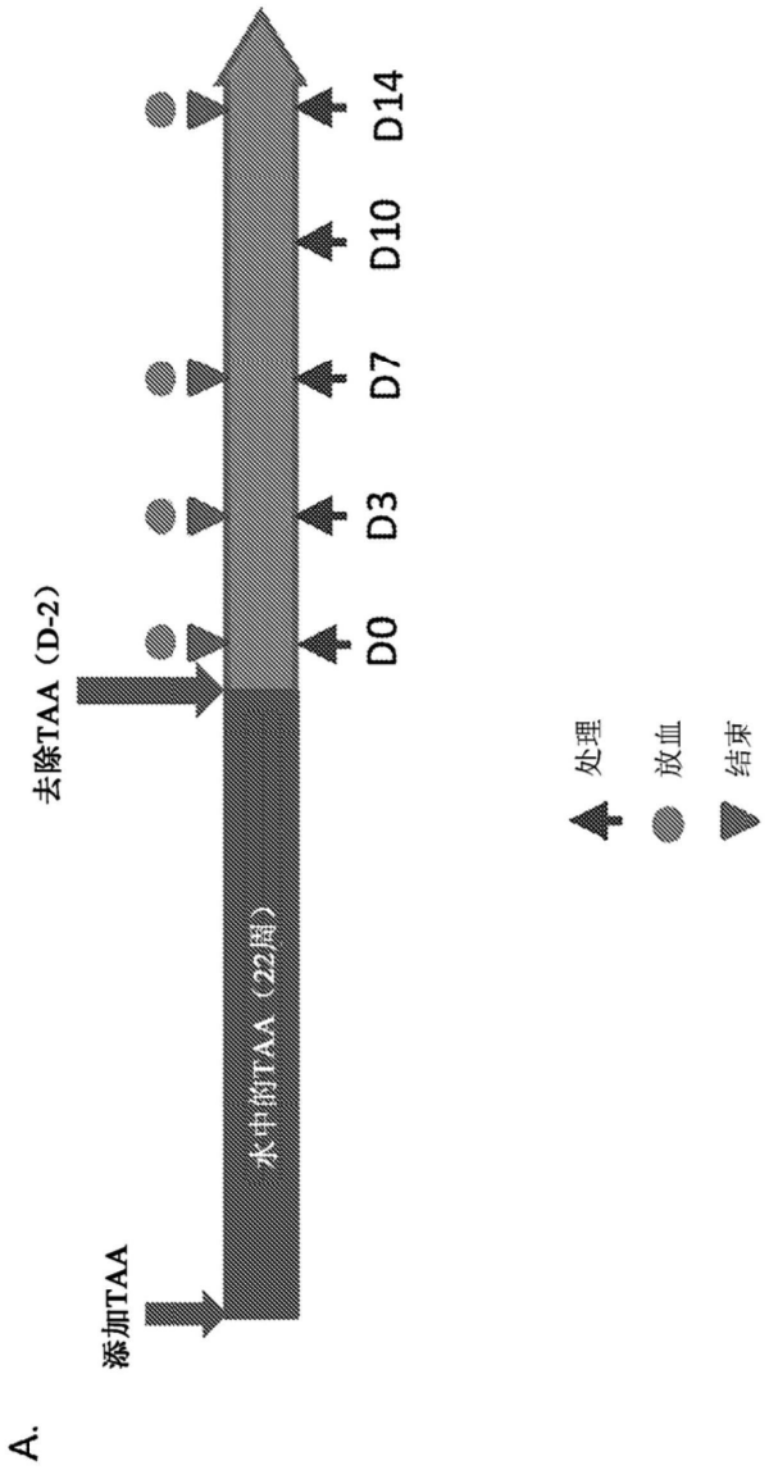


图41

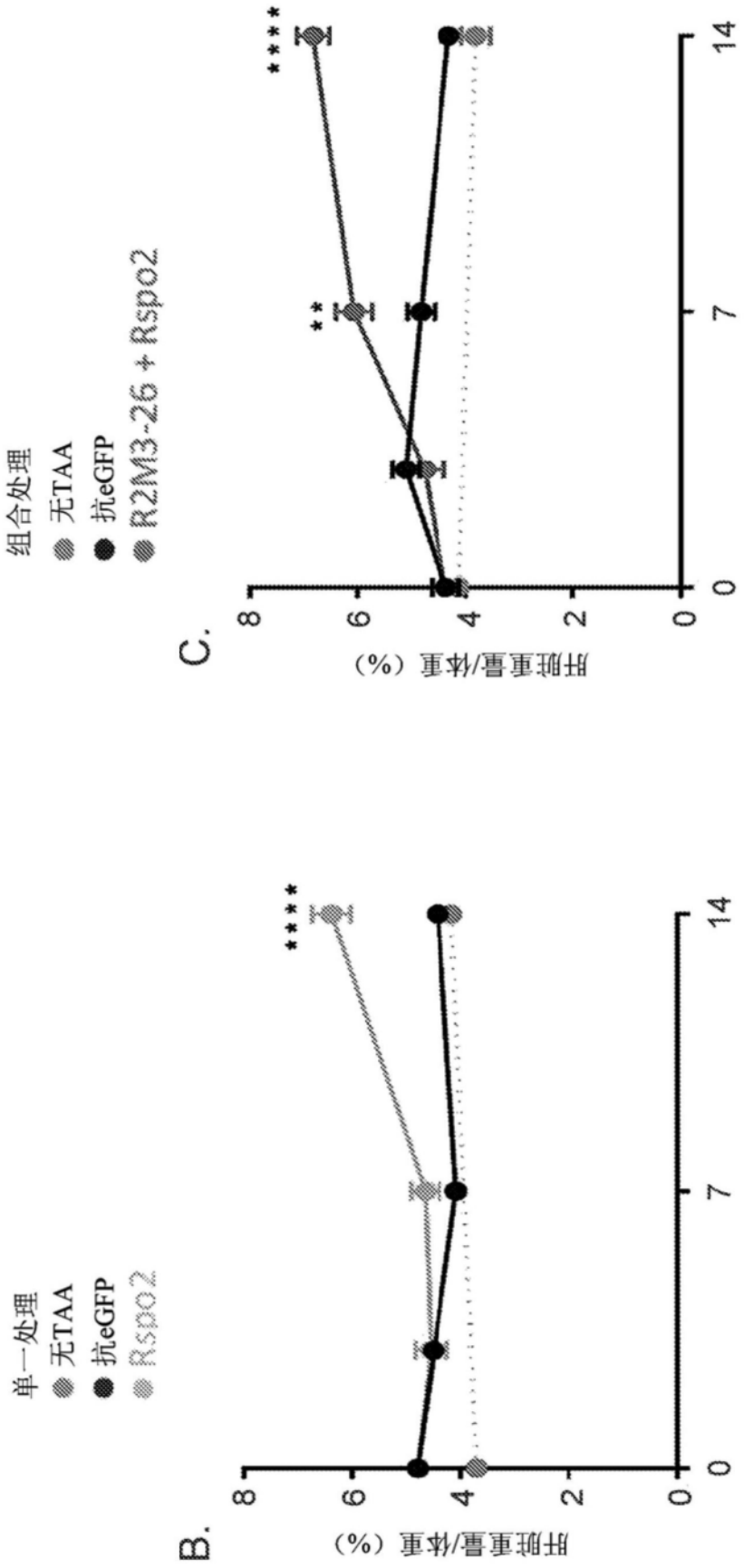

C.
肝脏重量/体重（%）
0
2
4
6
8
0
7
14
****
**
组合处理
无TAA
抗eGFP
R2M3-26 + Rspo2
B.
肝脏重量/体重（%）
0
2
4
6
8
0
7
14
****
单一处理
无TAA
抗eGFP
Rspo2

图41(续)

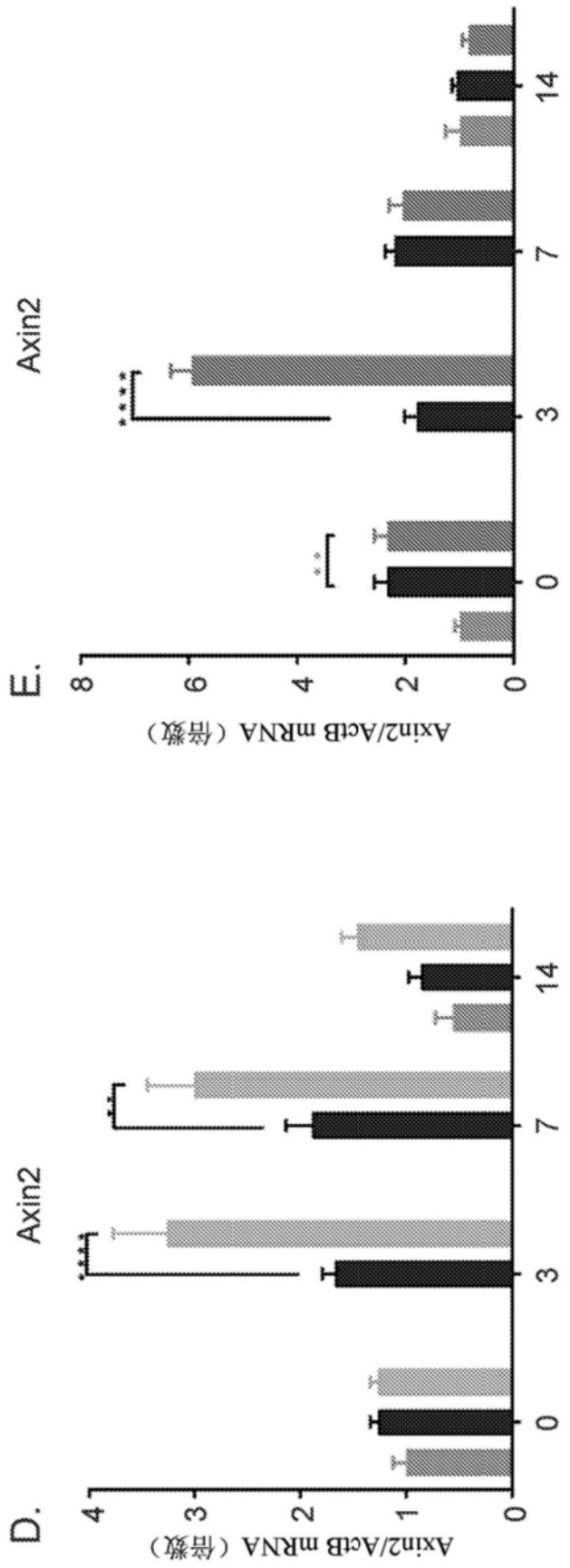

E.
Axin2
Axin2/ActB mRNA（倍数）
0
2
4
6
8
0
3
7
14
D.
Axin2
Axin2/ActB mRNA（倍数）
0
1
2
3
4
0
3
7
14

图41(续)

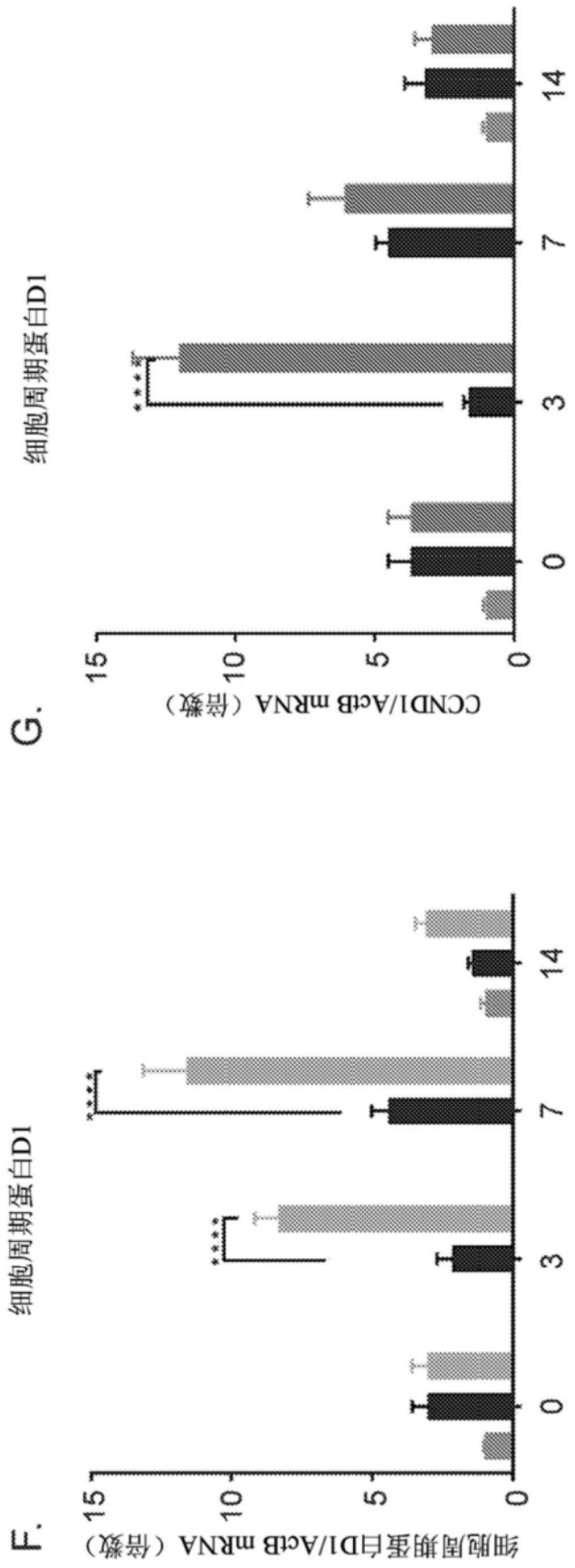

G.
细胞周期蛋白D1
CCND1/ActB mRNA（倍数）
15
10
5
0
0
3
7
14
****
F.
细胞周期蛋白D1
细胞周期蛋白D1/ActB mRNA（倍数）
15
10
5
0
0
3
7
14
****
****

图41(续)

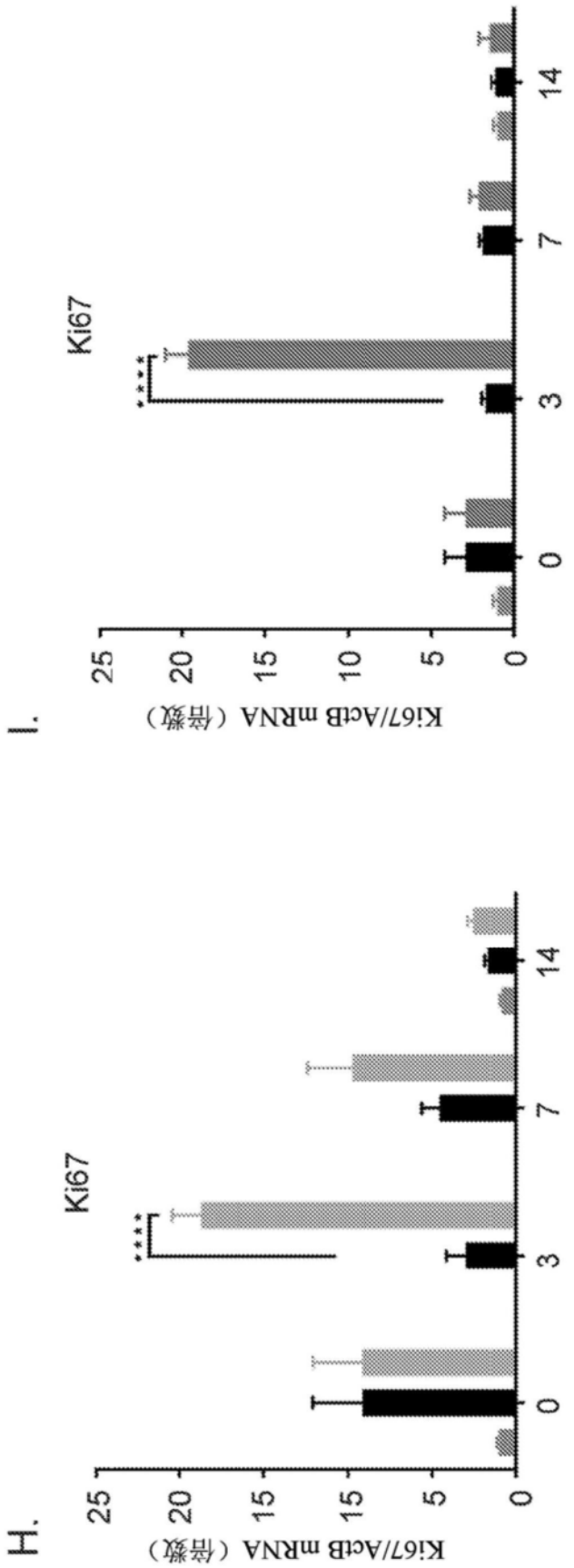
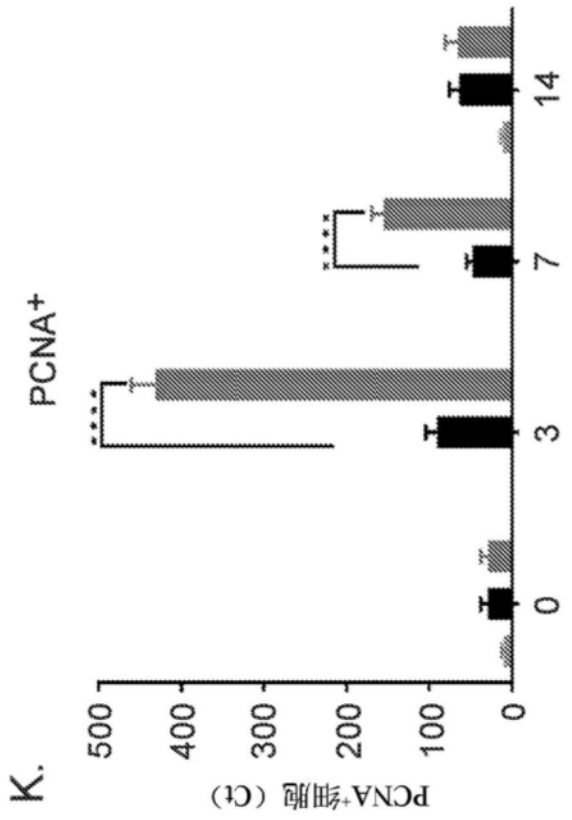

I.
Ki67
Ki67/ActB mRNA（倍数）
0
5
10
15
20
25
0
3
7
14
****
H.
Ki67
Ki67/ActB mRNA（倍数）
0
5
15
15
20
25
0
3
7
14
****

图41(续)


K.
PCNA+
PCNA+细胞（Ct）
0
100
200
300
400
500
0
3
7
14
****

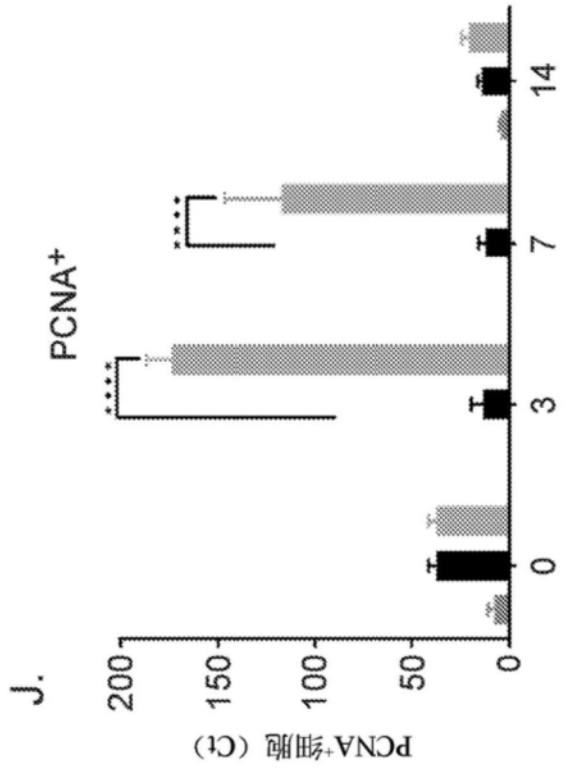

J.
PCNA+
PCNA+细胞（Ct）
0
50
100
150
200
0
3
7
14
****

图41(续)

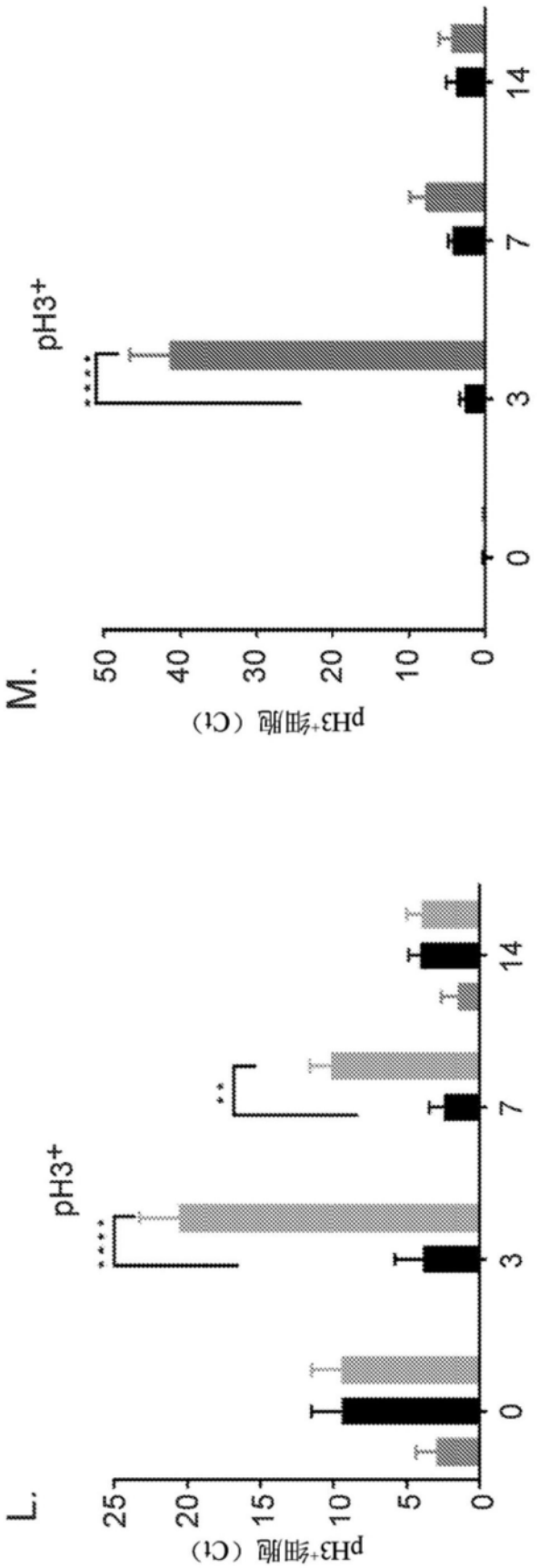

M.
pH3+细胞（Ct）
0
10
20
30
40
50
pH3+
****
0
3
7
14
L.
pH3+细胞（Ct）
0
5
10
15
20
25
pH3+
****
**
0
3
7
14

图41(续)

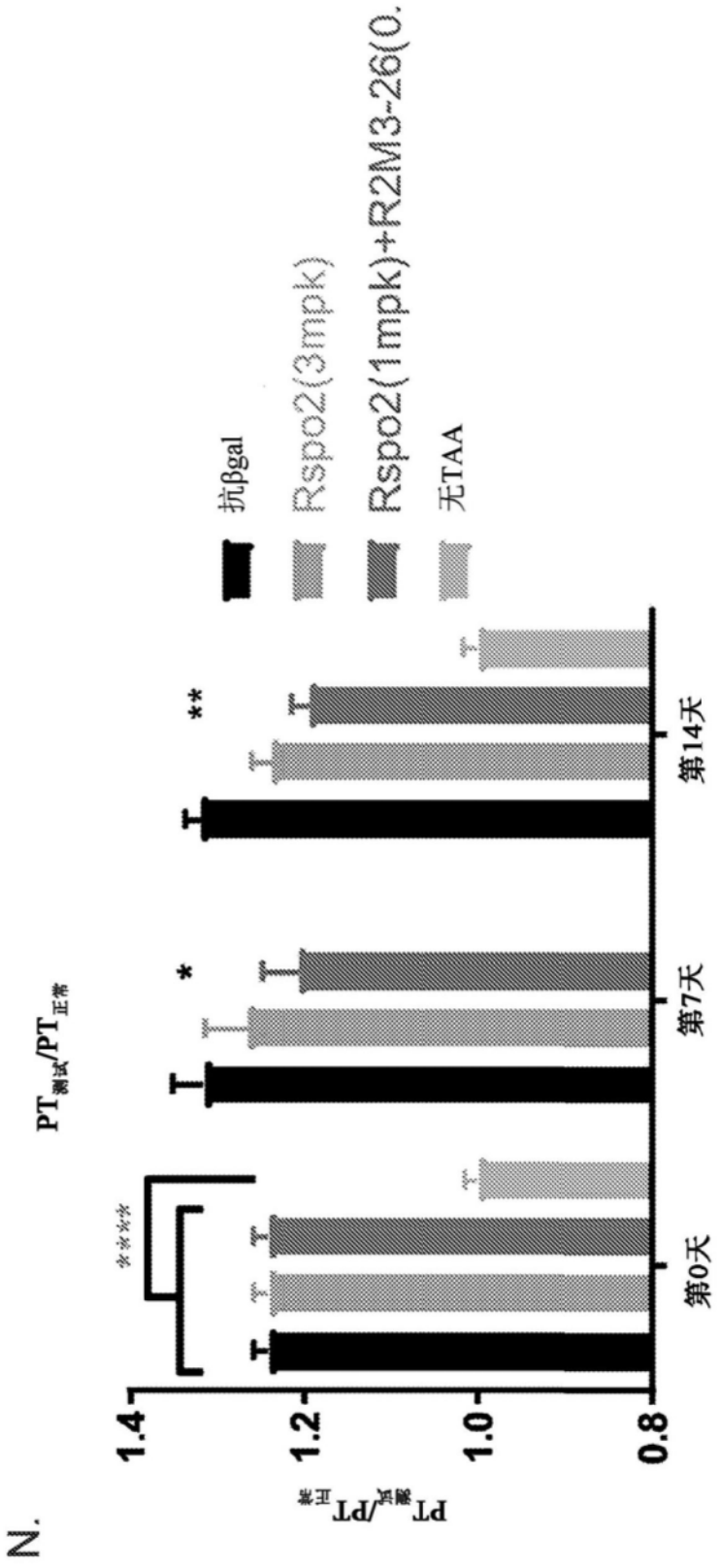

N.
PT测试/PT正常
1.4
1.2
1.0
0.8
****
*
**
第0天
第7天
第14天
抗βgal
Rspo2(3mpk)
Rspo2(1mpk)+R2M3-26(0.
无TAA

图41(续)

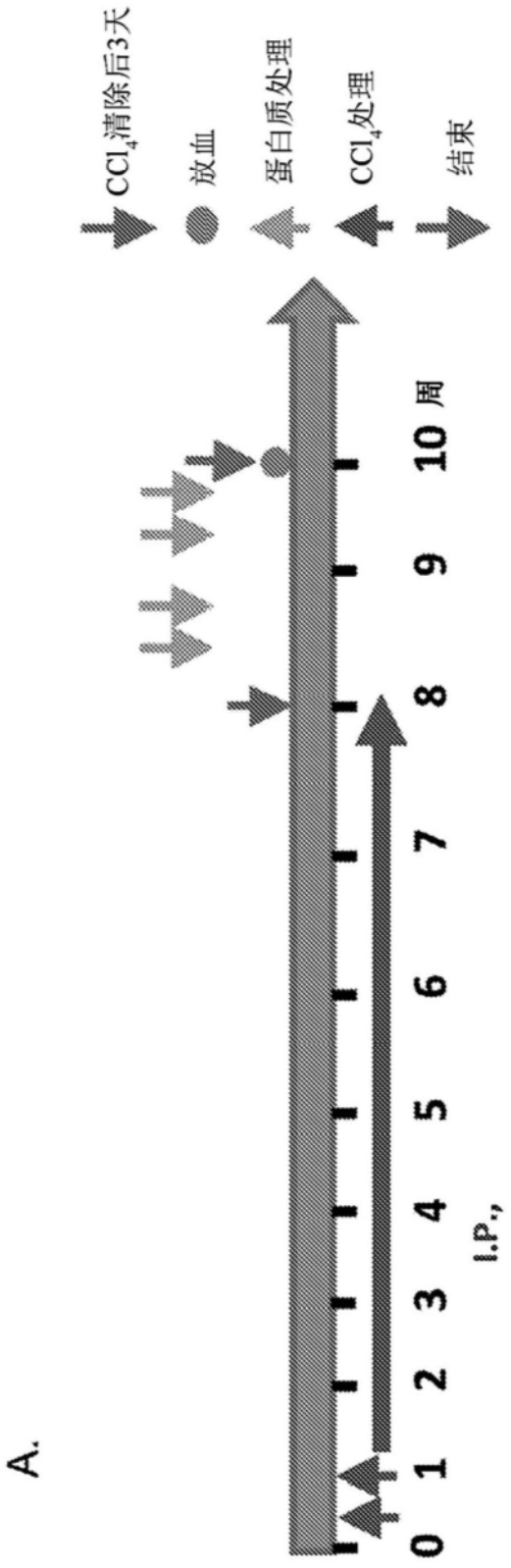


图42

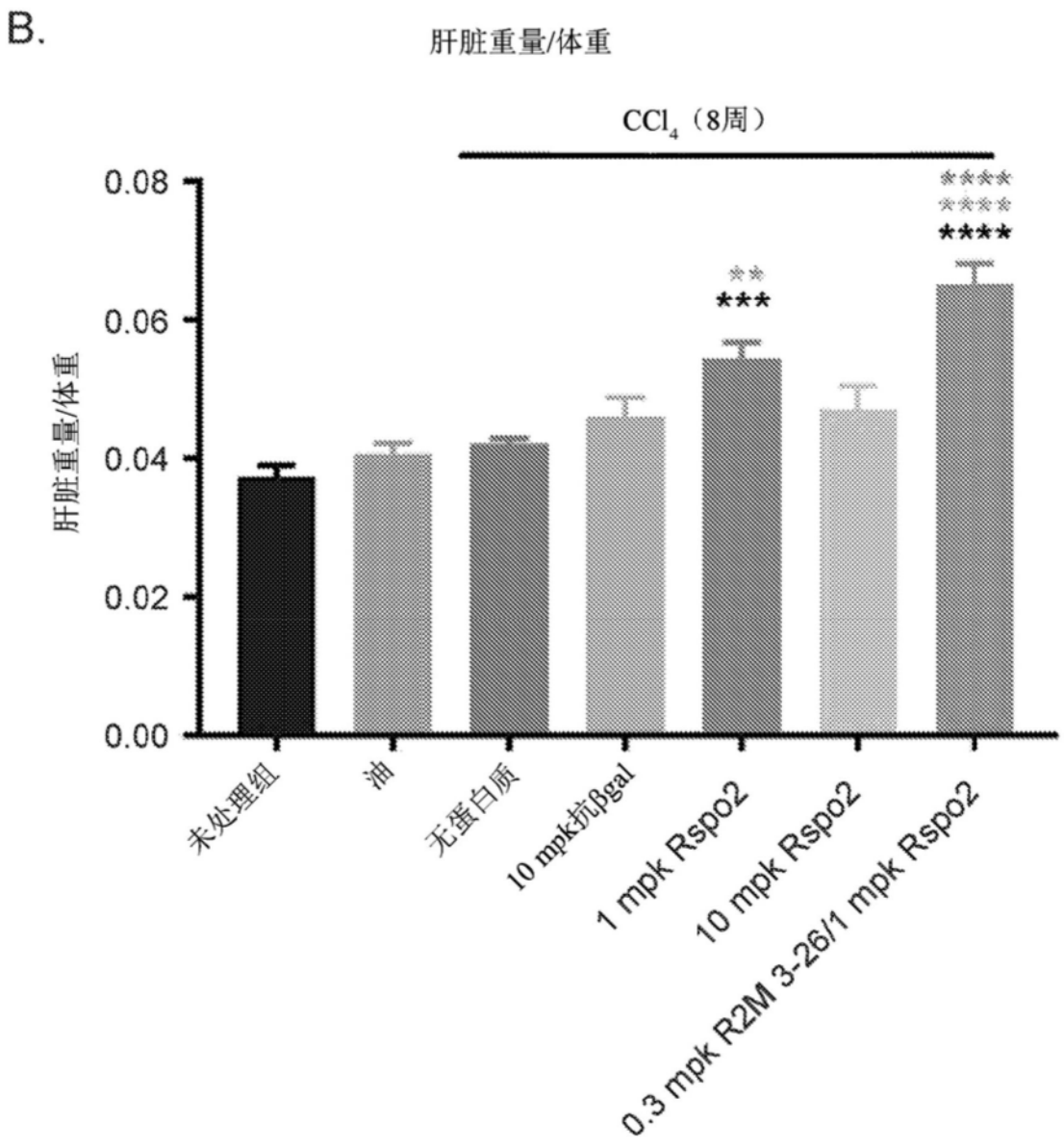

B.
肝脏重量/体重
CCl_4（8周）
肝脏重量/体重
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
**
***
****
****
****
未处理组
油
无蛋白质
10 mpk抗βgal
1 mpk Rspo2
10 mpk Rspo2
0.3 mpk R2M 3-26/1 mpk Rspo2

图42(续)

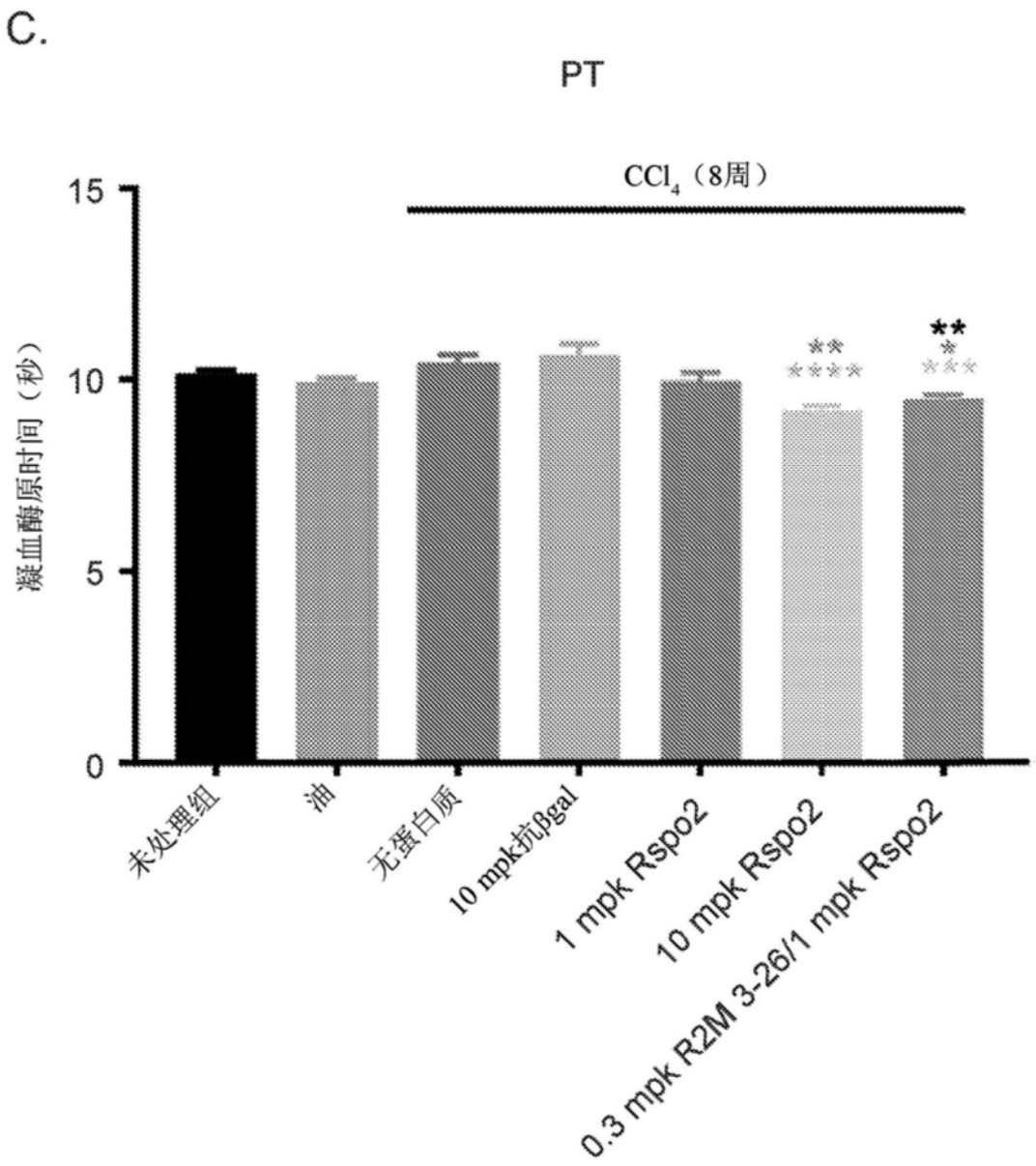

C.
PT
CCl_4（8周）
凝血酶原时间（秒）
15
10
5
0
未处理组
油
无蛋白质
10 mpk抗βgal
1 mpk Rspo2
10 mpk Rspo2
0.3 mpk R2M 3-26/1 mpk Rspo2

图42(续)

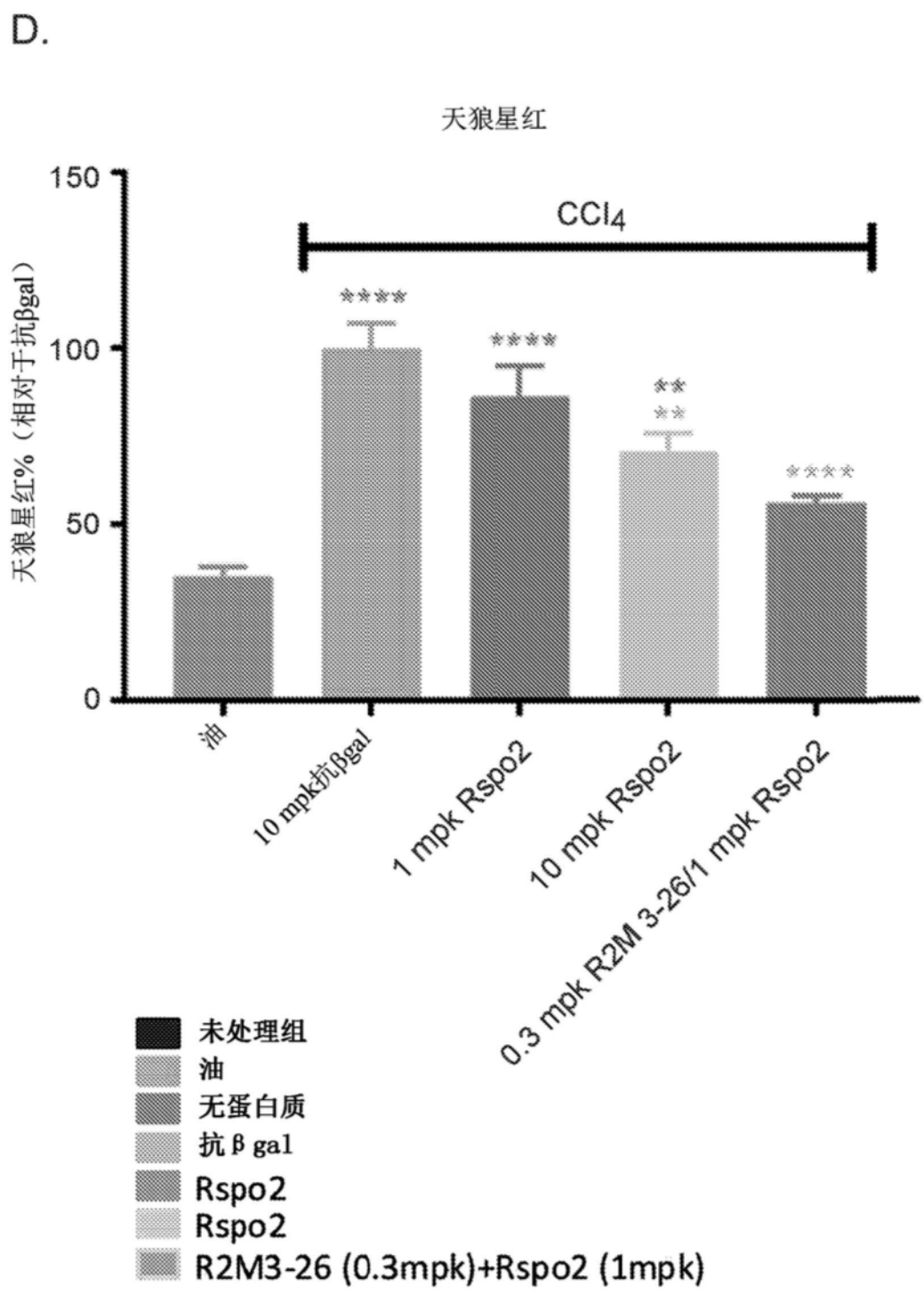

D.
天狼星红
天狼星红%（相对于抗βgal）
150
100
50
0
CCl4
****
****
**
**
****
油
10 mpk抗βgal
1 mpk Rspo2
10 mpk Rspo2
0.3 mpk R2M 3-26/1 mpk Rspo2
未处理组
油
无蛋白质
抗βgal
Rspo2
Rspo2
R2M3-26 (0.3mpk)+Rspo2 (1mpk)

图42(续)

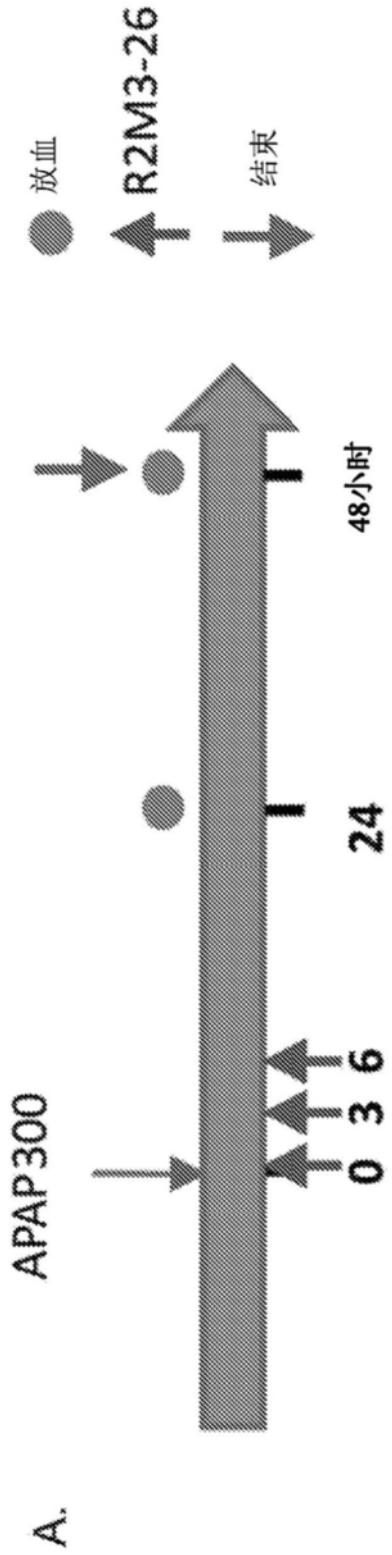


图43

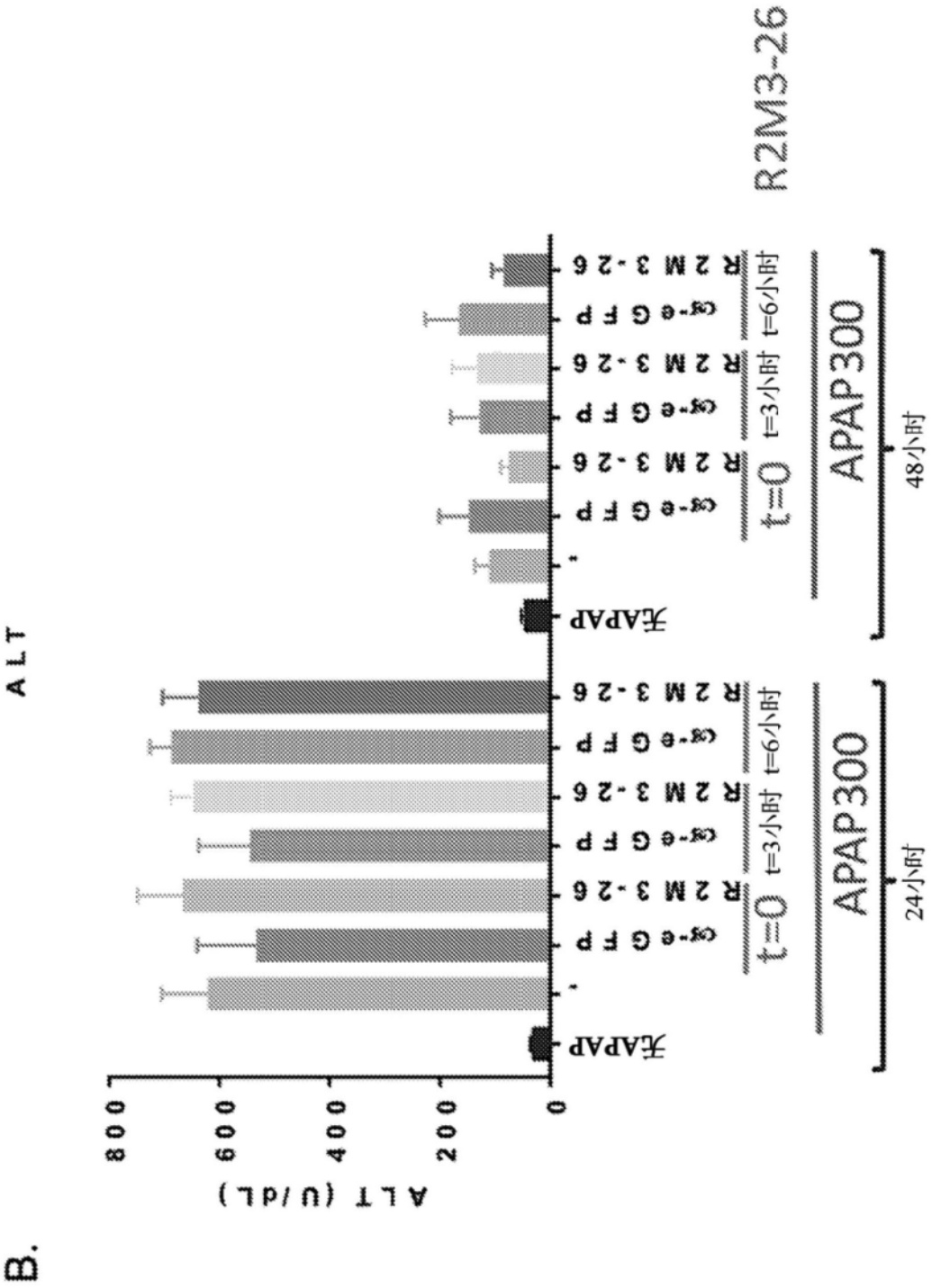

B.
ALT
ALT (U/dL)
800
600
400
200
0
无APAP
-
cγ-e GFP
R2M3-26
t=0
t=3小时
t=6小时
APAP300
24小时
48小时

图43(续)

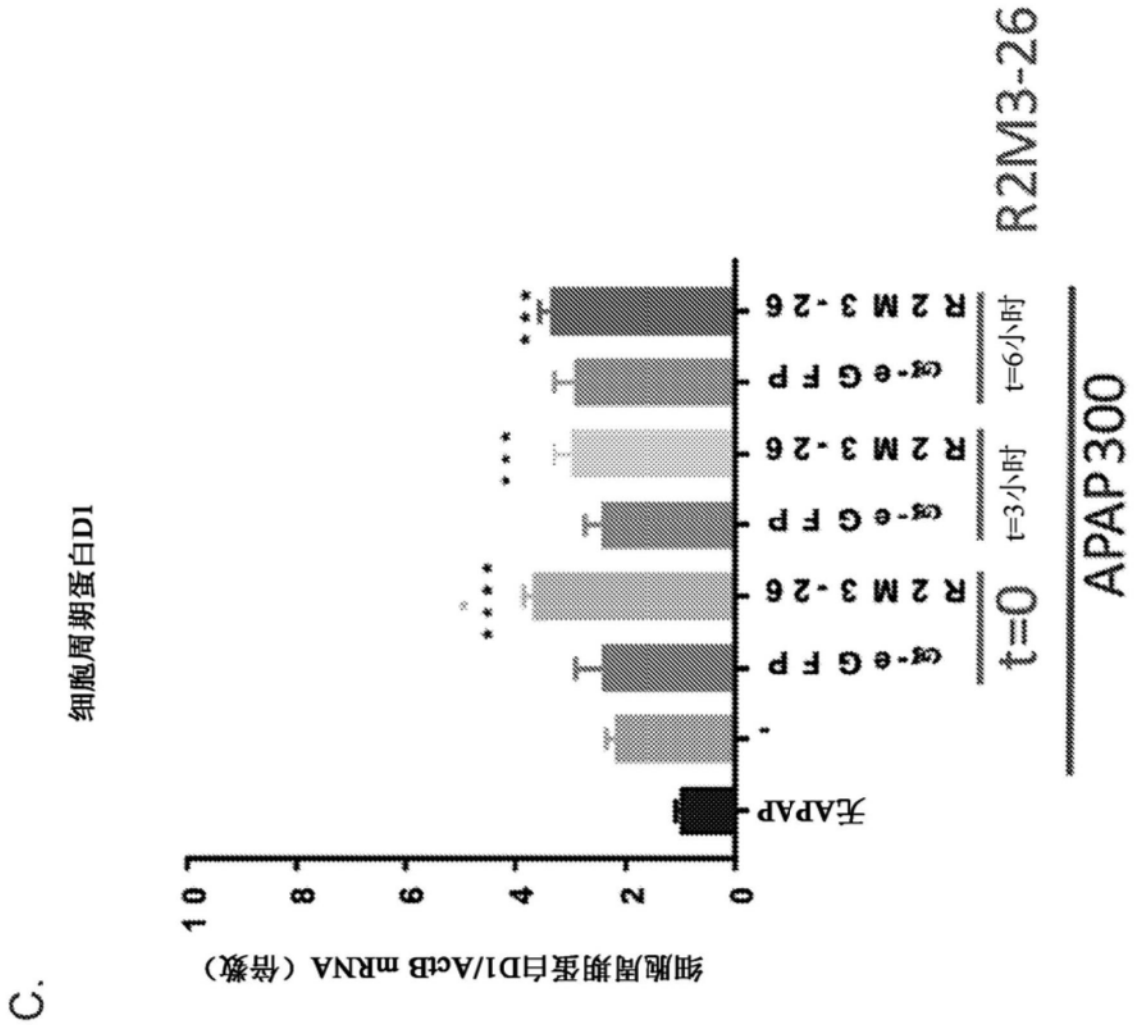

C.
细胞周期蛋白D1
细胞周期蛋白D1/ActB mRNA（倍数）
0
2
4
6
8
10
无APAP
-
载体-eGFP
R2M3-26
载体-eGFP
R2M3-26
载体-eGFP
R2M3-26
t=0
t=3小时
t=6小时
APAP300
R2M3-26

图43(续)

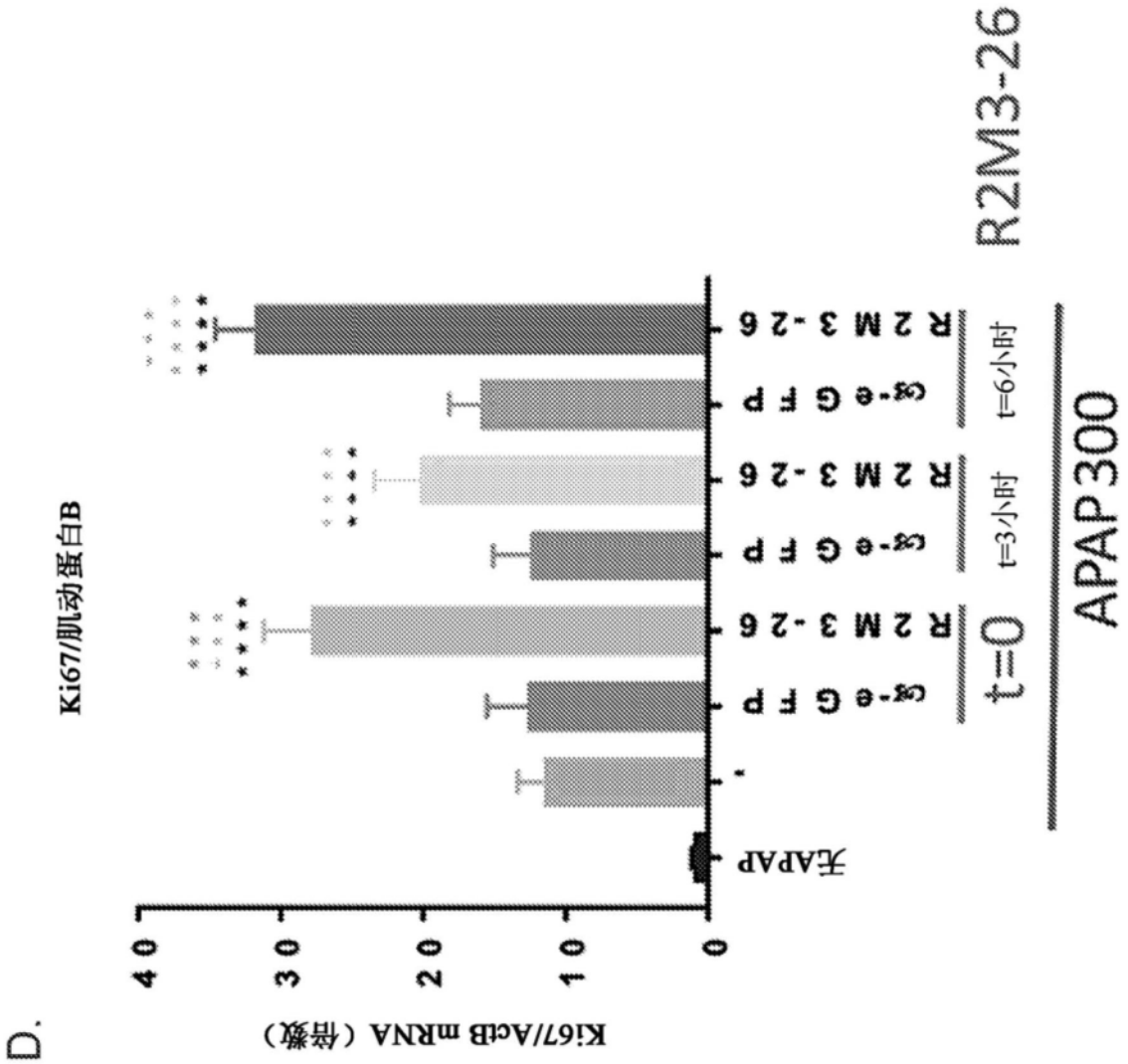

D.
Ki67/ActB mRNA（倍数）
0
10
20
30
40
无APAP
-
载体GFP
R2M3-26
t=0
载体GFP
R2M3-26
t=3小时
载体GFP
R2M3-26
t=6小时
APAP300
R2M3-26
Ki67/肌动蛋白B

图43(续)

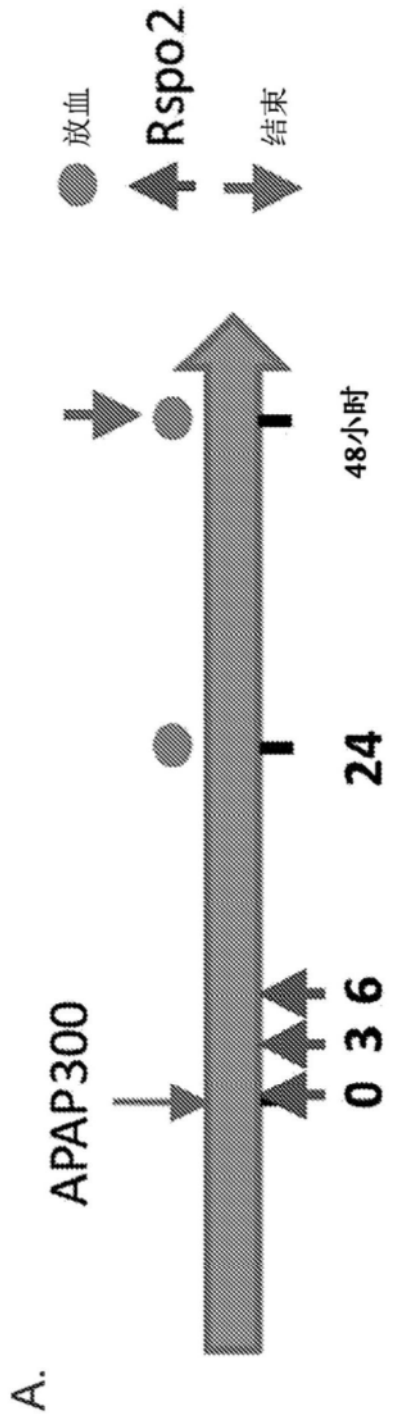


图44

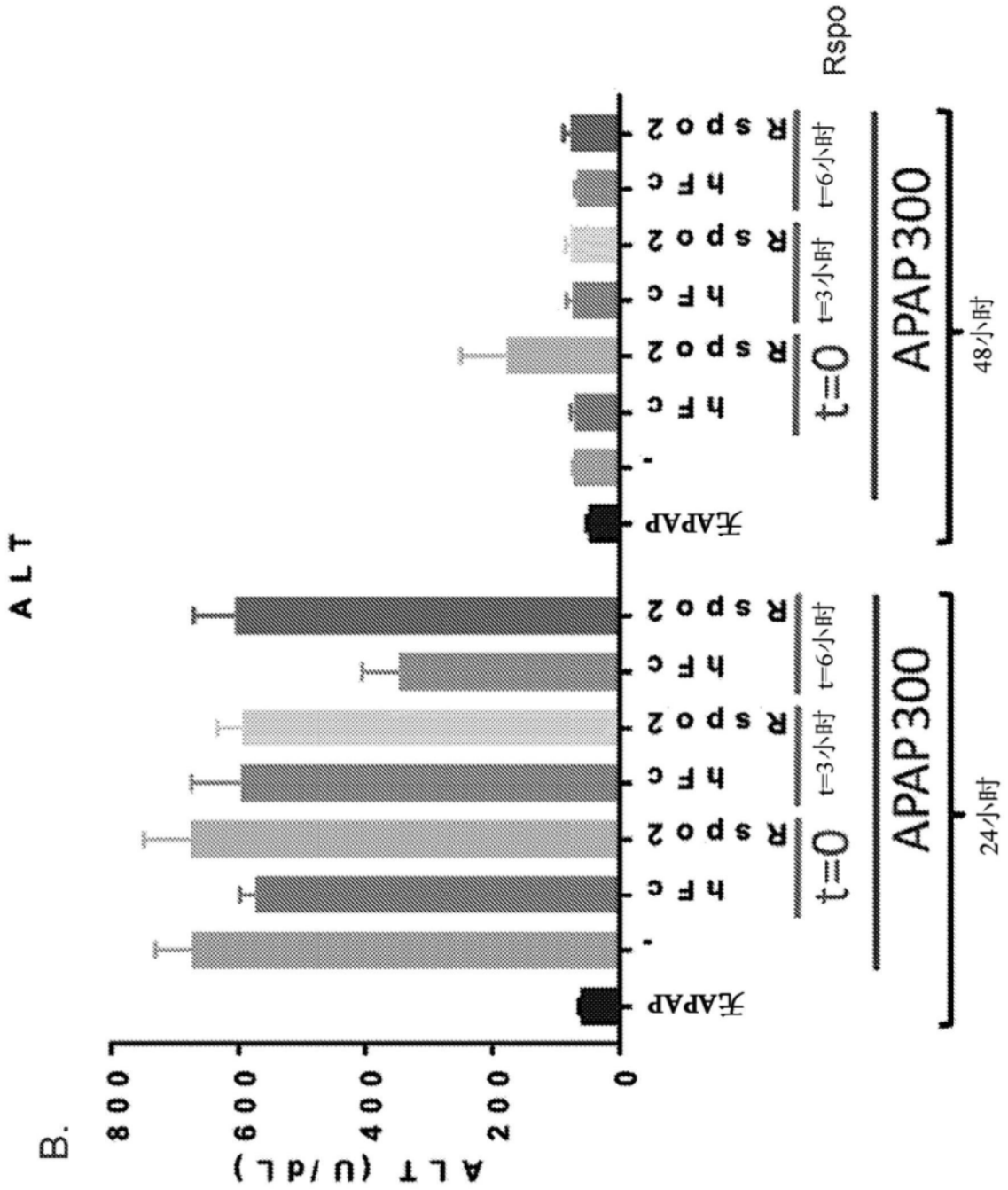

B.
ALT
ALT (U/dL)
800
600
400
200
0
无APAP
-
hFc
Rspo2
t=0
t=3小时
t=6小时
APAP300
24小时
48小时
Rspo

图44(续)

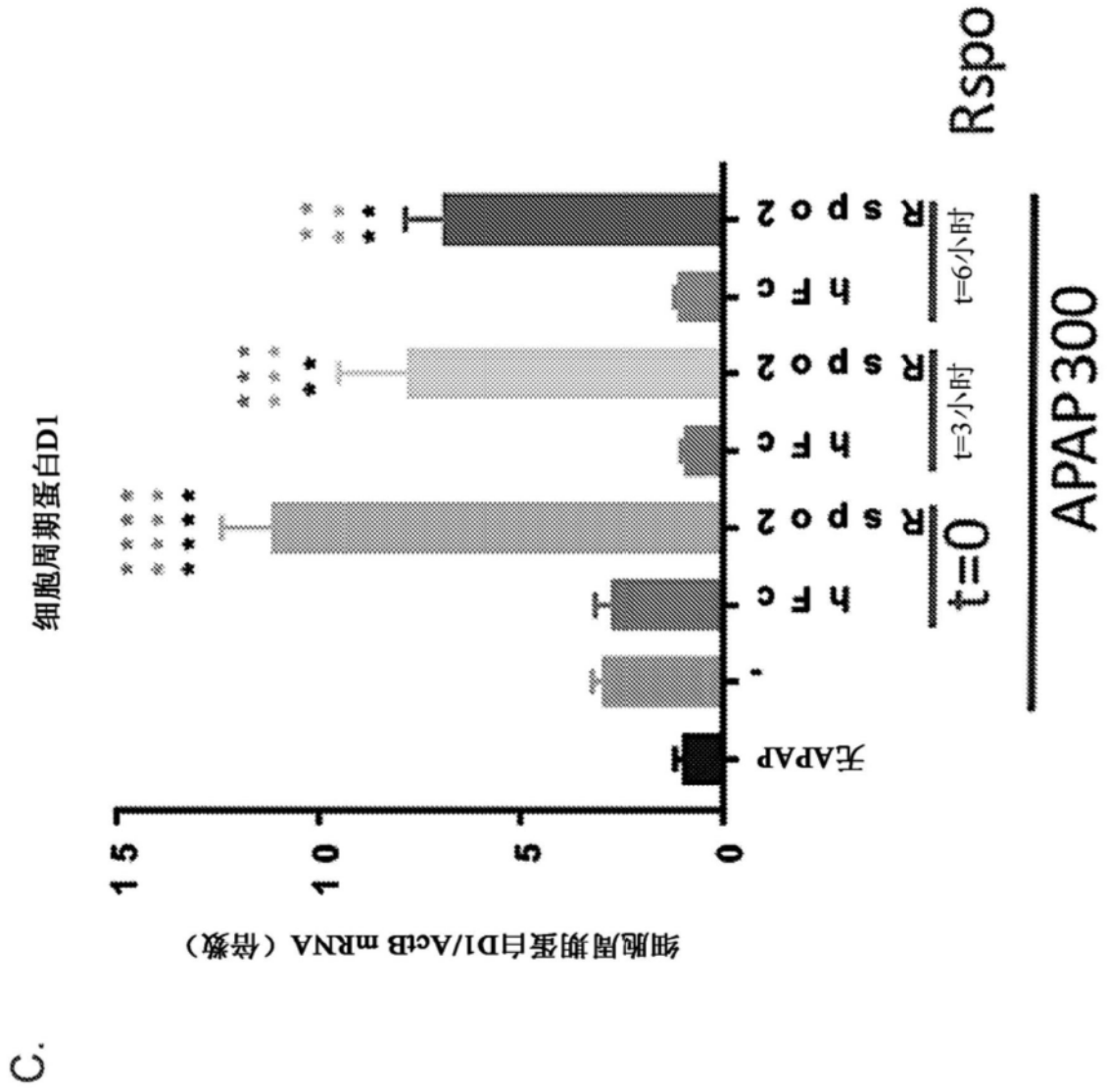

C.
细胞周期蛋白D1/ActB mRNA（倍数）
15
10
5
0
无APAP
-
hFc
Rspo2
hFc
Rspo2
hFc
Rspo2
t=0
t=3小时
t=6小时
APAP300
Rspo
细胞周期蛋白D1

图44(续)

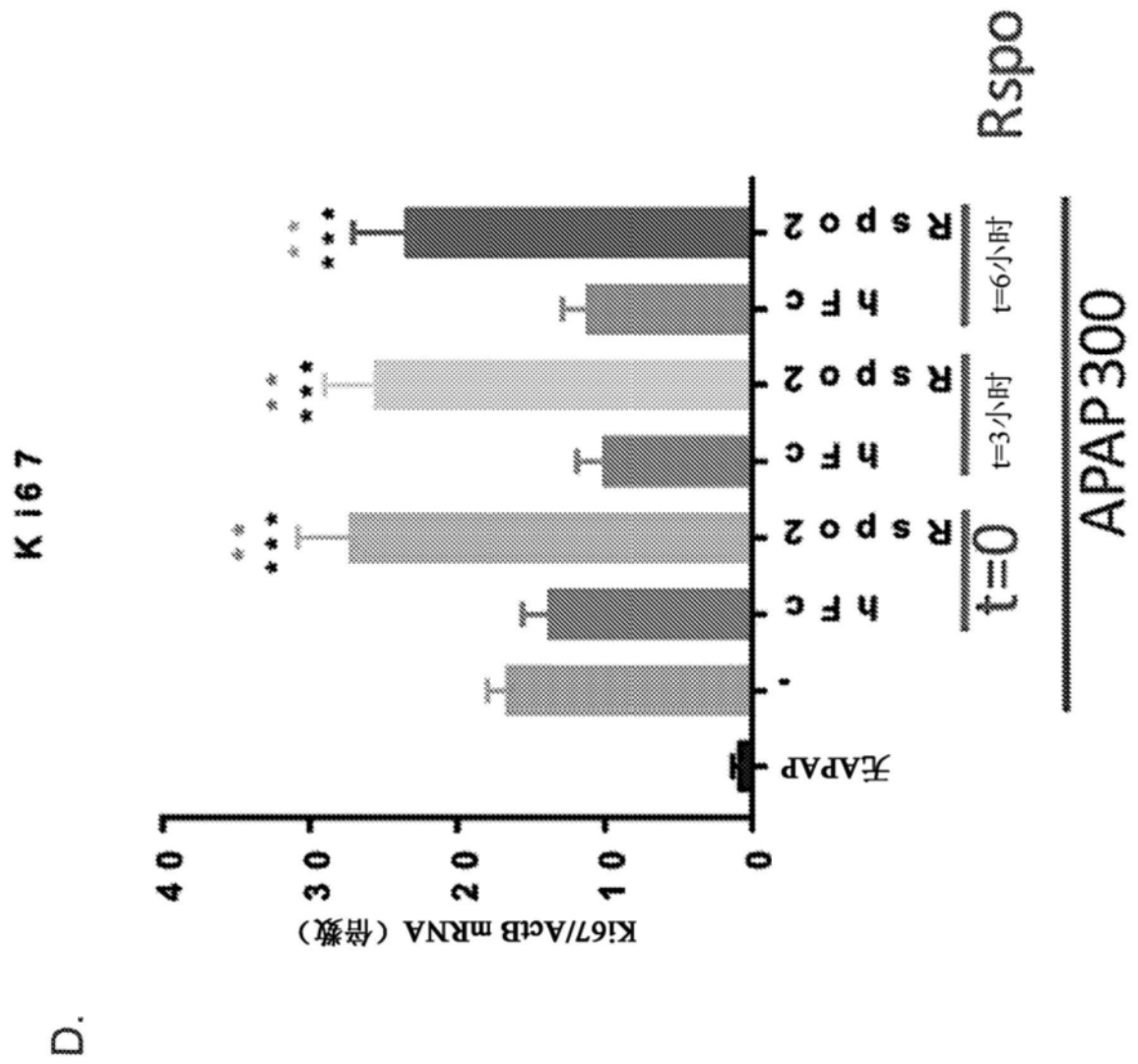

D.
Ki67
Ki67/ActB mRNA（倍数）
0
10
20
30
40
无APAP
-
hFc
Rspo2
t=0
t=3小时
t=6小时
APAP300
Rspo
***
**

图44(续)

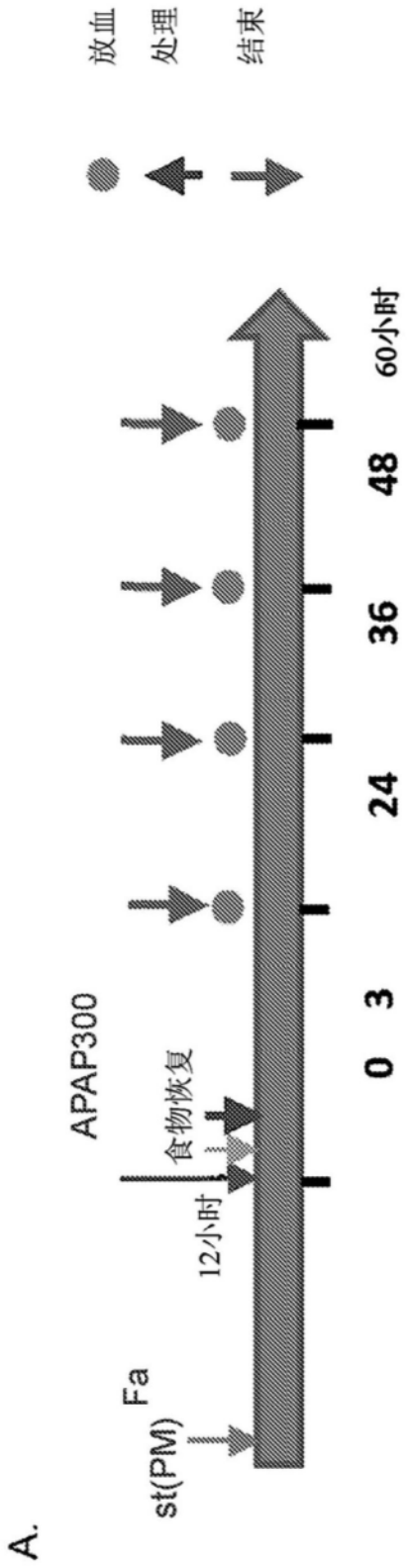


图45

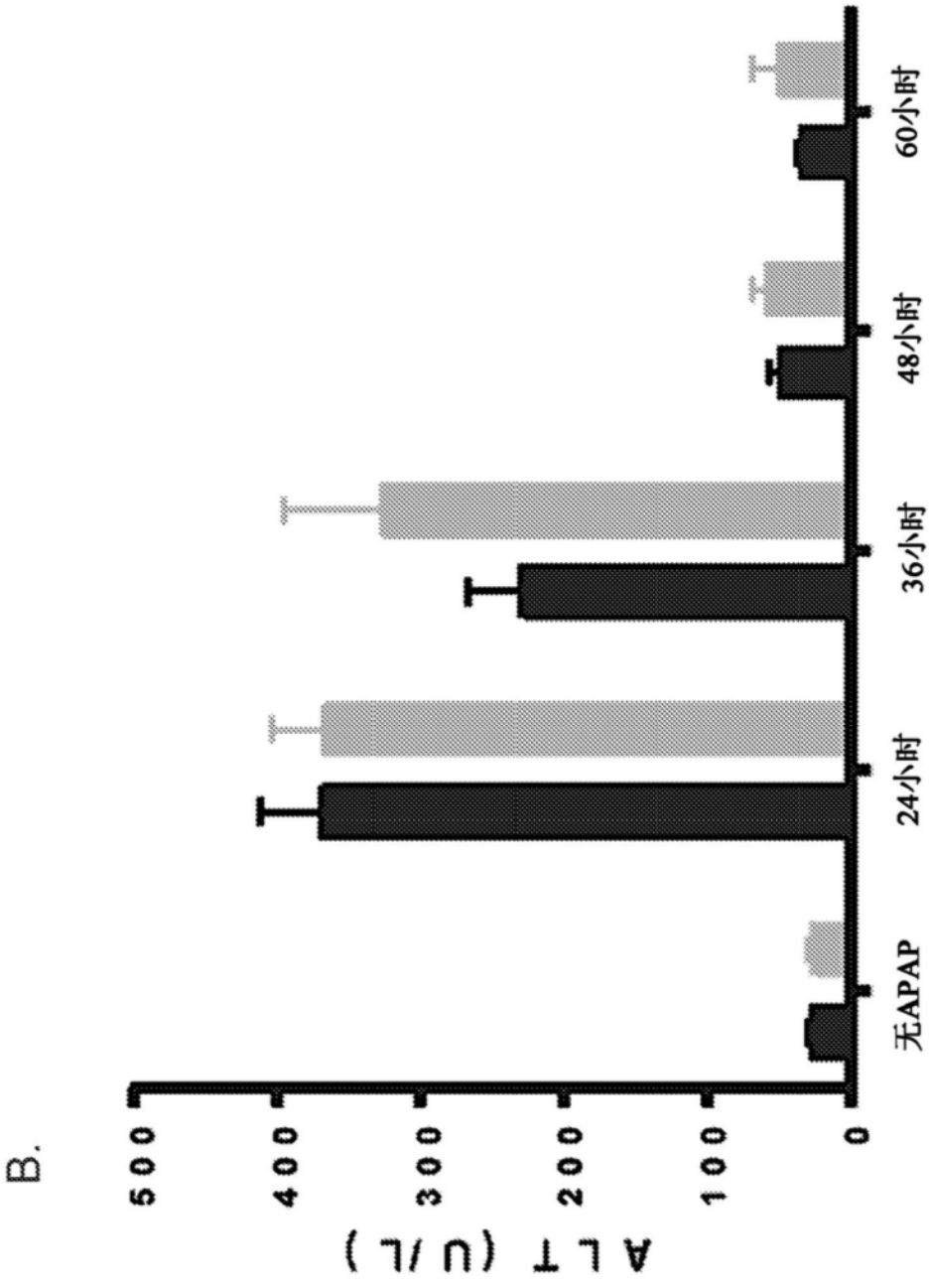


图45(续)

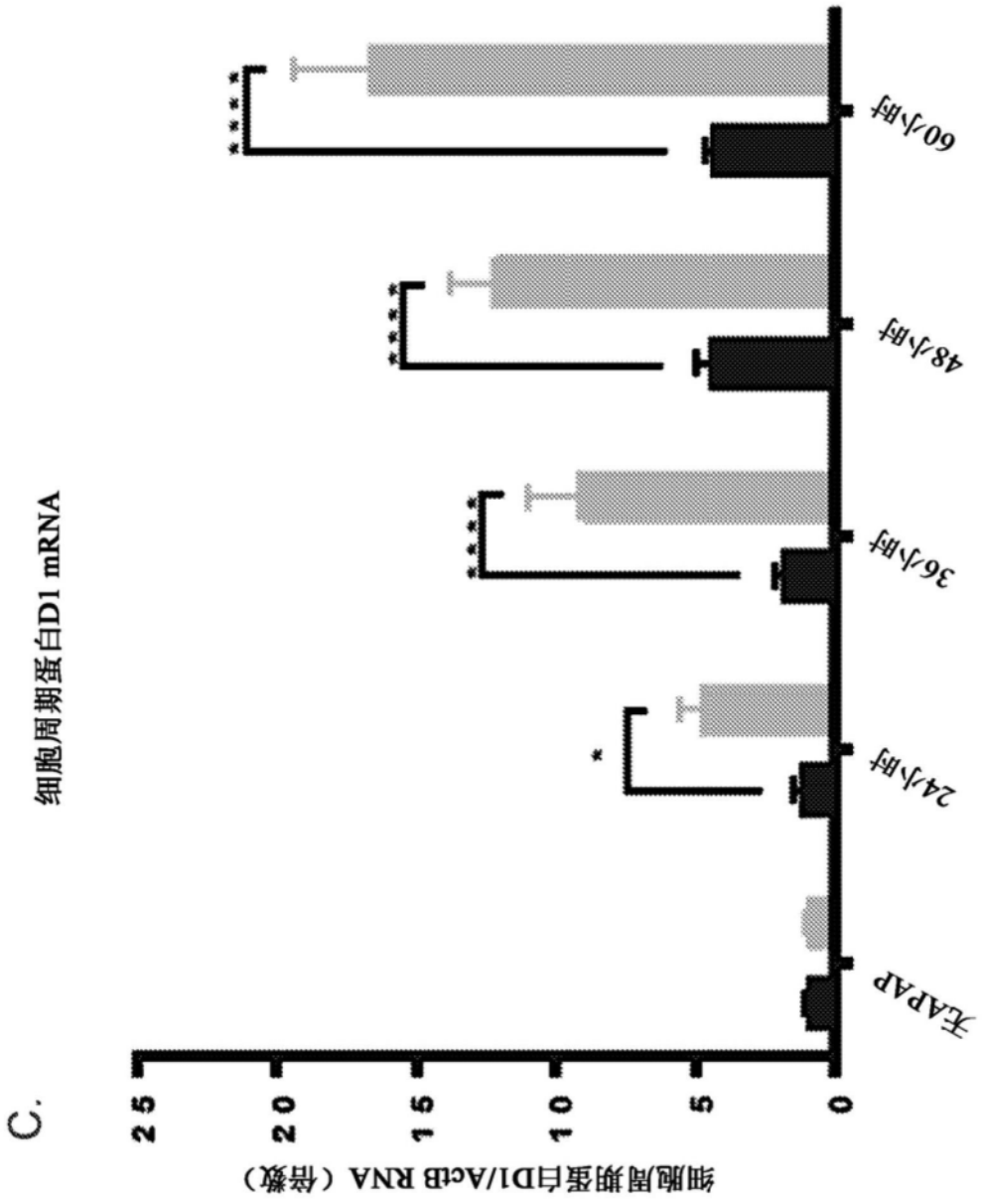

C.
细胞周期蛋白D1 mRNA
细胞周期蛋白D1/ActB RNA（倍数）
0
5
10
15
20
25
无APAP
24小时
36小时
48小时
60小时
*
****
****
****

图45(续)

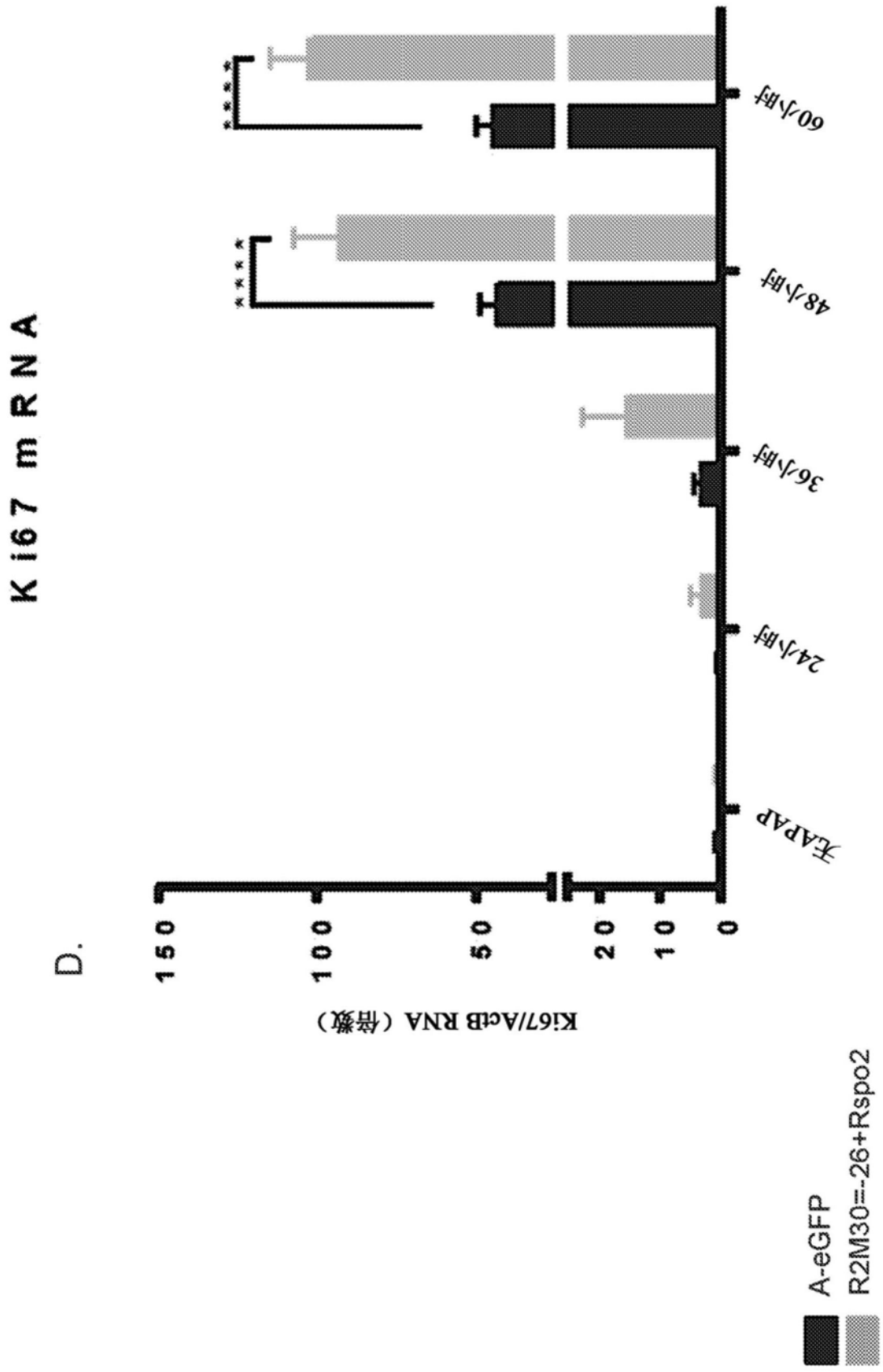

D.
Ki67 mRNA
Ki67/ActB RNA（倍数）
150
100
50
20
10
0
无APAP
24小时
36小时
48小时
60小时
****
****
A-eGFP
R2M30=-26+Rspo2

图45(续)

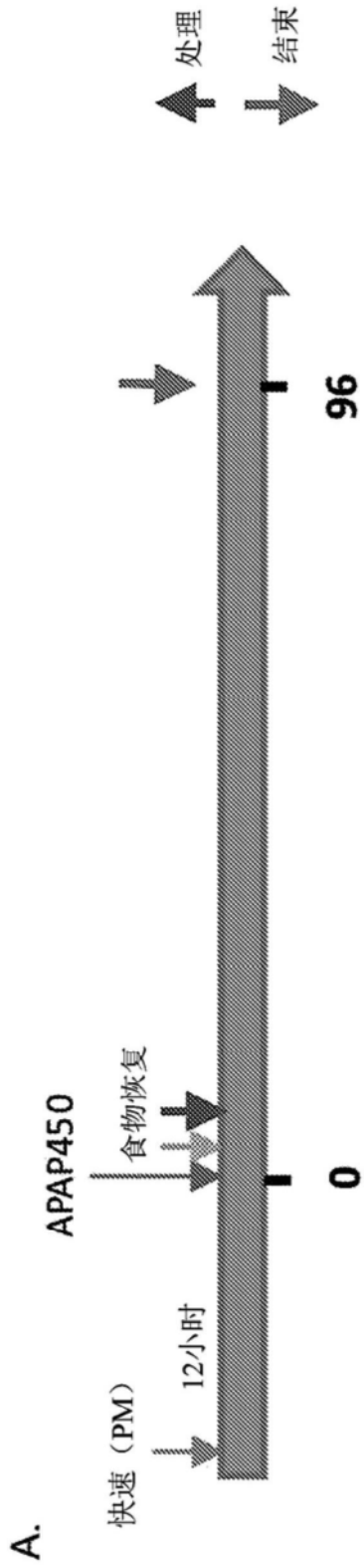


图46

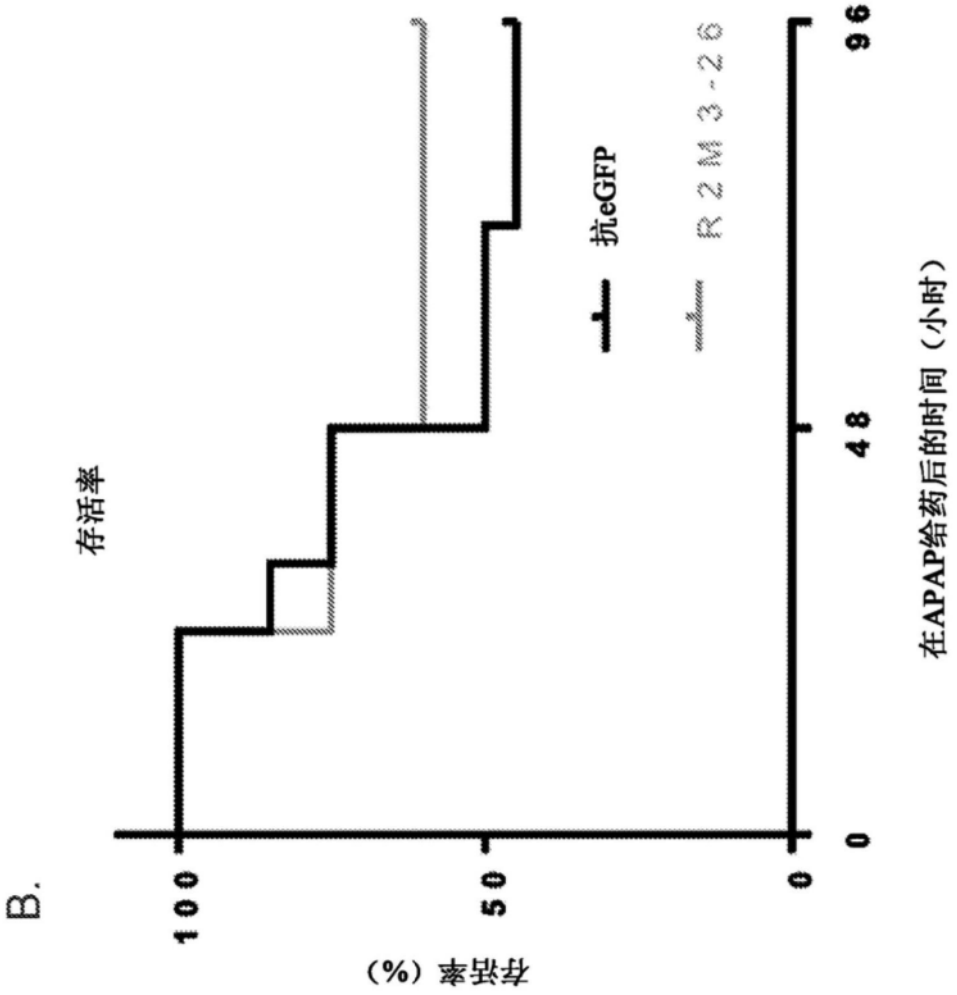


图46(续)

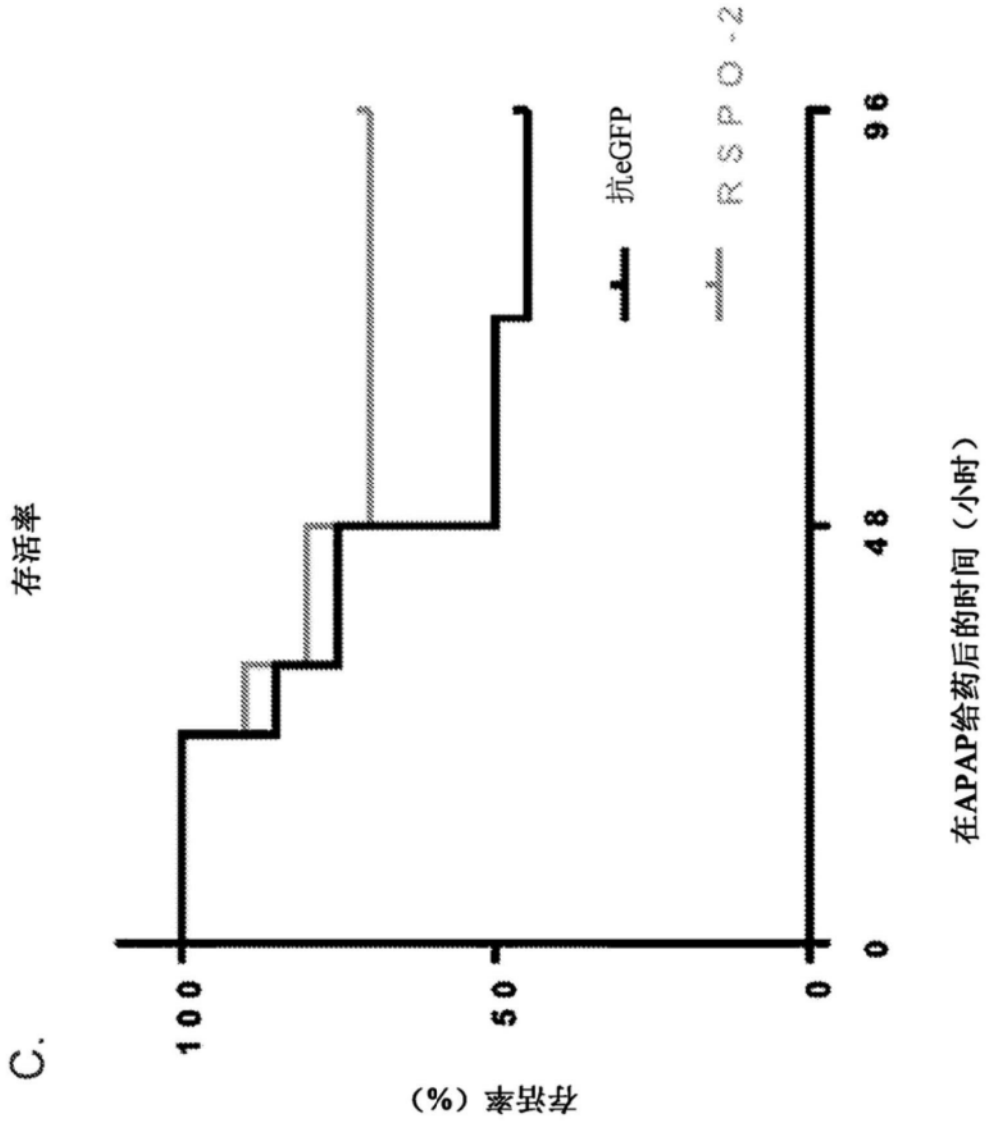


图46(续)

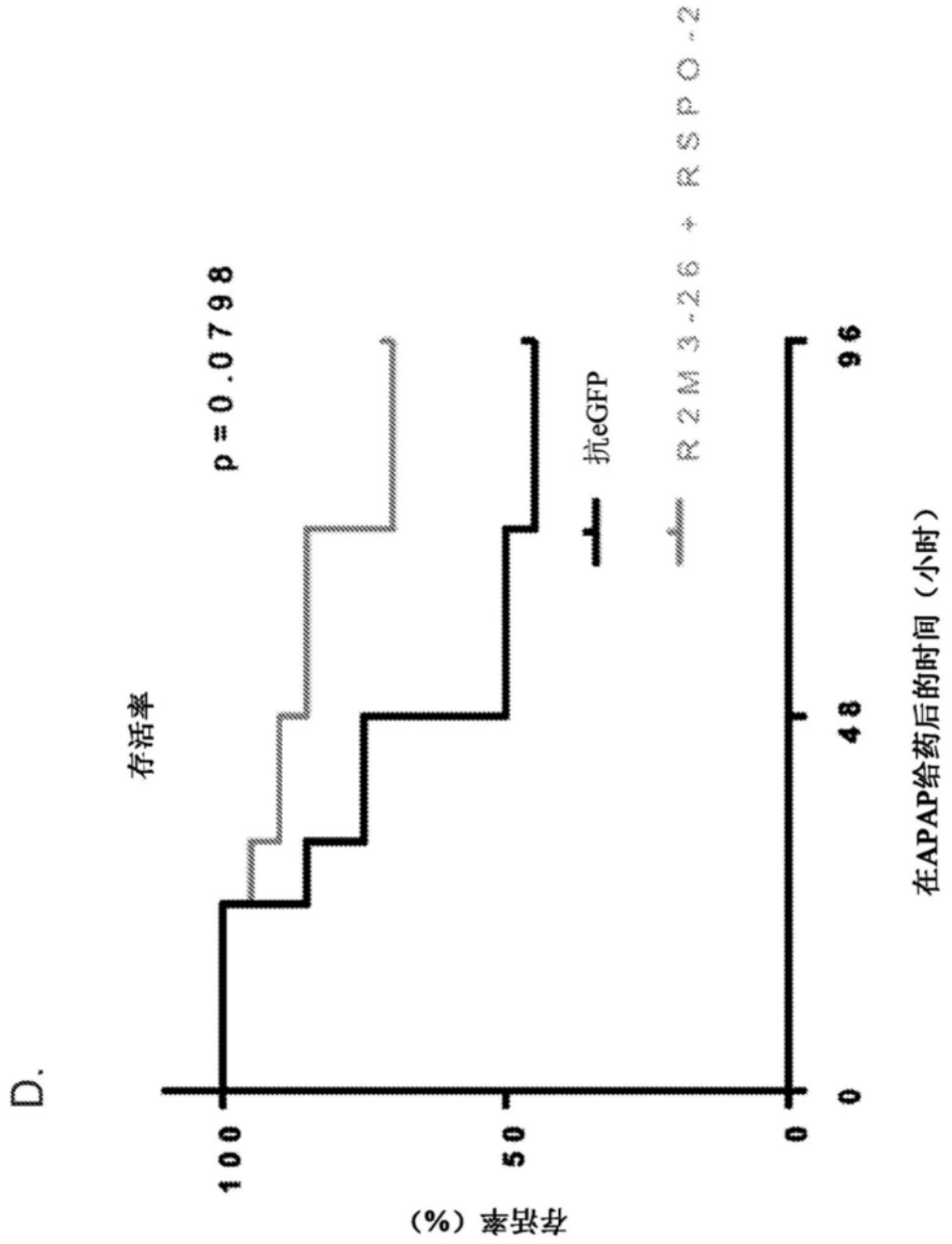

D.
存活率
p = 0.0798
抗eGFP
R2M3-26 + RSPO-2
100
50
0
存活率（%）
0
48
96
在APAP给药后的时间（小时）

图46(续)