



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109111523 B

(45) 授权公告日 2022.06.07

(21) 申请号 201810805989.1	A61K 39/395 (2006.01)
(22) 申请日 2012.10.12	A61K 38/53 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61P 3/10 (2006.01)
申请公布号 CN 109111523 A	A61P 35/00 (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.01.01	A61P 9/00 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61P 19/10 (2006.01)
61/547,209 2011.10.14 US	A61P 1/04 (2006.01)
(62) 分案原申请数据	A61P 1/12 (2006.01)
201280060847.8 2012.10.12	A61P 25/00 (2006.01)
(73) 专利权人 诺华股份有限公司	A61P 19/08 (2006.01)
地址 瑞士巴塞尔	A61P 31/04 (2006.01)
(72) 发明人 F·从 H·郝	(56) 对比文件
L·B·科立克斯泰恩 R-F·孔	CN 101951954 A,2011.01.19
A·泰勒 Y·谢	US 2009047276 A1,2009.02.19
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所	WO 2010016766 A2,2010.02.11
11247	GenBank.RecName: Full=Zinc/RING
专利代理师 胡志君 黄革生	finger protein 3;AltName: Full=RING
(51) Int.Cl.	finger protein 203;Flags: Precursor.
C07K 16/40 (2006.01)	《GenBank》.2011,第1-3页.
	审查员 王金辉
	权利要求书1页 说明书46页 附图9页

(54) 发明名称  
用于Wnt途径相关疾病的抗体和方法

(57) 摘要  
跨膜E3泛素连接酶ZNRF3和RNF43是真核细胞中β-联蛋白和Wnt信号转导途径的负调节物。与ZNRF3的胞外域结合的抗体可以调节ZNRF3的活性,从而导致Wnt信号转导的增强。ZNRF3拮抗抗体可以用来治疗具有弱Wnt信号转导的疾病,如短肠综合征、骨质疏松、糖尿病、神经变性疾病和黏膜炎。此外,本发明的拮抗抗体可以用来增强Wnt信号转导以用于组织修复和伤口愈合。

1. 与跨膜E3泛素连接酶ZNRF3的胞外域特异性结合的分离的抗体或抗原结合片段在增强真核细胞Wnt信号转导中的用途,所述用途为非治疗目的的用途,其中,所述分离的抗体或抗原结合片段包含选自以下(a), (b), (c) 和 (d) 的任一项:

(a) SEQ ID NO:3所示氨基酸序列和SEQ ID NO:4所示氨基酸序列;

(b) SEQ ID NO:5所示氨基酸序列和SEQ ID NO:6所示氨基酸序列;

(c) SEQ ID NO:87所示氨基酸序列和SEQ ID NO:88所示氨基酸序列;

和

(d) SEQ ID NO:89所示氨基酸序列和SEQ ID NO:90所示氨基酸序列;

所述增强真核细胞Wnt信号转导是通过所述抗体或抗原结合片段与真核细胞表面上的跨膜E3泛素连接酶ZNRF3的胞外域结合来实现,并且增强的Wnt信号转导可在体外测定中检测。

## 用于Wnt途径相关疾病的抗体和方法

[0001] 本申请是中国专利申请201280060847.8的分案申请,原申请的申请日是2012年10月12日,发明名称是“用于Wnt途径相关疾病的抗体和方法”。

### 技术领域

[0002] 本发明广泛涉及结合受体的单克隆抗体,尤其涉及结合ZNR3蛋白或RNF43蛋白的抗体。

### 背景技术

[0003] Wnt信号转导途径是真核细胞中对调节细胞生长和分化重要的蛋白质网络。Logan CY和Nusse R,“The Wnt signaling pathway in development and disease.”Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.20:781-810(2004);Nusse R,“Wnt signaling in disease and in development.”Cell Res.15(1):28-32(2005年1月);Clevers H,“Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.”Cell 127(3):469-80(3Nov.2006)。Wnt信号转导对在胚胎发育过程中调节细胞生长和分化至关重要。在成体中,Wnt信号转导促进组织稳态。

[0004] 已将Wnt信号转导的调节异常与许多人类疾病相联系。Wnt途径异常的过度激活可以涉及引起结直肠癌的肿瘤发生。相反,已将Wnt信号转导的病理性低水平与骨质疏松、骨关节炎、多囊肾病和神经变性疾病相联系。已显示Wnt途径的受控激活促进诸如组织修复和伤口愈合的再生过程。Zhao J,Kim KA和Abo A,“Tipping the balance:modulating the Wnt pathway for tissue repair.”Trends Biotechnol.27(3):131-6(2009年3月)。

[0005] Wnt蛋白是结合细胞表面受体(“Wnt受体复合体”)来激活细胞中的Wnt途径的蛋白质配体。已鉴定了典型和非典型的几种Wnt途径。

[0006] 通过典型Wnt/ $\beta$ -联蛋白途径的Wnt信号转导调节转录辅因子蛋白 $\beta$ -联蛋白的细胞周转。MacDonald BT,Tamai K和He X,“Wnt/beta-catenin signaling:components, mechanisms,and diseases.”Dev.Cell 17(1):9-26(2009年7月)及标题为“Evaluating and treating scleroderma”的美国专利申请2009/0220488。在缺乏Wnt配体的情况下, $\beta$ -联蛋白通过多蛋白“破坏复合体”保持磷酸化,其引起 $\beta$ -联蛋白的多遍在蛋白化及 $\beta$ -联蛋白在细胞蛋白体中的降解。在Wnt结合Wnt受体复合体时, $\beta$ -联蛋白通过抑制“破坏复合体”而得以稳定。然后 $\beta$ -联蛋白易位至细胞核。在细胞核中, $\beta$ -联蛋白激活Wnt靶基因的转录,从而激活用于细胞生长和分化的基因表达程序。

[0007] 在典型Wnt/ $\beta$ -联蛋白途径中,Frizzled(FZD)蛋白和低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(LRP5/6)形成受体复合体。Frizzled蛋白和LRP5/6对典型Wnt/ $\beta$ -联蛋白途径都很重要。

[0008] 在非典型、独立于 $\beta$ -联蛋白的途径中,Wnt信号转导调节控制细胞和组织移动的平面细胞极性(PCP)或组织极性信号转导。Zallen JA,“Planar polarity and tissue morphogenesis.”Cell 129(6):1051-63(2007年6月15日);Simons M和Mlodzik M,“Planar cell polarity signaling:from fly development to human disease.”

Annu.Rev.Genet;42:517-40(2008);美国专利申请2009/0220488。Frizzled蛋白是非典型Wnt信号转导中的受体,但LRP5/6并非必需的。

[0009] 虽然许多蛋白质涉及Wnt信号转导途径,但在该途径中鉴定的可作为药物靶点的蛋白质很少,尤其是在Wnt途径中的 $\beta$ -联蛋白途径中处于上游的靶点。存在用于增强Wnt信号以开发用于Wnt信号转导相关病症的治疗的试剂的需要。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明产生于本发明人将两种同源的跨膜E3泛素连接酶鉴定为细胞表面Wnt受体复合体的量的活性负调节物。该连接酶是锌/环指蛋白(Zinc/RING finger protein)3(ZNRF3)和环指蛋白43(RNF43)。本发明人还显示,ZNRF3和RNF43是R-反应蛋白(RSPO)的分子靶标,R-反应蛋白是强烈使细胞对Wnt信号转导敏感的一组分泌性蛋白质。本发明人进一步显示,R-反应蛋白诱导ZNRF3和含有富含亮氨酸重复单位的G蛋白偶联受体4(LGR4)之间的相互作用,LGR4导致ZNRF3的抑制和Wnt信号转导的激活。

[0012] 本发明通过与真核细胞表面上的ZNRF3或RNF43蛋白的胞外域结合的抗体提供了ZNRF3或RNF43活性的调节来增加该真核细胞中的Wnt信号转导。在一个实施方案中,本发明是增加Wnt信号转导的抗-ZNRF3拮抗抗体。在另一实施方案中,本发明是增加Wnt信号转导的抗-RNF43拮抗抗体。

[0013] 本发明还提供本发明的拮抗抗体在治疗低Wnt信号转导相关的疾病和病症中的医学用途。与低Wnt信号转导相关的一些疾病和病症包括但不限于黏膜炎短肠综合症、胃肠黏膜中的细菌移位、肠毒性或肠病性感染性腹泻、乳糜泻、非热带性口炎性腹泻、乳糖不耐症和其中膳食摄入量(dietary exposure)导致黏膜绒毛钝化的其他病症、吸收障碍、萎缩性胃炎和II型糖尿病。还包括骨质疏松、骨折、代谢疾病(metabolic disease)如糖尿病、神经变性疾病和黑素瘤。此外,本发明的拮抗抗体可以用来增强Wnt信号转导以用于组织再生,如组织修复和伤口愈合。

[0014] 本发明还提供具有多种结合特异性的抗体,如双特异性抗体。该抗体的一部分与ZNRF3或RNF43的胞外域结合。该抗体的另一部分与R-反应蛋白的共同受体(例如LGR4、LGR5(也称为GPR49)或LGR6)的胞外域结合。例如,在某些实施方案中,本公开涉及:

[0015] (i) 抗体,其中该抗体的一部分与ZNRF3的胞外域结合,并且该抗体的另一部分与R-反应蛋白的共同受体的胞外域结合;或

[0016] (ii) 抗体,其中该抗体的一部分与RNF43的胞外域结合,并且该抗体的另一部分与R-反应蛋白的共同受体的胞外域结合。

[0017] 本发明提供本发明的抗体在治疗II型糖尿病中的用途,其中所述抗体与DPP-4抑制剂联合治疗。施用本发明的抗体来提高肠降血糖素的水平。由于DPP-4抑制剂的功效需要肠降血糖素的内源产生,本发明的抗体可以与DPP-4抑制剂(如维格列汀(**Galvus®**)或另一DPP-4抑制剂)联合治疗来施用。该联合治疗可以是在施用DPP-4抑制剂之前或与施用DPP-4抑制剂同时施用本发明的抗体。

[0018] 本发明提供分别与ZNRF3或RNF43的外部区域结合的抗-ZNRF3或抗-RNF43抗体在不需要调节ZNRF3或RNF43活性来增强Wnt信号转导的功用中的用途。抗ZNRF3或RNF43外部区域的抗体可以用来诊断疾病,其中ZNRF3或RNF43由于Wnt途径超活化而高表达,如在某些类型的肿瘤,例如结肠腺癌中。抗ZNRF3或RNF43外部区域的抗体还可以用于抗体药物缀合

物(ADC)、依赖抗体的细胞毒性(ADCC)或用于癌细胞特异性递送和杀伤的其他类似方法。

[0019] 本发明提供抗ZNR3外部区域的抗体,其可以用来干扰R-反应蛋白与ZNR3的结合和抑制R-反应蛋白诱导的Wnt信号转导。这类抗体可以用来治疗与强Wnt信号转导相关的病症,其包括但不限于癌症、骨关节炎、硬化性骨化病(sclerosteosis)、特发性肺纤维化和心肌肥厚(cardiac hypertrophy)。

[0020] 本发明还提供可药用载体中的跨膜E3泛素连接酶(ZNR3或RNF43)的可溶性胞外域,其在受益于Wnt信号转导减弱的疾病或其他适应症的治疗中用作药物。ZNR3或RNF43的可溶性胞外域特异地结合R-反应蛋白来阻断R-反应蛋白刺激的Wnt信号转导。这类抗体可以用来治疗与强Wnt信号转导相关的病症,其包括但不限于癌症、骨关节炎、硬化性骨化病、特发性肺纤维化和心肌肥厚。

[0021] 附图简述

[0022] 图1是一组条形图,显示ZNR3和RNF43是Wnt靶基因。用或不用Wnt3A条件培养基(CM)处理小鼠L细胞24小时。提取总RNA来进行反转录,并用ZNR3、RNF43和GUSB **Taqman**<sup>®</sup> 探针进行qPCR分析。用 $\Delta\Delta Ct$ 法来获得mRNA水平,条形图中所示的水平对GUSB(人的 $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶基因),且相对于无Wnt3A条件培养基归一化。

[0023] 图2是一组条形图,显示ZNR3和RNF43在结肠癌中上调。ZNR3mRNA水平(图2A)和RNF43mRNA水平(2B)是来自四名患者的结肠腺癌和邻近正常组织中的水平。按图1中所述测量和分析mRNA水平。

[0024] 图3是一组条形图,显示SW480结肠癌细胞中siRNA介导的 $\beta$ -联蛋白基因缺失及所述缺失对该细胞系中ZNR3和RNF43的相对mRNA水平的影响。以GUSB(人的 $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶基因)作为内部对照,通过基于 **TaqMan**<sup>®</sup> 探针的定量RT-PCR,用 $\Delta\Delta Ct$ 法测量所有mRNA水平。误差棒表示标准差(n=4)。

[0025] 图4是一组条形图,显示ZNR3负调节Wnt信号转导。用对照siRNA(PGL2)或ZNR3siRNA转染具有克隆的 **SuperTopFlash**<sup>®</sup> (STF) 报道基因的HEK293细胞,其稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)或用siRNA抗性(siR)和带有C端血凝素(HA)标记的野生型(WT)ZNR3或缺乏RING结构域( $\Delta$ RING)的ZNR3。转染后2天,按所示加入30%Wnt3A条件培养基(CM)。转染后3天,用来自Promega的 **BrightGlo**<sup>®</sup> 试剂测定萤光素酶活性。

[0026] 图5是一组条形图,显示RNF43是ZNR3的功能同系物。条形图表示用对照siRNA(PGL2)或ZNR3siRNA转染具有克隆的 **SuperTopFlash**<sup>®</sup> (STF) 报道基因的HEK293细胞的结果,所述HEK293细胞稳定表达GFP或野生型(WT)RNF43或缺乏RING结构域( $\Delta$ RING)的RNF43。转染后3天,用来自Promega的 **BrightGlo**<sup>®</sup> 试剂测定萤光素酶活性,并对GFP+pGL2si组归一化。

[0027] 图6是一组聚丙烯酰胺凝胶图片,针对以下细胞系和处理显示所示蛋白质的免疫印迹:转染对照pGL2siRNA或ZNR3siRNA后,稳定表达空载体(EV)、siRNA抗性ZNR3或缺乏RING结构域( $\Delta$ RING)的ZNR3的HEK293-STF细胞的Wnt报道基因测定。误差棒表示标准差(n=4)。所示蛋白质是磷酸化Dv12(上部条带);pLRP6,磷酸化的LRP6。LRP6印迹中的下部条带

是ER形式的蛋白质,其不受ZNR3影响。Dvl2是体节极性蛋白Dishevelled同系物。

[0028] 图7是一组聚丙烯酰胺凝胶图片,显示生物素化稳定表达Myc-FZD8的HEK293细胞后,通过neutravidin小珠结合的总Myc-FZD8和细胞表面Myc-FZD8(Frizzled 8)的免疫印迹。用对照pGL2siRNA或ZNR3siRNA转染细胞。TCL,总细胞裂解物。

[0029] 图8是一组条形图,鉴定调节Wnt信号转导的两种ZNR3hFab。具体而言,该条形图显示ZNR3抗体提高STF活性。在缺乏和存在5%Wnt3a条件培养基的情况下用50 $\mu$ g/ml ZNR3抗体或对照抗体过夜处理HEK293-STF细胞,并进行STF萤光素酶报道基因测定。

[0030] 图9是一组聚丙烯酰胺凝胶图片,显示R-反应蛋白(RSP0)、LGR4和ZNR3的共免疫沉淀。用RSP01-GFP条件培养基(CM)处理共表达LGR4-HA和Myc-ZNR3 $\Delta$ RING的HEK293细胞1小时,用抗-Myc抗体免疫沉淀细胞裂解物,溶解免疫沉淀,并用抗-HA、抗-Myc和抗-GFP抗体印迹。此图显示RSP01增强ZNR3和LGR4之间的相互作用。

[0031] 图10是一组条形图,显示过表达ZNR3ECD-TM(大部分胞内域截短的ZNR3突变体)特异地抑制RSP01而不是Wnt3a诱导的STF活性。用Wnt3a或RSP01 $\Delta$ C过夜处理稳定表达空载体(EV)或ZNR3ECD-TM的HEK293-STF细胞,并进行STF萤光素酶报道基因测定。

[0032] 图11是显示IgG-Ab1和IgG-Ab2在**SuperTopFlash<sup>®</sup>**(STF)报道基因测定中的刺激效应的条形图。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明提供以下:第一,ZNR3和RNF43是细胞表面蛋白,因此有可能在抗体结合ZNR3或RNF43后作为药物靶点。第二,ZNR3和RNF43是 $\beta$ -联蛋白和Wnt信号转导途径的负调节物。通过使用siRNA或通过表达显性失活突变体ZNR3蛋白质来抑制ZNR3导致Wnt信号转导的增加。第三,RNF43是ZNR3的功能同系物。第四,与蛋白质的胞外域结合的抗ZNR3抗体模拟通过使用siRNA或通过表达显性失活突变体ZNR3蛋白来抑制ZNR3,从而导致Wnt信号转导的增强。第五,与蛋白质的胞外域结合的多种类型的抗ZNR3或RNF43抗体可以通过产生具有特异性结合的抗体的已知方法来产生。第六,在体内,ZNR3的抑制增强Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导,并破坏Wnt/PCP信号转导。第七,可以用施用治疗性抗体的已知方法来实现与蛋白质的胞外域结合的抗ZNR3和RNF43抗体的用途,用于增强Wnt信号转导,从而治疗Wnt信号转导的不足。第八,由于本发明人已显示R-反应蛋白通过增加ZNR3和LGR4之间的结合来抑制ZNR3,一方面与ZNR3或RNF43结合,另一方面与LGR4、LGR5或LGR6结合的双特异性抗体可以用来模拟R-反应蛋白并增强真核细胞中的Wnt信号转导。第九,由于本发明人已显示膜E3泛素连接酶ZNR3是R-反应蛋白的分子靶标,与ZNR3结合的抗体可以用来抑制真核细胞的R-反应蛋白活性。

[0035] ZNR3和RNF43是细胞表面蛋白。锌/环指蛋白3(ZNR3,Swiss-Prot Q9ULT6,SEQ ID NO:1)和环指蛋白43(RNF43,Swiss-Prot Q68DV7,SEQ ID NO:2)是结构上相关的环指蛋白。每种蛋白质包含信号肽、胞外域、跨膜结构域和胞内环结构域(非典型锌指结构域)。

表 1

人 ZNRF3 蛋白和人 RNF43 蛋白的氨基酸序列

[0036]

锌/环指蛋白 3 (ZNRF3, Swiss-Prot Q9ULT6, SEQ ID NO: 1), 胞外域来自氨基酸 56-219。	MRPRSGGRP	ATGRRRRRLR	RRPRGLRCSR	LPPPPPLPLL
	LGLLLAAAGP	GAARAKETAF	VEVVLFEESP	SGDYTTYTTG
	LTGRFSRAGA	TLSAEGEIVQ	MHPLGLCINN	DEEDLYEYGW
	VGVVKLEQPE	LDPKPCLTVL	GKAKRAVQRG	ATAVIFDVSE
	NPEAIDQLNQ	GSEDPLKRPV	VYVKGADAIK	LMNIVNKQKV
	ARARIQHRPP	RQPTEYFDMG	IFLAFFVVVS	LVCLILLVKI
	KLKQRRSQNS	MNRLAVQALE	KMETRKFNSK	SKGRREGSCG
	ALDTLSSSST	SDCAICLEKY	IDGEELRVIP	CTHRFHRKCV
	DPWLLQHHTC	PHCRHNIIEQ	KGNPSAVCVE	TSNLSRGRQQ
	RVTLPVHYPG	RVHRTNAIPA	YPTRTSMDSH	GNPVTLLTMD
	RHGQSLYSP	QTPAYIRSYF	PLHLDHSLAA	HRCGLEHRYA

	SPAHPFRRPK	LSGRSFSKAA	CFSQYETMYQ	HYYFQGLSYP
	EQEGQSPPSL	APRGPAPAFP	PSGSGSLLFP	TVVHVAPPSP
	LESGSTSSFS	CYHGHRVCS	GYLADCPGSD	SSSSSSSGQC
	HCSSSDSVVD	CTEVSNQGVY	GSCSTFRSSL	SSDYDPFIYR
	SRSPCRASEA	GGSGSSGRGP	ALCFEGSPPP	EELPAVHSHG
	AGRGEFPWPGP	ASPSGDQVST	CSLEMNYSSN	SSLEHRGPNS
	STSEVGLEAS	PGAAPDLRRT	WKGGHHELPSC	ACCCEPQPSP
	AGPSAGAAGS	STLFLGPHLY	EGSGPAGGEP	QSGSSQGLYG
	LHPDHLPRTD	GVKYEGLPCC	FYEKQVARG	GGGSGCYTE
	DYSVSVQYTL	TEEPPPGCYP	GARDLSQRIP	IIPEDVDCDL
	GLPSDCQGTH	SLGSWGGTRG	PDTPRPHRGL	GATREEERAL
	CCQARALLRP	GCPPEEAGAV	RANFPSALQD	TQESSTTATE
	AAGPRSHSAD	SSSPGA		
[0037]	环指蛋白 43 (RNF43, Swiss-Prot Q68DV7, SEQ ID NO: 2), 胞外域来自氨基酸 24-197。	MSGGHQLQLA	ALWPWLLMAT	LQAGFGRTGL
		SAEQKAIIRV	IPLKMDPTGK	LNLTLLEGVFA
		KLMQSHPLYL	CNASDDDNLE	PGFISIVKLE
		SLASKARMAG	ERGASAVLFD	ITEDRAAAEQ
		VVLIWGNDAE	KLMEFVYKNQ	KAHVRIELKE
		ILMTVVGTIF	VIILASVLRI	RCRPRHSRPD
		SQLATRRYQA	SCRQARGEWP	DSGSSCSSAP
		EGQELRVISC	LHEFHRNCVD	PWLHQHRTCP
		SFSQSLGPSR	SYQEPGRRLH	LIRQHPGHAH
		PSRSAVARPP	RPGPFLPSQE	PGMGPRHHRF
		EQQLLAGAQH	PYAQGWGLSH	LQSTSQHPAA
		PDSSSGGESY	CTERSGYLAD	GPASDSSSGP
		NCTDISLQGV	HGSSSTFCSS	LSSDFDPLVY
		DMQPSVTSRP	RSLDSVVPTG	ETQVSSHVHY
		RFQWHGRKPG	PETGVPQSRP	PIPRTQPQPE
		SNSAAPSGRL	SNPQCPRALP	EPAPGPVDAS
		NLQKSSLSAR	HPQRKRRGGP	SEPTPGSRPQ
		FPHYTPSVAY	PWSPEAHPLI	CGPPGLDKRL
		NSQPVWLCLT	PRQPLEPHPP	GEGPSEWSSD
		HCQVLSAQPG	SEEELEELCE	QAV

[0038] 抗-ZNRF3抗体可从Santa Cruz Biotechnology购得。ZNRF3 (P-15) (产品sc-86958) 是亲和纯化的针对定位在人类来源的ZNRF3的内部区域(而不是胞外区域)内的肽的山羊多克隆抗体。

[0039] 之前已充分表征了ZNRF3,但Sugiura等人证明RNF43具有E3泛素连接酶活性。Sugiura T,Yamaguchi A和Miyamoto K,“A cancer-associated RING finger protein, RNF43, is an ubiquitin ligase that interacts with a nuclear protein, HAP95.” *Exp. Cell Res.* 314 (7):1519-28 (2008年4月15日)。标题为“Genes and polypeptides relating to human colon cancers”的美国专利号7,425,612中也描述了RNF43。

[0040] 本发明人进行了三项测试来显示ZNRF3和RNF43是细胞表面蛋白。

[0041] 第一,显微术观察显示,ZNRF3定位于细胞表面膜。本发明人通过基因工程使一些HEK293细胞稳定表达ZNRF3的C端绿色荧光蛋白(GFP)融合物,使其他HEK293细胞稳定表达

信号肽缺失的ZNR3-GFP。

[0042] 对于我们的转染测定,本发明人通过融合短变体(NM\_032173)和合成的300碱基对N端片段产生了全长人ZNR3cDNA(NM\_001206998)。我们通过两步PCR构建了siRNA抗性ZNR3cDNA,并用作模板来产生ZNR3  $\Delta$  RING(缺失氨基酸293-334)和ZNR3胞外域(ECD)-跨膜(TM)(氨基酸1-256)。将cDNA克隆入CMV启动子控制下的哺乳动物表达载体。测序质粒来确认同一性和不希望的突变的缺乏。

[0043] 本发明人用标准方案通过反转录病毒或慢病毒感染来将多种构建体引入HEK293细胞或具有克隆的 **SuperTopFlash<sup>®</sup>** (STF) 报道基因的HEK293细胞(即HEK293-STF细胞)。

[0044] 对于我们的测定的细胞培养,我们在补充了10%胎牛血清(FBS)的Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)中培养HEK293细胞或衍生的细胞系。

[0045] 第二,我们的HEK293细胞和衍生的细胞系的共焦显微术分析显示,ZNR3-GFP定位在质膜上,而信号肽缺失的ZNR3-GFP弥散定位在胞质中。

[0046] 第三,本发明人在细胞表面蛋白生物素化测定中确认了我们的显微结果。我们用全长ZNR3-HA或信号肽缺失的ZNR3  $\Delta$  SP-HA转染了具有克隆的 **SuperTopFlash<sup>®</sup>** (STF) 报道基因的HEK293细胞。

[0047] 对于我们的免疫印迹和免疫沉淀测定,我们使用了以下方法:通过用补充了蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 7.4,150mM NaCl,1%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1%SDS,1mM EDTA)裂解细胞,然后在4°C下14,000rpm离心10分钟来制备总细胞裂解物。然后通过SDS-PAGE分离来自各裂解物的等量蛋白质(25~50 $\mu$ g),并转移至硝酸纤维素膜上进行封闭,用所示一级抗体4°C温育过夜。用与HRP或红外染料缀合的第二抗体来分别通过ECL膜法或LI-COR Odyssey扫描仪进行信号显示。通过 **AlphaEaseFC<sup>®</sup>** 软件的光密度分析来进行免疫印迹条带的定量。对于共免疫沉淀实验,在含有50mM Tris-HCl,pH 7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、0.8%Nonidet P40、磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的缓冲液中裂解细胞。用所示抗体和蛋白G-琼脂糖珠(Amersham)4°C过夜孵育澄清的细胞裂解物。用裂解缓冲液洗涤珠4次,并在SDS样品缓冲液中洗脱结合的蛋白质用于免疫印迹分析。

[0048] 两组转染的HEK293细胞都生物素化,并按照市售 **Pierce<sup>®</sup>** Cell Surface Protein Isolation Kit(Thermo Fisher Scientific Inc.,产品号89881)的说明通过链霉抗生物素蛋白琼脂糖亲和纯化。用市售抗-HA抗体(Roche)对细胞裂解物(输入)和结合的洗脱物进行免疫印迹。

[0049] 我们的结果显示,生物素化细胞表面蛋白之后,ZNR3-HA(而不是缺乏信号肽( $\Delta$ SP)的突变蛋白)回收在链霉抗生物素蛋白结合物中。这些免疫学结果确认了胞外区在ZNR3蛋白质上的存在。

[0050] 因此,我们的结果显示,ZNR3和RN43是定位在细胞表面上的E3泛素连接酶。由于ZNR3和RN43在细胞表面上,它们的活性可以直接受配体结合调节,因此可作为药物靶点。

[0051] ZNR3和RN43是 $\beta$ -联蛋白信号转导靶标及 $\beta$ -联蛋白和Wnt信号转导途径的负调节

物。总结起来,我们的来自图1至图5的结果显示,ZNRF3和RNF43是Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导靶标及 $\beta$ -联蛋白和Wnt信号转导途径的负调节物。

[0052] 第一,如图1中所示,在具有正常Wnt信号转导途径的细胞中,Wnt3a条件培养基(CM)诱导ZNRF3和RNF43的表达。

[0053] 对于我们的PCR测定,按照厂家的说明用RNeasy Plus Mini **Kit**<sup>®</sup> (Qiagen)提取来自处理的细胞的总RNA,并用Taqman Reverse Transcription **Reagents**<sup>®</sup> (Applied Biosystems)反转录。用ABI PRISM7900HT Sequence Detection **System**<sup>®</sup>评估转录物水平。在由0.6 $\mu$ l 20X Assay-on-**Demand**<sup>®</sup>混合物(18 $\mu$ M各引物和5 $\mu$ M **Taqman**<sup>®</sup>探针的预混合浓度)、6 $\mu$ l 2X Taqman Universal PCR Master **Mix**<sup>®</sup>和5.4 $\mu$ l稀释的cDNA模板组成的12 $\mu$ l反应体系中进行实时PCR。所利用的热循环条件为50 $^{\circ}$ C 2分钟,95 $^{\circ}$ C 10分钟,然后是95 $^{\circ}$ C 15秒和60 $^{\circ}$ C 1分钟的40个循环。

[0054] 本发明人用比较  $\Delta\Delta$  CT法进行基因表达分析,用持家基因GUSB进行归一化。所使用的Assay-on-**Demand**<sup>®</sup>试剂购自Applied Biosystems。

[0055] 如通过定量PCR所测量,在小鼠L细胞中,Wnt3A处理使ZNRF3和RNF43表达分别提高12.9倍和2.2倍。我们的结果显示,ZNRF3和RNF43是Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导靶标。

[0056] 第二,如图2中所示,在具有超活化的 $\beta$ -联蛋白信号转导的结直肠癌中,ZNRF3和RNF43的表达增加。如通过上述方法,通过定量PCR分析所示,在结肠腺癌细胞中,ZNRF3的表达(图2A)和RNF43的表达(图2B)都提高。

[0057] 已知由于APC(腺瘤性结肠息肉)基因突变,使得APC蛋白截短,所以结肠癌具有超活化的Wnt信号转导。APC蛋白是 $\beta$ -联蛋白“破坏复合体”的成分。因此,ZNRF3和RNF43的表达由于 $\beta$ -联蛋白的稳定而得以诱导。

[0058] 第三,如图3中所示,SW480结直肠癌细胞系中ZNRF3mRNA的表达由于siRNA介导的 $\beta$ -联蛋白的缺失而下调。

[0059] 第四,ZNRF3的siRNA的敲除增加了非癌细胞中的Wnt信号转导。第五,ZNRF3的显性失活突变体的表达同样增强Wnt信号转导。

[0060] 使用HEK293细胞,本发明人发现,如图4中所示,如通过 **SuperTopFlash**<sup>®</sup> (STF) 报道基因活性所测量,ZNRF3的siRNA敲除显著增加了Wnt报道基因活性。用对照pGL2siRNA或ZNRF3siRNA转染稳定表达空载体(EV)、siRNA抗性野生型(WT) ZNRF3或ZNRF3  $\Delta$  RING的HEK293-STF细胞,并测量STF活性。对于我们的测定,按照厂家的说明用 **BrightGlo**<sup>®</sup>或 **DualGlo**<sup>®</sup> Luciferase Assay kit (Promega) 进行STF萤光素酶测定。如上文所述,STF是Wnt报道基因测定。用于图4的测定的siRNA构建体在表2中列出。

表 2 siRNA 构建体	
[0061] ZNRF3-1(QiagenSI03089744), 有义链(SEQ. ID NO: 7)	cccaguauga gaccaugua
ZNRF3-1(QiagenSI03089744), 反义链(SEQ. ID NO: 8)	uacauggucu cauacuggga g
ZNRF3-2(Qiagen1027020), 有义链 (SEQ. ID NO: 9)	gcugcuacac ugaggacua
ZNRF3-2(Qiagen1027020), 反义链(SEQ. ID NO: 10)	uaguccucag uguagcagcc g

[0062] 如图4中所示, siRNA抗性ZNRF3的过表达废除了ZNRF3siRNA诱导的STF激活。这些结果表明, ZNRF3siRNA作用在靶标上 (on-target)。

[0063] 我们进一步发现, 如图4中所示, 缺乏RING结构域的ZNRF3突变体 (ZNRF3  $\Delta$  RING) 的过表达强烈增强SFT活性。缺乏RING结构域 ( $\Delta$  R) 的ZNRF3的过表达自身增强了STF报道基因活性。重要地, 在不加入外源Wnt3A条件培养基的情况下也观察到这些效应。

[0064] 总结我们的图4中的结果, siRNA抗性ZNRF3抑制ZNRF3siRNA诱导的STF的激活, 而ZNRF3  $\Delta$  RING增强STF活性。我们的结果还显示ZNRF3  $\Delta$  RING的显性阴性功能。

[0065] 第六, 图5的结果显示, RNF43是ZNRF3的功能同系物, 因此是 $\beta$ -联蛋白和Wnt信号转导途径的负调节物。如上文所述, E3泛素连接酶RNF43与E3连接酶ZNRF3具有高序列同源性。图5中的结果显示, RNF43的表达拯救ZNRF3siRNA对STF报道基因活性的作用。用于图5的测定中的siRNA构建体在表3中列出。

表 3 siRNA 构建体	
[0066]	

[0067]	RNF43(Dharmacon J-007004-09-0005) (SEQ. ID NO: 11)	gcagaacaga aagcuauua
	FZD6(Dharmacon J-005505-07) (SEQ. ID NO: 12)	gaaggaagga uuaguccaa
	LGR4-1(Dharmacon J-003673-07) (SEQ. ID NO: 13)	aggauucacu guaacguua
	LGR4-2(Dharmacon J-003673-08) (SEQ. ID NO: 14)	uuacugaagc gacguguaa
	CTNNB1, 有义链(SEQ. ID NO: 15)	uguggucacc ugucagcu
	CTNNB1, 反义链(SEQ. ID NO: 16)	agcugcacag gugaccaca

[0068] 野生型RNF43的过表达阻断ZNR3siRNA诱导的STF激活,而RNF43  $\Delta$  RING的过表达增强STF活性。缺乏RING结构域的RNF43 ( $\Delta$  R) 也显示针对ZNR3的显性阴性活性。

[0069] 第七, IWP-2是已知的阻断Wnt分泌的Porcupine抑制剂。Chen B. 等人“Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer.”*Nat. Chem. Biol.* 5, 100-107 (2009)。我们发现,在缺乏外源Wnt的情况下, IWP2完全抑制ZNR3siRNA或ZNR3  $\Delta$  RING诱导的 $\beta$ -联蛋白累积和STF激活。我们的结果表明, ZNR3抑制由内源Wnt蛋白起始的 $\beta$ -联蛋白信号转导。因此,我们的结果将ZNR3与Wnt信号转导的其他负调节物区别开来。

[0070] 第八, 生物化学测定显示了ZNR3调节 $\beta$ -联蛋白信号转导的分子机制。用对照pGL2siRNA或ZNR3siRNA转染稳定表达空载体 (EV)、siRNA抗性野生型或突变体ZNR3的HEK293细胞。

[0071] 我们的免疫印迹测定结果显示在图6中。一级抗体的来源是:抗-LRP6、抗-磷酸-LRP6 (Ser1490) 和抗-Dvl2 (Cell Signaling Technology); 抗-HA (Roche); 抗-微管蛋白 (Sigma)。

[0072] 免疫印迹测定显示,用ZNR3siRNA处理或过表达ZNR3  $\Delta$  RING提高了磷酸-LRP6和总LRP6的水平。见图6,泳道1、泳道2和泳道5。siRNA抗性ZNR3的表达阻断了ZNR3siRNA的作用。见图6,泳道2和泳道4。

[0073] 在图6中,与野生型ZNR3相比, ZNR3  $\Delta$  RING的蛋白质表达水平更高,这与ZNR3是E3泛素连接酶,经历自身泛素化和随后的降解相一致。

[0074] 有趣地,用ZNR3siRNA处理和过表达ZNR3  $\Delta$  RING增加了体节极性蛋白质Dishevelled同系物Dvl2磷酸化。见图6,泳道1、泳道2和泳道5。过表达野生型ZNR3减少了

Dvl2磷酸化。见图6,泳道1和泳道3。Dishevelled磷酸化是Frizzled激活的直接读出结果,且不依赖于LRP6激活。MacDonald BT, Tamai K和He X, “Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.” *Dev. Cell* 17, 9-26 (2009)。因此,上述结果显示,Frizzled的活性也受ZNR3影响。

[0075] 使用与稳定表达空载体 (EV) 或ZNR3 Δ RING的HEK293细胞结合的抗-LRP6抗体,用流式细胞术分析确认了ZNR3抑制时增加的LRP6质膜表达。

[0076] 对于流式细胞术,用不含胰蛋白酶的细胞解离缓冲液 (Invitrogen) 收集细胞,并重悬在FACS缓冲液 (含1% BSA和0.02% 叠氮化钠的PBS) 中。封闭后,用抗-LRP6 (R&D system) 4℃培养细胞1小时。在FACS缓冲液中充分洗涤后,用碘化丙啶 (PI) 染色细胞,并用BD LSR II流式细胞仪进行多通道分析。

[0077] 第九,本发明人进行了测定来测试发现Frizzled的水平或活性受ZNR3的影响。为了产生带N端Myc标记的FZD8,我们产生了遗传构建体,其中刚好在信号肽之后用N端三重Myc表位标记Frizzled 8 (FZD8)。用刚好在信号肽之后的三重Myc表位或C端血凝素 (HA) 表位标记ZNR3。

[0078] 通过转染来构建稳定表达带N端Myc标记的FZD8的HEK293细胞。此细胞系中的大部分Myc-FZD8在胞质中,只有小部分Myc-FZD8定位在质膜上。

[0079] 细胞表面蛋白生物素化测定揭示,ZNR3siRNA强烈提高质膜上的Myc-FZD8的水平,而不影响总Myc-FZD8的水平。见图7。一级抗体的来源是:抗-Myc标记 (Cell Signaling Technology);抗-微管蛋白 (Sigma)。

[0080] 此外,如通过流式细胞术所示,ZNR3siRNA和ZNR3 Δ RING提高而野生型ZNR3降低Myc-FZD8的膜水平。使用pan-Frizzled抗体,我们发现,在过表达野生型ZNR3或ZNR3 Δ RING时,细胞表面的内源Frizzled蛋白水平分别降低或提高。

[0081] 总结起来,这些结果显示,ZNR3调节质膜上的Frizzled和LRP6的水平。

[0082] 总结起来,ZNR3和RNF43是Wnt/β-联蛋白信号转导靶标及β-联蛋白和Wnt信号转导途径的负调节物。

[0083] 抗ZNR3的拮抗抗体。由于ZNR3定位在细胞表面且包含保守的胞外域,本发明人用纯化的ZNR3胞外域和标准技术进行了基于噬菌体展示的抗体淘选,以鉴定结合ZNR3胞外域并调节ZNR3功能的抗体。

[0084] 用Fc-ZNR3ECD (胞外域,SEQ ID NO:1的氨基酸56-219) 蛋白进行噬菌体淘选。通过使用Fc-ZNR3ECD进行的ELISA来筛选片段抗原结合 (Fab) 克隆,并通过使用稳定表达ZNR3 Δ RING的HEK293细胞进行的FACS分析来验证所述克隆与ZNR3的结合。

[0085] 甚至在缺乏外源Wnt3a加入的情况下,得到的抗体中的两种 (Fab克隆Ab1和Ab2) 也显示通过STF报道基因测量的Wnt刺激活性。此外,图8显示,这两种抗体增强了Wnt3a诱导的STF活性。该抗体的序列在SEQ. ID NO:3和SEQ ID NO:4 (Ab1) 中及SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6 (Ab2) 中提供。

[0086]

表 4

Fab 克隆 Ab1 和 Ab2 的轻链和重链的氨基酸序列

[0087]

Ab1, 轻链- $\lambda$ 3(SEQ. ID NO: 3)	DIELTQPPSV QAPVLVIYGK DEADYYCAAW PPSSEELQAN VETTTPSKQS GSTVEKTVAP	SVSPGQTASI SHRPSGIPER DLLGDGWVFG KATLVCLISD NNKYAASSYL TEA	TCSGDSIPSK FSGSNSGNTA GGTKLTVLGQ FYPGAVTVAW SLTPEQWKSH	YAHWYQQKPG TLTISGTQAE PKAAPSVTLF KADSSPVKAG RSYSCQVTHE
Ab1, 重链-VH1B(SEQ. ID NO: 4)	QVQLVQSGAE PGQGLEWMGW MELSRLRSED GPSVFPLAPS ALTSGVHTFP VNHKPSNTKV	VKKPGASVKV INPYTGDTNY TAVYYCAREK SKSTSGGTAA AVLQSSGLYS DKKVEPKSEF	SCKASGYTFT AQKFQGRVTM VYMDIWQGT LGCLVKDYFP LSSVVTVPSS DYKDDDDKGA	SYHMHWRQA TRDTSISTAY LVTVSSASTK EPVTVSWNSG SLGTQTYICN PHHHHHH
Ab2, 轻链- $\lambda$ 3(SEQ. ID NO: 5)	DIELTQPPSV QAPVLVIYRN DEADYYCQTY PPSSEELQAN VETTTPSKQS GSTVEKTVAP	SVSPGQTASI KQRPSGIPER DWMYSSRVFG KATLVCLISD NNKYAASSYL TEA	TCSGDSLGSY FSGSNSGNTA GGTKLTVLGQ FYPGAVTVAW SLTPEQWKSH	YVHWYQQKPG TLTISGTQAE PKAAPSVTLF KADSSPVKAG RSYSCQVTHE
Ab1, 重链-VH1B(SEQ. ID NO: 6)	EVQLVESGGG PGKLEWVGR LYLQMNLSKT SASTKGPSVF SWNSGALTSG TYICNVNHKP HH	LVKPGGSLRL IKSKTDGGIT EDTAVYYCAR PLAPSSKSTS VHTFPAVLQS SNTKVDKKVE	SCAASGFTFS EYAAPVKGRF AIYYLEAFDV GGTAALGCLV SGLYSLSSVV PKSEFDYKDD	DYGIHWVRQA TISRDDSKNT WGQGLTIVTS KDYFPEPVTV TVPSSSLGTQ DDKGAPHHH

[0088] 此外,这两种抗体中度地提高LRP6和膜Myc-FZD8的水平。这些结果进一步显示,ZNRF3通过降低Frizzled和LRP6的膜水平来抑制Wnt信号转导。

[0089] 我们的结果显示,这两种抗体模拟上文通过siRNA敲除和通过表达ZNRF3的显性失活突变显示的ZNRF3的抑制。这些抗-ZNRF3抗体是拮抗抗体,因为它们的活性类似于ZNRF3siRNA。因此,这些抗-ZNRF3抗体是增强Wnt信号转导的拮抗抗体。

[0090] 此外,本发明人按照Morphosys提供的方案通过亲和力成熟选择了Ab2的Fab变体。参见可在[http://issuu.com/abdserotec/docs/hucal-manual\\_2nd-ed\\_highres](http://issuu.com/abdserotec/docs/hucal-manual_2nd-ed_highres)看到的 **HuCAL®** Antibodies-Technical Manual (第2版,2010)。简言之,本发明人用限制性核酸内切酶消化编码轻链Ab2的质粒,去除编码LCDR3的序列,加入以多核苷酸形式存在的LCDR3盒,所述多核苷酸具有可编码LCDR3区的长度的随机序列,然后重新连接质粒和LCDR3盒以形成可表达Ab2的轻链的变体形式的表达文库。使用此文库,选择了结合ZNRF3的Ab2的变异Fab(变异轻链和非变异重链)。

[0091] 同样,本发明人用限制性核酸内切酶消化重链Ab2,去除编码HCDR2的序列,加入以多核苷酸形式存在的HCDR2盒,所述多核苷酸具有可编码HCDR2区的长度的随机序列,然后重新连接质粒和HCDR2盒以形成可表达Ab2的重链的变体形式的表达文库。对于此文库,所

使用的质粒具有HCDR1盒,其不同于未改变的Ab2重链的HCDR1。使用此文库,选择了结合ZNR3的Ab2的变异Fab(变异轻链和非变异重链)。

[0092] 对于轻链的亲合力成熟,修饰LCDR3结构域。因此,Ab2的轻链的LCDR3的序列(SEQ ID NO:39)不同于Ab2的变体的轻链的LCDR3序列,所述Ab2的变体的轻链的LCDR3序列包括1F2(3\_1B1)(SEQ ID NO:93);2A6(3\_4A10)(SEQ ID NO:99);2B7(3\_4G1)(SEQ ID NO:105);2B8(4\_3E10)(SEQ ID NO:111);2C9(4\_4E3)(SEQ ID NO:117);2F5(3\_4A4)(SEQ ID NO:123)和2G6(3\_4D9)(SEQ ID NO:129)。

[0093] 对于重链的亲合力成熟,修饰HCDR2结构域。因此,Ab2的重链的HCDR2的序列(SEQ ID NO:41)不同于Ab2的变体的重链的HCDR3的序列,所述Ab2的变体的重链的HCDR3的序列包括2C1(2\_3A5)(SEQ ID NO:137);2D1(2\_3A7)(SEQ ID NO:143)和2H2(2\_3H8)(SEQ ID NO:149)。

[0094] 此外,Ab2的重链的HCDR1的序列(SEQ ID NO:40)不同于Ab2的变体的重链的HCDR3序列,其中该重链修饰自Ab2的重链,所述HCDR3的序列包括SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:142和SEQ ID NO:148。

[0095] Ab2的变体的重链中的一些包含允许该重链以在某种程度上类似于二聚的IgG蛋白的四级蛋白质结构的方式二聚化的肽。参见在[http://issuu.com/abdserotec/docs/hucal-manual\\_2nd-ed\\_-highres](http://issuu.com/abdserotec/docs/hucal-manual_2nd-ed_-highres)上可见的 **HuCAL®** Antibodies-Technical Manual(第2版,2010)。还参见在[www.abdserotec.com/HuCAL](http://www.abdserotec.com/HuCAL)上从Morphosys部门AbD Serotec获得的小册子“Choosing the Best **HuCAL®** Antibody Format”。因此,含有该肽的重链在本文中称为“重链-二聚体”。

[0096] 在ELISA测定中,Ab2的变体与亲本Ab2一样好地或比亲本Ab2更好地特异地结合未纯化的裂解物中的ZNR3。Ab2的轻链和重链的氨基酸序列在表5中显示。

表 5 Ab2的Fab变体的轻链和重链的氨基酸序列	
Ab2, 轻链-λ3, 变体 1F2(3_1B1)(SEQ. ID NO: 67)	DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYCQTF DSQAVTNVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TEA
Ab2, 重链-VH1B, 变体 1F2(3_1B1)(SEQ. ID NO: 68)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA PGKGLEWVGR IKSKT DGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFDYKD DDDKGAPHHHH HH
Ab2, 轻链-λ3, 变体 2A6(3_4A10)(SEQ. ID NO: 69)	DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYCQTF DSQAVTNVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TEA
Ab2, 重链二聚体, 变体 2A6(3_4A10)(SEQ ID NO:70)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA PGKGLEWVGR IKSKT DGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTLLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPKPST PPGSSGELEE LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL

[0097]

表 5 Ab2的Fab变体的轻链和重链的氨基酸序列	
	ISEEDLNDAP HHHHHH
Ab2, 轻链-λ3, 变体 2B7(3_4G1)(SEQ. ID NO: 71)	DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DDADYYCATY DSSSWWNVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TEA
Ab2, 重链二聚体, 变体 2B7(3_4G1)(SEQ ID NO: 72)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA PGKGLEWVGR IKSKTDGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTSLTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPKPST PPGSSGELEE LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL ISEEDLNDAP HHHHHH
[0098] Ab2, 轻链-λ3, 变体 2B8(4_3E10)(SEQ. ID NO: 73)	DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYCQTW DWWARHWVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TEA
Ab2, 重链二聚体, 变体 2B8(4_3E10)(SEQ ID NO:74)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA PGKGLEWVGR IKSKTDGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGTSLTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPKPST PPGSSGELEE LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL ISEEDLNDAP HHHHHH
Ab2, 轻链-λ3, 变体 2C9(4_4E3)(SEQ. ID NO: 75)	DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYCASY TSPINVFVGG TKLTVLGQPK AAPSVTLFPP SSEELQANKA TLVCLISDFY PGAVTVAWKA DSSPVKAGVE TTTPSKQSNN KYAASSYLSL TPEQWKSHRS YSCQVTHEGS TVEKTVAPTE A

表 5 Ab2的Fab变体的轻链和重链的氨基酸序列			
Ab2, 重链二聚体, 变体 2C9(4_4E3)(SEQ ID NO:76)	EVQLVESGGG PGKGLEWVGR LYLQMNSLKT SASTKGPSVF SWNSGALTSG TYICNVNHKP LLKHLKELLK ISEEDLNDAP	LVKPGGSLRL IKSKTDGGIT EDTAVYYCAR PLAPSSKSTS VHTFPAVLQS SNTKVDKKVE GPRKGELEEL HHHHHH	SCAASGFTFS EYAAPVKGRF AIYYLEAFDV GGTAALGCLV SGLYSLSSVV PKSEFPKPST LKHLKELLKG GSGGAPEQKL
Ab2, 轻链-λ3, 变体 2F5(3_4A4)(SEQ. ID NO: 77)	DIELTQPPSV QAPVLVIYRN DDADYYCAVW PPSSEELQAN VETTTPSKQS GSTVEKTVAP	SVSPGQTASI KQRPSGIPER DDEPHHDVFG KATLVCLISD NNKYAASSYL TEA	TCSGDSLGSY FSGSNSGNTA GGTKLTVLGQ FYPGAVTVAW SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE
Ab2, 重链二聚体, 变体 2F5(3_4A4)(SEQ ID NO:78)	EVQLVESGGG PGKGLEWVGR LYLQMNSLKT SASTKGPSVF SWNSGALTSG TYICNVNHKP LLKHLKELLK ISEEDLNDAP	LVKPGGSLRL IKSKTDGGIT EDTAVYYCAR PLAPSSKSTS VHTFPAVLQS SNTKVDKKVE GPRKGELEEL HHHHHH	SCAASGFTFS EYAAPVKGRF AIYYLEAFDV GGTAALGCLV SGLYSLSSVV PKSEFPKPST LKHLKELLKG GSGGAPEQKL
Ab2, 轻链-λ3, 变体 2G6(3_4D9)(SEQ. ID NO: 79)	DIELTQPPSV QAPVLVIYRN DDADYYCQTY PPSSEELQAN VETTTPSKQS GSTVEKTVAP	SVSPGQTASI KQRPSGIPER DSLKFSRVFG KATLVCLISD NNKYAASSYL TEA	TCSGDSLGSY FSGSNSGNTA GGTKLTVLGQ FYPGAVTVAW SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE
Ab2, 重链二聚体, 变体 2G6(3_4D9)(SEQ ID NO:80)	EVQLVESGGG PGKGLEWVGR LYLQMNSLKT SASTKGPSVF SWNSGALTSG TYICNVNHKP LLKHLKELLK ISEEDLNDAP	LVKPGGSLRL IKSKTDGGIT EDTAVYYCAR PLAPSSKSTS VHTFPAVLQS SNTKVDKKVE GPRKGELEEL HHHHHH	SCAASGFTFS EYAAPVKGRF AIYYLEAFDV GGTAALGCLV SGLYSLSSVV PKSEFPKPST LKHLKELLKG GSGGAPEQKL
Ab2, 轻链-λ3, 变体	DIELTQPPSV	SVSPGQTASI	TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG

[0099]

表 5 Ab2的Fab变体的轻链和重链的氨基酸序列	
2C1(2_3A5)(SEQ ID NO: 81)	QAPV LVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYCQTY DWMYSSRVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TEA
Ab2, 重链二聚体, 变体 2C1(2_3A5)(SEQ. ID NO: 82)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS NAWMSWVRQA PGKGLEWVGH IKSSNMGGAA QYAASVKGRF TISRDDS KNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGT LVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEF PKPST PPGSSGELEE LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL ISEEDLNDA P HHHHHH
Ab2, 轻链-λ3, 变体 2D1(2_3A7)(SEQ ID NO:83)	DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG QAPV LVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYCQTY DWMYSSRVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TEA
Ab2, 重链二聚体, 变体 2D1(2_3A7) (SEQ. ID NO: 84)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS NAWMSWVRQA PGKGLEWVGF TKNEVGGYTT EYAASVKGRF TISRDDS KNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGT LVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEF PKPST PPGSSGELEE LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL ISEEDLNDA P HHHHHH
Ab2, 轻链-λ3, 变体 2H2(2_3H8)(SEQ ID NO: 85)	DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG QAPV LVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYCQTY DWMYSSRVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TEA
Ab2, 重链二聚体, 变体 2H2(2_3H8) (SEQ. ID NO: 86)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS NAWMSWVRQA PGKGLEWVGR IKAFKEGYIT QYAASVKGRF TISRDDS KNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGT LVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV

[0100]

<p>表 5</p> <p>Ab2的Fab变体的轻链和重链的氨基酸序列</p>	
[0101]	<p>SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ</p> <p>TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSEFPKPST PPGSSGELEE</p> <p>LLKHLKELLK GPRKGELEEL LKHLKELLKG GSGGAPEQKL</p> <p>ISEEDLNDAP HHHHHH</p>

[0102] 本发明人将抗-ZNRF3Fab (Ab1和Ab2) 转化为人IgG LALA形式。用来自在19Blackstone Street, Cambridge, MA 02139具有场所的GeneWiz的市售服务进行该转化。

[0103] 图11的结果显示,如通过**SuperTopFlash<sup>®</sup>** (STF) 报道基因测定所示,得到的IgG (IgG-Ab1和IgG-Ab2) 保持ZNRF3拮抗剂活性。

[0104] 表6显示IgG-Ab1 (h\_κ\_ZNRF3\_Ab1\_轻链和h\_IgG1f\_LALA\_ZNRF3\_Ab1\_重链) 和IgG-Ab2 (h\_κ\_ZNRF3\_Ab2\_轻链和h\_IgG1f\_LALA\_ZNRF3\_Ab2\_重链) 的人轻链和人重链的序列。

<p>表 6</p> <p>人 IgG1 LALA 形式的抗 ZNRF3 抗体的氨基酸序列</p>					
[0105]	<table border="1"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>h_κ_ZNRF3_Ab1_轻链 )</p> <p>(SEQ. ID NO: 87)</p> <p>可变域来自氨基酸 1-110。</p> <p>恒定域来自氨基酸 111-214。</p> </td> <td> <p><u>DIELTQPPSV</u> <u>SVSPGQTASI</u> <u>TCSGDSIPSK</u> <u>YAHWYQQKPG</u></p> <p><u>QAPVLVIYGK</u> <u>SHRPSGIPER</u> <u>FSGSNSGNTA</u> <u>TLTISGTQAE</u></p> <p><u>DEADYYCAAW</u> <u>DLLGDGWVFG</u> <u>GGTKLTVLGQ</u> <u>PKAAPSVTLF</u></p> <p><u>PPSSEELQAN</u> <u>KATLVCLISD</u> <u>FYPGAVTVAW</u> <u>KGDSSPVKAG</u></p> <p><u>VETTTPSKQS</u> <u>NNKYAASSYL</u> <u>SLTPEQWKSH</u> <u>RSYSQVTHE</u></p> <p><u>GSTVEKTVAP</u> <u>TECS</u></p> </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab1_重链 )</p> <p>(SEQ. ID NO: 88)</p> <p>可变域来自氨基酸 1-116。</p> <p>3 个恒定域来自氨基酸 117-229、230-339 和 340-446。</p> </td> <td> <p><u>QVQLVQSGAE</u> <u>VKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFT</u> <u>SYMHHWVRQA</u></p> <p><u>PGQGLEWMGW</u> <u>INPYTGDTNY</u> <u>AQKFQGRVTM</u> <u>TRDTSISTAY</u></p> <p><u>MELSRLRSED</u> <u>TAVYYCAREK</u> <u>VYMDIWGGT</u> <u>LVTVSSASTK</u></p> <p><u>GPSVFPLAPS</u> <u>SKSTSGGTAA</u> <u>LGCLVKDYFP</u> <u>EPVTVSWNSG</u></p> <p><u>ALTSGVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYS</u> <u>LSSVTVPSS</u> <u>SLGTQTYICN</u></p> <p><u>VNHKPSNTKV</u> <u>DKRVEPKSCD</u> <u>KTHTCPPCPA</u> <u>PEAAGGPSVF</u></p> <p><u>LFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDP</u> <u>EVKFNWYVDG</u></p> <p><u>VEVHNAKTKP</u> <u>REEQYNSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKC</u></p> <p><u>KVSNKALPAP</u> <u>IEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTL</u> <u>PPSREEMTKN</u></p> <p><u>QVSLTCLVKG</u> <u>FYPSDIAVEW</u> <u>ESNGQPENNY</u> <u>KTPPVLDSD</u></p> </td> </tr> </table>	<p>h_κ_ZNRF3_Ab1_轻链 )</p> <p>(SEQ. ID NO: 87)</p> <p>可变域来自氨基酸 1-110。</p> <p>恒定域来自氨基酸 111-214。</p>	<p><u>DIELTQPPSV</u> <u>SVSPGQTASI</u> <u>TCSGDSIPSK</u> <u>YAHWYQQKPG</u></p> <p><u>QAPVLVIYGK</u> <u>SHRPSGIPER</u> <u>FSGSNSGNTA</u> <u>TLTISGTQAE</u></p> <p><u>DEADYYCAAW</u> <u>DLLGDGWVFG</u> <u>GGTKLTVLGQ</u> <u>PKAAPSVTLF</u></p> <p><u>PPSSEELQAN</u> <u>KATLVCLISD</u> <u>FYPGAVTVAW</u> <u>KGDSSPVKAG</u></p> <p><u>VETTTPSKQS</u> <u>NNKYAASSYL</u> <u>SLTPEQWKSH</u> <u>RSYSQVTHE</u></p> <p><u>GSTVEKTVAP</u> <u>TECS</u></p>	<p>h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab1_重链 )</p> <p>(SEQ. ID NO: 88)</p> <p>可变域来自氨基酸 1-116。</p> <p>3 个恒定域来自氨基酸 117-229、230-339 和 340-446。</p>	<p><u>QVQLVQSGAE</u> <u>VKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFT</u> <u>SYMHHWVRQA</u></p> <p><u>PGQGLEWMGW</u> <u>INPYTGDTNY</u> <u>AQKFQGRVTM</u> <u>TRDTSISTAY</u></p> <p><u>MELSRLRSED</u> <u>TAVYYCAREK</u> <u>VYMDIWGGT</u> <u>LVTVSSASTK</u></p> <p><u>GPSVFPLAPS</u> <u>SKSTSGGTAA</u> <u>LGCLVKDYFP</u> <u>EPVTVSWNSG</u></p> <p><u>ALTSGVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYS</u> <u>LSSVTVPSS</u> <u>SLGTQTYICN</u></p> <p><u>VNHKPSNTKV</u> <u>DKRVEPKSCD</u> <u>KTHTCPPCPA</u> <u>PEAAGGPSVF</u></p> <p><u>LFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDP</u> <u>EVKFNWYVDG</u></p> <p><u>VEVHNAKTKP</u> <u>REEQYNSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKC</u></p> <p><u>KVSNKALPAP</u> <u>IEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTL</u> <u>PPSREEMTKN</u></p> <p><u>QVSLTCLVKG</u> <u>FYPSDIAVEW</u> <u>ESNGQPENNY</u> <u>KTPPVLDSD</u></p>
<p>h_κ_ZNRF3_Ab1_轻链 )</p> <p>(SEQ. ID NO: 87)</p> <p>可变域来自氨基酸 1-110。</p> <p>恒定域来自氨基酸 111-214。</p>	<p><u>DIELTQPPSV</u> <u>SVSPGQTASI</u> <u>TCSGDSIPSK</u> <u>YAHWYQQKPG</u></p> <p><u>QAPVLVIYGK</u> <u>SHRPSGIPER</u> <u>FSGSNSGNTA</u> <u>TLTISGTQAE</u></p> <p><u>DEADYYCAAW</u> <u>DLLGDGWVFG</u> <u>GGTKLTVLGQ</u> <u>PKAAPSVTLF</u></p> <p><u>PPSSEELQAN</u> <u>KATLVCLISD</u> <u>FYPGAVTVAW</u> <u>KGDSSPVKAG</u></p> <p><u>VETTTPSKQS</u> <u>NNKYAASSYL</u> <u>SLTPEQWKSH</u> <u>RSYSQVTHE</u></p> <p><u>GSTVEKTVAP</u> <u>TECS</u></p>				
<p>h_IgG1f_LALA_ZNRF3_Ab1_重链 )</p> <p>(SEQ. ID NO: 88)</p> <p>可变域来自氨基酸 1-116。</p> <p>3 个恒定域来自氨基酸 117-229、230-339 和 340-446。</p>	<p><u>QVQLVQSGAE</u> <u>VKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFT</u> <u>SYMHHWVRQA</u></p> <p><u>PGQGLEWMGW</u> <u>INPYTGDTNY</u> <u>AQKFQGRVTM</u> <u>TRDTSISTAY</u></p> <p><u>MELSRLRSED</u> <u>TAVYYCAREK</u> <u>VYMDIWGGT</u> <u>LVTVSSASTK</u></p> <p><u>GPSVFPLAPS</u> <u>SKSTSGGTAA</u> <u>LGCLVKDYFP</u> <u>EPVTVSWNSG</u></p> <p><u>ALTSGVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYS</u> <u>LSSVTVPSS</u> <u>SLGTQTYICN</u></p> <p><u>VNHKPSNTKV</u> <u>DKRVEPKSCD</u> <u>KTHTCPPCPA</u> <u>PEAAGGPSVF</u></p> <p><u>LFPPKPKDTL</u> <u>MISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDP</u> <u>EVKFNWYVDG</u></p> <p><u>VEVHNAKTKP</u> <u>REEQYNSTYR</u> <u>VVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKC</u></p> <p><u>KVSNKALPAP</u> <u>IEKTISKAKG</u> <u>QPREPQVYTL</u> <u>PPSREEMTKN</u></p> <p><u>QVSLTCLVKG</u> <u>FYPSDIAVEW</u> <u>ESNGQPENNY</u> <u>KTPPVLDSD</u></p>				

	GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
h <sub>κ</sub> _ZNF3_Ab2_轻链) (SEQ. ID NO: 89) 可变域来自氨基酸 1-110。 恒定域来自氨基酸 111-214。	DIELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDSLGSY YVHWYQQKPG QAPVLVIYRN KQRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYQCQTY DWMYSSRVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KGDSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS
[0106] h_IgG1f_LALA_ZNF3_Ab2_重链)(SEQ. ID NO: 90) 可变域来自氨基酸 1-121。 3 个恒定域来自氨基酸 122-234、235-344 和 345-451。	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYGIHWVRQA PGKGLEWVGR IKSKT DGGIT EYAAPVKGRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR AIYYLEAFDV WGQGT LVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

[0107] 抗体产生方法。多种类型的抗ZNF3或RNF43的抗体可以通过下文所述的产生具有特异性结合的抗体的已知方法来产生。

[0108] 定义。除非另有说明，本文中所用的所有技术和科学术语具有与免疫学领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0109] 本文所用的术语“抗体”包括全抗体及其任意抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。天然存在的抗体通常具有通过二硫键相互连接的至少两个重链(H)和两个轻链(L)。每一重链由重链可变区(在本文中简称为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域,CH1、CH2和CH3组成。每一轻链由轻链可变区(在本文中简称为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域,CL组成。VH和VL区可以进一步细分成高变区(称为互补决定区(CDR)),其散布于更保守的区域(称为构架区(FR))中。每一VH和VL由三个CDR和四个FR组成。

[0110] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”指完整抗体的一个或多个片段,其保持特异地结合给定抗原(例如ZNF3或RNF43的胞外区)的能力。抗体的抗原结合功能可以由完整抗体的片段执行。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”之内的结合片段的实例包括:由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段、单价片段;F(ab)<sub>2</sub>片段、包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;由VH结构域或VL结构域组成的单结构域抗体(dAb)片段;以及分离的互补决定区(CDR)。Ward等,Nature 341:544-546(1989)。

[0111] Fv片段的两个结构域VL和VH可以通过使得能够将它们制备为单条蛋白质链的人工肽接头来用重组方法连接,其中VL和VH配对形成单价抗体及其片段,称为单链Fv(scFv)。

见例如Bird等, *Science* 242:423-426 (1988) 和Huston等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883 (1988)。这类单链抗体包括抗体的一个或多个“抗原结合部分”。用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段, 并以与完整抗体相同的方式针对用途筛选该片段。

[0112] 还可以将抗体片段掺入到单结构域抗体、大型抗体、小型抗体、胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和双-scFv中。参见, 例如Hollinger和Hudson, *Nature Biotechnology* 23,9,1126-1136 (2005)。还可以将抗体的抗原结合部分片段移植到基于多肽, 例如III型纤连蛋白(Fn3)的支架中。参见美国专利号6,703,199, 其描述了纤连蛋白多肽单抗体。

[0113] 还可以将抗原结合部分掺入到包含一对串联Fv区段(VH-CH1-VH-CH1)的单链抗体及其片段中, 其与互补轻链多肽一起形成了一对抗原结合区。Zapata等, *Protein Eng.* 8 (10):1057-1062 (1995); 和美国专利号5,641,870。

[0114] 本文所用的术语“结合特异性”指单个抗体结合部位仅与一个抗原决定簇反应的能力。抗体的结合部位定位在抗体或其片段的Fab部分中, 且构建自重链和轻链的高变区。因此, 本发明提供一系列抗体结构, 抗体通过所述抗体结构“特异地结合”ZNF3的胞外域; 并且本发明提供一系列抗体结构, 抗体通过所述抗体结构“特异地结合”RNF43的胞外域。

[0115] 术语“嵌合抗体”意指这样的抗体或其片段, 其中(a)改变、替换或者交换了恒定区或其部分, 以使抗原结合位点(可变区)与不同或者改变种类、效应子功能和/或物种的恒定区或者完全不同的分子例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等连接, 所述完全不同的分子给嵌合抗体赋予了新的性质; 或(b)改变、替换或者交换了可变区或其部分, 并且所述可变区具有不同的或者改变的抗原特异性。例如, 可以通过用来自人免疫球蛋白的恒定区替换鼠抗体的恒定区来修饰鼠抗体。由于用人恒定区进行了替换, 所以嵌合抗体可以保留其识别抗原的特异性, 而与最初的鼠抗体相比, 在人类中还具有降低的抗原性。

[0116] 本文所用的术语“互补决定区”和“CDR”指抗体可变区内赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸序列。通常, 每个轻链可变区中存在三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3), 每个重链可变区中存在三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)。

[0117] 可以用许多公知的方案中的任一种来容易地测定给定CDR的精确的氨基酸序列边界, 所述方案包括Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版(Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) (“Kabat”编号方法) 或Al-Lazikani等, *J. Mol. Biol.* 273,927-948 (1997) (“Chothia”编号方法) 描述的那些方案。

[0118] 作为如何进行给定CDR的氨基酸序列边界的测定的实例, 表7提供了Ab1的轻链和重链(SEQ ID NOS:3和4)以及Ab2的轻链和重链(SEQ ID NOS:5和6)的CDR。本发明人用类似于由University College of London的Dr. Andrew CR Martin's Group在www.bioinf.org.uk/abs/上提供的方法的比对法进行了Ab1和Ab2的轻链和重链的CDR的Kabat序列的最初测定(SEQ ID NOS:31-42, “最初”)。用来进行CDR的Kabat序列的最初测定的其他信息和比对法由MRC Centre for Protein Engineering在http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/上和THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION **SYSTEM**®在http://www.imgt.org/上提供。

[0119] 表7还显示通过Kabat编号法进行的Ab1和Ab2的轻链和重链的CDR的更新的测定

(SEQ ID NOS:43-54, “Kabat”)。表7进一步显示通过Chothia编号法进行的Ab1和Ab2的轻链和重链的CDR的更新的测定(SEQ ID NOS:55-66, “Chothia”)。

[0120]

表 7					
Ab1 和 Ab2 的 CDR 的氨基酸序列					
SEQ ID NO.	抗体链	氨基酸	CDR	序列	测定的方法
31	Ab1, LC	23-33	LCDR1	SGDSIPSKYAH	最初
32	Ab1, LC	45-55	LCDR2	LVIYGKSHRPS	最初
33	Ab1, LC	88-97	LCDR3	AAWDLLGDGW	最初
34	Ab1, HC	27-35	HCDR1	YTFTSYHMH	最初
35	Ab1, HC	50-67	HCDR2	WINPYTGDTNYAQKFQGR	最初
36	Ab1, HC	100-106	HCDR3	KVYMDIW	最初
37	Ab2 LC	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
38	Ab2 LC	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
39	Ab2 LC	88-97	LCDR3	QTYDWMYSSR	最初
40	Ab2 HC	27-35	HCDR1	FTFSDYGIH	最初
41	Ab2 HC	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	最初
42	Ab2 HC	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
43	Ab1, LC	23-33	LCDR1	SGDSIPSKYAH	Kabat
44	Ab1, LC	49-55	LCDR2	GKSHRPS	Kabat
45	Ab1, LC	88-98	LCDR3	AAWDLLGDGWV	Kabat
46	Ab1, HC	31-35	HCDR1	SYHMH	Kabat
47	Ab1, HC	50-66	HCDR2	WINPYTGDTNYAQKFQG	Kabat
48	Ab1, HC	99-105	HCDR3	EKVYMDI	Kabat
49	Ab2 LC	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	Kabat

[0121]

表 7					
Ab1 和 Ab2 的 CDR 的氨基酸序列					
SEQ ID NO.	抗体链	氨基酸	CDR	序列	测定的方法
50	Ab2 LC	49-55	LCDR2	RNKQRPS	Kabat
51	Ab2 LC	88-98	LCDR3	QTYDWMYSSRV	Kabat
52	Ab2 HC	31-35	HCDR1	DYGIH	Kabat
53	Ab2 HC	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	Kabat
54	Ab2 HC	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	Kabat
55	Ab1, LC	25-31	LCDR1	DSIPSKY	Chothia
56	Ab1, LC	49-51	LCDR2	GKS	Chothia
57	Ab1, LC	90-97	LCDR3	WDL LGDW	Chothia
58	Ab1, HC	26-32	HCDR1	GYTFTSY	Chothia
59	Ab1, HC	52-57	HCDR2	NPYTDG	Chothia
60	Ab1, HC	99-105	HCDR3	EKVYMDI	Chothia
61	Ab2 LC	25-31	LCDR1	DSLGSYY	Chothia
62	Ab2 LC	49-51	LCDR2	RNK	Chothia
63	Ab2 LC	90-97	LCDR3	YDWMYSSR	Chothia
64	Ab2 HC	26-32	HCDR1	GFTFSDY	Chothia
65	Ab2 HC	52-59	HCDR2	KSKTDGGI	Chothia
66	Ab2 HC	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	Chothia
LC=轻链-λ3					
HC=重链-VH1B					

[0122] 此外,用上文所述用于确定Kabat序列的“最初”测定法计算了Ab2的Fab变体(见表5)的CDR序列。表8显示CDR序列及在轻链或重链中的氨基酸位置。

表 8

Ab2 变体的 CDR 的氨基酸序列

SEQ ID NO.	抗体链	氨基酸	CDR	序列	测定的方法
91	Ab2, LC, 1F2	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
92	Ab2, LC, 1F2	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
93	Ab2, LC, 1F2	88-97	LCDR3	QTFDSQAVTN	最初
94	Ab2, HC, 1F2	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	最初
95	Ab2, HC, 1F2	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	最初
96	Ab2, HC, 1F2	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
97	Ab2, LC, 2A6	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
98	Ab2, LC, 2A6	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
99	Ab2, LC, 2A6	88-97	LCDR3	QTFDSQAVTN	最初
100	Ab2, HC, 2A6	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	最初
[0123] 101	Ab2, HC, 2A6	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	最初
102	Ab2, HC, 2A6	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
103	Ab2, LC, 2B7	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
104	Ab2, LC, 2B7	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
105	Ab2, LC, 2B7	88-97	LCDR3	ATYDSSSWWN	最初
106	Ab2, HC, 2B7	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	最初
107	Ab2, HC, 2B7	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	最初
108	Ab2, HC, 2B7	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
109	Ab2, LC, 2B8	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
110	Ab2, LC, 2B8	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
111	Ab2, LC, 2B8	88-97	LCDR3	QTWDWWARHW	最初
112	Ab2, HC, 2B8	27-35	HCDR1	FTFSDYGIH	最初
113	Ab2, HC, 2B8	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	最初
114	Ab2, HC, 2B8	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初

表 8

Ab2 变体的 CDR 的氨基酸序列

SEQ ID NO.	抗体链	氨基酸	CDR	序列	测定的方法
115	Ab2, LC, 2C9	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
116	Ab2, LC, 2C9	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
117	Ab2, LC, 2C9	88-95	LCDR3	ASYTSPIN	最初
118	Ab2, HC, 2C9	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	最初
119	Ab2, HC, 2C9	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	最初
120	Ab2, HC, 2C9	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
121	Ab2, LC, 2F5	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
122	Ab2, LC, 2F5	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
123	Ab2, LC, 2F5	88-97	LCDR3	AVWDDEPHHD	最初
124	Ab2, HC, 2F5	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	最初
[0124] 125	Ab2, HC, 2F5	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	最初
126	Ab2, HC, 2F5	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
127	Ab2, LC, 2G6	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
128	Ab2, LC, 2G6	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
129	Ab2, LC, 2G6	88-97	LCDR3	QTYDSLKFSR	最初
130	Ab2, HC, 2G6	26-35	HCDR1	FTFSDYGIH	最初
131	Ab2, HC, 2G6	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPVKG	最初
132	Ab2, HC, 2G6	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
133	Ab2, LC, 2C1	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
134	Ab2, LC, 2C1	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
135	Ab2, LC, 2C1	88-97	LCDR3	QTYDWMYSSR	最初
136	Ab2, HC, 2C1	27-35	HCDR1	FTFSNAWMS	最初
137	Ab2, HC, 2C1	50-68	HCDR2	HIKSSNMGGAAQYAASVKG	最初
138	Ab2, HC, 2C1	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初

[0125]

表 8					
Ab2 变体的 CDR 的氨基酸序列					
SEQ ID NO.	抗体链	氨基酸	CDR	序列	测定的方法
139	Ab2, LC, 2D1	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
140	Ab2, LC, 2D1	45-55	LCDR2	LVIYR NKQRPS	最初
141	Ab2, LC, 2D1	88-97	LCDR3	QTYDWMYSSR	最初
142	Ab2, HC, 2D1	27-35	HCDR1	FTFSNAWMS	最初
143	Ab2, HC, 2D1	50-68	HCDR2	FTKNEVGGYTTEYAASVKG	最初
144	Ab2, HC, 2D1	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
145	Ab2, LC, 2H2	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
146	Ab2, LC, 2H2	45-55	LCDR2	LVIYR NKQRPS	最初
147	Ab2, LC, 2H2	88-97	LCDR3	QTYDWMYSSR	最初
148	Ab2, HC, 2H2	27-35	HCDR1	FTFSNAWMS	最初
149	Ab2, HC, 2H2	50-68	HCDR2	RIKAFKEGYITQYAASVKG	最初
150	Ab2, HC, 2H2	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
LC=轻链-λ3					
HC=重链-VH1B 或重链二聚体					

[0126] 此外,用上文所述用于确定Kabat序列的“最初”测定法计算了IgG形式的抗-ZNRF3抗体的CDR区。表9显示序列及在轻链或重链中的氨基酸位置。

[0127]

表 9					
IgG 形式的抗-ZNRF3 抗体的 CDR 的氨基酸序列					
SEQ ID NO.	抗体链	氨基酸	CDR	序列	测定的方法
151	h_κ_ZNRF3_ Ab1_轻链	23-33	LCDR1	SGDSIPSKYAH	最初
152	h_κ_ZNRF3_	45-55	LCDR2	LVIYGKSHRPS	最初

表 9

IgG 形式的抗-ZNRF3 抗体的 CDR 的氨基酸序列

SEQ ID NO.	抗体链	氨基酸	CDR	序列	测定的方法
	Ab1_轻链				
153	h_κ_ZNRF3_ Ab1_轻链	87-96	LCDR3	AAWDLLGDG	最初
154	h_IgG1f_LA LA_ZNRF3_ Ab1_重链	27-35	HCDR1	TFTSYHMH	最初
155	h_IgG1f_LA LA_ZNRF3_ Ab1_重链	50-66	HCDR2	WINPYTGDTNYAQKFQ G	最初
156	h_IgG1f_LA LA_ZNRF3_ Ab1_重链	99-105	HCDR3	EKVYMDI	最初
157	h_κ_ZNRF3_ Ab2_轻链	23-33	LCDR1	SGDSLGSYYVH	最初
158	h_κ_ZNRF3_ Ab2_轻链	45-55	LCDR2	LVIYRNKQRPS	最初
159	h_κ_ZNRF3_ Ab2_轻链	87-96	LCDR3	QTYDWMYSSR	最初
160	h_IgG1f_LA LA_ZNRF3_ Ab2_重链	27-35	HCDR1	FTFSDYGIH	最初
161	h_IgG1f_LA LA_ZNRF3_ Ab2_重链	50-68	HCDR2	RIKSKTDGGITEYAAPV KG	最初

[0128]

表 9					
IgG 形式的抗-ZNRF3 抗体的 CDR 的氨基酸序列					
SEQ ID NO.	抗体链	氨基酸	CDR	序列	测定的方法
[0129] 162	h_IgG1f_LA LA_ZNRF3_ Ab2_重链	101-110	HCDR3	AIYYLEAFDV	最初
LC=人 κ					
HC=人 IgG1f LALA					

[0130] 术语“保守修饰的变体”应用于氨基酸和核酸序列二者。关于特定的核酸序列，保守修饰的变体指编码相同的或者基本上相同的氨基酸序列的那些核酸，或者当核酸并不编码氨基酸序列时，指基本上相同的序列。对于多肽序列，“保守修饰的变体”包括对多肽序列的个别取代、缺失或添加，其导致用在化学上相似的氨基酸取代氨基酸。提供在功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域熟知的。此类保守修饰的变体有且不排除多态变体、种间同源物，以及本发明的等位基因。以下八组含有相互保守取代的氨基酸：1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K)；5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；以及8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。参见，例如，Creighton, Proteins (1984)。在一些实施方案中，术语“保守序列修饰”用于指没有显著影响或者改变含有氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。

[0131] 术语“交叉阻断(cross-block)”和“交叉阻断的(cross-blocked)”在本文中可互换使用，指的是在标准竞争结合测定法中，抗体或其他结合剂干扰其他配体(如R-反应蛋白)结合的能力。可以使用标准竞争结合测定法，测定抗体或其他结合剂干扰另一配体结合的能力或程度，并由此确定是否可将其称为根据本发明的交叉阻断。一种合适的测定法涉及Biacore技术的使用(例如，通过使用BIAcore 3000<sup>®</sup>仪器(Biacore, Uppsala, 瑞典))，其使用表面振子共振技术测量相互作用的程度。用于测量交叉阻断的另一测定法使用基于ELISA的方法。

[0132] 术语“表位”意指能够与抗体特异地结合的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或糖侧链)组成，且通常具有特定的三维结构特征，以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于，与前者而不是后者的结合在变性溶剂的存在下丧失。对于本发明的抗体，表位可以是ZNRF3或RNF43的胞外域或可以在ZNRF3或RNF43的胞外域上。在一个实施方案中，该表位是脊椎动物ZNRF3或RNF43(例如斑马鱼、爪蟾属(Xenopus)、鼠或人ZNRF3或RNF43)的胞外域。在更具体的实施方案中，该表位在人或食蟹猴(或在人和食蟹猴)的ZNRF3或RNF43的胞外域上。

[0133] 术语“遗传改造的”指通过人为干预，通过产生和使用重组DNA技术并且从重组DNA

表达多肽,来改变活生物中的遗传物质的结构。使用重组DNA和表达多肽的技术为本领域技术人员已知。用于产生本发明的经遗传改造的抗体或抗体片段的技术描述于本文中提供的参考文献中。见例如Bird等人,Science 242:423-426(1988)和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883(1988)。还见例如Riechmann L等人,Nature 332:323-327(1998);Jones P等人,Nature 321:522-525(1986);Queen C等人,Proc.Natl.Acad.,U.S.A.86:10029-10033(1989);Winter的美国专利号5,225,539及Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370。

[0134] 术语“人抗体”包括具有这样的可变区的抗体,在该可变区中,构架区和CDR区都来源于人来源的序列。此外,如果该抗体包含恒定区,则该恒定区也来源于这类人序列,例如人种系序列、或人种系序列的突变形式。本发明的人抗体可以包括不由人序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变)。

[0135] 术语“人单克隆抗体”指显示单一结合特异性的抗体,其具有这样的可变区,其中构架区和CDR区都来源于人序列。在一个实施方案中,通过杂交瘤产生人单克隆抗体,该杂交瘤包括获自转基因非人动物例如转基因小鼠的与无限增殖化细胞融合的B细胞,所述转基因非人动物具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0136] “人源化”抗体是保持非人抗体的反应性同时在人类中免疫原性低的抗体。这可以例如通过保留非人CDR区,而用其人对应物取代该抗体的其余部分(即恒定区及可变区的构架部分)来实现。见例如Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855,(1984);Morrison和Oi,Adv.Immunol.,44:65-92(1988);Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536,(1988);Padlan,Molec.Immun.,28:489-498(1991);和Padlan,Molec.Immun.,31:169-217(1994)。人工程技术的另一实例是US 5,766,886中公开的Xoma技术。

[0137] 术语“分离的抗体”指这样的抗体,其基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体(例如,特异地结合ZNR3或RNF43的分离的抗体基本上不含特异地结合ZNR3或RNF43以外的抗原的抗体)。但是,特异地结合目的蛋白质的分离的抗体具有对其他抗原的交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学品。

[0138] 术语“同种型”指由重链恒定区基因提供的抗体种类(例如IgM、IgE和IgG,如IgG1或IgG4)。同种型还包括这些种类之一的修饰形式,其中进行修饰来改变Fc功能,例如增强或减弱效应子功能或与Fc受体的结合。IgG形式的抗-ZNR3抗体的实例见表6。

[0139] 本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指单一分子组成的抗体制剂。单克隆抗体组合物显示对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0140] 术语“载体”意指能够转运与其连接的另一多核苷酸的多核苷酸。

[0141] 具有保守修饰的抗体。在某些实施方案中,本发明的抗体具有包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和/或包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文中所述的抗体或其保守修饰的特定氨基酸序列,其中该抗体保持本发明的抗体的希望的功能性质。见SEQ ID NOS:3-6和其中所述的CDR序列、SEQ ID NOS:67-86和其中所述的CDR序列及SEQ ID NOS:87-90和其中所述的CDR序列。还见表7中的SEQ ID NOS:31-66、表8中的SEQ ID NOS:91-150和表9中的SEQ ID NOS:151-162。

[0142] 因此,在几个实施方案中,如免疫学领域的技术人员所理解,本发明的抗体或抗原结合片段可以是具有三个CDR区的多肽,所述CDR区从多肽的氨基端向羧基端排列。

[0143] 在一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段具有:(a)具有选自以下肽序列的第一区域:SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:145、SEQ ID NO:151或SEQ ID NO:157;(b)具有选自以下肽序列的第二区域:SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:146、SEQ ID NO:152或SEQ ID NO:158和(c)具有选自以下肽序列的第三区域:SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:129、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:153或SEQ ID NO:159。在具体实施方案中,此抗体或抗原结合片段具有一条或多条多肽,其中该多肽中的至少一条具有选自前面的句子中所述的三个CDR区的CDR区的肽序列。在更具体的实施方案中,此多肽是抗体或抗体片段的轻链。

[0144] 在另一实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段具有:(a)具有选自以下肽序列的第一区域:SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:154或SEQ ID NO:160;(b)具有选自以下肽序列的第二区域:SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:155或SEQ ID NO:161和(c)具有选自以下肽序列的第三区域:SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:138、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:156或SEQ ID NO:162。在具体实施方案中,此抗体或抗原结合片段具有一条或多条多肽,其中该多肽中的至少一条具有选自前面的句子中所述的三个CDR区的CDR区的肽序列。在更具体的实施方案中,此多肽是抗体或抗体片段的轻链。

[0145] 在另一实施方案中,本发明的此抗体或抗原结合片段具有:(a)第一区域,其具有选自SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:37的肽序列;(b)第二区域,其具有选自SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:38的肽序列;和(c)第三区域,其具有选自SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:39的肽序列。在具体实施方案中,此抗体或抗原结合片段具有一条或多条多肽,其中该多肽中的至少一条具有选自前面的句子中所述的三个CDR区的CDR区的肽序列。在更具体的实施方案中,此多肽是抗体或抗体片段的轻链。

[0146] 在另一实施方案中,本发明的此抗体或抗原结合片段具有:(a)第一区域,其具有选自SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:40的肽序列;(b)第二区域,其具有选自SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:41的肽序列;和(c)第三区域,其具有选自SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:42的肽序列。在具体实施方案中,此抗体或抗原结合片段具有一条或多条多肽,其中该多肽中的至少一条具有选自按前面的句子中所述的三个CDR区的CDR区的肽序列。在更具体的实施方案

中,此多肽是抗体或抗体片段的重链。

[0147] 对于在本发明的抗体中处于CDR区之外的氨基酸,可以进行保守氨基酸取代而不改变本发明的抗体的功能性质。

[0148] 因此,在几个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段可以是这样的多肽,其与选自本文中公开的Ab1、Ab2、Ab2的变体、IgG-Ab1或IgG-Ab2的轻链或重链多肽具有高度肽序列同一性。

[0149] 在一个实施方案中,本发明的此抗体或抗原结合片段与这样的序列具有至少95%的序列同一性,所述序列选自:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:85。在具体实施方案中,此抗体或抗原结合片段具有一条或多条多肽,该多肽中的至少一条与这样的序列具有至少95%的序列同一性,所述序列选自:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83或SEQ ID NO:85。在更具体的实施方案中,此多肽是Fab的抗体或抗体片段的轻链。

[0150] 在另一实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段与这样的序列具有至少95%的序列同一性,所述序列选自:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:68;SEQ ID NO:70;SEQ ID NO:72;SEQ ID NO:74;SEQ ID NO:76;SEQ ID NO:78;SEQ ID NO:80;SEQ ID NO:82;SEQ ID NO:84;SEQ ID NO:86;SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90。在具体实施方案中,此抗体或抗原结合片段具有一条或多条多肽,该多肽中的至少一条与这样的序列具有至少95%的序列同一性,所述序列选自:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90。在更具体的实施方案中,此多肽是Fab的抗体或抗体片段的重链。

[0151] 在一个实施方案中,本发明的此抗体或抗原结合片段与选自SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:89的序列具有至少95%的序列同一性。在具体实施方案中,此抗体或抗原结合片段具有一条或多条多肽,该多肽中的至少一条与选自SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:89的序列具有至少95%的序列同一性。在更具体的实施方案中,此多肽是IgG的抗体或抗体片段的轻链。

[0152] 在另一实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段与选自SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90的序列具有至少95%的序列同一性。在具体实施方案中,此抗体或抗原结合片段具有一条或多条多肽,该多肽中的至少一条与选自SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:90的序列具有至少95%的序列同一性。在更具体的实施方案中,此多肽是IgG的抗体或抗体片段的重链。

[0153] 结合相同表位的抗体。本发明提供结合ZNR23和RNF43的抗体。因此,可以基于额外抗体与本发明的其他抗体在结合测定法中交叉竞争(例如,以统计学显著的方式竞争性抑制结合)的能力来鉴定所述额外抗体。如本文中所使用,在高于 $10^6$ x竞争抗体的 $K_D$ 的竞争抗体浓度的存在下,当竞争抗体抑制本发明的抗体的结合超过50%时,抗体“竞争”结合。

[0154] 遗传改造和修饰的抗体。还可以使用具有本文中所示的一个或多个VH和/或VL序列作为原料制备本发明的抗体以改造经修饰的抗体,其中经修饰的抗体可以具有从起始抗体改变的性质。可以进行的可变区改造的一种类型是CDR移植。因为CDR序列负责大多数抗

体-抗原相互作用,所以有可能通过构建表达载体表达模拟特定的天然存在的抗体的性质的重组抗体,所述表达载体包含来自特定的天然存在的抗体的CDR序列,该CDR序列被移植到来自具有不同特性的不同抗体的构架序列上。本见例如Riechmann L等,Nature 332:323-327 (1998); Jones P等,Nature 321:522-525 (1986); Queen C等,Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033 (1989); Winter的美国专利号5,225,539;及Queen等的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370。可以从包含种系抗体基因序列的公共DNA数据库或者发表的参考文献中获得此类构架序列。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可见于“VBase”人类种系序列数据库。见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication No.91-3242 (U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda MD, 1991); Tomlinson IM等,J. Mol. Biol. 227:776-798 (1992); 和Cox JPL等,Eur. J Immunol. 24:827-836 (1994)。

[0155] 将抗原结合结构域移植入备选的构架或支架。可以使用多种抗体/免疫球蛋白构架或支架,只要得到的多肽包括与ZNR3或RNF43特异性结合的至少一个结合区。此类构架或者支架包括人类免疫球蛋白的5种主要独特型或者其片段,并包括其他动物种类的免疫球蛋白,优选地具有人源化方面的免疫球蛋白。在这方面,单链抗体如在骆驼中鉴定的那些抗体是特别有用的。

[0156] 在一个方面,本发明涉及使用非免疫球蛋白支架(可以将本发明CDR移植到该支架上),产生基于非免疫球蛋白的抗体。可以使用已知的或者未来的非免疫球蛋白构架和支架,只要它们包含对靶蛋白(例如人和/或食蟹猴ZNR3或RNF43)特异的结合区。已知的非免疫球蛋白构架或者支架包括但不限于,纤连蛋白(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、ankyrin (Molecular Partners AG, Zurich, 瑞士)、结构域抗体(Domantis, Ltd., Cambridge, MA和Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium)、脂质运载蛋白(Pieris Proteolab AG, Freising, 德国)、小模块的免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、maxyodies (Avidia, Inc., Mountain View, CA)、A蛋白(Affibody AG, 瑞典),以及affilin ( $\gamma$ -晶体蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH, Halle, 德国)。

[0157] Avimer来源于包含天然A结构域的蛋白质,如LRP-1。这些结构域天然地用于蛋白质-蛋白质相互作用,并且在人中,超过250种蛋白质结构上是基于A-结构域的。Avimer由通过氨基酸接头连接的许多不同“A-结构域”单体(2-10)组成。可以用描述于例如美国专利申请号2004/0175756、2005/0053973、2005/0048512和2006/0008844中的方法来产生可以与靶抗原结合的avimer。

[0158] Affibody亲和配体是由基于A蛋白的IgG结合结构域之一的支架的三螺旋束组成的小的简单蛋白质。A蛋白是来自细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的表面蛋白质。这种支架结构域由58个氨基酸组成,其中将13个氨基酸随机化以产生具有大量配体变体的Affibody文库。参见例如美国专利号5,831,012。Affibody分子模拟的抗体具有约6kDa的分子量,而抗体的分子量通常为约150kDa。

[0159] 人或人源化抗体。本发明提供特异地结合ZNR3或RNF43蛋白(例如人和/或食蟹猴ZNR3或RNF43)的全长人抗体。在对人受试者施用,与嵌合或人源化的抗体相比,本发明的人ZNR3或RNF43结合抗体具有进一步降低的抗原性。

[0160] 可以使用本领域已知的方法产生人ZNR3或RNF43结合抗体。例如,可以将人源改

造技术 (humaneering technology) 用于将非人抗体转变成改造的人抗体。美国专利公开号 2005/0008625 描述了这样的体内方法: 用抗体中的人可变区替换非人抗体可变区, 同时相对于非人抗体, 维持相同的或者提供更好的结合特征。此外, 人 ZNRF3 或 RNF43 结合抗体还可以从通常生产人抗体的公司, 例如 KaloBios, Inc. (Mountain View, CA) 在商业上获得。

[0161] 骆驼抗体。已经对获自骆驼和单峰驼 (西亚骆驼 (*Camelus bactrianus*) 和 *Camelus dromaderius*) 家族成员包括新世界成员如骆马物种 (马驼 (*Lama glama*)、羊驼 (*Vicugna pacos*) 和小羊驼 (*Vicugna vicugna*)) 的抗体蛋白的大小、结构复杂性和对人受试者的抗原性进行了表征。发现来自该哺乳动物家族的一些 IgG 抗体天然缺失轻链, 从而在结构上不同于来自其他动物的抗体的具有两个重链和两个轻链的典型四链四级结构。参见 1994 年 3 月 3 日公开的国际专利申请 WO 94/04678。通过基因改造可以获得鉴定为 VHH 的小的单个可变区的骆驼抗体的一个区域, 以产生具有对靶标高亲和力的小蛋白质, 其导致了称为“骆驼纳米抗体”的低分子量抗体衍生蛋白质。见 1998 年 6 月 2 日授权的美国专利号 5,759,808。还见 Stijlemans B 等, *J Biol Chem* 279:1256-1261 (2004); Dumoulin M 等, *Nature* 424:783-788 (2003); Pleschberger M 等 *Bioconjugate Chem* 14:440-448 (2003); Cortez-Retamozo V 等, *Int J Cancer* 89:456-62 (2002); 和 Lauwereys M 等, *EMBO J* 17:3512-3520 (1998)。骆驼抗体和抗体片段的改造文库可通过商业途径得到的, 例如从 Ablynx, Ghent, 比利时 (Ablynx, Ghent, Belgium) 获得。与其他非人来源的抗体一样, 也可以重组改变骆驼抗体的氨基酸序列以获得更近似人序列的序列, 即可以“人源化”纳米抗体。因此, 可以进一步降低骆驼抗体对人的天然低抗原性。

[0162] 产生本发明的抗体的方法。在一些实施方案中, 用哺乳动物宿主细胞来表达和产生本发明的抗体。例如, 宿主细胞可以是表达内源免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系或者含有外源表达载体的哺乳动物细胞系。这些宿主细胞包括任一正常的永生或者正常的或者异常的永生动物或人类细胞。例如, 已经开发了能分泌完整免疫球蛋白的许多合适的宿主细胞系, 包括 CHO 细胞系、多种 Cos 细胞系、HeLa 细胞、骨髓瘤细胞系、经转化的 B 细胞和杂交瘤。在例如, Winnacker, FROM GENES TO CLONES, (VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987) 中概括地讨论了使用哺乳动物组织细胞培养物来表达多肽。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可以包括表达控制序列, 例如复制起点、启动子和增强子 (参见例如 Queen 等, *Immunol. Rev.* 89: 49-68 (1986)), 以及必需的加工信息位点, 例如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止序列。这些表达载体通常含有来源于哺乳动物基因或者来自哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异的、时期特异的和/或可调节或者可调控的启动子。有用的启动子包括但不限于, 本领域已知的金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松可诱导的 MMTV 启动子、SV40 启动子、MRP polIII 启动子、组成型 MPSV 启动子、四环素可诱导的 CMV 启动子 (例如人类即时早期 CMV 启动子)、组成型 CMV 启动子, 以及本领域已知的启动子-增强子组合。

[0163] 本发明的单克隆抗体的产生。可以通过多种技术, 包括常规单克隆抗体方法, 例如 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256:495 (1975) 的标准体细胞杂交技术来产生单克隆抗体。可以使用产生单克隆抗体的许多技术, 例如 B 淋巴细胞的病毒或致癌性转化。

[0164] 用于制备杂交瘤的动物系统是小鼠系统。小鼠中的杂交瘤产生是已经成熟建立的方法。免疫方案和分离用于融合的经免疫的脾细胞的技术是本领域已知的。融合配偶体 (例

如,小鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是已知的。

[0165] 可以基于如上所述制备的小鼠单克隆抗体的序列来制备本发明的嵌合或人源化抗体。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可以获自目的小鼠杂交瘤,并使用标准的分子生物学技术将所述DNA改造成含有非小鼠(例如,人类)的免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法,将小鼠可变区与人恒定区连接。参见例如,Cabilly等人的美国专利号4,816,567。为了产生人源化抗体,可以使用本领域已知的方法,将小鼠CDR区插入到人构架区中。参见例如Winter的美国专利号5,225,539,及Queen等的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370。

[0166] 在某些实施方案中,本发明抗体是人单克隆抗体。可以使用携带一部分人免疫系统,而不是小鼠系统的转基因或者转染色体小鼠产生针对ZNF3或RNF43的此类人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括分别在本文中称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在本文中共同称为“人Ig小鼠”。

[0167] HuMAb小鼠® (Medarex, Inc.) 含有人免疫球蛋白基因微型基因座,其编码未重排的人重链( $\mu$ 和 $\gamma$ )和 $\kappa$ 轻链免疫球蛋白序列,以及使内源性 $\mu$ 和 $\kappa$ 链基因座失活的靶向突变。参见例如Lonberg等, *Nature* 368 (6474): 856-859 (1994)。因此,该小鼠显示出小鼠IgM或 $\kappa$ 的表达的降低,并且应答免疫中,引入的人重链和轻链转基因经历了类别转换和体细胞突变,以产生高亲和力的人IgG $\kappa$ 单克隆抗体。Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101 (1994); Lonberg, N. 和Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995); 及Harding, F. 和Lonberg, N., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764: 536-546 (1995)。HuMAb小鼠的制备和用途,以及通过此类小鼠进行的基因组修饰进一步描述于Taylor, L. 等, *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295 (1992); Chen, J. 等, *International Immunology* 5: 647-656 (1993); Tuailon等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3720-3724 (1993); Choi等, *Nature Genetics* 4: 117-123 (1993); Chen, J. 等, *EMBO J.* 12: 821-830 (1993); Tuailon等, *J. Immunol.* 152: 2912-2920 (1994); Taylor, L. 等, *International Immunology* 579-591 (1994); 及Fishwild, D. 等, *Nature Biotechnology* 14: 845-851 (1996)。还参见, Lonberg和Kay的美国专利号5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299和5,770,429; Surani等人的美国专利号5,545,807; Lonberg和Kay的PCT公开号WO 92103918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97113852、WO 98/24884和WO 99/45962; 以及Korman等人的PCT公开号WO 01/14424。

[0168] 在另一个实施方案中,可以使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠,例如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠,产生本发明的人抗体。此类小鼠,在本文中称为“KM小鼠”详述于Ishida等人的PCT Publication WO 02/43478中。

[0169] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转基因动物系统是本领域可得到的,并且可用于产生本发明的抗体。例如,可以使用称为Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的备选转基因系统。此类小鼠描述于,例如Kucherlapati等人的美国专利号5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584和6,162,963中。

[0170] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转染色体动物系统是本领域可得到的,并且可用于产生本发明的抗体。例如,可以使用称为“TC小鼠”的携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠; 此类小鼠描述于Tomizuka等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727

(2000)中。此外,本领域已经描述了携带人重链和轻链转染色体的奶牛,并且其可以用于产生本发明的抗体。Kuroiwa等,Nature Biotechnology 20:889-894(2002)。

[0171] 还可以使用用于筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法制备本发明的人单克隆抗体。本领域已经建立了或者在下文实施例中描述了用于分离人抗体的此类噬菌体展示方法。参见例如:Ladner等人的美国专利号5,223,409;5,403,484和5,571,698;Dower等人的美国专利号5,427,908和5,580,717;McCafferty等人的美国专利号5,969,108和6,172,197;以及Griffiths等人的美国专利号5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081。

[0172] 还可以使用SCID小鼠制备本发明的人单克隆抗体,在所述SCID小鼠中已经重构了人免疫细胞,以致在免疫时可以产生人抗体应答。此类小鼠描述于,例如Wilson等人的美国专利号5,476,996和5,698,767中。

[0173] 构架或Fc改造。本发明的改造抗体包括已经对VH和/或VL内的构架残基进行了修饰的那些抗体,例如以改进抗体的性质。通常,进行此类构架修饰,以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个构架残基“回复突变”成相应的种系序列。更具体地,经历了体细胞突变的抗体可以含有与抗体来源的种系序列不同的构架残基。可以通过将抗体构架序列与抗体来源的种系序列比较来鉴定此类残基。为了将构架区序列回复成其种系构型,可以通过例如定向诱变,将体细胞突变“回复突变”成种系序列。本发明还期望包括此类“回复突变的”抗体。

[0174] 构架修饰的另一类型涉及在构架区内或者甚至在一个或多个CDR区内突变一个或多个残基,以去除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。该方法也被称为“去免疫化(deimmunization)”,并且进一步详述于Carr的美国专利公开号20030153043中。

[0175] 除在构架区或CDR区内进行修饰外或者作为在构架区或CDR区内进行修饰的备选,改造本发明抗体还可以包括Fc区内的修饰,通常以改变抗体的一种或多种功能性质,例如血清半寿期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖的细胞毒性。此外,可以化学修饰(将一个或多个化学部分与抗体连接)本发明抗体或者修饰本发明抗体以改变其糖基化,以再次改变抗体的一个或多个功能性质。这些实施方案的每一个都进一步详述于下文。Fc区中残基的编号是Kabat的EU索引(index)的编号。

[0176] 在一个实施方案中,修饰CH1的铰链区,以改变(例如,增加或减少)铰链区中半胱氨酸残基的数目。该方法进一步描述于Bodmer等人的美国专利号5,677,425中。改变CH1的铰链区中半胱氨酸残基的数目,例如,以便于轻链和重链的组装或者增加或降低抗体的稳定性。

[0177] 在另一个实施方案中,突变抗体的Fc铰链区来减少该抗体的生物学半寿期。更具体而言,在Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域界面区中引入一个或多个氨基酸突变,使得相对于天然Fc-铰链结构域葡萄球菌蛋白A(Staphylococcal protein A)的结合,该抗体具有受损的SpA结合。此方法更详细地描述于Ward等人的美国专利号6,165,745中。

[0178] 可以修饰多价抗体的Fc-铰链区,以增加其生物学半寿期。多种方法都是可以的。例如,如在Ward的美国专利号6,277,375中所述,可以引入一个或多个以下的突变:T252L、T254S、T256F。备选地,为了增加生物学半寿期,如在Presta等人的美国专利号5,869,046和6,121,022中所述,可以改变抗体的CH1或CL区,以含有取自IgG的Fc区的CH2结构域的两个

环的补救受体结合表位。例如为了控制剂量、毒性和清除,从而允许通过控制剂量来进行更好的临床管理,可以修饰多价抗体的Fc-铰链区,以缩短其生物学半寿期。

[0179] 在其他实施方案中,通过用不同的氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基改变Fc区,以改变抗体的效应功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替换一个或多个氨基酸,以使抗体具有对效应子配体改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力被改变的效应子配体可以例如是Fc受体或者补体的C1组分。该方法进一步详述于Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中。

[0180] 在另一个实施方案中,可以用不同的氨基酸残基替换选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸,以使抗体具有改变的C1q结合和/或降低的或者消除的补体依赖的细胞毒性(CDC)。该方法进一步详述于Idusogie等人的美国专利号6,194,551中。

[0181] 在另一个实施方案中,改变一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。该方法进一步描述于Bodmer等人的PCT公开W0 94/29351中。

[0182] 在另一个实施方案中,修饰Fc区,以增强抗体介导抗体依赖的细胞毒性(ADCC)的能力和/或通过修饰一个或多个氨基酸增加抗体对Fc $\gamma$ 受体的亲和力。该方法进一步描述于Presta的PCT公开W0 00/42072中。此外,已经对人IgG1上针对Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIII和FcRn的结合位点作图,并且已经描述了具有增强的结合的变体。参见,例如Shields RL等,J.Biol.Chem.276:6591-6604(2001)。

[0183] 在另一个实施方案中,修饰抗体的糖基化。例如,可以制备去糖基化抗体(即,抗体缺少糖基化)。可以改变糖基化,例如以增加抗体对抗原的亲和力。可以通过例如,改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现此类糖类修饰。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代导致一个或多个可变区构架糖基化位点的消除,从而消除该位点的糖基化。该方法进一步详述于Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中。

[0184] 另外地或备选地,可以制备具有改变类型的糖基化的抗体,例如具有减少量的岩藻糖残基的低岩藻糖基化(hypofucosylated)抗体或者具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。此类改变的糖基化模式已经显示出增加了抗体的ADCC能力。可以通过例如,在具有改变的糖基化机器的宿主细胞中表达抗体来实现此类糖类修饰。本领域已经描述了具有改变的糖基化机器的细胞,并且可以将其用作表达本发明重组抗体的宿主细胞,从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,Hang等人的EP 1,176,195描述了具有在功能上被破坏的FUT8基因(其编码岩藻糖转移酶)的细胞系,以致该细胞系中表达的抗体显示出低岩藻糖基化。Presta的PCT公开W0 03/035835描述了具有岩藻糖与Asn(297)-连接的糖类连接的能力降低的变体CHO细胞系Lec13细胞,并且也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化。还参见Shields R.L.等人,J.Biol.Chem.277:26733-26740(2002)。Umana等人的国际专利申请W0 99/54342描述了经改造而表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如 $\beta$ -(1,4)-N乙酰葡萄糖氨基转移酶III(GnTIII))的细胞系,以致在经改造的细胞系中表达的抗体表现出增加的二等分GlcNac结构,其导致增强了抗体的ADCC活性。还参见Umana等人,(1999) Nat.Biotech.17:176-180(1999)。

[0185] ZNRF3的抑制在体内增强Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导并破坏Wnt/PCP信号转导。Frizzled蛋白为Wnt/ $\beta$ -联蛋白和Wnt/PCP信号转导所需,ZNRF3的抑制提高Frizzled蛋白的膜水平。因此,预期ZNRF3的抑制促进Wnt/ $\beta$ -联蛋白和Wnt/PCP信号转导。本发明人在模式生

物中测试了此假设。

[0186] 第一,ZNRF3  $\Delta$  RING而不是野生型ZNRF3在斑马鱼胚胎中的过表达导致前神经结构(最主要是眼)的丧失。前神经外胚层中Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导的抑制是原肠胚形成过程中早期神经图式形成的重要步骤, $\beta$ -联蛋白信号转导的异位激活导致前神经结构的丧失。

[0187] 用标准方法养护斑马鱼。Nusslein-Volhard C和Dahm R Zebrafish.A practical approach. (Oxford University Press,UK,2002);Westerfield M The zebrafish book:a guide for the laboratory use of zebrafish(Brachydanio rerio). (University of Oregon Press,Eugene,OR,1995)。

[0188] 使用mMESSAGE mMACHINE试剂盒(Ambion),用含有人ZNRF3、ZNRF3  $\Delta$  RING和GFP编码序列的线性化质粒作为模板,进行体外转录来合成加帽的mRNA。对于斑马鱼,在1-2细胞期将200pg ZNRF3WT mRNA或400pg ZNRF3  $\Delta$  RING mRNA注入胚胎。

[0189] 对于原位杂交,在4%多聚甲醛/PBS中过夜固定处于所示阶段的胚胎。按标准流程产生和使用DIG标记的反义探针。Nusslein-Volhard C和Dahm R,Zebrafish.A practical approach. (Oxford University Press,UK,2002)。

[0190] 按Gerdes等,Nature Genetics 39,1350(2007)之前所述通过细胞跟踪进行运动分析。简言之,在256细胞期将1nL 10,000MW葡聚糖缀合的Alexa 488谱系示踪物(Invitrogen)注入刚好处于细胞下方的卵黄。针对细胞向胚胎中线的运动及沿前后轴的延伸观察背侧区中具有荧光克隆的胚胎。在同一胚胎的30%外包、盾和75%外包期采集活动图像。

[0191] 第二,ZNRF3  $\Delta$  RING在爪蟾属胚胎中的过表达导致轴复制和动物冠中 $\beta$ -联蛋白靶基因的表达增加。

[0192] 使用爪蟾属胚胎的实验如前所述。Goentoro L和Kirschner MW,“Evidence that fold-change,and not absolute level,of beta-catenin dictates Wnt signaling.” Mol.Cell 36,872-884(2009)。

[0193] 使用mMESSAGE mMACHINE试剂盒(Ambion),用含有人ZNRF3、ZNRF3  $\Delta$  RING和GFP编码序列的线性化质粒作为模板,进行体外转录来合成加帽的mRNA。对于爪蟾属,将200pg ZNRF3WT或ZNRF3  $\Delta$  RING mRNA以及GFP对照mRNA在边缘区注入4细胞期胚胎中的2个卵裂球。

[0194] 为了分析爪蟾属Znrf3的表达图式,从处于不同时期的胚胎提取总RNA。用Applied Biosystems SYBR-Green Master Mix对此cDNA进行定量PCR。所使用的引物是:ZNRF3

[0195] 5'-GATGGAGAGGAGCTGAGAGTCATTC-3' (正向) (SEQ ID NO:17)、

[0196] 5'-GATAACTCGCTGTTGCTGCTG-3' (反向) (SEQ ID NO:18);H4组蛋白5'-CGGGATAACATTCAGGGTA-3' (正向) (SEQ ID NO:19)、

[0197] 5'-TCCATGGCGGTAAGTGC-3' (反向) (SEQ ID NO:20)。将样品对作为内部对照的H4组蛋白归一化。对于爪蟾属动物冠的RT-PCR,在2细胞期将mRNA注入两个卵裂球的动物极。在8.5期分离动物冠,并培养至10.5期用于RT-PCR。所使用的引物是:Siamois,

[0198] 5'-CTCCAGCCACCAGTACCAGATC-3' (正向) (SEQ ID NO:21)、

[0199] 5'-GGGGAGAGTGAAAGTGGTTG-3' (反向) (SEQ ID NO:22);Xnr3,

[0200] 5'-TCCACTTGTGCAGTTCCACAG-3' (正向) (SEQ ID NO:23)、

[0201] 5-ATCTCTTCATGGTGCCTCAGG-3' (反向) (SEQ ID NO:24);Elf1 $\alpha$ ,

[0202] 5-CAGATTGGTGCTGGATATGC-3' (正向) (SEQ ID NO:25)、

[0203] 5'-ACTGCCTTGATGACTCCTAG-3' (反向) (SEQ ID NO:26)。

[0204] 总结我们的来自斑马鱼和爪蟾属测定的结果,我们发现,ZNRF3  $\Delta$  RING对与过量 $\beta$ -联蛋白信号转导相关的典型表型的诱导表明,ZNRF3在体内抑制Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导。PCP信号转导输出的精确调节为正常原肠胚形成所需,增强或减弱的PCP信号转导破坏汇集延伸运动。有趣地,野生型ZNRF3或ZNRF3  $\Delta$  RING在斑马鱼胚胎中的过表达产生汇集延伸缺陷的表型特征,如通过用针对myoD和pcdh8的核糖核酸探针染色判断的缩短的体轴和更宽的体节。野生型ZNRF3的过表达常导致轴分叉,有趣地,过表达显性阴性Frizzled也产生相同的表型。Nasevicius A.等“Evidence for a frizzled-mediated wnt pathway required for zebrafish dorsal mesoderm formation.”Development 125,4283-4292 (1998)。

[0205] 所有观察到的表型都与汇集延伸缺陷一致,表明干扰ZNRF3的活性影响原肠胚形成运动。这在荧光谱系追踪实验中得到确认。在对照胚胎中,细胞在背侧中线上汇集。相反,过表达野生型ZNRF3或ZNRF3  $\Delta$  RING的细胞显示缺陷的背侧运动,因为它们未正常地向中线汇集。

[0206] 第三,为了研究ZNRF3在小鼠中的功能,本发明人构建了Znrf3敲除小鼠,并使敲除突变与C57BL/6背景回交。Znrf3缺陷的胚胎在出生前后死亡。

[0207] 在寻靶载体中,两个loxP位点位于编码RING结构域的外显子7侧翼。将线性化的寻靶载体电穿孔入129/SvJ ES细胞,首先通过嵌套式PCR筛选G418抗性ES克隆,然后进行Southern印迹分析。用XmnI或BglIII限制酶消化基因组DNA,并用分别位于5'和3'同源区外侧的探针杂交。用ES克隆5A7进行胚泡注射,使嵌合雄性小鼠与C57BL/6J背景中的CRE缺失(deleter)小鼠交配。通过PCR鉴定具有cre介导的外显子7缺失的F1小鼠,并在杂合小鼠互交之前进一步在C57BL/6J背景中回交来产生纯合小鼠/胚胎。用以下引物通过“多重”PCR鉴定野生型、杂合和纯合小鼠:NEO (T,正向):5'-TATCATGGTCTGTATACCGGGATCG-3' (SEQ ID NO:27);#523 (E,正向):

[0208] 5'-CATACTTTGGGCTCATGAGCAAGC-3' (SEQ ID NO:28);#521 (E,T,反向):5'-GCAGGTATACATTACCACACCC-3' (SEQ ID NO:29)。使Znrf3缺陷小鼠杂接入C57BL/6J背景。通过杂合亲本的预时配种来产生Znrf3<sup>-/-</sup>小鼠胚胎和野生型同窝对照。在所示胚胎期,处死怀孕的雌性,剖出胚胎,在4%多聚甲醛中4℃过夜固定后用于成像或组织学。用提取自卵黄囊的基因组DNA通过PCR基因型分型来确定胚胎的基因型。在梯度系列的乙醇中脱水后,对胚胎的头部进行石蜡包埋用于水平切片,并通过苏木精和伊红染色载玻片。用来自Exiqon的25nM双DIG标记的锁定核酸(LNA)探针按照标准方案进行E9.5小鼠胚胎的全样载片原位杂交。小鼠Axin2探针序列:TCTCTAACATCCACTGCCAGA (SEQ ID NO:30)。

[0209] Znrf3无效胚胎最值得注意的表型是晶状体形成的缺乏。此表型可能是由晶状体发育过程中 $\beta$ -联蛋白信号转导的超活化引起,因为 $\beta$ -联蛋白靶基因Axin2的表达在E9.5Znrf3无效胚胎的眼区中显著增加。

[0210] 已知表面外胚层中Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导的抑制对晶状体发育很重要。眼中 $\beta$ -联蛋白信号转导的异位激活阻断晶状体形成,而 $\beta$ -联蛋白的眼特异性缺失导致异位类晶状体的形成。Smith AN,Miller LA,Song N,Taketo MM和Lang RA,“The duality of beta-

catenin function:a requirement in lens morphogenesis and signaling suppression of lens fate in periocular ectoderm.”Dev.Biol.285,477-489 (2005); Kreslova J等“Abnormal lens morphogenesis and ectopic lens formation in the absence of beta-catenin function.”Genesis.45,157-168 (2007); Machon O等“Lens morphogenesis is dependent on Pax6-mediated inhibition of the canonical Wnt/beta-catenin signaling in the lens surface ectoderm.”Genesis.48,86-95 (2010)。

[0211] 已知Wnt/PCP信号转导对折叠神经板变窄过程中的细胞运动很重要,Frizzled和Dishevelled缺陷的小鼠显示神经管封闭缺陷。Wang Y,Guo N和Nathans J,The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells.J.Neurosci.26,2147-2156 (2006); Yu H等“Frizzled and frizzled 2 genes function in palate,ventricular septum and neural tube closure:general implications for tissue fusion processes.”Development 137, 3707-3717 (2010); Wang J等“Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation.”Development 133, 1767-1778 (2006); Etheridge SL等“Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development.”PLoS Genet.4,e1000259 (2008)。有趣地,我们约20%的Znrf3无效胚胎显示神经管封闭缺陷,其可能由被破坏的Wnt/PCP信号转导引起。总结起来,这些结果表明,ZNRF3在体内调节Wnt/ $\beta$ -联蛋白和Wnt/PCP信号转导。

[0212] R-反应蛋白通过抑制ZNRF3来增强信号转导。如下文进一步描述,R-反应蛋白(例如RSP01-RSP04)是强烈增强Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导和增加Wnt/PCP的分泌性分子的家族,因此具有生物学和治疗意义。本发明人已发现,ZNRF3是R-反应蛋白的分子靶标。我们的结果显示,ZNRF3通过促进Frizzled和LRP6的更新来抑制Wnt信号转导,此ZNRF3活性受R-反应蛋白抑制。

[0213] R-反应蛋白增强Wnt/ $\beta$ -联蛋白和Wnt/PCP信号转导。由于Frizzled为Wnt/ $\beta$ -联蛋白和Wnt/PCP途径所共享且R-反应蛋白诱导Dvl磷酸化,我们测试了是否R-反应蛋白通过提高Frizzled的膜水平来增强Wnt信号转导。实际上,通过使用细胞表面蛋白生物素化测定和流式细胞术测定,我们发现,R-反应蛋白1 (RSP01) 提高Myc-FZD8的膜水平。我们发现,在使用pan-Frizzled抗体进行的流式细胞术测定中RSP01还提高内源Frizzled的细胞表面水平。

[0214] 由于ZNRF3调节Frizzled蛋白的膜水平,我们测试了R-反应蛋白是否通过抑制ZNRF3来增强Wnt信号转导。我们发现,R-反应蛋白在物理上与R-反应蛋白的胞外域相互作用。为此,本发明人用带有N端Myc标记的FZD4 (Frizzled 4) 或ZNRF3ECD-TM或ZNRF3P103A ECD-TM瞬时转染了HEK293细胞,然后用RSP01-GFP条件培养基培养这些细胞1小时。我们用基于抗-GFP和抗-Myc抗体的免疫荧光测定了RSP01-GFP与表达在细胞表面上的带Myc标记的蛋白质的结合。使用这种基于细胞的结合测定,显示RSP01-GFP与ZNRF3ECD-TM结合,但不与ZNRF3P103A ECD-TM或FZD4结合。因此,我们的结果显示,R-反应蛋白与ZNRF3的胞外域特异地相互作用。

[0215] 由于还已知R-反应蛋白与LGR4结合,本发明人测试了是否R-反应蛋白同时与LGR4

和ZNR3相互作用来诱导ZNR3和R-反应蛋白之间的相互作用。这显示在图9中。用RSP01-GFP条件培养基 (CM) 处理共表达LGR4-HA和Myc-ZNR3  $\Delta$  RING的HEK293细胞1小时。然后用抗-Myc抗体免疫沉淀细胞裂解物。分离免疫沉淀,并用抗-HA、抗-Myc和抗-GFP抗体印迹。图9显示RSP01增加ZNR3和LGR4之间的相互作用。

[0216] 由于R-反应蛋白通过与ZNR3结合并抑制其活性来增强Wnt信号转导,我们测试了ZNR3ECD的过表达是否阻止R-反应蛋白和内源ZNR3之间的相互作用,并抑制R-反应蛋白介导的信号转导。这显示在图10中。以所示浓度和组合的Wnt3a条件培养基或RSP01  $\Delta$  C条件培养基过夜处理稳定表达STF萤光素酶报道基因和空载体或ZNR3ECD-TM的HEK293细胞。然后对细胞进行萤光素酶报道基因测定。如图10中所示,ZNR3ECD-TM的过表达阻断RSP01而不是Wnt3a诱导的STF激活。

[0217] 因此,我们的结果显示,在HEK293细胞中,ZNR3ECD-TM的过表达抑制R-反应蛋白而不是Wnt3a诱导的 $\beta$ -联蛋白的稳定。在使用pan-Frizzled抗体进行的流式细胞术测定中,ZNR3ECD-TM的过表达还阻断RSP01诱导的内源Frizzled的膜聚积。总结起来,我们的来自图9和图10的结果显示,R-反应蛋白通过抑制ZNR3和提高Frizzled蛋白的细胞表面水平来增强Wnt信号转导。R-反应蛋白在物理上与ZNR3的胞外域相互作用,并诱导ZNR3和LGR4之间的相互作用。

[0218] 如下文进一步讨论,我们的结果表明,与ZNR3 (或RNF43) 和LGR4 (或LGR5或LGR6) 结合的双特异性抗体可模拟R-反应蛋白活性,并增强Wnt信号转导。

[0219] 为治疗由Wnt信号转导不足引起的疾病而进行的本发明的抗体的施用及用于施用本发明的抗体的药物制剂。本发明的抗体用于治疗表征为低Wnt信号转导的疾病。

[0220] 已将Wnt信号转导的病理性低水平与骨质疏松、多囊肾病和神经变性疾病相联系。已显示Wnt途径的受控激活促进诸如组织修复和伤口愈合的再生过程。Zhao J, Kim KA和Abo A, "Tipping the balance: modulating the Wnt pathway for tissue repair." Trends Biotechnol. 27 (3): 131-6 (Mar. 2009)。还见Logan CY和Nusse R, "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 20: 781-810 (2004); Nusse R., "Wnt signaling in disease and in development." Cell Res. 15 (1): 28-32 (2005年1月); Clevers H, "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell 127 (3): 469-80 (2006年11月3日)。已进行了概念验证实验来显示Wnt信号转导在骨质疏松或黏膜炎中的作用。此外,已表明,Wnt信号转导的增强可能对糖尿病和其他代谢疾病的治疗有益。

[0221] 与ZNR3和RNF43的胞外域结合来抑制ZNR3和RNF43的功能的抗体将使细胞对Wnt信号转导敏感,因此可以用于受益于Wnt刺激物的疾病或其他适应症。与低Wnt信号转导相关的一些疾病和病症包括但不限于黏膜炎短肠综合症、胃肠黏膜中的细菌移位、肠毒性或肠病性感染性腹泻、乳糜泻、非热带性口炎性腹泻、乳糖不耐症和其中膳食摄入量导致黏膜绒毛钝化的其他病症、吸收障碍、萎缩性胃炎和糖尿病。还包括骨质疏松、骨折、代谢疾病如糖尿病、神经变性疾病和黑素瘤。此外,本发明的拮抗抗体可以用来增强Wnt信号转导以用于组织再生,如组织修复和伤口愈合。可以用本发明的方法治疗的损伤组织的实例包括但不限于肠组织、心脏组织、肝组织、肾组织、骨骼肌、脑组织、骨组织、结缔组织和皮肤组织。

[0222] 美国专利申请2009/0220488描述了施用抗体 (不是本发明的抗体) 来治疗性调节

Wnt信号转导途径的活性,尤其是与Wnt信号转导途径的分泌成分或与Wnt信号转导途径的成分的胞外区结合的抗体。美国专利申请2009/0220488描述了例如与Wnt结合并抑制Wnt活性,例如抑制Wnt与细胞表面受体(例如Frizzled受体或LRP5/6)结合的抗体。该专利申请所引用的另一类抗体包括这样的抗体,其与Wnt的细胞表面受体(如Frizzled受体或LRP5/6)的胞外区结合以减少或防止Wnt与受体相互作用或以其他方式减弱受体信号转导。该专利申请所述的施用方法可以适用于与ZNR3或RNF43的胞外域结合的抗体。因此,本发明的抗体可以用来对患有表征为低Wnt信号转导的疾病或病症的受试者施用。通过此施用,用本发明的抗体来“治疗”该受试者。由于该受试者中的Wnt信号转导增强,本发明的抗体的施用将“减轻”该受试者的疾病或病症。

[0223] 黏膜炎是癌症治疗的临床并发症。黏膜炎由辐射或化疗对快速增殖的细胞的细胞毒效应引起。黏膜炎由主要影响肠黏膜和口腔黏膜的上皮损伤组成。临川病征是严重的口腔疼痛、恶心、腹泻、营养不良及几种情况下的脓毒和死亡。该症状通常导致癌症治疗的剂量限制。对于与用于实体瘤的化疗或放疗相关的口腔或胃肠道黏膜炎,目前没有可用的治疗。

[0224] 口腔黏膜炎是癌症治疗的常见且常使人虚弱的并发症。进行头颈癌放疗的50%患者和用5-FU治疗的10-15%患者患上3-4级口腔黏膜炎。已显示RSP01在动物模型中减轻口腔黏膜炎。Zhao J等,PNAS 106:2331(2010)。

[0225] 短肠综合征(SBS)由小肠延伸区段的功能性丧失或解剖学丧失引起,使得消化和吸收能力严重受损。每年,许多人由于多种病症而进行大段小肠的切除,该病症包括外伤、炎性肠病、恶性肿瘤、肠系膜缺血等。诸如辐射的多种非手术操作可以引起功能性短肠综合征。目前对短肠综合征的治疗包括膳食方法、全胃肠外营养(TPN)、小肠移植和非移植腹部手术。虽然这些治疗有助于改善SBS患者的结果,但他们仅部分矫正了肠功能减少的潜在问题。目前没有治疗可以在SBS患者中加快剩余小肠的恢复。见Seetharam和Rodrigues,“Short bowel syndrome:a review of management of options”The Saudi Journal of Gastroenterology 17,229-235(2011)。

[0226] 成体哺乳动物肠构成了最快速地自我更新的组织之一,其中肠黏膜包含折叠为增殖性隐窝和分化绒毛的连续结构。在对黏膜破坏的应答中,宿主启动愈合应答,其导致黏膜完整性恢复和黏膜结构再生。此过程严重依赖于肠干细胞的增殖。Neal等,“Intestinal stem cells and their roles during mucosal injury and repair.”Journal of Surgical Research 167,1-8(2010);van der Flier和Clevers,“Stem cells,self-renewal,and differentiation in the intestinal epithelium.”Annual Review of Physiology 71,241-261(2009)。

[0227] 因此,调节肠干细胞活性的因子在宿主应答肠道内损伤的能力中发挥主导作用。由于Wnt蛋白是支持肠干细胞增殖的最重要的生长因子,增强Wnt信号转导将增加肠上皮的增殖。这将导致小肠绒毛数目的增加和黏膜吸收表面积的增加。

[0228] 因此,在一个实施方案中,对患有短肠综合征的个人施用本发明的抗体。施用该抗体,以增加胃肠黏膜吸收表面积。在患有偶发性短肠综合征的个人适应肠道喂养时,或在患有流行性SBS的个人从肠道喂养吸收营养时,或在个人减少该个人每日所需的总胃肠外营养的量来维持体重时,本发明的抗体的施用具有成功的结果。

[0229] 细菌移位的预防。在一个实施方案中,对处于由肠细菌引起的败血症风险的个人施用本发明的抗体。施用该抗体,以提高胃肠黏膜完整性,从而防止肠细菌进入该个人的血流。胃肠黏膜完整性降低(与人群中正常的胃肠黏膜完整性相比)是危重病人中血流感染和脓毒的主要来源。在施用本发明的抗体的重症监护病房(ICU)患者中比在未施用该抗体的患者中观察到更少的菌血症和脓毒病例时,指示抗体的施用具有成功的结果。

[0230] 肠毒性或肠病性感染性腹泻期间或之后的加速恢复。感染性腹泻是主要的儿科问题。在一个实施方案中,施用本发明的抗体,以缩短腹泻结束的时间或达到正常排便的时间。本发明的抗体可以在护理标准之外施用,该护理标准包括口腔或肠胃外补充水分,有时还包括抗生素。与未施用本发明的抗体的儿科患者相比,在施用了本发明的抗体的儿科患者中观察到住院减少、住院时间缩短或脱水和电解质异常的并发症的发病率降低,指示抗体的施用具有成功的结果。

[0231] 乳糜泻、非热带性口炎性腹泻、乳糖不耐症和其中膳食摄入量导致黏膜绒毛钝化的其他病症和吸收障碍。在一个实施方案中,施用本发明的抗体,以增加黏膜吸收表面积。本发明的抗体可以在护理标准之外施用,该护理标准主要是避免讨厌的食品,有时还避免食品添加剂。在患有乳糜泻、非热带性口炎性腹泻、乳糖不耐症或其他病症的个人适应肠道喂养时,或在患有该病症中任一种的个人从肠道喂养吸收营养时,或在个人减少该个人每日所需的总胃肠外营养的量来维持体重时,本发明的抗体的施用具有成功的结果。

[0232] 萎缩性胃炎,特别是之前所称的环境化生性萎缩性胃炎(environmental metaplastic atrophic gastritis)。萎缩性胃炎是老年人中常见的病症,目前用维生素B12注射来治疗。患者具有提高的类癌瘤和腺癌风险。在医学专家观察到肿瘤发病率降低(在类癌的情况下,通过减少来自化生性G细胞的胃泌素产生)时,抗体的施用具有成功的结果。如果医学专家确定通过Wnt途径的增强激活了肿瘤,则不应对该受试者施用抗体。

[0233] II型糖尿病。在一个实施方案中,施用本发明的抗体,以提高肠降血糖素(例如胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和抑胃肽(GIP))的水平。肠降血糖素导致进食后从胰岛β细胞释放的胰岛素的量增加。二肽酶-4(DPP-4)快速失活肠降血糖素GLP-1和GIP。DPP-4抑制剂通过阻止DPP-4对内源肠降血糖素的失活来提高活性肠降血糖素水平。

[0234] DPP-4抑制剂的功效取决于内源活性肠降血糖素水平,其在II型糖尿病患者中似乎降低了。见Pratley RE和Gilbert M, Rev. Diabet. Stud. 5 (2): 73-94 (2008)。

[0235] 本发明的抗体的施用通过抑制Wnt途径来增加肠内分泌细胞(例如L细胞和K细胞)的数目,所述Wnt途径可导致肠内能够产生肠降血糖素的细胞的增殖。由于DPP-4抑制剂的功效需要内源地产生肠降血糖素,所以本发明的抗体可以作为与II型糖尿病患者所用的DPP-4抑制剂(维格列汀(**Galvus®**)、西他列汀(sitagliptin)(**Januvia®**)、沙格列汀(saxagliptin)(**Onglyza®**)、利拉利汀(**Trajenta®**)、dutogliptin、吉格列汀(gemigliptin)、阿格列汀(alogliptin)或另一DPP-4)或含DPP-4抑制剂的化合物(如小檗碱)联合治疗施用。

[0236] 该联合治疗可以是在施用DPP-4抑制剂之前对受试者施用本发明的抗体。施用DPP-4抑制剂之前的时间将是这样,使得受试者的肠内分泌细胞将增殖至足以产生肠降血糖素。可以通过实验室方法测试肠降血糖素的产生。

[0237] 联合治疗还可以是将DPP-4抑制剂与本发明的抗体同时施用于受试者,使得肠内分泌细胞的增殖和DPP-4的抑制同时发生。术语“与…同时”意指当对患有II型糖尿病的受试者进行DPP-4抑制剂治疗时,对该受试者施用本发明的抗体。本发明的抗体可以与DPP-4抑制剂同时或不同时施用,或与DPP-4抑制剂组合施用。由于诸如GLP-1的肠降血糖素还导致L细胞的增殖(见Grigoryan M等,Endocrinology 153:3076-3088(2012)),本发明的抗体与DPP-4抑制剂的施用可以增强正反馈回路,这是因为提高的肠降血糖素水平(来自DPP-4抑制剂)上调肠上皮L细胞,而上调的L细胞(来自ZNR3拮抗作用)上调肠降血糖素水平。

[0238] 当受试者具有如通过HgbA1c从基线起始的变化所评估的更好的II型糖尿病控制时,本发明的抗体的施用(在施用DPP-4抑制剂之前施用或与DPP-4抑制剂组合施用)具有成功的结果。评估HgbA1c从基线起始的变化的方法见例如 Vilsbøll T等,J Clin Endocrinol Metab 88:4897-4903(2003)。

[0239] 代谢疾病。已将减弱的Wnt信号转导与代谢疾病相联系。功能丧失的LRP6<sup>R611C</sup>突变在人类中导致早期冠心病、代谢综合症和骨质疏松。Main A等人,Science 315:1278(2007)。“LRP5 loss-of-function mutation is associated with osteoporosis, impaired glucose metabolism and hypercholesterolaemia in human.”;Saarinen等人,Clin Endocrinol 72:481(2010)。Severe hypercholesterolemia,impaired fat tolerance,and advanced atherosclerosis in mice lacking both LRP5and apoE;Magoori K等人,JBC11331(2003)。LRP5is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion in mice;Fujino等人,PNAS 100:229(2003)。TCF7L2variant confers risk of type 2diabetes;Grant SF等人,Nat Genet 38:320(2006);Florez JC等人,N Engl J Med 355:241(2006)。总结起来,已知Wnt信号转导增强有益于代谢疾病的治疗。因此,对患有代谢疾病的受试者施用本发明的抗体以用于治疗该受试者的代谢疾病。

[0240] 炎性肠病(IBD)是结肠和小肠的一组炎性病症。IBD的主要类型是局限性肠炎和溃疡性结肠炎。已显示RSP01蛋白在动物模型中减轻炎性肠病。Zhao J等人,Gastroenterology 132:1331(2007)。因此,对患有IBD的受试者施用本发明的抗体以用于治疗该受试者的IBD。

[0241] 制剂。本发明提供包含与可药用载体配制在一起的本发明的抗体或抗原结合片段的药物组合物。可药用载体增强或稳定该组合物,或可以用来方便地制备该组合物。可药用载体包括生理上相容的溶剂、分散剂、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。

[0242] 本发明的药物组合物可以通过本领域已知的多种方法施用。施用的途径和/或方式取决于希望的结果而不同。优选静脉内施用、肌内施用、腹膜内施用或皮下施用,或靠近靶位点施用。可药用载体应适合用于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如通过注射或灌输)。取决于给药途径,可以将活性化合物(即抗体、双特异性和多特异性抗体或其片段)包被在材料中,以保护该化合物免受可以失活该化合物的酸和其他天然条件的作用。

[0243] 组合物应无菌,且为液体。可以例如在分散剂存在的情况下,通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过维持所需颗粒大小及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇或山梨醇)和氯化钠。通过在组

合物中包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝或明胶)可以导致可注射组合物的长期吸收。

[0244] 可以按照本领域公知和常规实践的方法制备本发明的药物组合物。参见例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Mack Publishing Co., 20th ed, 2000); 和 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson ed., (Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1978)。药物组合物优选在GMP条件下制备。通常, 在本发明的药物组合物中利用本发明的抗体的治疗有效剂量或有效量。通过本领域技术人员已知的常规方法将抗体配制为可药用剂型。调整剂量方案来提供最佳的希望的反应(例如治疗反应)。例如, 可以施用快速灌注剂(single bolus), 可以随时间施用几个分份剂量, 或者可以按治疗情况的紧急性所示按比例地减少或增加剂量。为了施用的便利和剂量的均一性, 以剂量单位形式配制肠胃外组合物是尤其有利的。本文中所用的剂量单位形式指物理上分开的单位, 其适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量; 每个单位包含经计算的与所需药物载体结合产生希望的疗效的预定量的活性化合物。

[0245] 剂量。可以改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平, 以获得对特定受试者、组合物和施用方式而言, 对实现希望的治疗反应有效, 而对该受试者无毒性的活性成分的量。所选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素, 包括所利用的本发明的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性, 给药途径, 施用时间, 所利用的特定化合物的排泄率, 治疗持续时间, 其他药物, 与所利用的特定组合物组合使用的化合物和/或物质, 所治疗的受试者的年龄、性别、体重、状况、健康、既往病史等因素。

[0246] 医师或兽医可以以低于达到希望的疗效所需的水平的水平开始用于药物组合物中的本发明的抗体的剂量, 并逐渐增加剂量, 直至达到预期效应。通常, 对于本文中所述的变应性炎症病症的治疗, 本发明的组合物的有效剂量取决于许多不同因素而不同, 所述因素包括施用的手段、靶位点、受试者的生理状态、受试者是人还是动物、施用的其他药物及治疗是预防性的还是治疗性的。需滴定治疗剂量来优化安全性和功效。对于用抗体全身施用, 剂量范围为约0.0001至100mg/kg宿主体重, 更通常是0.01至15mg/kg宿主体重。示例性治疗方案需要每两周一次或每月一次或每3至6个月一次全身施用。对于用抗体进行的玻璃体内施用, 剂量范围为约0.0001至约10mg。示例性治疗方案需要每两周一次或每月一次或每3至6个月一次全身施用。

[0247] 抗体通常在多个时间点施用。单个剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。如测量受试者中本发明的抗体的血液水平所示, 间隔也可以是无规律的。在全身施用的一些方法中, 调整剂量来达到1-1000 $\mu$ g/ml及在一些方法中为25-500 $\mu$ g/ml的血浆抗体浓度。备选地, 抗体可以作为持续释放制剂施用, 在这种情况下, 需要较低频率的施用。剂量和频率取决于抗体在受试者中的半寿期而不同。通常, 人源化抗体显示的半寿期比嵌合抗体和非人抗体的半寿期长。取决于该治疗是预防性的还是治疗性的, 施用的剂量和频率可以不同。在预防性应用中, 在长时期内按相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些受试者在其余生中持续接受治疗。在治疗性应用中, 有时需要在相对短的间隔施用相对高的剂量, 直至疾病的进程减慢或终止, 优选直至受试者显示疾病症状的部分或完全减轻。然后, 可以对受试者施用预防性方案。

[0248] 双特异性抗体。ZNR3是R-反应蛋白的分子靶标。R-反应蛋白与ZNR3和LGR4相互作用, 并抑制ZNR3的功能。预期ZNR3和LGR4的诱导二聚化模拟R-反应蛋白, 并抑制ZNR3

的功能。因此,本发明提供双特异性或多特异性抗体或其抗原结合片段。该抗体的一部分与ZNR3或RNF43的胞外域结合。该抗体的另一部分与R-反应蛋白共同受体LGR4、LGR5或LGR6结合。这类抗体应模拟R-反应蛋白,并增强Wnt信号转导。

[0249] 本发明的抗体或其抗原结合区可以衍生或连接至另一功能分子,例如另一肽或蛋白质(例如受体的另一抗体或配体),以产生与至少两个不同的结合部位或靶分子结合的双特异性抗体及其片段。事实上,本发明的抗体可以衍生或连接至一个以上其他功能分子,以产生与两个以上不同的结合部位和/或靶分子结合的多特异性分子;预期这类多特异性分子也包含在本文中所述的术语“双特异性分子”中。为了产生本发明的双特异性分子,可以将本发明的抗体功能性地连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方式)至一个或多个其他结合分子,如另一抗体体、另一片段、肽或结合模拟物,使得产生双特异性分子。

[0250] 此外,对于其中双特异性抗体及其片段为多特异性的发明,除第一和第二靶表位外,该抗体及其片段可以进一步包括第三结合特异性。

[0251] 在一个实施方案中,本发明的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段(包括例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或单链Fv)作为结合特异性。该抗体还可以是轻链或重链二聚体或其任一个最小片段,如Fv或美国专利号4,946,778中所述的单链构建体。

[0252] 双抗体是二价、双特异性分子,其中VH和VL结构域表达在单条多肽链上,通过接头连接,所述接头太短而不允许同一条链上的两个结构域之间配对。VH和VL结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合部位。见例如Holliger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448(1993);Poljak等人,Structure 2:1121-1123(1994)。双抗体可以通过在同一细胞内表达具有结构VHA-VLB和VHB-VLA(VH-VL构型)或VLA-VHB和VLB-VHA(VL-VH构型)的两条多肽链来产生。它们中的大部分可以在细菌中以可溶形式表达。通过用约15个氨基酸残基的接头连接两条双抗体形成多肽链来产生单链双抗体(scDb)。见Holliger和Winter,Cancer Immunol.Immunother.45(3-4):128-30(1997);Wu等人,Immunotechnology 2(1):21-36(1996)。scDb可以以可溶、有活性的单体形式在细菌中表达。见Holliger和Winter,Cancer Immunol.Immunother.,45(34):128-30(1997);Wu等人,Immunotechnology 2(1):21-36(1996);Pluckthun和Pack,Immunotechnology 3(2):83-105(1997);Ridgway等人,Protein Eng.9(7):617-21(1996)。可以将双抗体与Fc融合来产生“双-双抗体”。见Lu等人,J.Biol.Chem.279(4):2856-65(2004)。

[0253] 可以用于本发明的双特异性分子中的其他抗体是鼠、嵌合和人源化单克隆抗体。

[0254] 本发明的双特异性抗体可以通过用本领域已知的方法结合组成结合特异性(constituent binding specificity)来制备。例如,双特异性抗体的每种结合特异性可以单独产生,然后相互结合。在结合特异性是蛋白质或肽时,可以用多种偶联剂或交联剂进行共价结合。交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻-苯二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(carboxylate)(磺基-SMCC)。参见例如Karpovsky等人,J.Exp.Med.160:1686(1984);Liu,MA等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648(1985)。其他方法包括描述于Paulus,Behring Ins.Mitt.No.78,118-132(1985);Brennan等人,Science 229:81-83

(1985);和Glennie等人, *J. Immunol.* 139:2367-2375 (1987) 中的那些方法。结合剂 (conjugating agent) 是SATA和磺基-SMCC, 都获自Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)。

[0255] 在该结合特异性是抗体时, 可以通过两条重链的C端铰链区的巯基键来结合它们。在具体实施方案中, 在结合之前, 修饰铰链区以包含奇数个巯基, 例如一个巯基。

[0256] 备选地, 两种结合特异性都可以编码在同一载体中, 并在同一宿主细胞中表达和组装。在双特异性分子是mAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')<sub>2</sub>或配体x Fab融合蛋白时, 此方法尤其有用。本发明的双特异性分子可以是包含一种单链抗体和结合决定簇的单链分子或者是包含两种结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可以包含至少两种单链分子。用于制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203、美国专利号5,455,030、美国专利号4,881,175、美国专利号5,132,405、美国专利号5,091,513、美国专利号5,476,786、美国专利号5,013,653、美国专利号5,258,498和美国专利号5,482,858中。

[0257] 可以通过例如酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (REA)、FACS分析、生物测定 (例如生长抑制) 或Western印迹测定来确认双特异性分子与它们的特异性靶标的结合。这些测定中的每一种通常通过利用特异地针对目的蛋白质-抗体复合体的标记试剂 (例如抗体) 来检测该特定的复合体的存在。

[0258] 在另一方面, 本发明提供多价复合物, 其包含本发明的抗体的至少两个相同或不同的抗原结合部分。抗原结合部分可以通过蛋白质融合或共价键或非共价键连接在一起。备选地, 已经描述了连接双特异性抗体及其片段的方法。例如通过将本发明的抗体的抗体与结合本发明的抗体的恒定区 (例如Fc或铰链区) 的抗体交联可以获得四价抗体。

[0259] 因此, 与LGR4/LGR5/LGR6和ZNR3/RNF43均结合的双特异性抗体 (或其他类似的物质, 如蛋白质嵌合体) 将使细胞对Wnt信号转导敏感, 并可以用于受益于Wnt刺激物的疾病或其他适应症。这类适应症包括但不限于包括但不限于黏膜炎短肠综合症、胃肠黏膜中的细菌移位、肠毒性或肠病性感染性腹泻、乳糜泻、非热带性口炎性腹泻、乳糖不耐症和其中膳食摄入量导致黏膜绒毛钝化的其他病症、吸收障碍、萎缩性胃炎和II型糖尿病。还包括骨质疏松、骨折、代谢疾病如糖尿病、神经变性疾病和黑素瘤。

[0260] 例如, 在某些实施方案中, 本公开涉及:

[0261] (i) 抗体, 其中该抗体的一部分与ZNR3的胞外域结合, 该抗体的另一部分与R-反应蛋白的共同受体的胞外域结合, 或

[0262] (ii) 抗体, 其中该抗体的一部分与RNF43的胞外域结合, 该抗体的另一部分与R-反应蛋白的共同受体的胞外域结合。

[0263] R-反应蛋白。R-反应蛋白 (RSP01-4) 是强烈增强Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导和Wnt/PCP信号转导的分泌分子的家族。Kazanskaya O等人 “R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis” .*Dev. Cell* 7, 525-534 (2004); Kim KA等人, “Mitogenic influence of human R-spondin on the intestinal epithelium.” *Science* 309, 1256-1259 (2005); Kim KA, “R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism.” *Mol. Biol. Cell* 19, 2588-2596 (2008); Ohkawara B, Glinka A和Niehrs C, “Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis.” *Dev. Cell* 20, 303-314 (2011); Kamata T等人, “R-spondin, a

novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants.” *Biochim. Biophys. Acta* 1676, 51-62 (2004); Nam JS., Turcotte TJ 和 Yoon JK, “Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development.” *Gene Expr. Patterns*. 7, 306-312 (2007); Aoki M 等人, “R-spondin3 is required for mouse placental development.” *Dev. Biol.* 301, 218-226 (2007); Blaydon DC 等人, “The gene encoding R-spondin 4 (RSP04), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia.” *Nat. Genet.* 38, 1245-1247 (2006); Kazanskaya O. 等人 “The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development.” *Development* 135, 3655-3664 (2008); Parma P 等人, “R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy.” *Nat. Genet.* 38, 1304-1309 (2006)。R-反应蛋白与Wnt共表达或由Wnt诱导,且涉及组织图式形成和分化。

[0264] Rspo1在肠隐窝的帕内特细胞中表达,肠隐窝形成Lgr5+干细胞的小生境。RSP01刺激隐窝干细胞的增殖,并保护小鼠免受化疗诱发的黏膜炎。Zhao J 等人 “R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/beta-catenin pathway.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106, 2331-2336 (2009)。

[0265] 因此,本发明提供的与ZNR3和RNF43的胞外域结合的抗体,其阻断R-反应蛋白和ZNR3或RNF43之间的相互作用。这类抗体可以配制在可药用载体中。这类抗体将阻断R-反应蛋白刺激的Wnt信号转导,并可以用于受益于Wnt抑制剂的适应症。这类适应症包括但不限于多种癌症、硬化性骨化病、特发性肺纤维化、心肌肥厚。

[0266] 此外,本发明提供ZNR3和RNF43的胞外域。这些胞外域可以为疗效而施用,因为这些蛋白质将与在组织中循环的R-反应蛋白结合来抑制R-反应蛋白信号转导。所施用的ZNR3或RNF43的胞外域作为伪受体。这类施用的蛋白质可以配制在可药用载体中。这类施用的蛋白质将阻断R-反应蛋白刺激的Wnt信号转导,并可以用于受益于Wnt抑制剂的适应症。这类适应症包括但不限于多种癌症、硬化性骨化病、特发性肺纤维化、心肌肥厚。

[0267] 将本文中引用的每一专利和出版物的内容以其整体并入本文作为参考。

[0268] 本文中提供的详细描述是为了说明本发明而不是限制其范围。本发明的其他变型对本领域普通技术人员而言将是显而易见的,且为所附权利要求所涵盖。

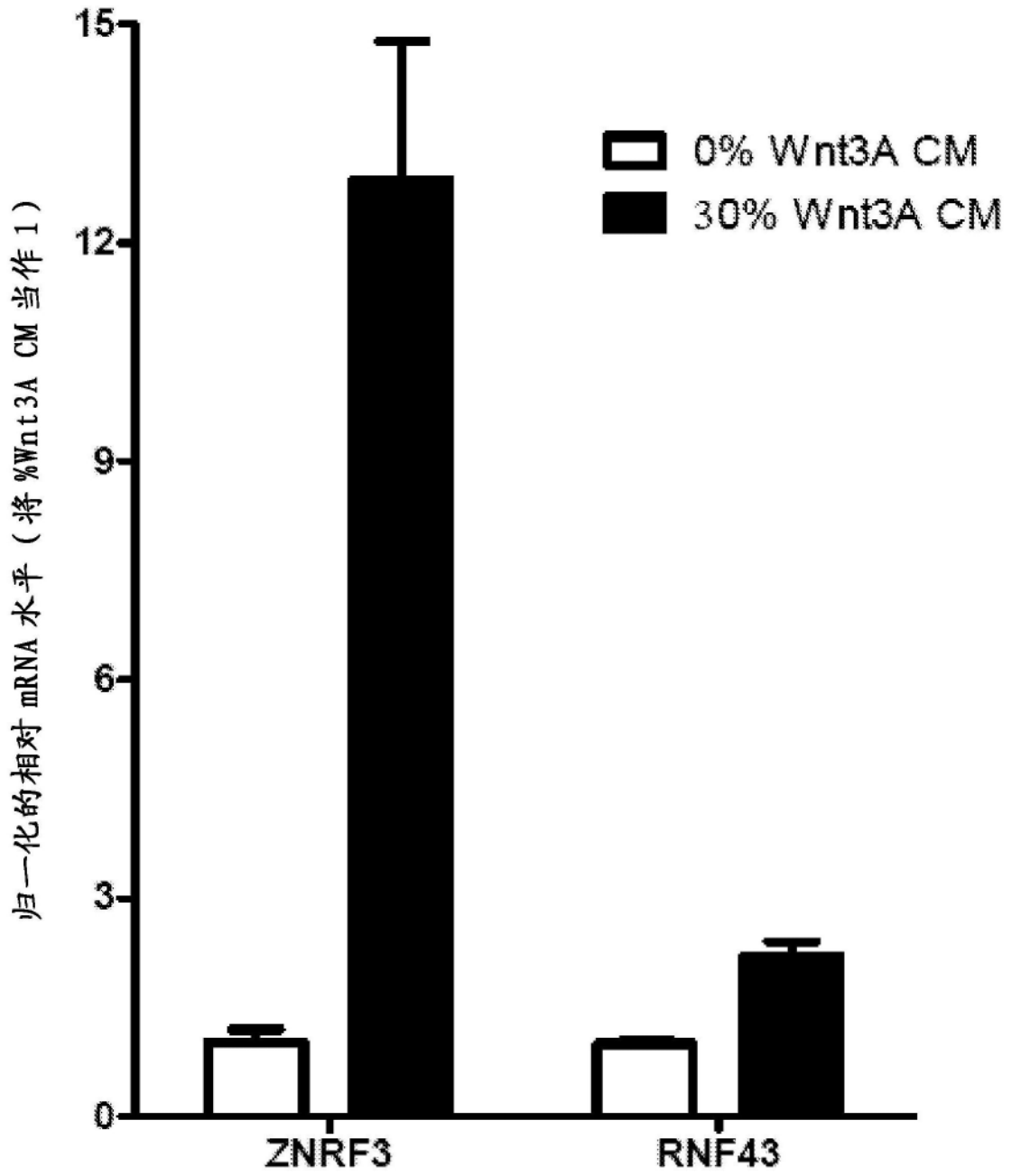


图1

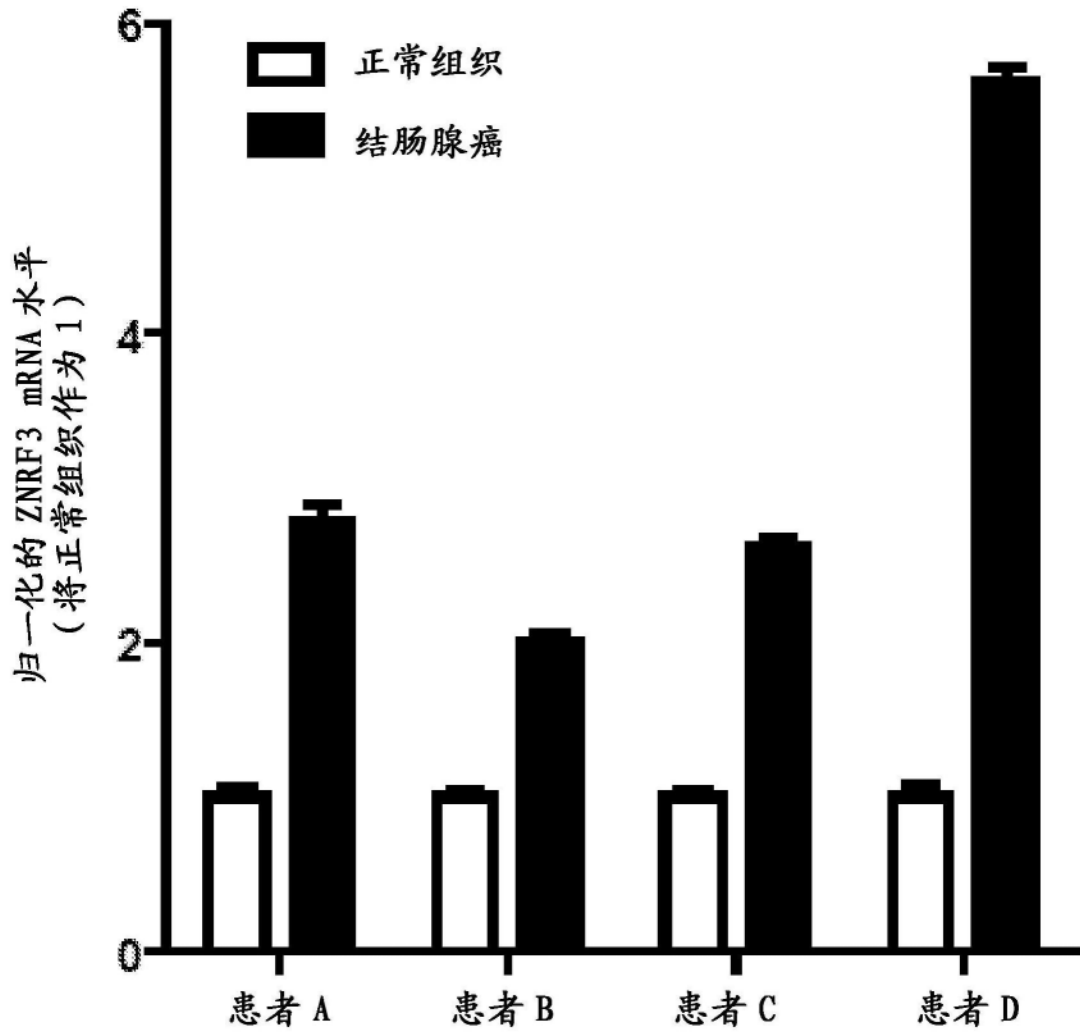


图2A

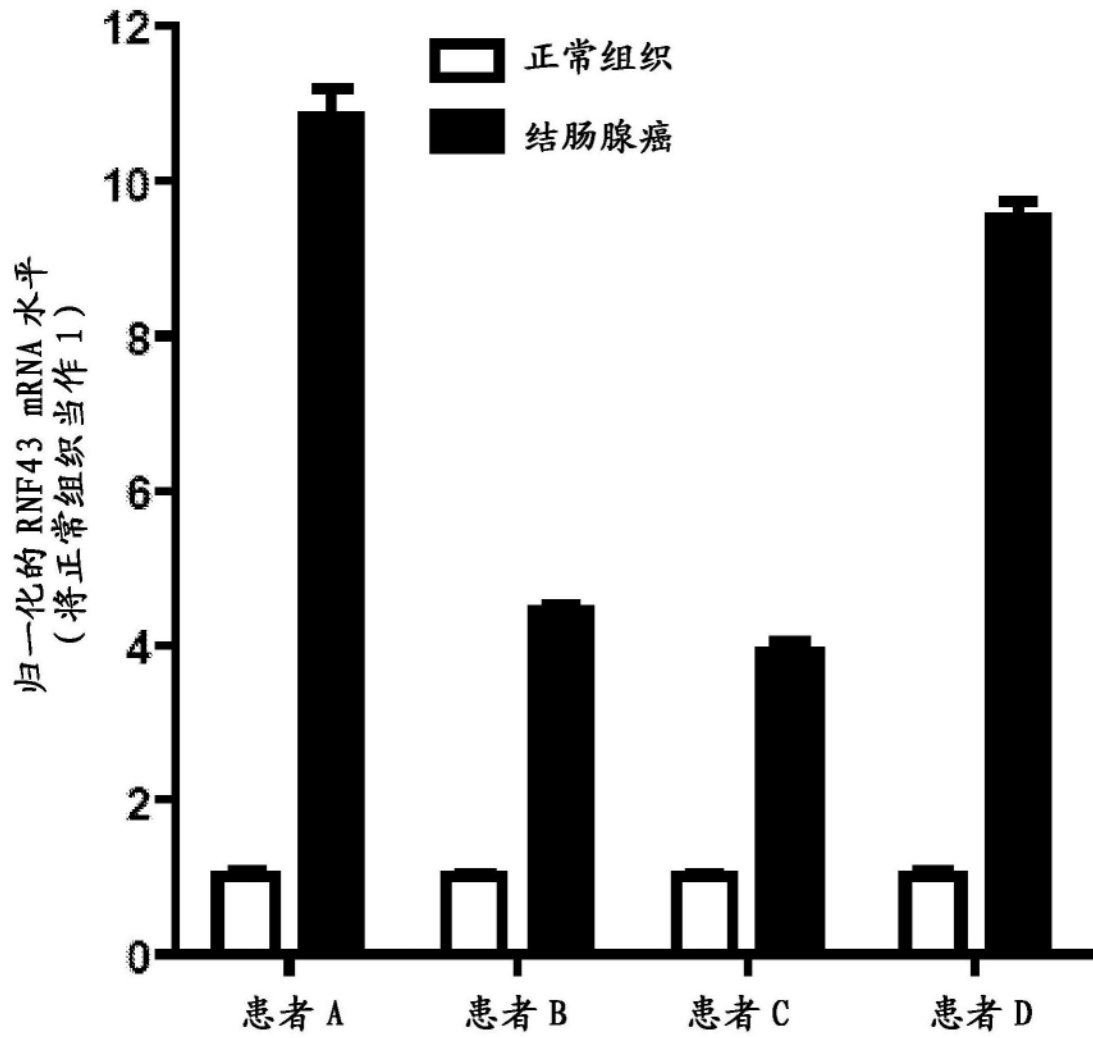


图2B

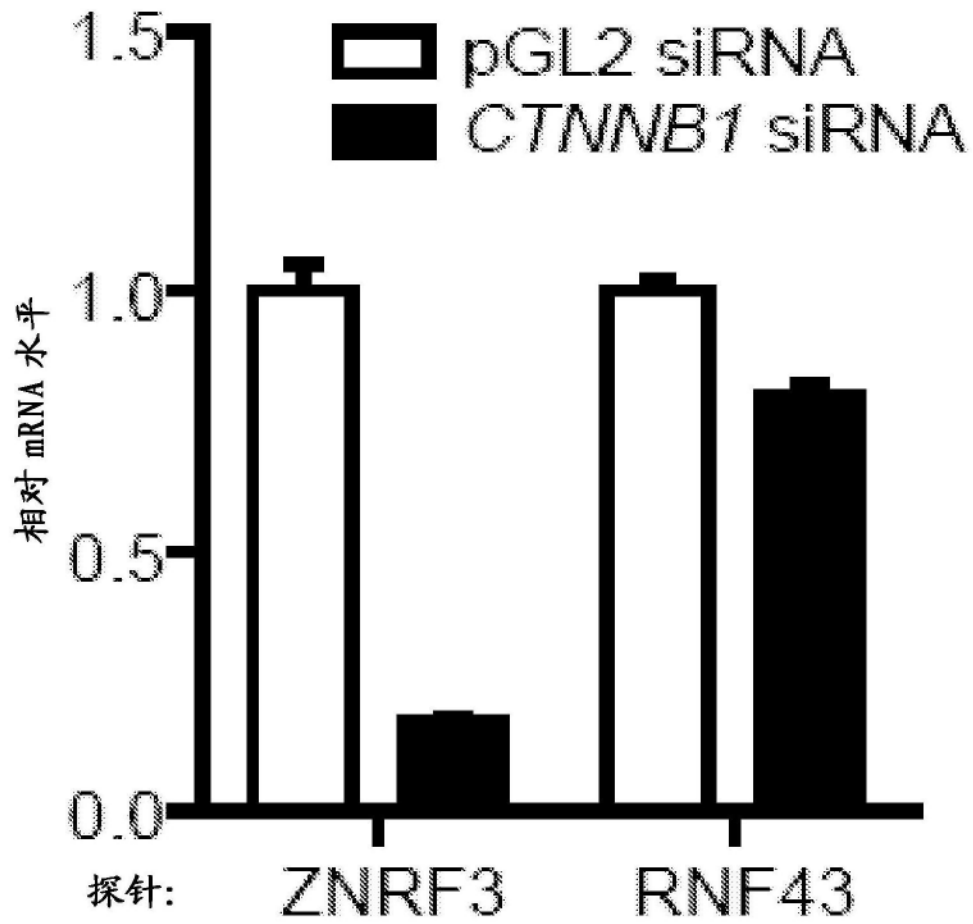


图3

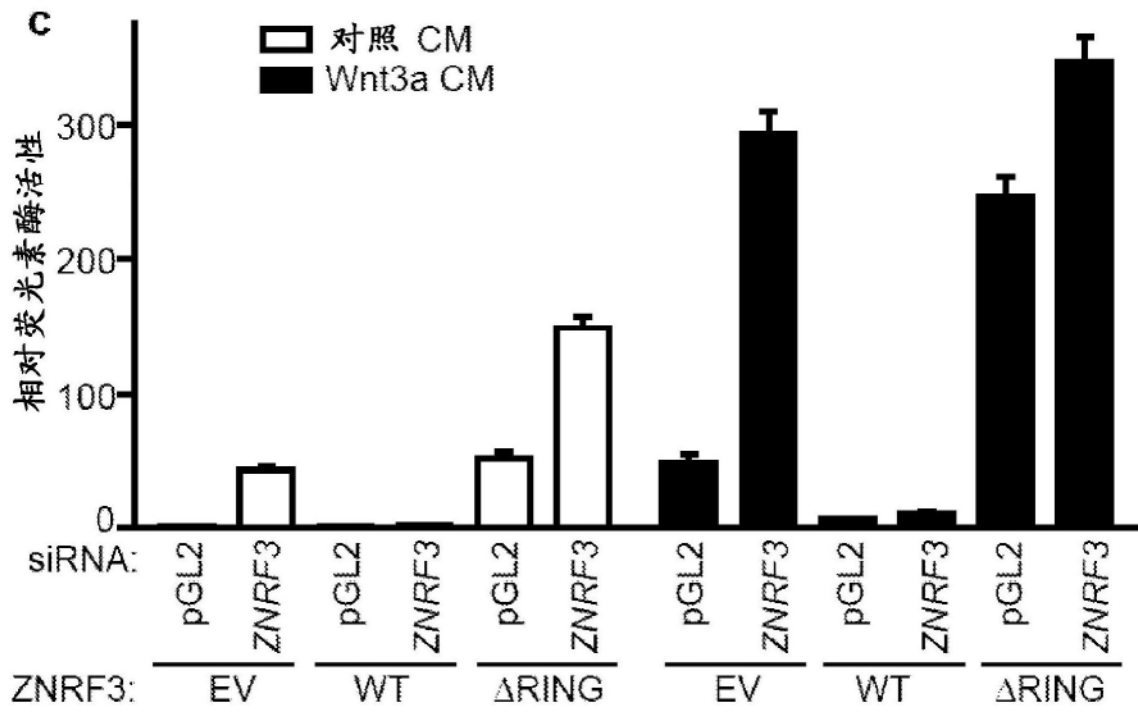


图4

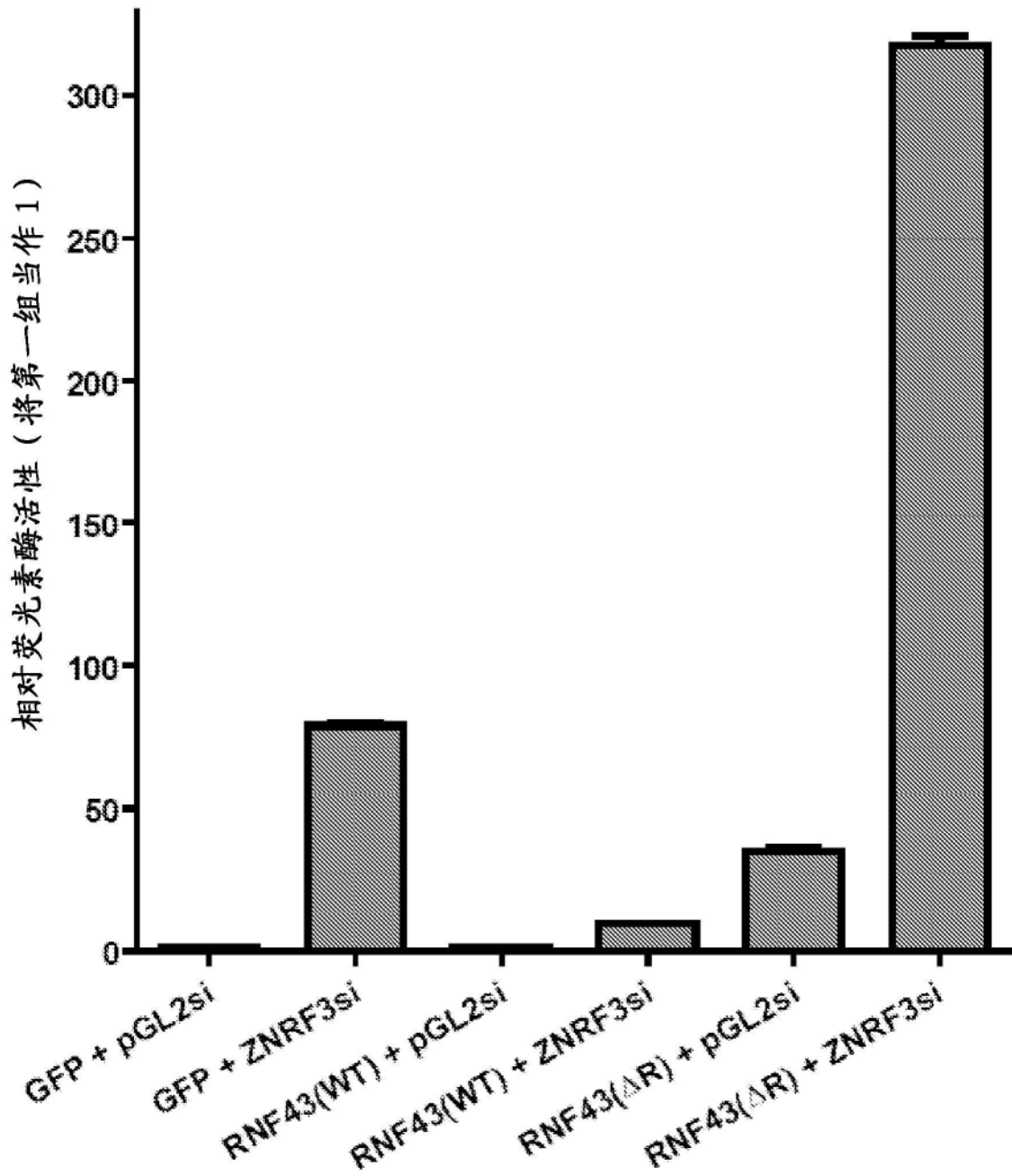


图5

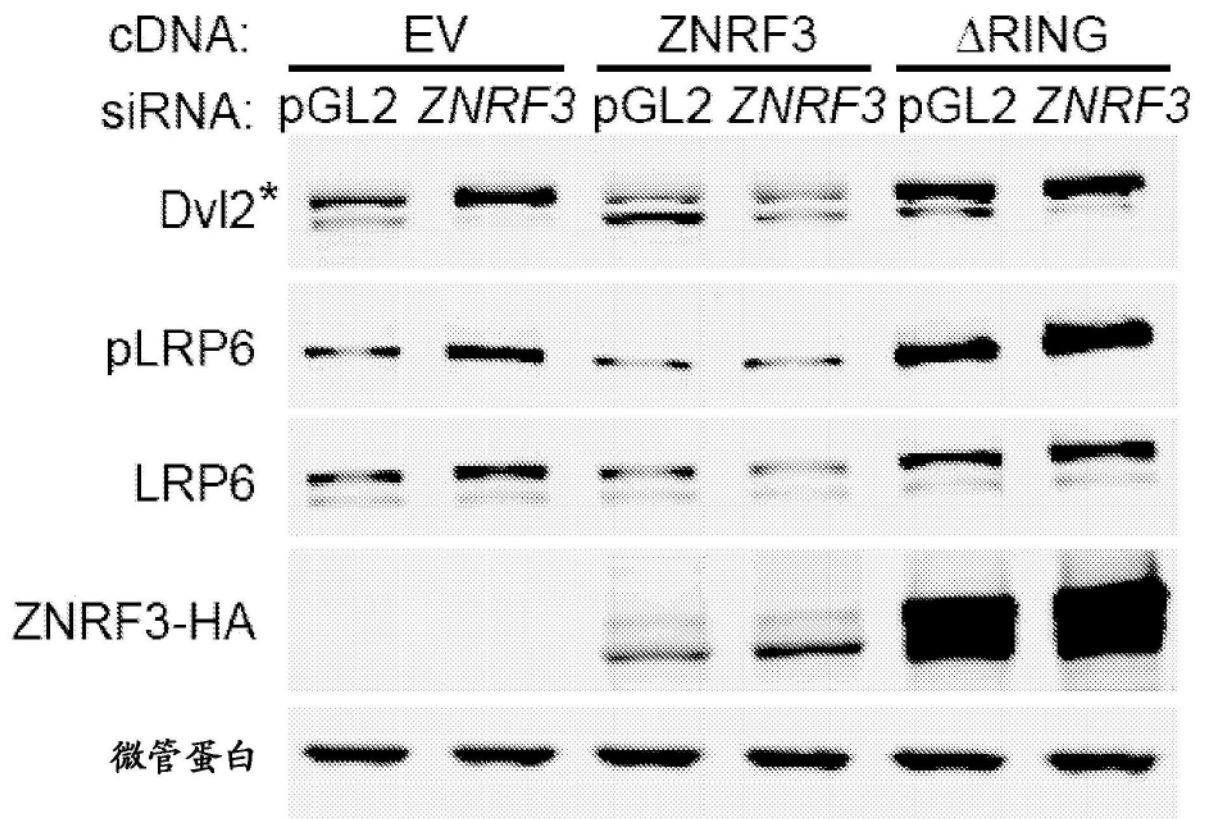


图6

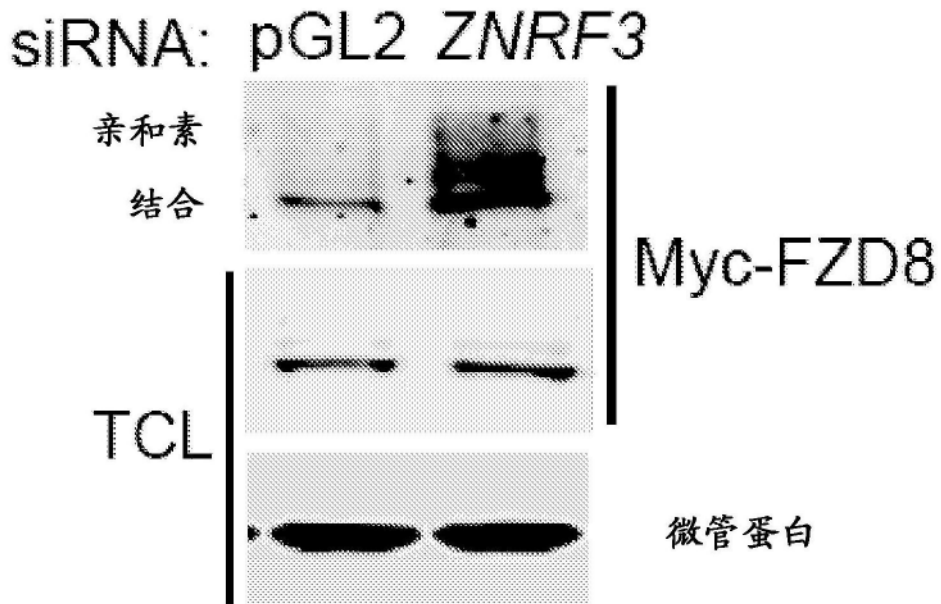


图7

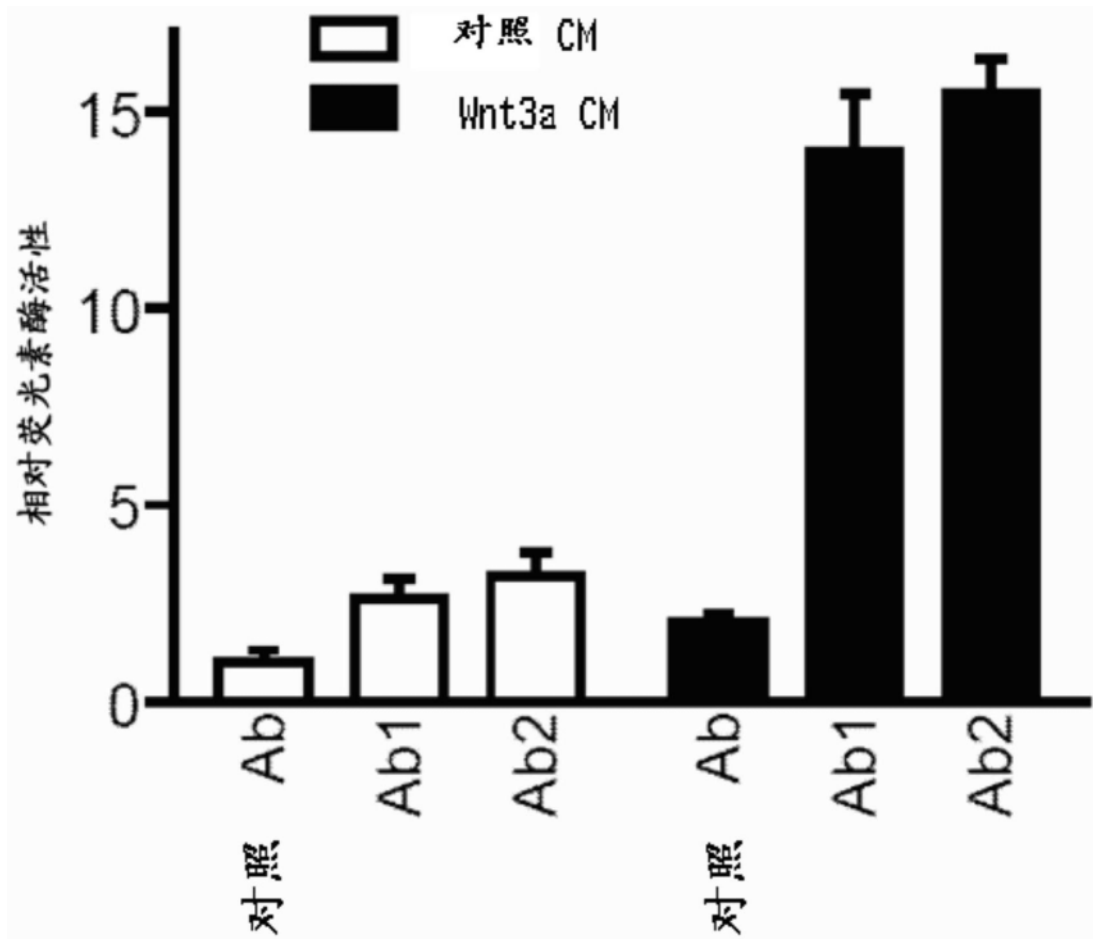


图8

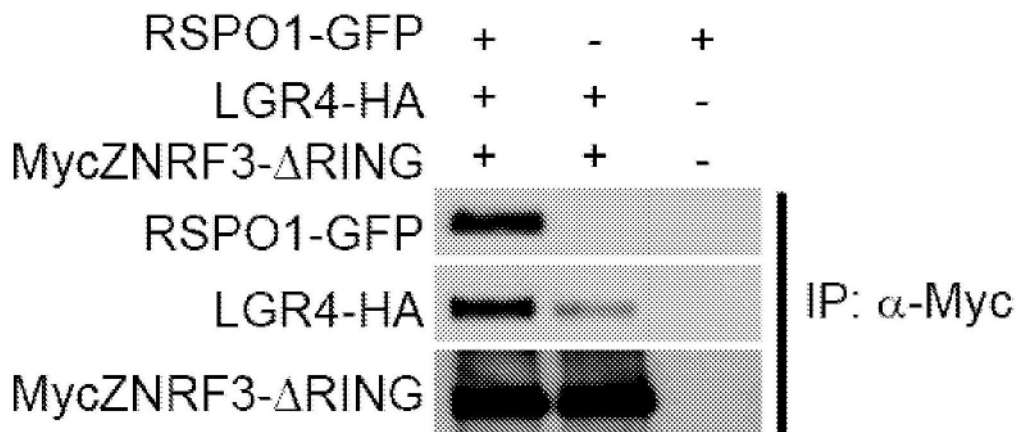


图9

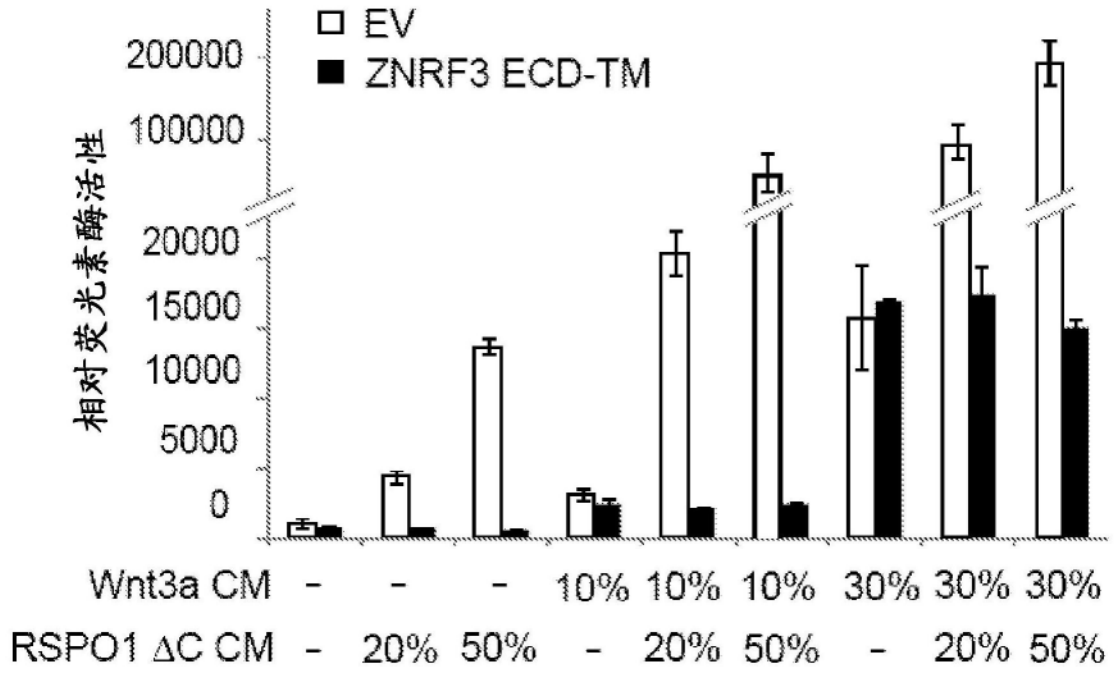


图10

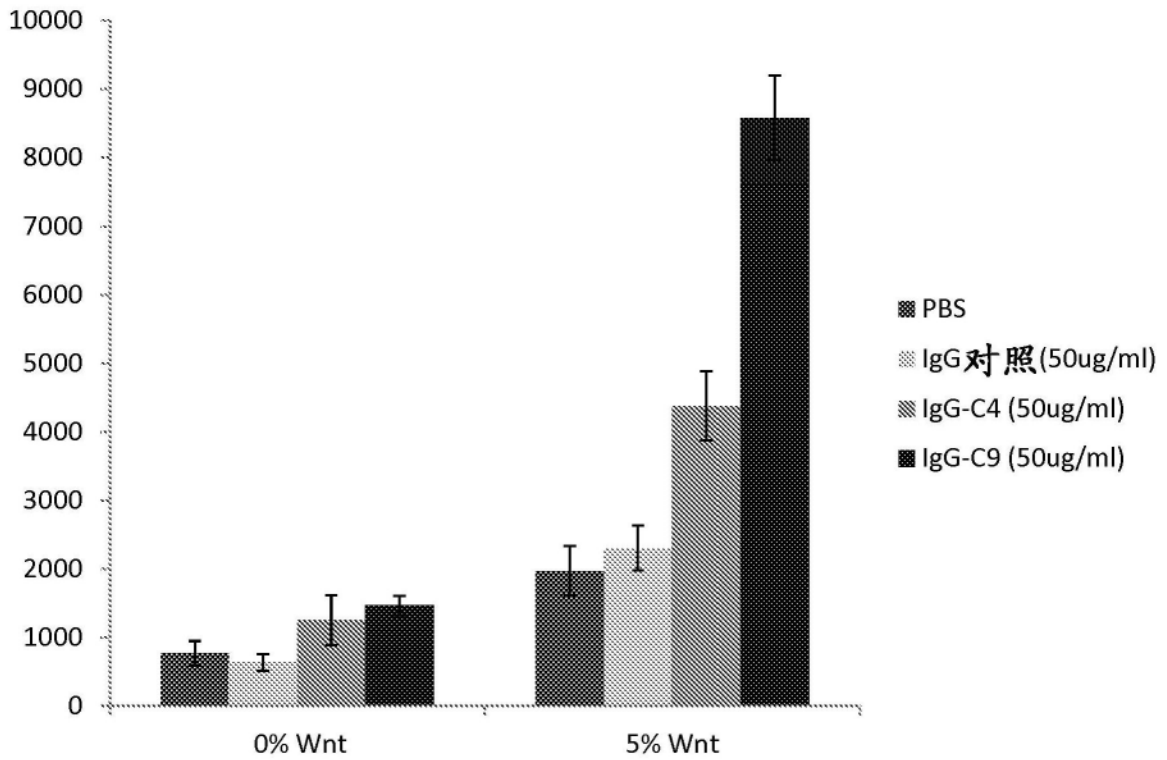


图11