



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101400406 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 29

(21) 申请号 200780009135. 2

C07K 16/18 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 01. 12

C12N 15/12 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 1/00 (2006. 01)

60/759, 216 2006. 01. 13 US

A61P 3/00 (2006. 01)

A61P 3/04 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 3/10 (2006. 01)

2008. 09. 16

A61P 19/08 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 19/10 (2006. 01)

PCT/US2007/000777 2007. 01. 12

A61P 21/00 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 29/00 (2006. 01)

W02007/084344 EN 2007. 07. 26

A61P 35/00 (2006. 01)

(73) 专利权人 诺华股份有限公司

(56) 对比文件

地址 瑞士巴塞尔

吴梧桐. 抗体形成的影响. 《现代生化药
学》. 2002, 第 674 页.

(72) 发明人 J·舒洛克 F·从 M·费什曼

S·埃滕伯格 M·巴德罗夫

M·东佐 S·厄林格

审查员 陈皓

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 凌立

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 38/17 (2006. 01)

A61K 31/675 (2006. 01)

A61K 45/00 (2006. 01)

C07K 14/47 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书90页

序列表66页 附图7页

(54) 发明名称

使用 Dickkopf-1 和 / 或 -4 抗体的组合物和
方法

(57) 摘要

本 发 明 提 供 结 合 到 蛋 白 质 靶 标
Dickkopf (DKK1) 的抗体和片段, 也提供了处理靶
标细胞 (特别是与骨质溶解性病症相关的细胞)
的使用方法和试剂盒。

1. 分离的抗体或其功能片段,其包含抗原结合区,所述抗原结合区包含可变轻链的 CDR 序列和可变重链的 CDR 序列,所述可变重链的 CDR 序列为:CDR1 = GFTFSSYWMS; CDR2 = WVSGISYSGSNTHYADSVKG;CDR3 = MGIDL DY,所述可变轻链的 CDR 序列为:CDR1 = TGTSSDVGGFNYVS;CDR2 = LMIHDGSRPS;CDR3 = QSWDVSPITA。

2. 权利要求 1 的分离的抗体或其功能片段,其中所述抗体或其功能片段以 100pm 或更小的 K_D 特异性地结合人 DKK1 中的表位,和 / 或特异性结合人 DKK1 和人 DKK4,和 / 或以小于 100pM 的 K_D 特异性地结合人、小鼠和食蟹猴 DKK1 多肽。

3. 权利要求 1 的分离的抗体或其功能片段,其中所述抗原结合区是:SEQ ID NO:11 的重链序列和 SEQ ID NO:30 的轻链序列;或 SEQ ID NO:115 的重链序列和 SEQ ID NO:111 的轻链序列。

4. 权利要求 1 的分离的抗体或其功能片段,其中所述抗原结合区是:SEQ ID NO:101 的核苷酸序列编码的重链序列和 SEQ ID NO:97 的核苷酸序列编码的轻链序列;或 SEQ ID NO:108 的核苷酸序列编码的重链序列和 SEQ ID NO:104 的核苷酸序列编码的轻链序列。

5. 权利要求 1 的分离的抗体,其包含选自 IgM 和 IgG 的支架,其中 IgG 选自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

6. 权利要求 1 的分离的抗体或其功能片段,其选自或包含完整免疫球蛋白或其 Fab 片段或 scFv 抗体片段、重链抗体和非免疫球蛋白支架上的抗原结合区,所述分离的抗体或其功能片段处于包含至少一种所述抗体或功能片段和可药用载体或赋形剂的药物组合物中,以有效量与第二种治疗物质组合使用。

7. 根据权利要求 6 的分离的抗体或其功能片段,其中第二治疗物质选自抗癌物质、抗新陈代谢物质、抗糖尿病物质、抗骨质疏松物质、抗生素、抗炎物质、生长因子和细胞因子。

8. 根据权利要求 6 的分离的抗体或其功能片段,其中第二治疗物质是唑来膦酸。

9. 药物组合物,其包含至少一种权利要求 1 的抗体或其功能片段和可药用载体。

10. 转基因动物的体细胞,其携带编码权利要求 1 的抗体或其功能片段的可变重链和可变轻链的基因,所述抗体或其功能片段选自完整免疫球蛋白或其 Fab 片段或 scFv 抗体片段、重链抗体和非免疫球蛋白支架上的抗原结合区。

11. 试剂盒,其含有权利要求 1 的抗体或其片段。

12. 权利要求 11 的试剂盒,其还含有对受试者施用的说明书。

13. 分离的核苷酸,其编码权利要求 1 的抗体或其功能片段的可变重链和可变轻链,其中所述重链序列由 SEQ ID NO:101 的核苷酸序列编码并且轻链序列由 SEQ ID NO:97 的核苷酸序列编码;或所述重链序列由 SEQ ID NO:108 的核苷酸序列编码并且轻链序列由 SEQ ID NO:104 的核苷酸序列编码。

使用 Dickkopf-1 和 / 或 -4 抗体的组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使用 Dickkopf-1 (“DKK1”) 抗体、Dickkopf-4 (“DKK4”) 抗体或其两者的组合物和方法, 以治疗 DKK 异常性相关的骨密度、新陈代谢、糖尿病、癌症等。

背景技术

[0002] Wnt 信号通路涉及胚胎发育和瘤形成过程的调控。胞外 Wnt 蛋白质负责许多细胞类型生长和分化, 所述生长和分化尤其包括成骨细胞、破骨细胞和脂肪细胞的生长、分化和调节。

[0003] 许多癌症与骨组织相关, 并可导致例如在前列腺癌中发现的那些成骨细胞病变, 或例如在肺癌、乳腺癌和多发性骨髓瘤中发现的那些骨质溶解性损伤 (例如, Tian 等人, 2003 New England J. Med. 349 :2483-2494)。

[0004] Wnt 基因家族的成员编码多种发育过程所需的分泌型糖蛋白 (Fedi 等人, 1999 J. Bio. Chem. 274 :19465-19472)。Wnt 家族成员蛋白质启动对成骨细胞生长和分化重要的信号通路, 其引起骨沉积。除了骨形成之外, 骨再吸收是由称为破骨细胞的细胞执行的进行性正常过程。反之, 核因子 κ B 配体的受体活化剂 (RANKL) 是破骨细胞性骨再吸收的最终介导者, 其在绝经后的骨质疏松发病机理中具有重要作用, 也在类风湿性关节炎、转移癌、多发性骨髓瘤、芳香化酶抑制剂治疗和抗雄激素治疗 (androgen deprivation therapy) 相关的骨丢失中具有重要作用 (参见例如 Lewiecki (2006) Expert Opin Biol Ther. 6 :1041-50)。由成骨细胞表达的护骨蛋白 (OPG) 抑制 RANKL, 因而减少破骨细胞活性和形成。合成代谢的骨形成和分解代谢的 (analytic) 骨再吸收的平衡调节正常骨密度, 合成代谢的骨形成和分解代谢的骨再吸收中一个或另一个增加分别导致骨密度增加或骨丢失增加。

[0005] Wnt 与其他细胞表面蛋白结合并由此发挥作用, 并且 Wnt 信号可促成瘤形成过程。此外, 基因改变可影响涉及称为腺瘤结肠息肉的蛋白质 β -联蛋白的细胞蛋白质复合体, 并且在患有如人结肠癌、黑素瘤和肝细胞癌的患者细胞中已检测到这些复合体, 这表明 Wnt 信号通路的异常与这些以及其他可能的人类癌症的发生有关 (Fedi 等人, 1999 J. Bio. Chem. 274 :19465-19472)。

[0006] 至少有两个家族的蛋白质抑制 Wnt 信号发放, 即分泌型卷曲相关家族和 Dickkopf (DKK) 家族。目前 DKK 家族包括四个家族成员, 即 DKK1 (人类 DNA, 登录号 NM_12242 ;PRT, 登录号 094907)、DKK2 (人类, 登录号 NM_014421 ;PRT 登录号 NP_055236)、DKK3 (人类, 登录号 NM_015881 ;PRT, 登录号 AAQ88744) 和 DKK4 (人类, 登录号 NM_014420 ;PRT, 登录号 NP_055235)。

[0007] Dickkopf-1 (DKK1) 是 Wnt/ β -联蛋白信号通路的分泌型抑制剂。参见例如 Niehrs 的美国专利申请 2005-0079173、McCarthy 的美国专利申请 2004-0234515。DKK1 具有抑制 Wnt 诱导的轴 (axis) 复制能力, 并且遗传分析显示 DKK1 向上游抑制 Wnt 信号发放。暴露于增加水平的 DKK1 后, 对小鸡和小鼠胚胎中骨结构丢失的影响证明 DKK1 在骨骼发育中也很重要 (Tian 等人, 2003 New England J. Med. 349 :2483-2494)。增加的 DKK1 血清水平已与前

列腺癌相关,并且在患有多发性骨髓瘤的患者骨髓血浆和外周血中增强的 DKK1 和 RANKL 水平与病灶性的骨病变相关,参见例如 Tian2003, OMIM 登录号 605189。DKK1 在脂肪形成、软骨形成、胃肠道上皮增生、风湿症相关的骨丢失和毛囊基板形成的开始中也发挥作用。OMIM 登录号 605189。

[0008] Dickkopf-4(DKK4) 未被良好表征但同样是 Wnt 途径的分泌型抑制剂。已显示 DKK4 在患有阿尔茨海默病患者的斑点中沉积并且在肌肉中表达。Wnt 在肌肉形成中的作用未知,因此本文假定 DKK4 对肌肉形成具有抑制作用。

[0009] 需要治疗癌症和骨密度异常的组合物和方法,其包括干扰或中和 DKK1 和 / 或 DKK4 介导的 Wnt 信号发放的拮抗作用的这类物质。

[0010] 发明概述

[0011] 本文本发明的实施方案提供抗体或其选择性结合的抗原结合部分,所述部分中和 DKK1 和 / 或 DKK4 多肽或其片段。在优选的实施方案中,抗体是 DKK1/4 中和抗体。在多个实施方案中,DKK1/4 中和抗体的抗原结合部分未结合 DKK2 或 DKK3。

[0012] 在一个实施方案中抗体或其抗原结合部分置于免疫球蛋白样支架内,如选自例如人的、人源化的、人改造的 (humaneer)、鲨鱼或骆驼支架的构架,所述抗体或其抗原结合部分和 / 或还可是重组、嵌合或 CDR 移植的抗体。例如,在本发明中旨在设计使人抗鼠抗体应答最小化的技术 (Kalobios 的人改造技术或 PDL 的人源化技术)。此外,DKK1 或 DKK4 特异性的抗原结合部分也可在非免疫球蛋白样支架内,包括例如,置于 Adnectin、血纤蛋白原、源自锚蛋白的重复序列等类型的构架内。

[0013] 在具体实施方案中,DKK1 抗体表征为具有特异性靶向蛋白 DKK1 的抗原结合区,并且该抗体或功能片段结合到 DKK1 或其片段。在相关的实施方案中,DKK4 抗体表征为具有特异性靶向蛋白 DKK4 的抗原结合区,并且该抗体或功能片段结合到 DKK4 或其片段。在相关的实施方案中,DKK4 抗体表征为具有特异性靶向蛋白 DKK4 的抗原结合区,并且该抗体或功能片段结合到 DKK4 或其片段。在优选的实施方案中,抗体或其抗原结合部分结合至 DKK1 和 DKK4 多肽,而非 DKK2 或 DKK3 多肽。

[0014] 在另一实施方案中抗体或其抗原结合部分是单克隆的。在另一实施方案中,抗原结合部分是多克隆的。在多个实施方案中,DKK1 抗体或其抗原结合部分结合由 DKK1 或 DKK4 多肽的 30 个连续氨基酸组成的肽。

[0015] 在相关的实施方案中,至少通过下列一种检测来测定对 DKK1 或 DKK4 的结合:抑制 Wnt 信号转录的 DKK1 或 DKK4 拮抗作用;表面等离子共振共振亲合测定,酶联免疫吸收试验结合;基于电化学发光的结合分析;FMAT、SET、SPR、ALP、TopFlash、生物标志物如人骨钙蛋白 (OCN)、前胶原 1 型含氮前肽 (PINP) 和护骨蛋白 (OPG) 的血清浓度,以及结合到细胞表面的受体如 Frizzled (Fz)、LRP (LRP5/6) 或 Kremen (Krm) 的血清浓度。在某些实施方案中,DKK1 抗体或抗原结合部分具有至少一种以下特性:对 DKK1 比对人类 DKK2 或 DKK3 的选择性至少多 10^3 、 10^4 或 10^5 倍;以小于 100nM、50nM、10nM、1.0nM、500pM、100pM、50pM 或 10pM 的 K_{on} 结合到 DKK1 或 DKK4;并且具有小于 10^{-2} 每秒、 10^{-3} 每秒、 10^{-4} 每秒或 10^{-5} 每秒的 DKK1 解离率 (off-rate)。

[0016] 在相关的实施方案中,本发明的抗体与 DKK1 和 / 或 DKK4 竞争结合 LRP5/6。在相关的实施方案中,本发明的抗体与 DKK1 和 / 或 DKK4 竞争结合 Krm。

[0017] 在另一实施方案中,本发明提供任一上述抗体或这些抗体的功能片段的分离的抗原结合区,以及这些区域的氨基酸序列。因此在某些实施方案中,本发明提供选自 SEQ ID NO:2-20 和 SEQ ID NO:40-72 的分离的氨基酸序列以及这些序列的保守的或人改造的变体。

[0018] 此外,在某些其他实施方案中,本发明提供氨基酸序列 SEQ ID NO:2-20、65-72,以及这些序列的保守的或人改造的变体,所述氨基酸序列提供各自是 H-CDR-3 的分离的抗原结合区。

[0019] 在相关的实施方案中,分离的抗原结合区是具有选自 SEQ ID NO:2-20、57-64 的氨基酸序列以及这些序列的保守的或人改造的变体的 H-CDR2 区。在另一相关实施方案中,分离的抗原结合区是描述于选自以下序列的共有 H-CDR2 区:具有氨基酸序列 GISGSGSYTTYADSVKF 的 SEQ ID NO:40,具有氨基酸序列 GISYYGGNTYYADSVKF 的 SEQ ID NO:41,具有氨基酸序列 GISYYGGSTYYADSVKF 的 SEQ ID NO:42,以及这些序列的氨基酸残基的保守的或人改造的变体。

[0020] 在某些实施方案中,提供的新序列是 SEQ ID NO:2-5、8-11、20、49-56,以及这些序列的保守的或人改造的变体,其提供的分离的抗原结合区是 H-CDR1 区。

[0021] 在相关的实施方案中,分离的抗原结合区是具有选自以下氨基酸序列的共有 H-CDR1 区:氨基酸序列(使用单字母氨基酸代码)GFTFSSYGMT(SEQ ID NO:43)、GFTFNSYGMT(SEQ ID NO:44)、GFTFSNYGMT(SEQ ID NO:45)、GFTFSSYWMT(SEQ ID NO:46)、GFTFSSYAMT(SEQ ID NO:47)、GFTFSSYGMS(SEQ ID NO:48)以及任意这些序列的保守的或人改造的变体。

[0022] 在另一实施方案中,本发明提供的氨基酸序列是具有 L-CDR3 区的分离的抗原结合区,例如选自 SEQ ID NO:21-39、89-96,以及这些序列的保守的或人改造的变体的氨基酸序列。在另一相关的实施方案中,分离的抗原结合区是具有选自 SEQ ID NO:21-39、73-80,以及这些序列的保守的或人改造的变体的氨基酸序列的 L-CDR1 区。在另一实施方案中,分离的抗原结合区是具有选自 SEQ ID NO:21-39、81-88,以及这些序列的保守的或人改造的变体的氨基酸序列的 L-CDR2 区。

[0023] 在某些实施方案中,分离的抗原结合区是具有选自 SEQ ID NO:21-39,以及这些序列的保守的或人改造的变体的氨基酸序列的可变轻链。

[0024] 在另一实施方案中,本发明提供选自 SEQ ID NO:97-103 的核苷酸序列。在相关的实施方案中,每个这些核苷酸序列编码氨基酸序列并且这些编码的氨基酸序列的保守的或人改造的变体也在本发明的范围内。在另一相关的实施方案中,每个 SEQ ID NO:97-100 的核苷酸序列编码抗原结合轻链。在另一相关的实施方案中,每个 SEQ ID NO:101-103 的核苷酸序列编码抗原结合重链。在另一相关的实施方案中,在细胞内进一步将这些核苷酸序列中的每一个最优化以用于表达。优选的细胞包括但不限于,例如中国仓鼠(如 CHO)细胞、杆状病毒、酵母、细菌、骨髓瘤细胞,和/或智人(*H. sapiens*)。

[0025] 优选地,将序列进行表达、生产以及临床用途的优化。临床使用优化的特征包括但不限于,例如,半寿期、药物代谢动力学(PK)、抗原性、效应功能、FcRn 清除,以及包括抗体依赖细胞的细胞毒性(ADCC)或补体依赖细胞毒性(CDC)活性的患者应答。

[0026] 在另一实施方案中,本发明提供具有由选自 SEQ ID NO:101-103 的核苷酸序列编

码的重链的分离的抗原结合区。在相关的实施方案中,本发明提供具有由选自 SEQ ID NO: 97-100 的核苷酸序列编码的轻链的分离的抗原结合区。在另一相关的实施方案中,本发明提供具有由选自 SEQ ID NO: 97-100 的核苷酸序列编码的轻链,以及由选自 SEQ ID NO: 101-103 的核苷酸序列编码的重链的分离的抗原结合区。

[0027] 在某些实施方案中,本发明提供选自 SEQ ID NO: 104-110 的核苷酸序列。在相关的实施方案中,这些核苷酸序列中的每一个编码氨基酸序列,并且本文这些氨基酸序列保守的或人改造变体也在本发明的范围内。在另一相关的实施方案中,SEQ ID NO: 104-107 的核苷酸序列中的每一个编码抗原结合轻链。在另一相关的实施方案中,SEQ ID NO: 108-110 的核苷酸序列中的每一个编码抗原结合重链。在另一相关的实施方案中,将这些核苷酸序列中的每一个进行表达和 / 或临床用途的优化。

[0028] 在另一实施方案中,本发明提供分离的抗原结合区,其具有由选自 SEQ ID NO: 108-110 的核苷酸序列编码的重链。在另一相关的实施方案中,本发明提供分离的抗原结合区,其具有由选自 SEQ ID NO: 104-107 的核苷酸序列编码的轻链。在另一相关的实施方案中,本发明提供分离的抗原结合区,其具有由选自 SEQ ID NO: 104-107 的核苷酸序列编码的轻链,以及由选自 SEQ ID NO: 108-110 的核苷酸序列编码的重链。

[0029] 在另一实施方案中,本发明提供选自 SEQ ID NO: 111-117 的氨基酸序列,并且提供这些序列的保守变体。在相关的实施方案中,每一 SEQ ID NO: 111-114 描述抗原结合轻链。在另一实施方案中,每一 SEQ ID NO: 115-117 描述抗原结合重链。在另一相关的实施方案中,将氨基酸序列进行表达和 / 或临床用途的优化。

[0030] 在另一实施方案中,本发明提供分离的抗原结合区,其具有描述于选自 SEQ ID NO: 115-117 的氨基酸序列中的重链,并且提供这些序列的保守变体。在相关的实施方案中,本发明提供分离的抗原结合区,其具有描述于选自 SEQ ID NO: 111-114 的氨基酸序列中的轻链,并且提供这些序列的保守变体。在另一相关的实施方案中,本发明提供分离的抗原结合区,其具有描述于选自 SEQ ID NO: 115-117 的氨基酸序列中的重链 (并且提供这些序列的保守变体), 以及描述于选自 SEQ ID NO: 111-114 的氨基酸序列中的轻链 (并且提供这些序列的保守变体)。

[0031] 在另一实施方案中,本发明提供选自 SEQ ID NO: 120-121 的核苷酸序列,和 / 或分离的抗原结合区,其具有由各核苷酸序列编码的轻链或重链可变区。在相关的实施方案中,每个这些核苷酸序列编码氨基酸序列,并且这些氨基酸序列的保守的或人改造的变体也在本发明的范围内。在另一相关的实施方案中,核苷酸序列 SEQ ID NO: 120 编码抗原结合轻链。在另一相关的实施方案中,核苷酸序列 SEQ ID NO: 121 编码抗原结合重链。在另一相关的实施方案中,进一步将每个这些核苷酸序列进行表达和 / 或临床用途的优化。

[0032] 在某些实施方案中,本发明提供选自 118-119 的氨基酸序列以及这些序列的保守的或人改造的变体。在相关的实施方案中,SEQ ID NO: 118 描述轻链的抗原结合可变区。在另一相关的实施方案中,SEQ ID NO: 119 描述重链的抗原结合可变区。在另一相关的实施方案中,将氨基酸序列进行表达和 / 或临床用途的优化。

[0033] 在另一实施方案中,本发明提供与描述于 SEQ ID NO: 2-39 的 CDR 区具有至少 60、70、80、90、95、96、97、98 或 99% 同一性的氨基酸序列。在相关的实施方案中,本发明提供与描述于 SEQ ID NO: 111-120 的序列具有至少 60、70、80、90、95、96、97、98 或 99% 同一性的氨

核酸序列。在另一相关的实施方案中,本发明提供与描述于 SEQ ID NO :97-110 和 120-121 中的序列具有至少 60、70、80、90、95、96、97、98 或 99% 同一性的核苷酸序列。

[0034] 在某个实施方案中,任一上述分离的抗体都是 IgG。在相关的实施方案中,任一上述分离的抗体都是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在另一实施方案中,抗体是 IgE、IgM、IgD 或 IgA。在相关的实施方案中,本发明选自单克隆抗体组合物或多克隆抗体组合物。在另一实施方案中,抗体是嵌合的、人源化的、人改造的、重组的等。在另一实施方案中,本发明提供具有 DKK1 表位特异性的抗原结合区的分离的人或人源化抗体或其功能片段,并且所述抗体或功能片段结合 DKK1 或 DKK4,或阻止 DKK1 或 DKK4 结合细胞表面受体(例如受体如 LRP5/6, Kremen, Frizzled)。在某些实施方案中抗体或其片段预防、治疗或改善骨质溶解性损伤的发展。在其他实施方案中,本发明的抗 DKK 组合物预防、治疗或改善 DKK1 或 DKK4 相关的癌症或疾病。

[0035] 在相关的实施方案中,本发明提供分离的人或人源化抗体或其功能片段,具有靶向 DKK1 或 DKK4 的表位的特异性抗原结合区,并且该表位包含来自多肽片段的六个或更多个氨基酸残基,所述多肽片段含有 DKK1 和 / 或 DKK4 的 CYS1- 交联(linker)-CYS2 结构域。在相关的实施方案中,表位是构象表位。在优选的实施方案中,表位存在于 CYS2 结构域内。在具体实施方案中,表位包括修饰的氨基酸残基。在相关的实施方案中,表位包含至少一个糖基化的氨基酸残基。

[0036] 功能片段包括 Fv 和 Fab 片段(包括单链型,如 scFv),以及抗体的其他抗原结合区,所述抗体包括那些连接到非免疫球蛋白支架的抗体、重链抗体如骆驼和鲨鱼抗体,以及纳米抗体(nanobody)。在相关的实施方案中,上述分离的抗体是 IgG。在另一相关的实施方案中,上述分离的抗体是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在另一实施方案中,抗体是 IgE、IgM 或 IgA。在相关的实施方案中,本发明是多克隆抗体组合物。

[0037] 在另一实施方案中,本发明提供药物组合物,其具有至少一个任一上述抗体或功能片段或保守变体,以及可药用载体或赋形剂。

[0038] 在另一实施方案中,本发明提供转基因动物,其具有编码任一上述抗体或其功能片段的基因。

[0039] 在某些实施方案中,本发明提供治疗与 DKK1 或 DKK4 表达相关的障碍或病症的方法。本文所用的“DKK1 相关疾病”或“DKK4 相关疾病”包括但不限于,骨质溶解性损伤,特别是与骨髓瘤(尤其是多发性骨髓瘤)相关的骨质溶解性损伤,或与骨癌、乳腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝细胞癌、上皮癌、食道癌、脑癌、肺癌、前列腺癌或胰腺癌或其转移瘤相关的骨质溶解性损伤;与移植相关的骨丢失。另外的疾病或障碍包括但不限于,例如,骨肉瘤、前列腺癌、肝细胞癌(HCC)、骨髓瘤包括多发性骨髓瘤、糖尿病、肥胖症、肌萎缩、阿尔茨海默病、骨质疏松症、骨质减少、风湿病、结肠炎和 / 或不希望的脱发。该方法涉及在受试者需要时向其施用有效量的任一上述药物组合物。

[0040] 在相关的实施方案中,待治疗的障碍或病症是骨密度异常性。在另一相关的实施方案中,待治疗的骨密度异常性是受试者中骨质溶解性损伤的存在。

[0041] 在另一实施方案中,待治疗的障碍或病症是骨质疏松病症,如与癌症相关的骨质溶解性损伤。在相关的实施方案中,治疗的癌症是骨髓瘤,如多发性骨髓瘤,或骨癌、乳腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝细胞癌、上皮癌、食道癌、脑癌、肺癌、前列腺癌或胰腺癌或其转移瘤。

在另一实施方案中,骨质疏松病症是骨质疏松症或骨质减少或骨肉瘤。

[0042] 在某些实施方案中,任一上述方法还涉及施用化疗物质。在相关的实施方案中,化疗物质是抗癌物质。在另一相关的实施方案中,化疗物质是抗骨质疏松物质。

[0043] 在另一实施方案中,本发明提供处理靶细胞的方法,该方法包括以任一上述抗体或其功能片段阻碍 DKK1 或 DKK4 与细胞的相互作用。通常,靶细胞具有结合 DKK1 或 DKK4 的受体。在一个实施方案中,靶细胞是成骨细胞,其中以本发明的中和抗 DKK1/4 组合物进行处理将增加增殖并刺激骨形成。在一个实施方案中,靶细胞是肌细胞,其中处理将阻碍肌萎缩。

[0044] 在相关的实施方案中,本方法还涉及以化疗物质或辐射处理具有靶细胞的患者。在相关的实施方案中,施用或接触后,上述任一方法还包括观察骨质溶解性损伤发展的改善或延缓。

[0045] 在另一实施方案中,本发明提供识别血清中 DKK1 或 DKK4 的方法。该方法涉及以另外具有可检测标记的任一上述抗体或抗体片段检测 DKK1 或 DKK4。该标记是放射性的、荧光的、磁性的、顺磁性的或化学发光的。

[0046] 在另一实施方案中,任一上述人或人源化抗体或抗体片段都是合成的。

[0047] 在另一实施方案中,本发明提供任一上述抗体或这些抗体的功能片段以及其他治疗物质的药物组合物。其他治疗物质可选自抗癌物质、抗骨质疏松物质、抗生素、抗新陈代谢物质、抗糖尿病物质、抗炎物质、抗血管生成物质、生长因子和细胞因子。

[0048] 本发明还涉及以药物组合物在哺乳动物特别是人类中预防或治疗增殖性疾病或诸如癌症的疾病的方法,其中所述组合物包括:

[0049] (a) 本发明的 DKK1/4 中和物质;和

[0050] (b) 一种或多种药物活性物质;

[0051] 其中至少一种药物活性物质是抗癌治疗剂。

[0052] 本发明还涉及药物组合物,其包括:

[0053] (a) DKK1/4 中和抗体;

[0054] (b) 药物活性物质;和

[0055] (c) 可药用载体;

[0056] 其中至少一种药物活性物质是抗癌治疗剂。

[0057] 本发明还涉及商业性包装或产品,其包括:

[0058] (a) DKK1/4 中和抗体的药物制剂;和

[0059] (b) 用于同时、并列、分别或顺次使用的药物活性物质的药物制剂;其中至少一种药物活性物质是抗癌治疗剂。

[0060] 在某一实施方案中,本发明提供抗体,其具有选自 SEQ ID NO:2-20 的重链的第一氨基酸序列(其 CDR 区与具有 SEQ ID NO:2-20 的 CDR 区具有至少 60、70、80、90、95、96、97、98 或 99% 序列同一性),以及选自 SEQ ID NO:21-39 的轻链的第二氨基酸序列(其 CDR 区与 SEQ ID NO:21-39 所示的 CDR 区具有至少 60、70、80、90、95、96、97、98 或 99% 序列同一性)。

[0061] 在另一实施方案中,本发明提供免疫连接物,其由为上述抗体或片段的第一成分,和含有第二氨基酸序列的第二成分制成。例如,免疫连接物是细胞毒素,或者免疫连接物是

结合蛋白或具有不同于 DKK1 或 DKK4 的靶标结合特异性的抗体。例如,不同于 DKK1 或 DKK4 结合特异性的靶标是癌细胞表面上的肿瘤抗原或肿瘤相关蛋白质。

[0062] 在某些实施方案中,本发明提供任一上述抗体作为双重特异性抗体。

[0063] 在另一实施方案中,本发明提供含有任一上述抗体或抗体片段的试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒另外包含可药用载体或赋形剂。在另一相关的实施方案中,试剂盒中任一上述抗体以单位剂量存在。在另一实施方案中,试剂盒是 ELISA 诊断试剂盒。在相关的实施方案中,试剂盒包括向受试者施用任一上述抗体的说明书。

[0064] 附图简述

[0065] 图 1 图示当未洗涤的小珠与那些不同 **HuCAL**[®] 严格性洗涤的小珠相比, Strep-Tactin 包被的小珠中 His-Strep 标记的 DKK1 无明显损失。

[0066] 图 2 条形图图示实施例 3 提供的使用 100 μ l 明亮荧光素酶试剂的 Wnt 活性试验结果。

[0067] 图 3 图示酶联免疫吸附试验 (ELISA)。荧光在 TECAN Spectrafluor 平板读数仪中测定并且显示结合曲线。

[0068] 图 4 图示实施例 6 提供的标准 Wnt3a 依赖性 TCF/LEF luc 报告基因试验。

[0069] 图 5 图示 TCF/LEF luc 报告基因试验的改良版本,显示由 Kremen 共同受体蛋白的共表达介导的对 DKK1 灵敏性的高度提高。

[0070] 图 6A 图示结合到 DKK1 的抗 DKK1/4 抗体的表面纤维蛋白溶酶共振测量法。图 6B 是计算出的结合亲和力和动力学值的列表。

[0071] 图 7A 图示用于表位作图的全长和截短的 DKK1。图 7B 描述本发明抗体与图 7A 的 DKK1 蛋白质和片段的结合。

[0072] 图 8 图示在竞争性 ELISA 试验中 DKK1/4 抗体结合。

[0073] 图 9 图示 Wnt 调节基因转录下游 DKK1/4 抗体相关的再激活。

[0074] 图 10 图示 DKK1/4 抗体逆转 DKK1 抑制的 ALP 分泌。

[0075] 图 11 图示 DKK1/4 抗体对异种移植的体内影响。

[0076] 图 12 图示体内 DKK1/4 抗体相关的骨密度增加。

[0077] 图 13 图示比较唑来膦酸 (Zometa) 与 DKKI/4 抗体的抗溶骨效应。

[0078] 图 14 图示 DKKI/4 抗体对骨合成代谢的剂量依赖效应。

[0079] 发明详述

[0080] 本发明涉及分离的 DKK1/4 抗体,特别是人抗体,其特异性结合 DKK1 或 DKK4 并抑制 DKK1 或 DKK4 的功能性质的。在优选的实施方案中,DKK1/4 抗体不特异性结合 DKK2 或 DKK3。在某些实施方案中,本发明的抗体衍生自特定重链和轻链序列,和 / 或包括特定结构特征,如包含特定氨基酸序列的 CDR 区。本发明提供分离的抗体、制备这类抗体的方法、免疫连接物和包括这些类抗体的双特异性分子以及包含抗体的药物组合物、本发明的免疫连接物或双特异性分子。本发明也涉及使用抗体以抑制与 DKK1 或 DKK4 相关的障碍或病症的方法。预期的疾病和障碍包括但不限于,骨质溶解性损伤,特别是与骨髓瘤 (特别是多发性骨髓瘤) 相关的骨质溶解性损伤,或与骨癌、乳腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝细胞癌、上皮癌、食道癌、脑癌、肺癌、前列腺癌或胰腺癌或其转移瘤相关的骨质溶解性损伤;与移植相关的骨丢失。其他的疾病或障碍包括但不限于,例如,骨肉瘤、前列腺癌、肝细胞癌 (HCC)、包括

多发性骨髓瘤的骨髓瘤、糖尿病、肥胖症、肌萎缩、阿尔茨海默病、骨质疏松症、骨质减少、风湿病、结肠炎和 / 或不希望的脱发。

[0081] 以便更易于理解本发明,首先定义某些术语。在详述描述中列出其他定义。

[0082] 术语“免疫应答”指淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用,其导致选择性损害、破坏或从人体清除侵入性病原体、受病原体感染的细胞或组织、癌性细胞,或者(在自身免疫或病理炎症的情况下)正常人细胞或组织。

[0083] “信号转导途径”指多种信号转导分子之间的生物化学关系,所述分子在信号从细胞的一部分传递到细胞的另一部分中起作用。本文所用的短语“细胞表面受体”包括例如,分子或分子复合体,其能够接受信号并且能够将这种信号经细胞的质膜传递。本发明的“细胞表面受体”的实例是 DKK1 或 DKK4 蛋白质分子结合的受体。这类细胞表面受体包括但不限于 Frizzled (Fz)、LRP (LRP5 和 LRP6) 和 Kremen (Krm)。

[0084] 本文所用的术语“抗体”指多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、单链抗体及其片段如 F_{ab} 、 $F_{(ab)2}$ 、 F_v , 以及保留母体抗体的抗原结合功能的其他片段。同样地,抗体可指免疫球蛋白或糖蛋白,或其片段或部分,或指包括修饰的免疫球蛋白样构架内包含的抗原结合部分的结构,或指包含非免疫球蛋白样构架或支架的结构内包括的抗原结合部分。

[0085] 本文所用的术语“单克隆抗体”指含有同源抗体群体的抗体组合物。该术语未限定关于抗体的种类或来源,也未旨在由制备的方式所限定。该术语包括全部免疫球蛋白以及片段如 F_{ab} 、 $F_{(ab)2}$ 、 F_v , 以及保留抗体的抗原结合功能的其他片段。在本发明中可使用任一哺乳动物种类的单克隆抗体。然而,由于大鼠或鼠细胞系在用于制备产生单克隆抗体所需的杂交细胞系或杂交瘤中的实用性,抗体一般将是大鼠或鼠源性的。

[0086] 本文所用的术语“多克隆抗体”指含有异源抗体群体的抗体组合物。多克隆抗体常源自免疫动物或所选人类的混合血清。

[0087] 本文所用的短语“单链抗体”指通过测定结合抗体的结合结构域(重链和轻链),以及提供允许保持结合功能的连接部分制备的抗体。实质上,这形成仅具有结合抗原所需可变结构域的部分的极短缩抗体。单链抗体的测定和构建描述于 Ladner 等人的美国专利号 4,946,778。

[0088] “天然存在的抗体”是糖蛋白,其包含通过二硫键连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链包含重链可变区(本文中简写为 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域:CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文中简写为 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域 C_L 。可以将 V_H 和 V_L 进一步细分为高变区,称作互补决定区(CDR),其散布着更保守的称作构架区(FR)的区域。每个 V_H 和 V_L 由三个 CDR 和四个 DR 组成,它们从氨基末端到羧基末端以下面的顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。

[0089] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简单地“抗原部分”)指结合靶标的蛋白质序列,例如一个或多个 CDR。它包括例如,全长抗体、一个或多个抗体片段,和 / 或保留抗原(如 DKK1)特异性结合能力的非免疫球蛋白相关的支架上的 CDR。抗体的抗原结合功

能可以通过全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合部分”内包括的结合片段的实例包括 Fab 片段、由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 CH1 结构域组成的单价片段； $F(ab)_2$ 片段、包含通过二硫键在铰链区连接的两个 Fab 片段的二价片段；由 V_H 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段；由 V_H 结构域组成的 dAb 片段 (Ward 等人, 1989Nature341: 544-546)；和分离的互补决定区 (CDR)。

[0090] 本文所用的“抗原”或“表位”可互换使用,指靶蛋白上的多肽序列,所述靶蛋白由抗体、抗体片段或其等价体的抗原结合部分特异识别。抗原或表位包括在靶序列内连续或非连续的至少六个氨基酸。构象表位可包括非连续残基,并且任选可包括天然或人工修饰的氨基酸残基。对残基的修饰包括但不限于,磷酸化、糖基化、聚乙二醇化、泛素化、呔喃化等。

[0091] 此外,尽管 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由单独的基因编码,但是它们可以用重组方法通过合成接头连接,所述接头使得它们成为一条蛋白质链,其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子 (称作单链 Fv(scFv); 参见例如, Bird 等人, 1988Science242:423-426; 和 Huston 等人, 1988Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883)。此类单链抗体意在被术语抗体的“抗原结合部分”包括。使用本领域技术人员已知的常规技术得到这些抗体片段,并且以与完整抗体相同的方式筛选所述片段的效用。

[0092] 如本文描述的,保守变体包括任一鉴定的氨基酸序列中的氨基酸残基,特别是蛋白质工程领域任一普通技术人员众所周知的保守改变。

[0093] 本文所用的“分离的抗体”指指抗体,其基本上没有具有不同抗原特异性的其他抗体 (例如,特异结合 DKK1 的分离的抗体基本上无特异结合不同于 DKK1 的抗原的抗体)。然而,特异结合 DKK1 的分离的抗体可以与其他抗原,如来自其他物质的 DKK1 分子,或其他家族成员如 DKK4 或相关的侧向同源物具有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上无其他细胞物质和 / 或化学品。

[0094] 本文所用的术语“人抗体”意在包括具有可变区的抗体,其中构架区和 CDR 区都来自人来源的序列。此外,如果抗体含有恒定区,那么该恒定区也来自此类人序列,例如,人种系序列,或者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,通过在体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变导入的突变)。然而,如本文所用的术语“人抗体”不意在包括这样的抗体,其中来自另一哺乳动物物种如小鼠的种系的 CDR 序列已经被嫁接到人构架序列上。

[0095] 术语“人单克隆抗体”指显示出单结合特异性的抗体,其具有可变区,其中构架区和 CDR 区都来自人序列。在一个实施方案中,通过杂交瘤产生人单克隆抗体,杂交瘤包括来自转基因非人动物,例如转基因小鼠的 B 细胞,其具有包含与永生细胞融合的人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0096] 本文所用的术语“人源化抗体”指衍生自人类免疫球蛋白序列的免疫球蛋白构架区的至少一部分。已移植到人类构架序列上的“人源化”抗体如具有 CDR 序列的抗体源自其他物种的种系,特别是哺乳动物种如小鼠。实技术例包括 PDL 的人源化技术。

[0097] 本文所用的术语“人改造的抗体”指结合相同表位但序列不同的抗体。技术实例包括通过 Kalobios 的人改造技术制备的人改造抗体,其中抗原结合区序列是源于例如突变而非源于保守性氨基酸取代。

[0098] 本文所用的术语“重组人抗体”包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如从对于人免疫球蛋白基因为转基因或转染色体的动物(例如,小鼠)或从其制备的杂交瘤分离的抗体,从被转化而表达人抗体的宿主细胞分离的抗体,例如,从转染瘤分离的抗体,从重组的组合人抗体文库分离的抗体,和通过涉及将人免疫球蛋白基因序列的全部或部分剪接成其他 DNA 序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有可变区,其中构架区和 CDR 区来自人种系免疫球蛋白序列。然而,在一些实施方案中,此类重组人抗体可以进行体外诱变(或者,当使用人 Ig 序列转基因的动物时,体内体细胞诱变),并且从而重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是这样的序列,其尽管来自并且涉及人种系 VH 和 VL 序列,但是可以不天然在体内存在于人抗体种系所有组成成分。

[0099] 本文所用的“同种型”指重链恒定区基因提供的抗体类别(例如 IgA、IgD、IgM、IgE、IgG 如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)。

[0100] 短语“识别抗原的抗体”和“抗原特异性的抗体”在本文中与术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。本文所用的“特异性结合人 DKK1”的抗体意指以 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小、 $2 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小,或 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合到人 DKK1 的抗体。“与不同于人 DKK1 的抗原交叉反应”的抗体意指以 $0.5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小,或 $2 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合该抗原的抗体。“不与特定抗原交叉反应”的抗体意指以 $1.5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更大,或 $5-10 \times 10^{-8} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更大的 K_D 结合该抗原的抗体。在某些实施方案中,不与所述抗原交叉反应的此类抗体在标准结合测定中显示出对于这些蛋白质的基本上检测不到的结合。

[0101] 本文所用的“抑制 DKK1 结合细胞表面受体”的抗体如 LRP、Fz 或 Krm,指以 1nM 或更小,0.75nM 或更小,0.5nM 或更小,或 0.25nM 或更小的 K 抑制 DKK1 结合受体的抗体。

[0102] 本文所用的“骨质溶解”指骨密度的减少,其可能由于多种作用机理,包括例如,减少的成骨细胞活性、增加的破骨细胞活性。骨质溶解因此包含通常影响骨矿物质密度的机理。本文所用的“抑制骨溶解活性”的抗体意指通过增加骨形成或阻碍骨再吸收来抑制骨密度损失的抗体。

[0103] 本文所用的术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”意指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而本文所用的术语“ K_{dis} ”或“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用的,术语“ K_D ”意指解离常数,其从 K_d 与 K_a 的比(即 K_d/K_a) 得到并且表达为摩尔浓度(M)。可以使用本领域成熟的方法测定抗体的 K_D 值。用于测定抗体 K_D 的方法是通过使用表面等离子共振体共振,或者使用生物传感器系统,如 **Biacore**[®] 系统。

[0104] 本文所用的术语“亲和力”指在单个抗原位点上抗体和抗原之间相互作用的强度。在每一抗原位点,抗体“臂”的可变区通过弱的非共价力与抗原在多位点相互作用;相互作用越强,亲和力越强。

[0105] 本文所用的术语“抗体亲抗原性”指抗体-抗原复合物全部的稳定性的信息度量。它由三种主要因素调节:抗体表位亲和力;抗体和抗原的效价;以及相互作用部分的结构排列。最终这些因素限定抗体的特异性,即特定抗体结合到精确的抗原表位的可能性。

[0106] 为获得更高抗体亲抗原性探针,可构建二聚缀合物(连结 FACS 标记的两分子 JWJ-1),从而使得低亲和力相互作用(如与种系抗体)通过 FACS 更易检测到。此外,增加结合抗原的抗体亲抗原性的其他方法包括产生 DKK1 或 DKK4 抗体的任一本文描述的纤连蛋

白结构的二聚体或多聚体。可通过各个分子间的共价结合产生这类多聚体,例如,通过模拟天然 C 至 N 端结合或通过模拟经其恒定区保持在一起的抗体二聚物。设计进入 Fc/Fc 界面的键可以是共价的或非共价的。此外,在 DKK1 或 DKK4 杂化物中可使用不同于 Fc 的二聚化或多聚化配偶体以创建这种更有序的结构。

[0107] 本文所用的术语“交叉反应”指抗体或抗体群体结合其他抗原表位。这可由抗体的低抗体亲抗原性或特异性,或由具有同样或非常相似表位的多个不同抗原引起。当需要大体结合到抗原相关组时,或当抗原表位序列在进化中不是高度保守而尝试跨种标记时,交叉反应有时是所期望的。

[0108] 本文所用的术语 IgG 抗体的“高亲和力”或“高特异性”指对靶抗原具有 10^{-8} M 或更小、 10^{-9} M 或更小,或 10^{-10} M 或更小的 K_D 的抗体。然而,“高亲和力”结合可因其他抗体同种型而不同。例如, IgM 同种型的“高亲和力”结合指具有 10^{-7} M 或更小,或 10^{-8} M 或更小的 K_D 的抗体。

[0109] 本文所用的术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、奶牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。。

[0110] 本文所用的术语“优化”指已被改变成此类氨基酸序列的核酸序列,所述氨基酸序列使用在产生的细胞或有机体中优选的密码子,和 / 或已被改变成除去潜在的剪接供体或剪接受体位点的核酸序列。对于多种物种的优化的密码子表是本领域众所周知的。剪接供体或受体位点的序列也是本领域公知的并且潜在的剪接位点可通过例如分析转录或表达数据来鉴定。产生的细胞包括但不限于,原核细胞,例如像杆状病毒或细菌(大肠杆菌(E. coli))的原核细胞,或真核细胞,例如酵母(如毕赤酵母(Pichia))、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、骨髓瘤细胞或人细胞。将优化的核苷酸序列设计成完全保留或尽可能多地保留由也被认为是“母本”序列的启动核苷酸序列最初编码的氨基酸序列和残基数。本文已将优化序列设计成具有在产生的细胞中优选的密码子,然而本文也预见其他真核或原核细胞中这些序列的优化表达。优化核苷酸序列编码的氨基酸序列任选称为优化的。

[0111] 在相关的实施方案中,本发明的中和抗 -DKK1/4 组合物的多肽序列以及编码它们的核苷酸优选进行生产和临床用途的优化。临床使用优化的特征包括但不限于,例如,半寿期、药物代谢动力学(PK)、抗原性、效应功能、FcRn 清除,以及包括抗体依赖细胞的细胞毒性(ADCC)或补体依赖细胞毒性(CDC)活性的患者应答。

[0112] 本文所用的“DKK1 相关的疾病”或“DKK4 相关的疾病”包括但不限于,骨质溶解性损伤,特别是与骨髓瘤(特别是多发性骨髓瘤)相关的骨质溶解性损伤,或与骨癌、乳腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝细胞癌、上皮癌、食道癌、脑癌、肺癌、前列腺癌或胰腺癌或其转移瘤相关的骨质溶解性损伤;与移植相关的骨丢失。其他的疾病或障碍包括但不限于,例如,骨肉瘤、前列腺癌、肝细胞癌(HCC)、包括多发性骨髓瘤的骨髓瘤、糖尿病、肥胖症、肌萎缩、阿尔茨海默病、骨质疏松症、骨质减少、风湿病、结肠炎和 / 或不希望的脱发。

[0113] 本文所用的“治疗”是以预防发展或改变障碍的病状为目的进行的干预。因此,“治疗”指治疗性处理和预防或预止性。需要治疗的个体包括患有障碍的个体以及待预防障碍的个体。在肿瘤(如癌症)治疗中,治疗剂可直接减少肿瘤细胞的病状,或通过其他的治疗剂如辐射和 / 或化学疗法使肿瘤细胞更易治疗。癌症的“病状”包括危害患者健康的所有

现象。这非限定地包括异常或无法控制的细胞生长、转移、干扰邻近细胞的正常功能、异常水平释放细胞因子或其他分泌产物、炎症或免疫应答的抑制或恶化等。

[0114] 患有临床疾病、生物化学疾病、放射性疾病或主观疾病（如骨质溶解）的患者治疗，可包括减轻一些或全部这类症状或减少患病诱因。

[0115] 通常，本发明的中和抗-DKK1/4 组合物预防、治疗或改善与 DKK1、DKK4 或该两者有关，而不是与 DKK2、DKK3 或 Wnt 途径的其他调节剂有关的 Wnt 相关疾病。

[0116] 本发明的多个方面进一步详细描述于下面部分。

[0117] Wnt 途径是充质干细胞（MSC）分化成成骨细胞的主要调节因子。它也是活性成骨细胞的重要存活因子。Dickkopf-1 (DKK1) 是主要在成人骨中表达的 Wnt 途径拮抗物并且在患有骨质溶解性损伤的骨髓瘤患者中被增量调节。中和抗-DKK1/4 的抗体确切地是同化剂，其通过增加成骨细胞的活性同时减少破骨细胞活性来起作用。相反，目前的药物如作为同化剂销售的 PTH，实际上增加了成骨细胞和破骨细胞相关的标记。

[0118] 本发明提供的是选择用于结合 DKK1 的多克隆和单克隆抗体。优选的抗体具有针对人 DKK1 小于 10pM 的亲和力。在某些实施方案中，抗 DKK1 抗体与 DKK4 (Kd ~ 300DM) 而不与 DKK2 交叉反应（进行中的亲和力分析）。

[0119] 将抗-DKK1 或抗-DKK4 抗体的优选表位定位到 Cys-2 结构域（第 189-263 位氨基酸），其被认为负责 LRP6 和 Kremen 的结合。在一个实施方案中，该表位包括 DKK1 或 DKK4 多肽的 Cys-2 结构域的至少六个且至多三十个氨基酸残基。在某一实施方案中，表位包括至少六个连续的氨基酸的一段序列。在另一实施方案中，优选的结合位点是非线性的，即包括非连续性的氨基酸残基。在某些实施方案中，结合取决于 N-糖基化。仅仅预知 Cys-2 结构域中的残基 256 处的一个 N-糖基化位点。

[0120] 在本发明中，中和抗-DKK1/4 抗体在 ELISA 和细胞表面结合试验中阻碍 DKK1 与 LRP6 的相互作用。如所预期的，其在体外以低于 1nM 的 EC50 有效中和 DKK1 的 Wnt 抑制活性。

[0121] 在成骨细胞分化的体外模式中，用 Wnt3A 处理小鼠 10T1/2 细胞以刺激成骨细胞活性标记物碱性磷酸酶（AP）的分泌。在该模型中 DKK1 阻碍 AP 产生并且本发明的抗体充分逆转该抑制作用。

[0122] 在某些实施方案中，本发明的抗体在小鼠中显示剂量线性药物代谢动力学（AUC），在小鼠中剂量超过 20-200 μ g/小鼠时具有 35-96 小时的剂量依赖性终末半寿期。

[0123] 使用溶骨性前列腺肿瘤转移的胫骨内模型，本发明的抗体抑制肿瘤诱导的骨皮质损伤。在该模型中通过肿瘤移植和虚拟移植对骨造成机械损伤的观测不能区分对骨小梁的影响，其导致在随后重塑的编织骨的初始增加，因此引起表观骨容量的减少。在某一实施方案中，本发明的抗体在肿瘤和虚拟移植的胫骨中增加编织骨的产生，并且抑制伴随重塑的骨容量的减少。

[0124] 在相关的实施方案中，使用骨标记物的改变（骨钙蛋白、sRANKL、OPG、AP、TRAP）来说明本发明抗体对骨相关疾病的临床效果，并以药物有效水平的本文提供的中和抗 DKK1 抗体预测治疗的临床结果。Krm 在与 LRP 大约同样的区域结合 DKK。经由 DKK 与 LRP 相互作用的 Wnt 信号抑制需要 Krm。Krm-DKK-LRP 联合以便内在化用于 Wnt 途径失活。

[0125] 本发明的中和抗-DKK1/4 组合物优选结合 DKK1 或 DKK4，阻碍它们与 LRP 和 / 或

Krm 的相互作用,从而在 Wnt 信号途径中中和 DKK1 或 DKK4 效应。Wnt 途径再活化仅仅发生在 DKK1 和 / 或 DKK4 受限制处。

[0126] 评估抗体与不同种类 DKK1 结合能力的标准试验是本领域公知的,包括例如,ELISA、western 印迹和 RIA。合适的试验详细描述于实施例 1 中。抗体的结合动力学(例如结合亲和力)也可通过本领域公知的标准试验来评估,例如通过 Biacore 分析、BioVeris SET 试验、FMAT、化学发光和 / 或 SPR 试验——信号抑制或释放试验。评估抗体对 DKK1 功能性质的影响的试验进一步详细描述于实施例 1 中。

[0127] 因此,“抑制”依据本领域公知并描述于本文的方法学测定的一种或多种这些 DKK1 功能性质(例如,生物化学活性、免疫化学活性、细胞活性、生理学活性或其他生物学活性)的抗体,将被认为与相对于缺乏抗体时(例如,或当无相关特异性的对照抗体存在时)所显示的特定活性的统计学显著降低相关。抑制 DKK1 活性的抗体影响这类统计学显著降低至少 10% 的测量参数,至少 50%、80% 或 90%,并且在某些实施方案中本发明抗体可抑制大于 95%、98% 或 99% 的 DKK1 功能性活性。

[0128] Dickkopf 家族成员

[0129] 适当的骨代谢包括调节途径的复杂网络以及成骨细胞、破骨细胞和周围基质间的相互联系。这些调节机制中的不平衡涉及溶骨病症,例如骨质疏松症、肿瘤诱导的骨质溶解性损伤、肾和肝移植诱导的骨丢失,以及抗激素化学疗法诱导的骨丢失。这些病症可具有严重症状包括骨痛、骨折、脊椎压缩和灵活性降低。批准的或目前临床评估中的大多数治疗通过抑制破骨细胞功能而产生显著效果。例如,二磷酸盐类如唑来膦酸(Zometa)是治疗的现行标准并且通过抑制破骨细胞的功能和存活而起作用。虽然二磷酸盐类通常有效时,某些患者无法有效应答或由于肾毒性或骨坏死而停止使用 [Markowitz2003] [Ruggiero2004]。另外,有靶向破骨细胞发育的多种试验药物如 RANKL 和 M-CSF 中和抗体,或靶向破骨细胞功能的多种试验药物如组织蛋白酶 K 抑制剂。

[0130] 成骨细胞活性的刺激将提供新机制以治疗溶骨性疾病。Wnt 途径在成骨细胞分化和活性中起重要作用,而作为拮抗剂的 Dickkopf (DKK) 家族已被特别鉴定作为该过程的体外关键调节因子(参见综述 [Krishnan2006])。在体外,Wnt 是必需的成骨细胞存活和分化因子。Wnt 途径作用的临床确认由 Wnt 途径共受体 LRP5 中的突变来提供。LRP5 中的失活突变导致骨质疏松-假性神经胶质瘤综合征 (OPPG) [Ai2005],而激活突变导致高的骨量 [Boyden2002]。这些激活突变发现于细胞外结构域并已证实可削弱对 Wnt 拮抗剂 Dickkopf (DKK) 家族的结合。

[0131] 已报道 DKK1 在患有骨病变患者的骨髓瘤细胞中过表达,但在正常浆细胞或未患骨病变患者的浆细胞中缺失 [Tian2004] [Politou2006]。这种骨髓瘤细胞的 DKK1 过表达可通过阻碍成骨细胞分化从而促进骨再吸收而扰乱成骨细胞和破骨细胞间的正常平衡。此外,已报道用于骨髓瘤的某些抗癌治疗如地塞米松可增量调节 DKK1 [Ohnaka2004]。因此,抗 DKK1 中和抗体应当允许骨质溶解性损伤中 Wnt 途径的再激活,而不影响 DKK1 水平相对低或其他拮抗剂占优势的其他组织中的 Wnt 信号发放。成人中,已报道 DKK1 仅在骨中高量表达 [Li2006],显示 DKK1 在调节成人骨代谢中的持续作用。

[0132] 转基因小鼠在乳房组织中过表达 Wnt 促进乳腺癌 [Tsukamoto1988] 并且约 90% 的人类结直肠癌在 Wnt 途径的两种细胞质成分 APC 或 β - 联蛋白中具有突变 [Morin1997]

[Rowan2000]。这种证据引起对 Wnt 途径的激活可能是增加肿瘤发生和进展的风险的关注。另外, DKK 在结直肠肿瘤和黑素瘤中是减量调节的, 这显示潜在的肿瘤抑制作用。

[0133] 本发明的 DKK 多肽包括 DKK1 (SEQ ID NO:1) 和 DKK4 (SEQ ID NO:124), 以及 DKK2 (SEQ ID NO:122) 和 DKK3 (SEQ ID NO:123)。DKK 家族成员具有示于表 A-DKK1 家族成员集 (pileup) 中的两个 CYS 结构域 (CYS1 和 CYS2)。DKK 蛋白质包含酸性 N 端信号肽、由分枝连接区 (divergent linker region) 隔开的含半胱氨酸残基簇的两个 CYS 结构域, 以及潜在的 C 末端 N 糖基化位点。DKK4 中的 CYS2 结构域具有可在质膜上促进 WNT/DKK 相互作用的脂质结合功能。OMIM 登录号 605417。

[0134]

Table A: DKK1 Family Member PileUp					
hDKK1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
hDKK2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
hDKK3	MQRLGATLLC	LLLAAAVPTA	PAPAPTATSA	PVKPGPALSY	PQEEATLNEM
hDKK4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	51				100
hDKK1	~~~~~M	MALGAAGATR	VFVAMVAAAL	GGHPLLGVSA	TLNSVLNSNA
hDKK2	~~~~~M	AALMRSKDSS	CCLLLLA AVL	MVESSQ	IGSSRAKLNS
hDKK3	FREVEELMED	TQHKLRSAVE	EMEAEEAAAK	ASSEVNLANL	PPSYHNETNT
hDKK4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	101				150
hDKK1	IKNLPPPLGG	AAGHPGSAVS	AAPGILYPG	..GNKYQTID	NYQPYPCAED
hDKK2	IKS...SLGG	ET..PGQAAN	RSAG.MYQGL	AFGGSKKGKN	LGQAYPCSSD
hDKK3	DTKVGNNIT	HVHREIHKIT	NQTGQMFSE	TVITSVGDEE	GRRSHECIID
hDKK4	~~~~~MVAA	VLLGLSWLCS	PLGALVLDEN	NIRSSADLHG	ARKGSQCLSD
	151	CYS1			200
hDKK1	EECGTDEYCA	SPTRGGDAGV	QICLACRKRR	KRCMRHAMCC	PGNYCKNGIC
hDKK2	KECEVGRYCH	SPHQGSSA..	..CMVCRRKK	KRCHRDGMCC	PSTRCNGIC
hDKK3	EDCGPSMYCQ	FASFQ	YTCQPCRGQR	MLCTRDSECC	GDQLCVWGHG
hDKK4	TDCNTRKFCL	QPRD....EK	PFCATCRGLR	RRCQORDAMCC	PGTLCVNDVC
	201				250
hDKK1	VSSDQN..HF	RGEI...EET	ITESFGNDH	STLD.GYSRR	TTLSSKMYHT
hDKK2	IPVTES..IL	TPHIPALDGT	RHRDRNHGHY	SNHDLGWQNL	GRPHTKMSHI
hDKK3	TKMA.....				T
hDKK4	TTMEDATPIL	ERQLDEQDGT	.HAEGTTGH	.PVQENQPKR	KPSIKKSQGR
	251		CYS2		300

CYS 1

[0135]

hDKK1	KGQEGSV	CLR SSDCASGLCC A..RHFWKI CKPVLKEGQV CTKHRRK...
hDKK2	KGHEGDP	CLR SSDCIEGFCC A..RHFWTKI CKPVLHQGEV CTKQRKK...
hDKK3	RGSNGTI	CDN QRDCQPGGLCC AFQRGLLFPV CTPLPVEGEL CHDPASRLLD
hDKK4	KGQEGES	CLR TFDCGPGGLCC A..RHFWTKI CKPVLLEGQV CSRRGHK...
	301	350
hDKK1	...	...G.SHGLE IFQRCYCGEG LSCRIQKDHH QASNSSLRLHT CQRH~~~~~
hDKK2	...	...G.SHGLE IFQRCDCAKG LSCKVWKD.A TYSSKARLHV CQKI~~~~~
hDKK3	LITWELEPDG	ALDRCPCASG LLC..... QPHSHSLVYV CKPTFVGSRD
hDKK4	...	...DTAQAPE IFQRCDGPG LLCRSOLTSN R..QHARLRV CQKIEKL~~~
	351	400
hDKK1	~~~~~	~~~~~
hDKK2	~~~~~	~~~~~
hDKK3	QDGEILLPRE	VPDEYEVGSF MEEVRQLEED LERSLTEEMA LGEPAAAAAA
hDKK4	~~~~~	~~~~~
	401	
hDKK1	~~~~~	(SEQ ID NO: 1)
hDKK2	~~~~~	(SEQ ID NO:122)
hDKK3	LLGGEEI	(SEQ ID NO:123)
hDKK4	~~~~~	(SEQ ID NO:124)

CYS 2

[0136] 抗 DKK1 和 DKK4 的抗体

[0137] 在优选的实施方案中,本发明的抗体对人 DKK 蛋白质有特异性。在进一步优选的实施方案中,本发明的抗体

[0138] DKK1 或 DKK4 中和抗体与肿瘤诱发相关的 Wnt 途径修饰不同。Wnt 途径由细胞外配基、受体和仅 DKK1 是拮抗物的复杂网络调节。由于成人中 DKK1 的限制性表达及其与其他 Wnt 拮抗物的功能冗余,中和 DKK1 的抗体不太可能引起 Wnt 信号发放或所致的肿瘤发生的广泛激活。这另外由两个观察所支持:首先,激活的 LRP5 突变(抑制 DKK 结合)诱导高骨量表现型但没有明显增加癌症风险 [Moon2004],而 DKK1 杂合裸细胞或双脊小鼠 (Doublerridge mice) 具有降低的 DKK1 水平、高骨量表现型,但未报到具有增加的肿瘤形成概率 [MacDonald2004]。

[0139] 抗 DKK1 抗体应确实影响骨髓瘤诱导的溶骨性疾病而不增加产生 (denovo) 肿瘤发生的风险。期望与抗肿瘤化学疗法以及可能与抑制破骨细胞功能的抗骨再吸收药物组合使用这类抗体。

[0140] 多克隆抗体

[0141] 本发明抗体可以是多克隆抗体,特别是人多克隆抗体。多克隆来自免疫动物或选择的人的混合血清。

[0142] 单克隆抗体

[0143] 本发明的抗体是如实施例 1-8 所述的分离的和结构表征的人单克隆抗体。所述抗体的 V_H 氨基酸序列分别示于 SEQ ID NO:2-20。所述抗体的 V_L 氨基酸序列分别示于 SEQ ID NO:21-39。

[0144] 可将抗体的 V_H 氨基酸序列优化,例如示于 SEQ ID NO:119 中的序列,以用于在哺乳动物细胞中表达。可将抗体的 V_L 氨基酸序列优化,例如示于 SEQ ID NO:118 中的序列,以用于在哺乳动物细胞中表达。同样,可将序列优化用于在例如酵母、细菌、仓鼠和其他细胞中表达,这取决于优选的特征优化表达系统。本发明的其他抗体包括已经被突变,然而在

CDR 区中与上述序列中描述的 CDR 区具有至少 60、70、80、90、95、96、97、98 或 99% 同一性的氨基酸。

[0145] 另外,全长轻链母本核苷酸序列示于 SEQ ID NO :97-100 中。全长重链母本核苷酸序列示于 SEQ ID NO :101-103 中。优化用于在哺乳动物细胞中表达的全长轻链核苷酸序列示于 SEQ ID NO :104-107 中。优化用于在哺乳动物细胞中表达的全长重链核苷酸序列示于 SEQ ID NO :108-110 中。由优化的轻链核苷酸序列编码的全长轻链氨基酸序列示于 EQ ID NO :111-114 中。由优化的重链核苷酸序列编码的全长重链氨基酸序列示于 EQ ID NO :115-117 中。本发明的其他抗体包括已经被突变,然而与上述序列具有至少 60、70、80、90、95、96、97、98 或 99% 同一性的氨基酸或核苷酸。

[0146] 因为这些抗体的每一种都可以结合 DKK1,所以,可以将 VH、VL 序列、全长轻链和全长重链序列(核苷酸序列和氨基酸序列)“混合和匹配”以产生本发明的其他抗 DKK1 结合分子。可以使用上述和实施例中所所述的结合测定法(例如,ELISA)测试此类“混合和匹配的”抗体的 DKK1 结合。当 V_H 和 V_L 链被混合和匹配时,来自具体 V_H/V_L 配对的 V_H 序列应该用结构上相似的 V_H 序列置换。同样,来自具体 V_H/V_L 配对的 V_L 序列应该用结构上相似的 V_L 序列置换。同样,来自具体全长重链/全长轻链配对的全长轻链序列应该用结构上相似的全长轻链序列置换。本发明抗体的 V_H 、 V_L 、全长轻链和全长重链序列尤其服从混合和置换,因为这些抗体使用来自相同种系序列的 V_H 、 V_L 、全长轻链和全长重链序列,并且从而显示出结构相似性。

[0147] 因此,一方面,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其具有:包含选自 SEQ ID NO :2-20 和 119 的氨基酸序列的 V_H 区;以及包含选自 SEQ ID NO :21-39 和 118 的氨基酸序列的 V_L 区;其中该抗体特异性结合 DKK1。

[0148] 重链和轻链组合的实例包括:包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :21 的氨基酸序列的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :3 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :22 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :4 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :23 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :5 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :24 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :6 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :25 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :7 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :28 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :8 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :29 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :9 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :30 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :10 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :31 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :11 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :32 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :12 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :33 的 V_L 区;或包含 SEQ ID NO :119 的 V_H 区和包含 SEQ ID NO :118 的 V_L 区。

[0149] 另一方面,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其具有:包含选自 SEQ ID NO :115-117 的氨基酸序列的全长重链;以及包含选自 SEQ ID NO :111-114 的氨基酸序列的全长轻链。

[0150] 因此,全长重链和全长轻链组合的实例分别包括:SEQ ID NO :115 与 SEQ ID NO :111;或 SEQ ID NO :116 与 SEQ ID NO :112;或 SEQ ID NO :117 与 SEQ ID NO :113;或 SEQ ID NO :117 与 SEQ ID NO :114。

[0151] 另一方面,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其含有:选自 SEQ ID NO :101-103 的核苷酸序列编码的全长重链;以及选自 SEQ ID NO :97-100 的核苷酸序列编码的全长轻链。

[0152] 因此,编码全长重链和全长轻链的核苷酸实例可分别组合包括:SEQ ID NO:101 和 97;或 SEQ ID NO:102 和 98;或 SEQ ID NO:103 和 99;或 SEQ ID NO:103 和 100。

[0153] 另一方面,本发明提供已进行在细胞中表达的优化的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其具有:包含选自 SEQ ID NO:108-110 的核苷酸序列的全长重链;以及包含选自 SEQ ID NO:104-107 的核苷酸序列的全长轻链。

[0154] 另一方面,本发明提供包括抗体重链和轻链 CDR1、重链和轻链 CDR2 和重链和轻链 CDR3 的抗体,或其组合。抗体的 V_H CDR1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:2-5、8-11、20 和 49-56。抗体的 V_H CDR2 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:2-20 和 57-64。抗体的 V_H CDR3 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:2-20 和 65-72。抗体的 V_L CDR1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:21-39 和 73-80。抗体的 V_L CDR2 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:21-39 和 81-88。抗体的 V_L CDR3 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:21-39 和 89-96。使用 Kabat 系统描述 CDR 区 (Kabat, E. A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。

[0155] 考虑到这些抗体的每一种可以结合 DKK1 并且抗体结合特异性主要通过 CDR1、2 和 3 区提供,可以将 V_H CDR1、2 和 3 序列与 V_L CDR1、2 和 3 序列“混合和匹配”(即,来自不同抗体的 CDR 可以被混合和匹配,尽管每个抗体必须含有 V_H CDR1、2 和 3 和 V_L CDR1、2 和 3)以产生本发明的其他抗 DKK1 结合分子。可以使用上文和实施例中描述的结合测定法(例如, ELISA)测试此类“混合和匹配的”抗体的 DKK1 结合。当混合和匹配 V_H CDR 序列时,来自具体 V_H 序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列应该用结构上相似的 CDR 序列置换。同样,当混合和匹配 V_L CDR 序列时,来自具体 V_L 序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列应该用结构上相似的 CDR 序列置换。此外,具体 V_H 或 V_L 序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列可特定或随机突变以产生可检测亲和力或结合特性的抗体。技术人员将容易显而易见的是,对于本发明的单克隆抗体,通过用来自本文所示 CDR 序列的结构上相似的序列替代一个或多个 V_H 和 / 或 V_L CDR 序列,可以产生新的 V_H 和 V_L 序列。

[0156] 分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其具有:包含选自 SEQ ID NO:2-5、8-11、20 和 49-56 的氨基酸序列的 V_H 区 CDR1;包含选自 SEQ ID NO:2-20 和 57-64 的氨基酸序列的 V_H 区 CDR2;包含选自 SEQ ID NO:2-20 和 65-72 的氨基酸序列的 V_H 区 CDR3;包含选自 SEQ ID NO:21-39 和 73-80 的氨基酸序列的 V_L 区 CDR1;包含选自 SEQ ID NO:21-39 和 81-88 的氨基酸序列的 V_L 区 CDR2;以及包含选自 SEQ ID NO:21-39 和 89-96 的氨基酸序列的 V_L 区 CDR3;其中该抗体特异性结合 DKK1。

[0157] 在某一实施方案中,抗体组成为:包含 SEQ ID NO:2 的 V_H 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:6 的 V_H 区 CDR2;包含 SEQ ID NO:7 的 V_H 区 CDR3;包含 SEQ ID NO:21 的 V_L 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:22 的 V_L 区 CDR2;以及包含 SEQ ID NO:23 的 V_L 区 CDR3。

[0158] 在另一实施方案中,抗体组成为:包含 SEQ ID NO:3 的 V_H 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:12 的 V_H 区 CDR2;包含 SEQ ID NO:13 的 V_H 区 CDR3;包含 SEQ ID NO:24 的 V_L 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:25 的 V_L 区 CDR2;以及包含 SEQ ID NO:26 的 V_L 区 CDR3。

[0159] 在另一实施方案中,抗体组成为:包含 SEQ ID NO:4 的 V_H 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:14 的 V_H 区 CDR2;包含 SEQ ID NO:15 的 V_H 区 CDR3;包含 SEQ ID NO:27 的 V_L 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:28 的 V_L 区 CDR2;以及包含 SEQ ID NO:29 的 V_L 区 CDR3。

[0160] 在另一实施方案中,抗体组成为:包含 SEQ ID NO:5 的 V_H 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:16 的 V_H 区 CDR2;包含 SEQ ID NO:17 的 V_H 区 CDR3;包含 SEQ ID NO:30 的 V_L 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:31 的 V_L 区 CDR2;以及包含 SEQ ID NO:32 的 V_L 区 CDR3。

[0161] 在某一实施方案中,抗体组成为:包含 SEQ ID NO:8 的 V_H 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:18 的 V_H 区 CDR2;包含 SEQ ID NO:19 的 V_H 区 CDR3;包含 SEQ ID NO:33 的 V_L 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:34 的 V_L 区 CDR2;以及包含 SEQ ID NO:35 的 V_L 区 CDR3。

[0162] 在某一实施方案中,抗体组成为:包含 SEQ ID NO:9 的 V_H 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:10 的 V_H 区 CDR2;包含 SEQ ID NO:11 的 V_H 区 CDR3;包含 SEQ ID NO:36 的 V_L 区 CDR1;包含 SEQ ID NO:37 的 V_L 区 CDR2;以及包含 SEQ ID NO:38 的 V_L 区 CDR3。

[0163] 如本文所用的,人抗体包含重链或轻链可变区,如果该抗体的可变区从使用种系免疫球蛋白基因的系统得到,那么所述可变区是特定种系序列的“产物”或“来自”该特定种系序列。此类系统包括用目的抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或者用目的抗原筛选在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库。为人种系免疫球蛋白序列的“产物”或者“来自”所述序列的人抗体可以如下鉴定:通过比较人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列并选自序列与人抗体的序列最接近(即,最大的%同一性)的人种系免疫球蛋白序列。为人种系免疫球蛋白序列的“产物”或者“来自”所述序列的人抗体可以由于例如天然存在的体细胞突变或者有意引入位点定向诱变而与种系序列相比含有氨基酸差异。然而,所选的人抗体通常与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列在氨基酸序列上至少 90% 同一并且含有这样的氨基酸残基,当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如,鼠种系序列)比较时,所述氨基酸残基将所述人抗体鉴定为人的。在一些情况中,人抗体可以在氨基酸序列上与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少 60%、70%、80%、90%、或至少 95%、或甚至至少 96%、97%、98%、或 99% 同一。通常,来自具体人种系序列的人抗体将显示出与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不超过 10 个氨基酸差异。在一些情况中,人抗体可以显示出与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不超过 5 个,或甚至不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸差异。同源抗体

[0164] 在另一实施方案中,本发明的抗体具有全长重链和轻链氨基酸序列,全长重链和轻链核苷酸序列,可变区重链和轻链核苷酸序列,或可变区重链和轻链氨基酸序列,其与本文所述抗体的氨基酸和核苷酸序列同源,并且其中所述抗体保留本发明中和抗 DKK1/4 复合物所希望的功能性质。

[0165] 例如,本发明提供分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其包括 V_H 区和 V_L 区,其中:V_H 区包含与选自 SEQ ID NO:2-20 和 119 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;V_L 区包含与选自 SEQ ID NO:21-39 和 118 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;该抗体特异性结合 DKK1 和 / 或 DKK4,并且抗体显示至少一种以下功能性质:抗体中和 DKK1 蛋白质与 LRP6、Fz 和 / 或 Krm 的结合,或抗体中和 DKK4 蛋白质与 LRP、Pz 和 / 或 Krm 的结合。

[0166] 在另一实施例中,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包括全长重链和全长轻链,其中:全长重链包含与选自 SEQ ID NO:115-117 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;全长轻链包含与选自 SEQ ID NO:111-114 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;该抗体特异性结合 DKK1,并且抗体显示至少一种以下功能性质:抗体抑制 DKK1 蛋白质与 DKK1 受体的结合,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解,或

抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解性损伤,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善癌症。

[0167] 在另一实施例中,本发明提供分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其包括全长重链和全长轻链,其中:全长重链包含与选自 SEQ ID NO:101-103 的核苷酸序列至少 80% 同源的核苷酸序列;全长轻链包含与选自 SEQ ID NO:97-100 的核苷酸序列至少 80% 同源的核苷酸序列;该抗体特异性结合 DKK1,并且抗体显示至少一种以下功能性质:抗体抑制 DKK1 蛋白质与 DKK1 受体的结合,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解性损伤,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善癌症。

[0168] 在另一实施例中,本发明提供已进行细胞中表达的优化的分离的单克隆抗体或抗原结合部分,其包括全长重链和全长轻链,其中:全长重链包含与选自 SEQ ID NO:108-110 的核苷酸序列至少 80% 同源的核苷酸序列;全长轻链包含与选自 SEQ ID NO:104-107 的核苷酸序列至少 80% 同源的核苷酸序列;该抗体特异性结合 DKK1,并且抗体显示至少一种以下功能性质:抗体抑制 DKK1 蛋白质与 DKK1 受体的结合,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解性损伤,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善癌症。

[0169] 在另一实施例中,本发明提供已进行细胞中表达的优化的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包括 V_H 区和 V_L 区,其中:全长重链包含与选自 SEQ ID NO:121 的核苷酸序列至少 80% 同源的核苷酸序列;全长轻链包含与选自 SEQ ID NO:120 的核苷酸序列至少 80% 同源的核苷酸序列;该抗体特异性结合 DKK1,并且抗体显示至少一种以下功能性质:抗体抑制 DKK1 蛋白质与 DKK1 受体的结合,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解性损伤,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善癌症。

[0170] 在多种实施方案中,抗体可以显示出上面讨论的功能性质的一种或多种、两种或多种,或三种。该抗体可以是例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0171] 如本文所用的,两个氨基酸序列之间的同源性百分比等于两个序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比是这两个序列共有的相同位置数目的函数(即, $\% \text{同源性} = \text{相同位置数} / \text{位置总数} \times 100$),考虑缺口数、每个缺口的长度,它们被引入以进行两个序列的最佳比对。可以使用如下面的非限制性实例中所述的数学算法完成序列的比较和两个序列之间同一性百分数的确定。

[0172] 可以使用 E. Meyers 和 W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) 的算法,使用 PAM120 权重残基表、缺口长度罚分 12 和缺口罚分 4,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数,该算法已经被结合到 ALIGN 程序(版本 2.0)中。此外,可以使用整合到 GCG 软件包(可以在 <http://www.gcg.com> 得到)的 GAP 程序的 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) 算法,使用 Blossum62 矩阵或 PAM250 矩阵,和缺口权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6 确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。

[0173] 额外或备选地,本发明的蛋白质序列还可以进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索以例如鉴定相关的序列。可以使用 Altschul, 等人, 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-10 的 XBLAST 程序(版本 2.0)进行此类搜索。可以用 XBLAST 程序,得分 = 50, 字长 =

3 进行 BLAST 蛋白质搜索来得到与本发明的抗体分子同源的氨基酸序列。为了得到用于比较目的的缺口比对,可以用如 Altschul 等人,1997Nucleic Acids Res. 25(17) :3389-3402 中描述的缺口 BLAST。当利用 BLAST 和缺口 BLAST 时,可以使用各自程序(例如 XBLAST 和 NBLAST)的默认参数。见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0174] 具有保守修饰的抗体

[0175] 在某些实施方案中,本发明的抗体具有由 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列组成的 V_H 区和由 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列组成的 V_L 区,其中这些 CDR 序列中的一个或多个具有基于本文所述抗体的特定氨基酸序列或者其保守修饰,并且其中所述抗体保留本发明的中和抗 DKK1/4 组合物的所需功能性质。因此,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其组成为由 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列组成的 V_H 区和由 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列组成的 V_L 区,其中:CDR1 的 V_H 区是选自 SEQ ID NO :2-5、8-11、20、49-56 的氨基酸序列的氨基酸序列及其保守修饰组成的序列;CDR2 的 V_H 区是选自 SEQ ID NO :2-20、57-64 的氨基酸序列的氨基酸序列及其保守修饰组成的序列;CDR3 的 V_H 区是选自 SEQ ID NO :2-20、65-72 的氨基酸序列的氨基酸序列及其保守修饰组成的序列;CDR1 的 V_L 区是选自 SEQ ID NO :21-39、73-80 的氨基酸序列的氨基酸序列及其保守修饰组成的序列;CDR2 的 V_L 区是选自 SEQ ID NO :21-39、81-88 的氨基酸序列的氨基酸序列及其保守修饰组成的序列;CDR3 的 V_L 区是选自 SEQ ID NO :21-39、89-96 的氨基酸序列的氨基酸序列及其保守修饰组成的序列;该抗体特异性结合 DKK1,并且抗体显示至少一种以下功能性质:抗体抑制 DKK1 蛋白质与 DKK1 受体的结合,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解性损伤,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善癌症。

[0176] 在多种实施方案中,抗体可以显示出上面讨论的功能性质的一种或多种、两种或多种,或三种。该抗体可以是例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0177] 在其他的实施方案中,本发明抗体具有全长重链序列和全长轻链序列,其中一种或多种这些序列具有基于本文描述的抗体或其保守修饰的特定氨基酸序列,并且其中所述抗体保留本发明的中和抗 DKK1/4 组合物的所希望的功能性质。因此,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包括全长重链序列和全长轻链序列,其中:全长重链具有选自 SEQ ID NO :115-117 的氨基酸序列及其保守修饰;全长轻链具有选自 SEQ ID NO :111-114 的氨基酸序列及其保守修饰;该抗体特异性结合 DKK1,并且抗体显示至少一种以下功能性质:抗体抑制 DKK1 蛋白质与 DKK1 受体的结合,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解性损伤,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善癌症。

[0178] 在多种实施方案中,抗体可以显示出上面讨论的功能性质的一种或多种、两种或多种,或三种。该抗体可以是例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0179] 在其他的实施方案中,进行在细胞中表达优化的本发明抗体具有 V_H 区序列和 V_L 区序列,其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述抗体的特定氨基酸序列或者其保守修饰,并且其中所述抗体保留本发明的中和抗 DKK1/4 组合物的所需功能性质。因此,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包括 V_H 区和 V_L 区,其中: V_H 区具有选自 SEQ ID NO :119 的氨基酸序列及其保守修饰; V_L 区具有选自 SEQ ID NO :118 的氨基酸序列及其保守修饰;该抗体特异性结合 DKK1,并且抗体显示至少一种以下功能性质:抗体抑制 DKK1 蛋

白质与 DKK1 受体的结合,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善骨质溶解性损伤,或抗体抑制 DKK1 受体的结合,以预防或改善癌症。

[0180] 在多种实施方案中,抗体可以显示出上面讨论的功能性质的一种或多种、两种或多种,或三种。该抗体可以是例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0181] 本文所用的术语“保守序列修饰”意指氨基酸修饰,其不显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特征。此类保守修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术,如位点定向诱变和 PCR 介导的诱变向本发明的抗体中引入修饰。

[0182] 保守氨基酸取代是其中将氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基置换的取代。在本领域中已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分枝侧链氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。从而,本发明抗体的 CDR 区内的一个或多个氨基酸残基可以用来自相同侧链家族的其他氨基酸残基置换,并且可以使用本文所述的功能测定法测试经改变的抗体所保留的功能。

[0183] 结合到与本发明的中和抗 DKK1/4 组合物相同表位的抗体

[0184] 在另一实施方案中,本发明提供了结合与本文提供的本发明的多种中和抗 DKK1/4 组合物结合相同表位的抗体。此类额外的抗体可以基于它们在标准 DKK1 结合测定法中与本发明的其他抗体交叉竞争(即,以统计学显著方式竞争性抑制结合)来鉴定。受试抗体抑制本发明的抗体与人 DKK1 结合的能力表明该受试抗体与本发明抗体竞争结合人 DKK1;根据非限制性理论,这种抗体可以与它所竞争的抗体结合人 DKK1 上相同或相关的(例如,结构上相似或空间上接近的)表位。在一些实施方案中,与本发明的抗体结合人 DKK1 上相同表位的抗体是人单克隆抗体。此类人单克隆抗体可以如实施例中所所述的制备和分离。

[0185] 骆驼的和其他的重链抗体

[0186] 获自包括新界成员如美洲驼物种(羊驼 *Lama paccos*、原驼 *Lama glama* 和瘦驼 *Lama vicugna*)的骆驼和单峰骆驼家族成员(双峰驼 *Camelus bactrianus* 和 *Camelus dromaderius*)的抗体蛋白质已为人类受试者表征了大小、结构复杂性和抗原性。对于其他动物的抗体,自然界中发现的该家族哺乳动物的某些 IgG 抗体缺乏轻链,并因此在结构上明显不同于典型的含两条重链和两条轻链的四链四级结构。见 PCT/EP93/02214(W094/04678,公开于 1994 年 3 月 3 日)。

[0187] 鉴定为 V_H 的小单链可变域的骆驼抗体区可通过基因工程获得以产生对靶标具有高亲和力的小蛋白质,结果形成已知为“骆驼抗体”的低分子量的源自抗体的蛋白质。见美国专利号 5,759,808,出版于 1998 年 6 月 2 日,也见 Stijlemans, B. 等人 2004 *J Biol Chem* 279:1256-1261, Dumoulin, M. 等人,2003 *Nature* 424:783-788, Pleschberger, M. 等人 2003 *Bioconjugate Chem* 14:440-448, Cortez-Retamozo, V. 等人 2002 *Int J Cancer* 89:456-62,以及 Lauwereys, M. 等人 1998 *EMBO J* 17:3512-3520。骆驼抗体和抗体片段的工程化文库通过商业途径获得,例如,来自 Ablynx、Ghent、Belgium。与非人源的其他抗体一样,

可重组改变骆驼抗体的氨基酸序列以获得更相似于人类序列的序列,即可将纳米抗体“人源化”。因此可将骆驼抗体对人类的天然低抗原性进一步降低。

[0188] 骆驼抗体具有人类 IgG 分子的大约十分之一的分子量,并且该蛋白质具有仅仅几纳米的物理直径。小尺寸的一个结果是骆驼纳米抗体结合到对于较大抗体蛋白质是功能不可见的抗原位点的能力,即骆驼纳米抗体可用作检测抗原的试剂,否则使用典型的免疫学技术是隐蔽的,以及作为可能的治疗制剂。因此小尺寸的另一个结果是骆驼纳米抗体由于能够抑制结合到靶蛋白的凹槽或窄裂缝中的特异位点,因而能够提供比典型抗体更相似于典型低分子量药物的功能。

[0189] 低分子量和紧凑尺寸进一步导致骆驼纳米抗体极端耐热,对极端 pH 和蛋白酶解消化稳定,并且是低抗原性的。另一个结果是骆驼纳米抗体易于从循环系统转移进组织,并且甚至穿过血脑屏障而可以治疗影响神经组织的障碍。纳米抗体可进一步促进穿过血脑屏障的药物转运。参见美国专利申请 20040161738,2004 公开于 8 月 19 日。组合这些对人类低抗原性的特征显示很大的治疗潜力。另外,这些分子在原核细胞如 *E. coli* 中可完整表达并且在噬菌体中作为融合蛋白表达并具有功能。

[0190] 因此,本发明的特征是对 DKK1 具有高亲和力的骆驼抗体或纳米抗体。在本文的某些实施方案中,骆驼抗体或纳米抗体是在骆驼类动物中天然产生的,即用 DKK1 或其肽片段免疫后的骆驼产生的,对其他抗体使用本文所述技术。备选地,中和抗 DKK1/4 骆驼纳米抗体是改造的,即使用如本文实施例中所述的以 DKK1 和 / 或 DKK4 作为靶标的筛选程序,通过例如从噬菌体展示文库中选择产生适当突变的骆驼纳米抗体蛋白质。改造的纳米抗体可进一步通过基因工程定制,使其在受体受试者中具有从 45 分钟到两周的半寿期。

[0191] 除了骆驼抗体,重链抗体天然产生于其他动物,所述动物包括但不限于例如鲨鱼和河豚鱼的某些物种(参见例如 PCT 公开 W003/014161)。尽管源自这些重链抗体的可变域可用于本发明,但源自骆驼的重链抗体和 / 或其可变结构域序列的用途优选最优化、人源化、人改造等和 / 或用于人类临床用途。

[0192] 改造和修饰的抗体

[0193] 还可以使用具有本文所示的一个或多个 V_H 和 / 或 V_L 序列的抗体作为起始物质进一步制备本发明的抗体以改造修饰的抗体,该修饰的抗体可以具有从起始抗体改变的形式。通过修饰一个或两个可变区(即, V_H 和 / 或 V_L),例如,一个或多个 CDR 区内和 / 或一个或多个构架区内的可变区,可以改造抗体。额外或备选地,通过修饰恒定区内的残基,例如,以改变抗体的效应功能来改造抗体。

[0194] 可以进行的一种类型的可变区改造是 CDR 嫁接。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为此,各抗体之间 CDR 内的氨基酸序列比 CDR 外的序列更多样化。因为 CDR 序列负责多数抗体-抗原相互作用,所以可能通过构建表达载体表达重组抗体,其模拟特定天然存在的抗体的性质,所述表达载体包括来自特定天然存在的抗体的 CDR 序列,其嫁接到来自具有不同性质的不同抗体的构架区上(见例如, Riechmann, L. 等人,1998Nature332:323-327; Jones, P. 等人,1986Nature321:522-525; Queen, C. 等人,1989Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:10029-10033; winter 的美国专利号 5,225,539,和 Queen 等人的美国专利号 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370)。

[0195] 因此,本发明的另一实施方案涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包括,包含分别具有选自 SEQ ID NO:2-5、8-11、20、49-56 的氨基酸序列的 CDR1 序列,具有选自 SEQ ID NO:2-20 和 57-64 的氨基酸序列的 CDR2 序列,具有选自 SEQ ID NO:2-20 和 65-72 的氨基酸序列的 CDR3 序列的 V_H 区;以及包含分别具有选自 SEQ ID NO:21-39 和 73-80 的氨基酸序列的 CDR1 序列,具有选自 SEQ ID NO:21-39 和 81-88 的氨基酸序列的 CDR2 序列,具有选自 SEQ ID NO:21-39 和 89-96 的氨基酸序列的 CDR3 序列的 V_L 区。因此,这类抗体包含单克隆抗体的 V_H 和 V_L CDR 序列,也可包含这些抗体的不同的构架序列。

[0196] 此类构架序列可以从公共 DNA 数据库或公布的参考文献得到,其包括种系抗体基因序列。例如,人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在 " VBase " 人种系序列数据库(可以在英特网网址 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase 获取),以及在 Kabat, E. A., 等人,1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., 等人,1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; 和 Cox, J. P. L. 等人,1994 Eur. J Immunol. 24:827-836 中找到,将它们都明确引入本文作为参考。

[0197] 用于本发明抗体的构架区的实例是与所选的本发明抗体使用的构架序列,例如,本发明的单克隆抗体使用的共有序列和/或构架序列结构上相似的那些构架序列。可以将 V_H CDR1、2 和 3 序列,和 V_L CDR1、2 和 3 嫁接在构架区上,该构架区具有与该构架序列所来源的种系免疫球蛋白基因中发现的相同序列,或者可以将 CDR 序列嫁接在构架区上,该构架区与种系序列相比具有一个或多个突变。例如,已经发现在一些情况中,有益的是突变构架区内的残基以保持或增强抗体的抗原结合能力(见,例如,Queen 等人的美国专利号 5,530,101;5,585,089;5,693,762 和 6,180,370)。

[0198] 另一类型的可变区修饰是突变 V_H 和/或 V_L CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸残基从而提高目的抗体的一种或多种结合性质(例如,亲和力),称作“亲和力成熟”。可以进行位点定向诱变或者 PCR 介导的诱变以导入突变,并且可以用如本文所述的和实施例中提供的体外或体内测定法评估对抗体结合或者其他目的功能性质的影响。可以引入保守修饰(如上文讨论)。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。此外,通常改变 CDR 区内不超过一个、两个、三个、四个或五个残基。

[0199] 因此,在另一实施方案中,本发明提供分离的中和抗 DKK1/4 组合物或其抗原结合部分,其组成为: V_H 区具有组成为选自 SEQ ID NO:2-5、8-11、20、49-56 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:2-5、8-11、20、49-56 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、添加或缺失的氨基酸序列的 V_H CDR1 区;具有选自 SEQ ID NO:2-20 和 57-64 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:2-20 和 57-64 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、添加或缺失的氨基酸序列的 V_H CDR2 区;具有选自 SEQ ID NO:2-20 和 65-72 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:2-20 和 65-72 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、添加或缺失的氨基酸序列的 V_H CDR3 区;具有选自 SEQ ID NO:21-39 和 73-80 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:21-39 和 73-80 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、添加或缺失的氨基酸序列的 V_L CDR1 区;具有选自 SEQ ID NO:21-39 和 81-88 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:21-39 和 81-88 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、添加或缺失的氨基酸序列的 V_L CDR2 区;具有选自 SEQ ID NO:21-39 和 89-96 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:21-39 和 89-96 相比具有一、二、三、四或五个氨基酸取代、添

加或缺失的氨基酸序列的 V_L CDR3 区。

[0200] 本发明的经改造的抗体包括这样的抗体,其中已经对 V_H 和 / 或 V_L 内的构架残基进行修饰以例如改善抗体的性质。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“回复突变”一个或多个构架残基成对应的种系序列。更特别地,已经经历体细胞突变的抗体可以含有与该抗体所来源的种系序列不同的构架残基。通过比较抗体构架序列与该抗体所来源的种系序列可以鉴定此类残基。为了使构架区序列回复到它们的种系构型,可以例如通过位点定向诱变或 PCR 介导的诱变将体细胞突变“回复突变”成种系序列。此类“回复突变”抗体也意在被本发明包括。

[0201] 另一类型的构架修饰涉及突变构架区内,或者甚至一个或多个 CDR 区内的一个或多个残基,以除去 T 细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。该方法也称作“去免疫”并且在 Carr 等人的美国专利公布号 20030153043 中进一步详细描述。

[0202] 作为在构架或 CDR 区内进行修饰,额外或备选地可以改造本发明的抗体以包括 Fc 区内的修饰,通常改变抗体的一种或多种功能性质,如血清半寿期、补体固定、Fc 受体结合,和 / 或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明的抗体可以被化学修饰(例如,一个或多个化学部分可以连接到抗体)或经修饰而改变它的糖基化,再次改变该抗体的一种或多种功能性质。这些实施方案的每一个都在下面详细描述。Fc 区内的残基编号为 Kabat 的 EU 指数编号。

[0203] 在一个实施方案中,修饰 CHI 的铰链区使得改变,例如,增加或减少铰链区中半胱氨酸残基的数目。该方法在 Bodmer 等人的美国专利号 5,677,425 中进一步描述。改变 CHI 的铰链区中的半胱氨酸残基数目以例如方便轻链和重链的装配或增加或降低抗体的稳定性。

[0204] 在另一实施方案中,将抗体的 Fc 铰链区突变以降低该抗体的生物学半寿期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变导入 Fc-铰链片段的 CH2-CH3 结构域界面区,使得该抗体相对于天然 Fc 铰链结构域 SpA 结合具有受损的葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 结合。该方法在 Ward 等人的美国专利号 6,165,745 中进一步详细描述。

[0205] 在另一实施方案中,修饰抗体以增加其生物学半寿期。多种方法是可能的。例如,可以导入一个或多个下面的突变:T252L、T254S、T256F,如 Ward 的美国专利号 6,277,375 所述。备选地,为了延长生物学半寿期,可以在抗体的 CHI 或 CL 区内改变以含有从 IgG 的 Fc 区的 CH2 结构域的两个环得到的回复受体结合表位,如 Presta 等人的美国专利号 5,869,046 和 6,121,022 中描述。

[0206] 在其他实施方案中,通过将至少一个氨基酸残基用不同的氨基酸残基置换以改变抗体的效应功能来改变 Fc 区。例如,一个或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基置换,使得该抗体对于效应配体具有改变的亲和力但是保留亲本抗体的抗原结合能力。改变亲和力的效应配体可以是例如,Fc 受体或补体的 C1 组分。该方法在 Winter 等人的美国专利号 5,624,821 和 5,648,260 中进一步详述。

[0207] 在另一实施方案中,选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸可以用不同氨基酸残基置换使得该抗体具有改变的 C1q 结合和 / 或减小或消除的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。该方法在 Idusogie 等人的美国专利号 6,194,551 中进一步详述。

[0208] 在另一实施方案中,改变一个或多个氨基酸残基以改变该抗体固定补体的能力。

该方法在 Bodmer 等人的 PCT 公布 W094/29351 中进一步描述。

[0209] 在另一实施方案中,通过修饰一个或多个氨基酸修饰 Fc 区以增加该抗体介导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和 / 或增加抗体对 Fc γ 受体的亲和力。该方法在 Presta 的 PCT 公布号 W000/42072 中进一步描述。此外,已经为人 IgG1 对 Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和 FcRn 的结合位点作图并且已经描述了具有提高的结合的变体 (见 Shields, R. L. 等人, 2001J. Biol. Chem. 276 :6591-6604)。

[0210] 在另一实施方案中,修饰抗体的糖基化。例如,可以制备无糖基化抗体 (即,缺少糖基化的抗体)。可以改变糖基化以例如,增加抗体对“抗原”的亲和力。此类糖类修饰可以通过例如改变抗体序列内一个或多个糖基化位点完成。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,其导致去除一个或多个可变区构架糖基化位点,从而去除该位点的糖基化。此类无糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。这种方法在 Co 等人的美国专利号 5,714,350 和 6,350,861 中进一步详细描述。

[0211] 额外或备选地,可以制备具有改变类型的糖基化的抗体,如具有减少量的岩藻糖残基的低岩藻糖基化抗体或者具有增加的等分 GlcNac 结构的抗体。已经表明此类改变的糖基化模式增加抗体的 ADCC 能力。通过例如在具有改变的糖基化系统的宿主细胞中表达抗体完成此类糖类修饰。具有改变的糖基化系统的细胞已经在本文中描述并且可以用作宿主细胞,在其中表达本发明的重组抗体从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如, Hang 等人的 EP1,176,195 描述了具有功能被破坏的 FUT8 基因的细胞系,所述 FUT8 基因编码岩藻糖基转移酶,使得在这种细胞系中表达的抗体显示出低岩藻糖化。Presta 的 PCT 公开 W003/035835 描述了变体 CHO 细胞系 Lec13 细胞,其将岩藻糖连接到 Asn(297)-连接的糖类的能力降低,也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖化 (也见 Shields, R. L. 等人, 2002J. Biol. Chem. 277 :26733-26740)。Umana 等人的 PCT 公开 W099/54342 描述了细胞系,其被改造而表达修饰糖蛋白的岩藻糖基转移酶 (例如, β (1,4)-N 乙酰基葡萄糖胺基转移酶 III (GnTIII),使得在该改造细胞系中表达的抗体显示出增加的等分 GlcNac 结构,其导致抗体增加的 ADCC 活性 (也见 Umana 等人, 1999Nat. Biotech. 17 :176-180)。

[0212] 本发明设想的本文抗体的另一种修饰是聚乙二醇化。可以将抗体聚乙二醇化,例如,以延长该抗体的生物学 (例如,血清) 半寿期。为了聚乙二醇化抗体,通常将该抗体或其片段与聚乙二醇 (PEG),如 PEG 的活性酯或醛衍生物在这样的条件下反应,在所述条件下,一个或多个 PEG 基团变得附着到抗体或抗体片段。通过用反应性 PEG 分子 (或其类似的反应性水溶性聚合物) 进行酰化反应或烷基化反应,可以进行聚乙二醇化。本文所用的术语“聚乙二醇”意在包括任一形式的 PEG,其已经被用于衍生其他蛋白质,如单 (C1-C10) 烷氧基 - 或芳氧基聚乙二醇或者聚乙二醇 - 马来酰亚胺。在一些实施方案中,待聚乙二醇化的抗体是无糖基化的抗体。聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的,并且可以应用于本发明的抗体。见例如, Nishimura 等人的 EP 0 154 316 和 Ishikawa 等人的 EP 0 401 384。

[0213] 非免疫球蛋白支架

[0214] 可应用多种的抗体 / 免疫球蛋白构架或支架,只要得到的多肽包括至少一个靶蛋白特异性结合区。这类构架或支架包括人类免疫球蛋白的五个主要的独特型或其片段 (例如本文别处公开的那些片段),并包括其他动物物种的免疫球蛋白,优选地具有人源化特征。如在骆驼和 / 或鲨鱼中鉴定的那些单一的重链抗体在这方面特别受关注。将由本领域

的技术人员继续发现和开发新的构架、支架和片段。

[0215] 一方面,本发明涉及使用可移植本发明的 CDR 于其上的非免疫球蛋白支架来产生基于非免疫球蛋白的抗体。可应用已知或未知的非免疫球蛋白构架和支架,只要它们包括目的蛋白质 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:122 的特异性结合区。这类化合物在本文中称为“包括靶标特异性结合区的多肽”。已知的非免疫球蛋白构架和支架包括但不限于,Adnectin(纤连蛋白)(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、锚蛋白(MolecularPartners AG, Zurich, 瑞士)、结构域抗体(Domantis, Ltd(Cambridge, MA) 和 Ablynx nv(Zwijnaarde, Belgium))、脂笼蛋白(Anticalin)(PierisProteolab AG, Freising, 德国)、小型免疫药物(small modularimmuno-pharmaceutical)(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、maxybodies(Avidia, Inc. (Mountain View, CA))、A 蛋白(Afiibody AG, 瑞典)以及 affilin(γ -晶体蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH, Halle, 德国)。

[0216] (i)Adnectin—化合物治疗

[0217] Adnectin 支架基于纤连蛋白 III 型结构域(例如纤连蛋白 III 型的第十模块(10Fn3 结构域))。纤连蛋白 III 型结构域具有 7 或 8 条分布在两个 β 片层的 β 链,其中它们之间相互包装(pack against each other)以形成蛋白质核心,并且还包含互相连接 β 链并且暴露于溶剂的环(类似于 CDR)。在 β 片层夹心层的每一边缘至少有三个这样的环,其中边缘是蛋白质垂直于 β 链方向的界线。(U S6,818,418)。

[0218] 这些基于纤连蛋白的支架不是免疫球蛋白,尽管全部折叠密切涉及最小的功能性抗体片段——重链可变区,其包括骆驼和美洲驼 IgG 中的完整抗原识别单位。由于这种结构,非免疫球蛋白抗体模拟与抗体特性在本质上和亲和力上相似的抗原结合特性。可将这些支架用于体外的环随机化和改组策略中,其与体内抗体亲和力成熟过程相似。这些基于纤连蛋白的分子可用作支架,其中使用标准克隆技术可将分子的环区用本发明的 CDR 取代。

[0219] (ii) 锚蛋白—分子伴侣

[0220] 该技术基于使用具有锚蛋白来源的重复模块的蛋白质作为携带可变区的支架,其可用于结合到不同靶标。锚蛋白重复模块是由两个反平行的 α -螺旋和 β -转角构成的 33 个氨基酸多肽。可变区的结合主要通过使用核糖体展示来最优化。

[0221] (iii)Maxybodies/Avimer-Avidia

[0222] Avimer 源自包含蛋白质如 LRP-1 的天然结构域 A。这些结构域本来是用于蛋白质-蛋白质相互作用并且在超过 250 个人蛋白质中结构性基于结构域 A。由大量不同的经由氨基酸键连接的“A 结构域”单体(2-10)构成 Avimer。使用描述于例如 20040175756、20050053973、20050048512 以及 20060008844 中的方法能够产生可结合到目的抗原的 Avimer。

[0223] (vi)A 蛋白—亲和体(affibody)

[0224] **Affibody®**亲和配基是小型的、简单的蛋白质,其组成为基于 A 蛋白的一种 IgG 结合结构域的支架的三个螺旋束。A 蛋白是细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的表面蛋白。该支架域由 58 个氨基酸构成,其中的 13 个随机产生含大量配体变体的 **Affibody®**文库(参见例如 US5,831,012)。**Affibody®**分子模拟抗体,与 150kDa 分子

量的抗体相比,它们具有 6kDa 的分子量。虽然它的尺寸小,但**Affibody®**分子的结合位点与抗体的结合位点相似。

[0225] (v)Anticalin—Pieris

[0226] **Anticalins®**是由 Pieris ProteoLab AG 公司开发的产品。它们源自脂笼蛋白,一组分布广泛的小而强力的蛋白质,该蛋白质通常涉及化学敏感的或不溶的化合物的生理转运或贮藏。某些天然的脂笼蛋白产生于人类组织或体液中。

[0227] 该蛋白质构造让人联想到具有刚性构架顶部高变环的免疫球蛋白。然而,与抗体或其重组片段相反,脂笼蛋白由含 160 至 180 个氨基酸残基的单一多肽链构成,仅在边缘比单一免疫球蛋白结构域更大些。

[0228] 一套四个环组成结合口袋,显示显著的结构可塑性并耐受多种侧链。可因此在专有的程序中改造结合位点以识别指定的具有高亲和力和特异性的不同形状的靶分子。

[0229] 通过诱变一套四个环,脂笼蛋白家族的一种蛋白质,甘兰菜粉蝶(PierisBrassicae)的胆汁三烯结合蛋白(BBP)已用于开发 Anticalin。描述“Anticalin”的专利申请书的一个实例是 PCT W0199916873。

[0230] (vi)Affilin—Scil 蛋白质

[0231] Affilin™ 分子是设计成对蛋白质和小分子具有特异亲和力的小的非免疫球蛋白蛋白质。新的 Affilin™ 分子可从两个文库中非常迅速地筛选出,每一文库都是基于源自不同人类的支架蛋白质。

[0232] Affilin™ 分子未显示与免疫球蛋白蛋白质的任何结构同源性。Scil 蛋白质使用两种 Affilin™ 支架,其中一种是 γ -晶体蛋白,人类结构性眼晶状体蛋白质以及另一种是“泛素”超家族蛋白质。两种人类支架都非常小,显示高温稳定性并且几乎能抵抗 pH 变化和变性剂。这种高稳定性主要是由于蛋白质的延展 β 片层结构。源自蛋白质的 γ -晶体蛋白的实例描述于 W0200104144 中并且“泛素样”蛋白质的实例描述于 W02004106368 中。

[0233] 改造抗体的方法

[0234] 如上面讨论,具有本文所示的 V_H 和 V_L 序列,或全长重链和轻链序列的抗 DKK1 抗体可以用于通过修饰全长重链和 / 或轻链序列、 V_H 和 / 或 V_L 序列或其连接的恒定区而产生新的抗 DKK1/4 抗体。从而,在本发明的另一方面,本发明的抗 DKK1 抗体的结构特征用于产生结构相关的抗 DKK1/4 抗体,其保留本发明抗体的至少一种功能性质,如结合人 DKK1 或 DKK4 或其两者,以及抑制 DKK1 或 DKK4 或其两者的一种或多种功能性质。

[0235] 例如,本发明抗体的一个或多个 CDR 区或其突变可以与已知的构架区和 / 或其他 CDR 重组组合,以产生如上文讨论的额外的重组改造的抗 DKK1 抗体。其他类型的修饰包括前面部分中描述的那些修饰。用于改造方法的起始材料是本文提供的一种或多种 V_H 和 / 或 V_L 序列,或者其一个或多个 CDR 区。为了产生改造的抗体,不必实际上制备(即,作为蛋白质表达)具有本文提供的一个或多个 V_H 和 / 或 V_L 序列或其一个或多个 CDR 区的抗体。相反,将序列中所含的信息用作起始材料产生来自最初序列的“第二代”序列,然后制备“第二代”序列并表达为蛋白质。

[0236] 因此,在另一实施方案中,本发明提供制备抗 DKK1 抗体的方法,所述抗 DKK1 抗体由 V_H 区抗体序列和 V_L 区抗体序列组成,所述 V_H 区抗体序列具有选自 SEQ ID NO :2-5、8-11、20、49-56 的 CDR1 序列,选自 SEQ ID NO :2-20 和 57-64 的 CDR2 序列和 / 或选自 SEQ ID NO :

2-20 和 65-72 的 CDR3 序列;所述 V_L 区抗体序列具有选自 SEQ ID NO:21-39 和 73-80 的 CDR1 序列,选自 SEQ ID NO:21-39 和 81-88 的 CDR2 序列和 / 或选自 SEQ ID NO:21-39 和 89-96 的 CDR3 序列;改变所述 V_H 区抗体序列和 / 或 V_L 区抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列;并将该改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0237] 因此,在另一实施方案中,本发明提供制备抗 DKK1 抗体的方法,所述抗 DKK1 抗体由全长重链抗体序列和全长轻链抗体序列组成,所述全长重链抗体序列具有选自 SEQ ID NO:115-117 的序列;所述全长轻链抗体序列具有选自 SEQ ID NO:111-114 的序列;改变所述全长重链抗体序列和 / 或全长轻链抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列;并将该改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0238] 在另一实施方案中,本发明提供制备进行哺乳动物表达的优化的中和抗 DKK1/4 组合物的方法,所述中和抗 DKK1/4 组合物由 V_H 区抗体序列和 V_L 区抗体序列组成,所述 V_H 区抗体序列具有选自 SEQ ID NO:119 的序列;所述 V_L 区抗体序列具有选自 SEQ ID NO:118 的序列;改变所述 V_H 区抗体序列和 / 或 V_L 区抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列;并将该改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0239] 可以用标准分子生物学技术制备和表达改变的抗体序列。所改变的抗体序列编码的抗体是保留本文所述的中和抗 DKK1/4 组合物的一种、一些或所有功能性质的抗体,其功能性质包括但不限于,特异性结合人 DKK1;和显示出至少一种下面的功能性质的抗体:该抗体抑制 DKK1 蛋白质与 DKK1 受体的结合,或该抗体抑制 DKK1 受体结合,以预防或改善骨质溶解;或该抗体抑制 DKK1 受体结合,以预防或改善骨质溶解性损伤;或该抗体抑制抑制 DKK1 受体结合,以预防或改善癌症。

[0240] 所改变的抗体可以显示出一种或多种、两种或多种,或三种或多种上面讨论的功能性质。

[0241] 可以使用本领域中可得的和 / 或本文所述的标准测定法,如实施例中给出的那些(例如,ELISA)评估改变的抗体的功能性质。

[0242] 在改造本发明抗体的方法的一些实施方案中,可以沿着抗 DKK1 抗体编码序列的全部或者部分随机或者选择性导入突变,并可以对得到的经修饰的抗 DKK1 抗体筛选如本文所述的结合活性和 / 或其他功能性质。突变方法已经在本领域描述。例如,Short 的 PCT 公布 W002/092780 描述了使用饱和诱变、合成连接装配,或者其组合产生和筛选抗体突变的方法。备选地,Lazar 等人的 PCT 公布 W003/074679 描述了使用计算机筛选方法优化抗体的理化性质的方法。

[0243] 抗体的 Fc 恒定区对确定血清半寿期和效应功能,即抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)活性是至关重要的。可设计 Fc 片段的特定突变以改变效应功能和 / 或血清半寿期(参见例如 Xencortech technology,也参见例如 W02004029207)。

[0244] 改变抗体的效应功能和血清半寿期的方法是嫁接具有适当效应功能的 Fc 片段的抗体片段的可变区。可针对细胞杀伤活性来选择 IgG1 或 IgG4 同种型,而 IgG2 同种型可用于沉默或中和抗体(不具有细胞杀伤活性)。

[0245] 通过用血清蛋白如 HSA 或结合到这种血清蛋白的蛋白质如 HSA 结合蛋白制备抗体可变区的嵌合融合物,以获得具有长血清半寿期的沉默抗体。

[0246] 效应功能也可通过调节抗体的糖基化模式来改变。Glycart(例如 US6,602,684)、

Biowa(例如 US6,946,292)和 Genentech(例如 W003/035835)已将哺乳动物细胞系改造为产生具有增加的或减少的效应功能的抗体。具体地,非岩藻糖基化的抗体将具有增强的 ADCC 活性。Glycofi 也已开发能产生抗体的特定糖形的酵母细胞系。

[0247] 编码本发明抗体的核酸分子

[0248] 本发明的另一方面涉及编码本发明抗体的核酸分子。全长轻链母本核苷酸序列的实例示于 SEQ ID NO:97-100 中。全长重链母本核苷酸序列的实例示于 SEQ ID NO:101-103 中。进行细胞中表达的优化的全长轻链核苷酸序列的实例示于 SEQ ID NO:104-107 中。进行细胞中表达的优化的全长重链核苷酸序列的实例示于 SEQ ID NO:108-110 中。

[0249] 核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解物中,或者可以是部分纯化或者基本上纯的形式。当通过标准技术纯化核酸以除去其他细胞组分或其他污染物,例如,其他细胞核酸或蛋白质时,核酸是“分离的”或“使得基本上纯的”,所述标准技术包括碱/SDS 处理、CsCl 分带(binding)、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域公知的其他技术。见 F. Ausubel, 等人, 编著, 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and WileyInterscience, New York。本发明的核酸可以是例如 DNA 或 RNA,并且可以含有或不含有内含子序列。在一个实施方案中,核酸是 cDNA 分子。核酸可以存在于载体,如噬菌体展示载体,或者重组质粒载体中。

[0250] 可以使用标准分子生物学技术得到本发明的核酸。对于杂交瘤(例如,如下文进一步描述的携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤)表达的抗体,编码通过杂交瘤制备的抗体的重链和轻链的 cDNA 可以通过标准 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术得到。对于从免疫球蛋白基因文库(例如,使用噬菌体展示技术)得到的抗体,可以从作为文库成员的多种噬菌体克隆回收编码所述抗体的核酸。

[0251] 一旦得到编码 V_H 和 V_L 区段的 DNA 片段,就可以通过标准重组 DNA 技术进一步操作这些 DNA 片段,例如,以将可变区基因转变成全长抗体链基因、Fab 片段基因,或者 scFv 基因。在这些操作中,编码 V_L - 或 V_H 的 DNA 片段有效连接到另一 DNA 分子,或者编码另一蛋白质的片段,如抗体恒定区或柔性接头。该上下文中使用的术语“有效连接”意指两个 DNA 片段以功能性方式连接,例如,使得这两个 DNA 片段编码的氨基酸序列保持符合读框,或者使得该蛋白质在所希望的启动子控制下表达。

[0252] 可以将编码 V_H 区的分离的 DNA 转变成全长重链基因,通过将 V_H 编码 DNA 有效连接到编码重链恒定区(CH1、CH2 和 CH3)的另一 DNA 分子实现所述转变。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(见例如, Kabat, E. A., 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 并且可以通过标准 PCR 扩增得到包含这些区域的 DNA 片段。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区。对于 Fab 片段重链基因,可以将编码 V_H 的 DNA 有效连接至编码仅仅重链 CH1 恒定区的另一 DNA 分子。

[0253] 通过将 V_L 编码 DNA 有效连接到编码轻链恒定区 CL 的另一 DNA 分子,可以将分离的编码 V_L 区的 DNA 转变成全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(见例如, Kabat, E. A., 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 并且包含这些区的 DNA 片段可以通过标准 DNA 扩增得到。轻链恒定区可以是

K 或 λ 恒定区。

[0254] 为了产生 scFv 基因,可以将编码 V_H 和 V_L 的 DNA 片段有效连接到编码柔性接头,例如,编码氨基酸序列 (Gly4-Ser)₃ 的另一片段,使得 V_H 和 V_L 序列可以作为连续的单链蛋白质表达,通过柔性接头连接 V_L 和 V_H 区 (见,例如,Bird 等人,1988Science242:423-426;Huston 等人,1988Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883;McCafferty 等人,1990Nature348:552-554)。

[0255] 本发明单克隆抗体的制备

[0256] 可以通过多种技术产生单克隆抗体 (mAb),所述技术包括常规的单克隆抗体方法,例如,Kohler 和 Milstein,1975Nature256:495 的标准体细胞杂交技术。可以使用多种用于产生单克隆抗体的技术,例如,B 淋巴细胞的病毒或癌基因转化。

[0257] 用于制备杂交瘤的动物系统是鼠系统。在鼠系统中的杂交瘤产生是成熟的方法。用于分离用于融合的经免疫的脾细胞的免疫方案和技术是本领域已知的。融合配偶体 (例如,鼠骨髓瘤细胞) 和融合步骤也是已知的。

[0258] 可以基于如上述制备的鼠单克隆抗体的序列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 可以从目的鼠杂交瘤得到并使用标准分子生物学技术改造含有非鼠 (例如人) 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鼠可变区连接到人恒定区 (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鼠 CDR 区插入到人构架区。见例如,Winter 的美国专利号 5,225,539 和 Queen. 等人的美国专利号 5,530,101;5,585,089;5,693,762 和 6,180,370。

[0259] 在某一实施方案中,本发明的抗体是人单克隆抗体。可以使用携带部分人免疫系统而不是小鼠免疫系统的转基因或转染色体小鼠产生针对 DKK1 的此类人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括在本文中分别称作 HuMAb 小鼠和 KM 小鼠的小鼠,并且它们在本文中统称为“人 Ig 小鼠”。

[0260] HuMAb 小鼠[®] (Medarex, Inc.) 含有人免疫球蛋白基因小基因座 (miniloci),其编码未重排的人重链 (μ 和 γ) 和 K 轻链免疫球蛋白序列,以及定向突变,其失活内源 μ 和 K 链基因座 (见例如,Lonberg, 等人,1994Nature368(6474):856-859)。因此,小鼠显示出小鼠 IgM 或 K 的降低的表达,并且在应答免疫时,所导入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和性人 IgGK 单克隆抗体 (Lonberg, N. 等人,1994 上文;Lonberg, N., 1994Handbook of Experimental Pharmacology113:49-101;Lonberg, N. 和 Huszar, D., 1995Intern. Rev. Immunol. 13:65-93, 和 Harding, F. 和 Lonberg, N., 1995Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546 中综述)。HuMAb 小鼠的制备和用途,和此类小鼠携带的基因组修饰在 Taylor, L. 等人,1992Nucleic Acids Research20:6287-6295;Chen, J. 等人,1993International Immunology5:647-656;Tuailon 等人,1993Proc. Natl. Acad. Sci. USA94:3720-3724;Choi 等人,1993NatureGenetics4:117-123;Chen, J. 等人,1993EMBO J. 12:821-830;Tuailon 等人,1994J. Immunol. 152:2912-2920;Taylor, L. 等人,1994InternationalImmunology579-591;和 Fishwild, D. 等人,1996Nature Biotechnology14:845-851 中进一步描述,将它们的内容都完整引入本文作为参考。还见, 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 ;和 Lonberg 和 Kay 的 PCT 公开号 W092103918、W093/12227、W094/25585、W097113852、W098/24884 和 W099/45962 ;和 Korman 等人的 PCT 公开号 W001/14424。

[0261] 在另一实施方案中,使用在转基因或转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠,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作“KM 小鼠”,在 Ishida 等人的 PCT 公布号 W002/43478 中详细描述。

[0262] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选的转基因动物系统可以在本领域中得到并且可以用于产生本发明的抗 DKK1 抗体。例如,可以使用称作 Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的备选转基因系统;此类小鼠在例如 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 中描述。

[0263] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选的转染色体动物系统可以在本领域中获得并且可以用于产生本发明的抗 DKK1 抗体。例如,可以使用称作“TC 小鼠”的携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠;此类小鼠在 Tomizuka 等人,2000Proc. Natl. Acad. Sci. USA97 :722-727 中描述。此外,携带人重链和轻链转折染色体的奶牛已经在本领域描述 (Kuroiwa 等人,2002Nature Biotechnology20 :889-894) 并且可以用于产生本发明的抗 DKK1 抗体。

[0264] 也可以使用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。此类用于分离人抗体的噬菌体展示方法在本领域中建立。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 ;和 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。

[0265] 也可以使用其中已经重建了人免疫细胞的 SCID 小鼠制备本发明的人单克隆抗体,从而当免疫时可以产生人抗体应答。此类小鼠在例如 Wilson 等人的美国专利号 5,476,996 和 5,698,767 中描述。

[0266] 筛选人抗体文库可用以鉴定本发明的抗体。筛选技术的选择包括但不限于,例如噬菌体展示 (Morphosys)、文库类型 (例如 Morphosys 的 HuCaI 文库)、亲和力突变技术和另外的密码子优化序列。

[0267] 产生抗 DKK1 的人单克隆抗体

[0268] 将来自大肠杆菌、杆状病毒或 HEK-EBNA 细胞的纯化重组人 DKK1、或纯化的缀合到钥孔血蓝蛋白 (KLH) 的重组人 DKK1 用作抗原。

[0269] 使用表达人抗体基因的 HuMab 转基因小鼠的 HCo7 品系制备针对 IL-13 的完全人单克隆抗体。在每一该小鼠品系中,可以如 Chen 等人,1993EMBO J. 12 :811-820 中描述的纯合地破坏内源小鼠 K 轻链基因并且可以如 PCT 公开 W001109187 的实施例 1 中所述的纯合地破坏内源小鼠重链基因。每一该小鼠品系携带如 Fishwild 等人,1996Nature Biotechnology14 :845-851 中描述的人 κ 轻链转基因 KCo5。如美国专利号 5,545,806 ;5,625,825 ;和 5,545,807 中所述的 HCo7 品系携带 HCo7 人重链转基因。如 PCT 公开 W001/09187 的实施例 2 中描述的 HCo12 品系携带 HCo12 人重链转基因。HCo17 品系携带 HCo17 人重链转基因。如 PCT 公开 W002/43478 中描述的 KNM 品系包括 SC20 转染色体。

[0270] 为产生 DKK1 的全长人单克隆抗体, HuMab 小鼠和 KM 小鼠使用来自大肠杆菌

的纯化重组 DKK1 或 DKK1-KLH 缀合物作为抗原来免疫。HuMab 小鼠的一般免疫方案在 Lonberg, N. 等人, 1994Nature368(6474):856-859; Fishwild, D. 等人, 1996Nature Biotechnology14:845-851 和 PCT 公开 W098/24884 中描述。第一次输注抗原时小鼠为 6-16 周龄。DKK1 抗原的纯化重组制剂 (5-50 μ g) (例如从表达 DKK1 的转染的大肠杆菌细胞中纯化的) 用于腹膜内、皮下 (Sc) 或经由足垫的注射来免疫 HuMab 小鼠和 KM 小鼠。

[0271] 转基因小鼠经腹膜内 (IP)、皮下 (Sc) 或足垫 (FP) 由完全弗氏佐剂或 Ribi 佐剂中的抗原免疫两次, 之后的 3-21 天用在不完全弗氏佐剂或 Ribi 佐剂中的抗原 IP、Sc 或 FP 免疫 (总共免疫 11 次)。免疫应答通过眼眶取血来监测。血浆由 ELISA 筛选, 并且具有足够抗 DKK1 人免疫球蛋白效价的小鼠用于融合。处死和移除脾脏前的 3 天和 2 天使用抗原对小鼠进行静脉推射。通常, 对每一种抗原进行 10-35 次融合。每一种抗原免疫几打小鼠。用 DKK1 免疫 HCo7、HCo12、HCo17 和 KM 小鼠品种 (strain) 总共 82 只小鼠。

[0272] 为选择产生结合 DKK1 的抗体的 HuMab 或 KM 小鼠, 来自免疫小鼠的血清可通过由 Fishwild, D 等人, 1996 描述的 ELISA 检测。简要地, 微量滴定板用 PBS 中来自大肠杆菌的 1-2 μ g/ml 纯化的重组 DKK1 包被, 50 μ l/孔 4 $^{\circ}$ C 温育过夜然后用 200 μ l/孔 PBS/Tween (0.05%) 中的 5% 鸡血清封闭。将来自 DKK1 免疫小鼠的血浆稀释液加入到每孔中并在室温下温育 1-2 小时。平板用 PBS/Tween 洗涤并然后用与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的山羊抗人 IgG Fc 多克隆抗体于室温下温育 1 小时。洗涤后, 平板用 ABTS 底物显色 (Sigma, A-1888, 0.22mg/ml) 并且通过分光光度计在 OD415-495 处分析。具有最高效价的抗 DKK1 抗体的小鼠用于融合。进行融合并且通过 ELISA 测定杂交瘤上清液的抗 DKK1 活性。

[0273] 基于标准方案, 分离自 HuMab 小鼠和 KM 小鼠的小鼠脾细胞在 PEG 存在下融合小鼠骨髓瘤细胞系。然后筛选得到的杂交瘤的抗原特异性抗体的产生。将来自免疫小鼠脾脏淋巴细胞的单细胞悬浮液在 50% PEG (Sigma) 存在下融合四分之一数量的 SP2/0 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL1581)。细胞以大约 1×10^5 /孔涂布于平底微量滴定板中, 接下来在包含 10% 胎牛血清、10% P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) 的条件培养基、以及含有 3-5% origen (IGEN)、5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50mg/ml 庆大霉素和 1x HAT (Sigma, CRL P-7185) 的 DMEM (Mediatech, CRL10013, 含有高葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠) 的选择性培养基中培养约两周。1-2 周后, 细胞培养于其中的 HAT 替换成 HT 的培养基中。然后通过 ELISA 来筛选各孔中的人抗 DKK1 单克隆 IgG 抗体。一旦杂交瘤大量生长, 就通常在 10-14 天后监测培养基。抗体分泌性杂交瘤重涂布、再次筛选并且, 如果仍然对人类 IgG 呈阳性, 则将抗 DKK1 单克隆抗体通过限制性稀释进行至少两次亚克隆。然后将稳定的亚克隆于体外培养以在组织培养基中产生小量抗体用于进一步的表征。

[0274] 人类 Ig 小鼠的免疫

[0275] 如描述于 Lonberg, N 等人, 1994Nature368(6474):856-859; Fishwild, D. 等人, 1996Nature Biotechnology14:845-851; 和 PCT 公开 W098124884 和 W001/14424 中的, 当人类 Ig 小鼠用于产生本发明的人抗体时, 这类小鼠可用 DKK1 抗原和 / 或重组 DKK1、或 DKK1 融合蛋白的纯化的或浓缩的制剂来免疫。第一次注射时小鼠可以是 6-16 周龄。例如, DKK1 抗原的纯化的或重组的制剂 (5-50 μ g) 可用于进行腹膜内免疫人类 Ig 小鼠。

[0276] 产生对 DKK1 的完整人单克隆抗体的详细程序如上所述。不同抗原累积的经验已显示当使用完全弗氏佐剂中的抗原进行腹膜内 (IP) 初始免疫时, 转基因小鼠应答, 接下来

使用不完全弗氏佐剂中的抗原进行每隔一周 IP 免疫（总达 6 次）。然而，发现除弗氏之外的佐剂也有效。另外，缺乏佐剂的整个细胞显现非常高的免疫原性。眼眶取血获得的血浆样品可在免疫方案的过程中监测免疫应答。血浆可通过 ELISA 筛选，并且具有充分效价的抗 DKK1 人类免疫球蛋白的小鼠可用于融合。处死和移除脾脏前的 3 天用抗原对小鼠可进行静脉推射。预期每次免疫可能需要进行 2-3 次融合。每种抗原通常免疫 6 至 24 只小鼠。通常使用 HCo7 和 HCo12 品种。另外，HCo7 和 HCo12 转基因可共同培育成具有两种不同人类重链转基因的单一小鼠（HCo7/HCo12）。

[0277] 产生人单克隆抗体的杂交瘤的制备

[0278] 为制备产生本发明的人单克隆抗体的杂交瘤，可将免疫小鼠的脾细胞和 / 或淋巴腺细胞分离并融合到合适的永生化细胞系，如小鼠骨髓瘤细胞。得到的杂交瘤可筛选用于产生抗原特异性抗体。例如，可将免疫小鼠的脾脏淋巴细胞的单细胞悬浮液用 50% PEG 融合到六分之一量的 P3X63-Ag8.653 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞。细胞在平底微量滴定板中以约 2×10^4 涂布，接下来在含 20% 胎克隆血清、18% “653” 条件培养基、5% origin (IGEN)、4mM L-谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠、5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50 单位 / ml 青霉素、50mg/ml 链霉素、50mg/ml 庆大霉素和 IX HAT (Sigma ; 融合后 24h 加入 HAT) 的选择性培养基中温育两周。约两周后，细胞可培养于其中的 HAT 培养基替换为 HT 培养基中。然后单独的孔通过 ELISA 来筛选人类单克隆 IgM 和 IgG 抗体。只要发生广泛的杂交瘤生长，通常就在 10-14 天后观测培养基。抗体分泌性杂交瘤重涂布、再次筛选，并且如果仍然对人类 IgG 呈阳性，则可将单克隆抗体通过限制性稀释进行至少两次亚克隆。然后将稳定的亚克隆于体外培养，用以在组织培养基中产生小量抗体用于表征。

[0279] 为纯化人单克隆抗体，可将选择的杂交瘤在两升搅拌式培养瓶中生长以纯化单克隆抗体。采用 A 蛋白 - 琼脂糖凝胶 (Pharmacia, Piscataway, N. J.) 的亲和色谱法前可过滤和浓缩上清液。洗脱的 IgG 可通过凝胶电泳和高效液相色谱检测以确保纯度。缓冲溶液可调换成 PBS，并且浓度可通过使用消光系数为 1.43 的 OD_{280} 来测定。可将单克隆抗体等分并储存于 -80°C 。

[0280] 产生单克隆抗体的转染瘤的制备

[0281] 还可以在宿主细胞转染瘤中产生本发明的抗体，使用例如，本领域公知的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合（例如，Morrison, S. (1985) Science 229 :1202）。

[0282] 例如，为了表达抗体，或者其抗体片段，可以通过标准分子生物学技术（例如，PCR 扩增或 cDNA 克隆，使用表达目的抗体的杂交瘤）可以得到编码部分或全长轻链和重链的 DNA，并且可以将 DNA 插入到表达载体中，使得基因有效连接到转录和翻译控制序列。在该上下文中，术语“有效连接”意指抗体基因连接到载体中，从而载体内的转录和翻译控制序列发挥它们调节抗体基因转录和翻译的预期功能。选择表达载体和表达控制序列以与所用的表达宿主细胞相容。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入到单独的载体，或者更典型地，可以将两种基因插入到相同的表达载体中。通过标准方法向表达载体中插入抗体基因（例如，在抗体基因片段或载体上连接互补限制性位点，或者如果不存在限制性位点，那么为平末端连接）。本文所述抗体的轻链和重链可变区可以用于产生任何抗体同种型的全长抗体基因，通过将所述基因插入到已经编码所希望同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中，使得 V_H 区段有效连接载体内的 CH 区段并且 V_L 区段有效连接载体内的 CL 区

段,可以实现所述产生。额外或备选地,重组表达载体可以编码信号肽,其方便抗体链从宿主细胞的分泌。可以将抗体链基因克隆到载体中使得信号肽与抗体链基因的氨基末端符合读框地连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0283] 除了抗体链基因外,本发明的重组表达载体还可以携带控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调节序列。术语“调节序列”意在包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多聚腺苷酸化信号),其控制抗体链基因的转录或翻译。此类调节序列描述于例如 Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA1990)。本领域技术人员将明白表达载体的设计,包括调节序列的选择,可以依赖于此类因素,如待转化的宿主细胞的选择、所希望的蛋白质表达水平,等等。哺乳动物宿主细胞表达的调节序列包括指导哺乳动物细胞中高水平蛋白质表达的病毒元件,如启动子和/或增强子,其来自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒 40(SV40)、腺病毒(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)),和多瘤。备选地,可以使用非病毒调节序列,如泛蛋白启动子或 P 珠蛋白启动子。此外,由不同来源的序列组成的调节元件,如 SRa 启动子系统,其含有来自 SV40 早期启动子的序列和人 T 细胞白血病病毒 1 型的长末端重复的序列(Takebe, Y. 等人, 1988 Mol. Cell. Biol. 8 :466-472)。

[0284] 除了抗体链基因和调节序列外,本发明的重组表达载体可以携带额外的序列,如调节宿主细胞中载体复制的序列(如复制原点)和选择标记基因。选择标记基因方便已经导入载体的宿主细胞的选择(见,例如, Axel 等人的美国专利号 4, 399, 216, 4, 634, 665 和 5, 179, 017)。例如,通常,选择标记基因对已经导入载体的宿主细胞赋予对药物(如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤)的抗性。选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于 dhfr- 宿主细胞,使用氨甲蝶呤选择/扩增)和 neo 基因(用于 G418 选择)。

[0285] 对于轻链和重链的表达,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞。术语“转染”的多种形式意在包括常用于向原核或真核宿主细胞中导入外源 DNA 的多种技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE- 葡聚糖转染等等。在理论上可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体。讨论了抗体在真核细胞,尤其哺乳动物宿主细胞中的表达,因为此类真核细胞,尤其哺乳动物细胞,比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠的和免疫活性抗体。已经报导抗体基因的原核表达对于产生高产量的活性抗体是无效的(Boss, M. A. 和 Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6 :12-13)。

[0286] 用于表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(包括 dhfr-CHO 细胞,描述于 Urlaub 和 Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 4216-4220, 使用 DH FR 选择标记,如 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159 : 601-621 中描述)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。具体地,为使用 NS0 骨髓瘤细胞,另一种表达系统是示于 W087/04462, W089/01036 和 EP338, 841 中的 GS 基因表达系统。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞足够允许抗体在宿主细胞中表达的时间或者将抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中来产生抗体。可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基回收抗体。

[0287] 药物组合物

[0288] 另一方面,本发明提供了组合物,例如,药物组合物,其含有本发明的中和抗

DKK1/4 组合物或其抗原结合片段之一或组合,与可药用载体一起配制。此类组合物可以包括本发明的抗体或免疫连接物或双特异性分子之一或组合(例如,两种或多种不同抗体的组合)。例如,本发明的药物组合物可以包含结合靶抗原上不同表位或者具有互补活性的抗体(或者免疫连接物或双特异性分子)的组合。

[0289] 也可以以组合疗法,即与其他药剂相组合来施用本发明的药物组合物。

[0290] 例如,组合疗法可以包括与至少一种其他抗炎剂或抗骨多孔性制剂组合的本发明的抗 DKK1 抗体。可以用于组合疗法的治疗剂的实例在下面关于本发明抗体用途的章节中更详细地描述。

[0291] 本文所用的“可药用载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂,等等。载体应该适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或灌输)。取决于施用途径,活性化合物,即抗体、免疫连接物,或双特异性分子可以用材料包衣以保护化合物免于酸和可以失活该化合物的其他自然条件的作用。

[0292] 本发明的药物化合物可以包括一种或多种可药用盐。“可药用盐”指保留亲本化合物的所希望的生物活性并且不赋予任何不希望的毒理学效应的盐(见例如, Berge, S. M., 等人, 1977 J. Pharm. Sci. 66 :1-19)。此类盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括来自无毒无机酸的盐,如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸的盐,等等,以及来自无毒有机酸的盐,所述无毒有机酸为如脂肪族一或二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂肪族和芳族磺酸,等等。碱加成盐包括来自碱土金属如钠、钾、镁、钙等等的那些盐,以及来自无毒有机胺的盐,所述无毒有机胺为如 N, N' - 二苯甲基乙二胺、N- 甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因,等等。

[0293] 本发明的药物组合物还可以包括可药用抗氧化剂。可药用抗氧化剂的实例包括:水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等等;油可溶的抗氧化剂,如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α 生育酚,等等;和金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸,等等。

[0294] 可以用于本发明的药物组合物中的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇,等等),和其合适的混合物,植物油,如橄榄油,和可注射的有机酯,如油酸乙酯。例如,通过使用包衣材料,如卵磷脂,对于分散体的情况通过保持所需的颗粒大小,和通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。

[0295] 这些组合物还可以含有佐剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。微生物存在的防止可以通过如上消毒程序,和通过包括多种抗菌剂和抗真菌剂来确保,所述抗菌剂和抗真菌剂为例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等等。还希望在组合物中包括等渗剂,如糖、氯化钠等等。此外,通过包括延缓吸收的试剂,如单硬脂酸铝和明胶可以引起可注射药物形式的延长吸收。

[0296] 可药用载体包括无菌水溶液或分散体和无菌粉剂,其用于临时制备无菌注射液或分散体。此类介质和试剂在药学活性物质中的用途是本领域已知的。除了与活性化合物不相容的常规介质或试剂之外,预期其用于本发明的药物组合物。还可以将补充性活性化合物掺入组合物中。

[0297] 治疗组合物通常必须是在生产和保存条件下是无菌的和稳定的。可以将组合物配制成溶液剂、微乳剂、脂质体或适于高药物浓度的其他有序结构。载体可以是溶剂或分散介质,含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇,等等),和其合适的混合物。可以保持适当流动性,例如,通过使用包衣,如卵磷脂,对于分散体的情况通过保持所需的颗粒大小和通过使用表面活性剂。在许多情况中,可以在组合物中包括等渗剂,例如,糖、多元醇,如甘露醇,山梨醇,或者氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延缓吸收的物质,如单硬脂酸盐和明胶来实现。

[0298] 通过将活性化合物以所需的量在合适的溶剂中与上面列举的成分之一或者组合掺和,如果需要,接着无菌微量过滤来制备无菌注射溶液。通常,通过将活性化合物掺入无菌载体制备分散体,所述载体含有基本分散介质和来自上面列举的那些成分的所需的其他成分。对于用于制备无菌注射溶液的无菌粉剂的情况,制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其产生活性成分加上来自其之前无菌过滤溶液的任何额外的所需成分的粉末。

[0299] 可以与载体物质组合以产生单一剂型的活性成分的量将取决于被治疗的受试者、具体施用方式而变。可以与载体物质组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的组合物的量。通常,以百分比计,该量将为约 0.01% 到约 99% 活性成分、约 0.1% 到约 70%,或约 1% 到约 30% 活性成分与可药用载体组合。

[0300] 调节剂量方案以提供最佳的目的应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用单次快速浓注,可以随时间施用几个分份剂量,或者可以根据治疗情况的紧迫性成比例地减小或增加剂量。特别有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物以容易施用和剂量统一。如本文所用的剂量单位形式指适宜作为待治疗受试者的单一剂量的物理上分散的单位;每个单位含有预定量的活性成分,所述量经计算以与所需的药物载体结合产生所希望的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格由如下决定并且直接依赖于:活性化合物的独特特征和待实现的具体治疗效果,和本领域中配制用于治疗个体中敏感性的这种活性化合物的固有局限性。

[0301] 对于抗体施用,剂量为约 0.0001 到 200mg/kg,更通常 0.01 到 50mg/kg 宿主体重。例如,剂量可以为 0.3mg/kg 体重、1mg/kg 体重、3mg/kg 体重、5mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或 1-20mg/kg 的范围内。示例性治疗方案需要每周施用一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每 3 月一次、或每 3 到 6 月一次。本发明的抗 DKK1 抗体的剂量方案可以包括通过静脉内或皮下施用 1mg/kg 体重或 3mg/kg 体重,用下面的给药方案之一施用抗体:例如,每四周一次施用 6 次剂量,然后每 3 月一次;每 3 周一次;3mg/kg 体重一次,接着每 3 周 1mg/kg 体重。

[0302] 在一些方法中,同时施用具有不同结合特异性的两种或多种单克隆抗体,在这种情况下施用的每种抗体的剂量落入所指出的范围内。通常在多个时机施用抗体。单次剂量之间的间隔可以是例如每周、每月、每 3 月或每年。间隔也可以是不规则的,通过测量患者中针对靶抗原或某些生物标记物如 OCN、OPG 或 PINP 的抗体的血液水平来指示。在一些方法中,调节剂量以实现血浆抗体浓度为约 1-1000 μ g/ml 并且在一些方法中为约 25-300 μ g/ml。

[0303] 备选地,可以作为持续释放制剂施用抗体,在该情况中,需要低频率的施用。剂量和频率取决于抗体在患者中的半寿期而变。通常,人抗体显示出最长的半寿期,其次是人源

化抗体、嵌合抗体,和非人抗体。剂量和施用频率可以随着治疗是预防性还是治疗性的而变。在预防性应用中,在长时间期间内以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者终生持续接受治疗。在治疗应用中,有时需要以相对较短的间隔施用相对高剂量直到疾病的进展减慢或者终止或者直到患者显示出疾病症状的部分或完全减轻。之后,可以对患者施用预防方案。

[0304] 本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以改变,只要活性成分的量对于具体患者、组合物和施用方式实现所希望的治疗应答,而对该患者无毒性。所选的剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因素,包括使用的本发明的具体组合物或者其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,使用的具体化合物的排泄速率,治疗持续时间,与所用的具体组分组合使用的其他药物、化合物和 / 或物质、被治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康和以前的医疗史,和医学领域中公知的其他因素。

[0305] 本发明抗 DKK1 抗体的“治疗有效剂量”可以导致疾病症状严重性的降低、无疾病症状期的频率和持续时间的增加,或者由于疾病折磨而引起的病损或残疾的预防。

[0306] 可以使用本领域已知的一种或多种方法,通过一种或多种施用途径施用本发明的组合物。如技术人员将理解,施用途径和 / 或方式将取决于所希望的结果而变。本发明抗体的施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱其他肠胃外施用途径,例如,通过注射或灌注。如本文使用的短语“肠胃外施用”指不同于经肠和局部施用的施用方式,通常通过注射,并且包括但不限于,静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下腔、脊柱内、硬膜外和 intrastemal 注射和灌注。

[0307] 备选地,本发明的抗体可以通过非肠胃外途径施用,如局部、表皮或粘膜施用途径,例如,鼻内、口腔、阴道、直肠、舌下或局部。

[0308] 可以用保护活性化合物免于快速释放的载体制备活性化合物,如控释制剂,包括植入物、经皮贴剂,和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的生物相容的聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的许多方法被申请专利或者是本领域技术人员公知的。见例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0309] 可以用本领域已知的医学装置施用治疗组合物。例如,在一个实施方案中,可以用无针头的皮下注射装置施用本发明的治疗组合物,如美国专利号 5, 399, 163 ; 5, 383, 851 ; 5, 312, 335 ; 5, 064, 413 ; 4, 941, 880 ; 4, 790, 824 或 4, 596, 556 中所示的装置。可用于本发明的公知的植入物或组件的实例包括 : 美国专利号 4, 487, 603, 其说明了用于以受控速率分配药物的可植入的微量输液泵 ; 美国专利号 4, 486, 194, 其说明了用于通过皮肤施用药物的治疗装置 ; 美国专利号 4, 447, 233, 其说明了用于以精确的输注速率递送药物的药物输液泵 ; 美国专利号 4, 447, 224, 其说明了用于连续药物递送的变速流可植入输液器 ; 美国专利号 4, 439, 196, 其说明了具有多个腔室的渗透药物递送系统 ; 和美国专利号 4, 475, 196, 其说明了渗透药物递送系统。将这些专利引入本文作为参考。许多其他此类植入物、递送系统,和组件是本领域技术人员已知的。

[0310] 在一些实施方案中,可以配制本发明的人单克隆抗体以确保在体内适当分配。例如,血脑屏障 (BBB) 排除许多高亲水性化合物。为了确保本发明的治疗化合物

穿过 BBB(如果希望),可以将它们用例如脂质体制配。关于生产脂质体的方法,见例如,美国专利 4,522,811;5,374,548;和 5,399,331。脂质体可以包含一种或多种部分,其被选择性运输到特定细胞或器官中,从而增强定向药物递送(见,例如, V. V. Ranade, 1989J. Cline Pharmacol. 29:685)。示例性定向部分包括叶酸或生物素(见,例如, Low 等人的美国专利 5,416,016);甘露糖苷类(Umezawa 等人,1988Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038);抗体(P. G. Bloeman 等人,1995FEBS Lett. 357:140;M. Owais 等人, 1995Antimicrob. Agents Chernother. 39:180);表面活性剂 A 蛋白受体(Briscoe 等人, 1995Am. J. Physiol. 1233:134);p120(Schreier 等人,1994J. Biol. Chem. 269:9090);也见 K. Keinanen;M. L. Laukkanen,1994FEBS Lett. 346:123;J. J. Killion;I. J. Fidler, 1994Immunomethods4:273。

[0311] 组合

[0312] 本发明还涉及在哺乳动物特别是人类中以药用物质的组合预防或治疗增殖性疾病或疾病如癌症的方法,其中包括:

[0313] (a) 中和抗 DKK1/4 组合物;和

[0314] (b) 一种或多种药用活性物质。

[0315] 本发明另外涉及的药物组合物,其包括:

[0316] (a) 中和抗 DKK1/4 组合物;

[0317] (b) 药用活性物质;和

[0318] (c) 可药用载体。

[0319] 本发明另外涉及商业包装或产品,其包括:

[0320] (a) 中和抗 DKK1/4 组合物的药物制剂;和

[0321] (b) 同时、并列、单独或依次使用的药用活性物质的药物制剂。

[0322] 药用活性物质

[0323] 术语“药用活性物质”是涵盖许多具有不同作用机理的药用活性物质的广义范畴。若这些药用活性物质和中和 DKK1/4 抗体/组合物的组合可导致癌症治疗的改进。通常,药用活性物质依据其作用机理分类。许多可获得的物质是多种肿瘤发生途径的抗代谢物,或与肿瘤细胞的 DNA 反应。这些也有抑制酶例如拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 的物质,或抗有丝分裂的物质。

[0324] 术语“药用活性物质”尤其指不同于中和抗 DKK1/4 组合物或其衍生物的任一药用活性物质。它包括但不限于:

[0325] i. 芳化酶抑制剂;

[0326] ii. 抗雌激素药、抗雄激素药或促性腺激素释放因子激动剂;

[0327] iii. 拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 II 抑制剂;

[0328] iv. 微管活性剂、烷化剂、抗肿瘤的抗代谢物或铂化合物;

[0329] v. 靶向/降低蛋白质或脂质激酶活性、或者蛋白质或脂质磷酸酶活性的化合物,或进一步的抗血管生成的化合物或诱导细胞分化过程的化合物;

[0330] vi. 单克隆抗体;

[0331] vii. 环加氧酶抑制剂、二磷酸盐、类肝素酶抑制剂、生物反应调节剂;

[0332] viii. Ras 致癌同种型抑制剂;

- [0333] ix. 端粒末端转移酶抑制剂；
- [0334] x. 蛋白酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、甲硫氨酸氨肽酶抑制剂或蛋白酶体抑制剂；
- [0335] xi. 用于治疗血液性恶性肿瘤的试剂、靶向，降低或抑制 Flt-3 活性的物质；
- [0336] xii. HSP90 抑制剂；
- [0337] xiii. 抗增殖性抗体；
- [0338] xiv. 组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂；
- [0339] xv. 靶向、降低或抑制丝氨酸 / 苏氨酸 mTOR 激酶活性 / 功能的化合物；
- [0340] xvi. 促生长素抑制素受体拮抗剂；
- [0341] xvii. 抗白血病的化合物；
- [0342] xviii. 肿瘤细胞损伤方式；
- [0343] xix. EDG 结合剂；
- [0344] xx. 核苷酸还原酶抑制剂；
- [0345] xxi. S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶抑制剂；
- [0346] xxii. VEGF 或 VEGFR 的单克隆抗体；
- [0347] xxiii. 光动力学治疗；
- [0348] xxiv. 血管稳定 (Angiostatic) 类固醇；
- [0349] xxv. 含糖皮质激素的植入物；
- [0350] xxvi. ATI 受体拮抗剂；和
- [0351] xxvii. ACE 抑制剂。

[0352] 本文所用的术语“芳化酶抑制剂”涉及抑制雌激素生成即抑制底物雄烯二酮和睾酮分别转化为雌酮和雌二醇的化合物。该术语包括但不局限于类固醇、尤其是阿他美坦、依西美坦和福美坦，以及特别地非类固醇的、尤其是氨鲁米特、洛太米特、吡鲁米特、曲洛司坦、睾内脂、肤康王、伏氯唑、法倔唑、阿那曲唑和来曲唑。依西美坦商标为 AROMASIN；福美坦商标为 LENTARON；法倔唑商标为 AFEMA；阿那曲唑商标为 ARIMIDEX；来曲唑商标为 FEMARA 或 FEMAR；氨鲁米特商标为 ORIMETEN。包含的药用活性物质为芳化酶抑制剂的本发明组合对于治疗诸如乳腺肿瘤的激素受体阳性肿瘤尤其有用。

[0353] 本文所用的术语“抗雌激素药”涉及在雌激素受体水平对抗雌激素效应的化合物。该术语包括但不局限于他莫西芬、氟维司群、雷咯昔芬和盐酸雷咯昔芬。他莫西芬可以以其 NOLVADEX 的商品化形式进行施用。盐酸雷咯昔芬可以以其 EVISTA 的商品化形式进行施用。氟维司群可以按照美国专利号 4,659,516 配制并且商标为 FASLODEX。包含的药用活性物质为抗雌激素药的本发明组合对于治疗诸如乳腺肿瘤的雌激素受体阳性肿瘤尤其有用。

[0354] 本文所用的术语“抗雄激素”涉及任何能够抑制雄激素生物效应的物质，并且包括但不局限于能够按照美国专利号 4,636,505 所公开的配制的比卡鲁胺 (CASODEX)。

[0355] 本文所用的术语“促性腺激素释放因子激动剂”包括但不局限于阿巴瑞克、戈舍瑞林和醋酸戈舍瑞林。戈舍瑞林在美国专利号 4,100,274 中得到公布，并且商标为 ZOLADEX。阿巴瑞克可以按照美国专利号 5,843,901 中公布的配方进行制造。

[0356] 本文所用的术语“拓扑异构酶 I 抑制剂”包括但不局限于托泊替康、gimatecan、依立替康、喜树碱及其类似物、9-硝基喜树碱和大分子的喜树碱结合物

PNU-166148 (W099/17804 中的化合物 A1)。依立替康可以以例如其诸如商标 CAMPTOSAR 的商品化形式进行施用。托泊替康可以以例如其诸如商标 HYCAMTIN 的商品化形式进行施用。

[0357] 本文所用的术语“拓扑异构酶 II 抑制剂”包括但不限于诸如多柔比星,其包含脂质体制剂,如 CAELYX;其包含脂质体制剂,如 DAUNOSOME、柔红霉素、表柔比星、伊达比星和奈莫柔比星、米托蒽醌和洛索蒽醌(蒽醌)、以及依托泊苷和替尼泊苷(鬼臼毒素)。依托泊苷商标为 ETOPOPHOS;替尼泊苷商标为 VM26-BRISTOL;多柔比星商标为 ADIRIBLASTIN 或 ADIRIAMYCIN;表柔比星商标为 FARMORUBICIN;伊达比星商标为 ZAVEDOS 且米托蒽醌商标为 NOVANTRON。

[0358] 本文所用的术语“微管活性剂”涉及微管稳定剂、微管去稳定剂和微管聚合抑制剂,其包括但不限于诸如紫杉醇和多西紫杉的紫杉烷、诸如长春碱、尤其是硫酸长春碱盐的长春花生物碱、尤其是硫酸长春新碱的长春新碱、长春瑞滨、discodermolide、秋水仙碱和诸如 epothilone B 或其衍生物的 epothilone 及其衍生物。紫杉醇商标为 TAXOL;多西紫杉醇商标为 TAXOTERE;硫酸长春碱商标为 VINBLASTIN R.P;硫酸长春新碱商标为 FARMISTIN。也包括紫杉醇的一般形式以及紫杉醇的多种剂量形式。紫杉醇的一般形式包括但不限于盐酸倍他洛尔。紫杉醇的多种剂量形式包括但不限于商标为 ABRAXANE、ONXOL、CYTOTAX 的清蛋白纳米紫杉醇;discodermolide 可例如美国专利号 5,010,099 中所公开的获得。还包含美国专利号 6,194,181、W098/10121、W098/25929、W098/08849、W099/43653、W098/22461 和 W000/31247 中公布的 Epothilone 衍生物。特别优选 Epothilone A 和 / 或 B。

[0359] 本文所用的术语“烷化剂”包括但不限于环磷酰胺、异磷酰胺、美法仑,或亚硝基脲 (BCNU 或 Gliadel),或泰莫佐罗 (TEMODAR)。环磷酰胺可以以例如其诸如商标 CYCLOSTIN 的商品化形式进行施用。环磷酰胺可以以例如其诸如商标 CYCLOSTIN 的商品化形式进行施用;而异环磷酰胺可以以例如其诸如商标 HOLOXAN 的商品化形式进行施用。

[0360] 术语“抗肿瘤的抗代谢物”包括但不限于 5-氟尿嘧啶 (5-FU)、卡培他滨、吉西他滨、DNA 脱甲基化剂、例如 5-阿扎胞苷和地西他滨、氮甲喋呤和依达曲沙、以及诸如培美曲塞的叶酸拮抗剂。卡培他滨可以以例如其诸如商标 XELODA 的商品化形式进行施用。吉西他滨可以以例如其诸如商标 GEMZAR 的商品化形式进行施用。

[0361] 本文所用的术语“铂化合物”包括但不限于卡铂、顺铂、顺氯氨铂、奥沙利铂、沙铂和铂物质如 ZD0473。卡铂可以以例如其商标 CARBOPLAT 的形式进行施用。奥沙利铂可以以例如其商标 ELOXATIN 的形式进行施用。

[0362] 本文所用的术语“靶向 / 减少蛋白质或脂质激酶活性,或蛋白质或脂质磷酸酶活性的化合物,或其他抗血管生成的化合物”包括但不限于,酪氨酸蛋白激酶和 / 或丝氨酸和 / 或苏氨酸激酶抑制剂或脂质激酶抑制剂,例如:

[0363] i) 靶向、降低或抑制血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 活性的化合物,如靶向、降低或抑制 VEGF 活性的化合物,尤其是抑制 VEGF 受体的化合物,例如但不限于,7H-吡咯 [2,3-d] 嘧啶衍生物 (AEE788)、BAY43-9006、公开于 W000/09495 中的异胆碱 (isocholine) 化合物如 (4-叔丁基-苯基)-94-吡啶-4-基甲基-异喹啉-1-基)-胺 (AAL881);和

[0364] ii) 靶向、降低或抑制血小板衍生的生长因子受体 (PDGFR) 活性的化合物,例如靶向、降低或抑制 PDGFR 活性的化合物,尤其是抑制 PDGF 受体的化合物,例如 N-苯基-2-嘧

啉-胺衍生物,如 imatinib、SU101、SU6668 和 GFB-111;

[0365] iii) 靶向、降低或抑制成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 活性的化合物;

[0366] iv) 靶向、降低或抑制胰岛素样生长因子受体 1 (IGF-1R) 活性的化合物,例如靶向、降低或抑制 IGF-1R 活性的化合物,尤其是抑制 IGF-1R 受体的化合物,如 W002/092599 中公布的那些化合物以及衍生物,4-氨基-5-苯基-7-环丁基-吡咯 [2,3-d] 嘧啶衍生物 (AEW541)。

[0367] v) 靶向、降低或抑制 Trk 受体酪氨酸激酶家族活性的化合物;

[0368] vi) 靶向、降低或抑制 Ax1 受体酪氨酸激酶家族活性的化合物;

[0369] vii) 靶向、降低或抑制 c-Met 受体活性的化合物;

[0370] viii) 靶向、降低或抑制 Ret 受体酪氨酸激酶活性的化合物;

[0371] ix) 靶向、降低或抑制 Kit/SCFR 受体酪氨酸激酶活性的化合物;

[0372] x) 靶向、降低或抑制 C-kit 受体酪氨酸激酶 (PDGFR 家族的一部分) 活性的化合物,例如靶向、降低或抑制 c-Kit 受体酪氨酸激酶家族活性的化合物,尤其是抑制 c-Kit 受体的化合物,例如 imatinib;

[0373] xi) 靶向、降低或抑制 c-Ab1 家族成员及其基因融合产物 (例如 BCR-Ab1 激酶) 活性的化合物,例如靶向、降低或抑制 c-Ab1 家族成员及其基因融合产物的化合物,例如 N-苯基-2-嘧啉-胺衍生物,例如 imatinib、PD180970、AG957、NSC680410 或来自 ParkeDavis 的 PD173955、BMS354825;

[0374] xii) 靶向、降低或抑制蛋白激酶 C (PKC) 和丝氨酸 / 苏氨酸激酶的 Raf 家族成员、MEK、SRC、JAK、FAK、PDK 和 Ras/MAPK 家族成员或者 PI (3) 激酶家族或 PI (3) 激酶相关激酶家族成员、和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶家庭 (CDK) 成员活性的、并且尤其是那些美国专利号 5,093,330 中公布的诸如米喹妥林的星形孢菌素衍生物的化合物;其他化合物的实例还包括例如 UCN-01、沙芬戈、BAY43-9006、苔藓抑素 I、哌立福辛、11mofosine、R0318220 和 R0320432;诸如 W000/09495 中公布的那些异喹啉化合物、FTI、PD184352 或 QAN697、P13K 抑制剂;

[0375] xiii) 靶向、降低或抑制蛋白质酪氨酸激酶活性的化合物,例如靶向、降低或抑制蛋白质酪氨酸激酶抑制剂活性的、包括甲磺酸伊马替尼 (GLEEVEC)、酪氨酸磷酸化抑制剂 (tyrphostin) 或 pyrimidylaminobenzamide 及其衍生物 (AMN107)。酪氨酸磷酸化抑制剂优选低分子量 ($M_r < 1500$) 的化合物或其可药用盐,尤其是选自苄叉丙二腈类或者 S-芳基苯丙二腈或双底物喹啉类 (bisubstrate quinoline class) 的化合物,更尤其是选自酪氨酸磷酸化抑制剂 A23/RG-50810、AG99、酪氨酸磷酸化抑制剂 AG213、酪氨酸磷酸化抑制剂 AG1748、酪氨酸磷酸化抑制剂 AG490、酪氨酸磷酸化抑制剂 B44、酪氨酸磷酸化抑制剂 B44(+) 对映异构体、酪氨酸磷酸化抑制剂 AG555、AG494、酪氨酸磷酸化抑制剂 AG556、AG957 和 adaphostin (4-[(2,5-二羟基苯基)甲基]氨基)-苯甲酸金刚烷酯、NSC680410、adaphostin) 的化合物;

[0376] xiv) 靶向、降低或抑制受体酪氨酸激酶的表皮生长因子家族 (同二聚体或异二聚体的 EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4) 活性的化合物,例如靶向、降低或抑制表皮生长因子受体家族活性的化合物尤其是抑制诸如 EGF 受体、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的 EGF 受体酪氨酸激酶家族成员或者结合 EGF 或 EGF 相关配体的化合物、蛋白质或抗体,并且特别是那

些 W097/02266 中一般性和特别地公布的化合物、蛋白质或单克隆抗体,例如实施例 39 的化合物或 EP 0 564 409、W099/03854、EP0520722、EP 0 566226、EP 0 787 722、EP 0 837 063、美国专利号 5,747,498、W098/10767、W097/30034、W097/49688、W097/38983、并且尤其是 W096/30347(例如命名为 CP358774 的化合物)、W096/33980(例如化合物 ZD1839)和 W095/03283(例如化合物 ZM105180)中的化合物,例如司徒曼布(HERCEPTIN)、西妥昔单抗、Iressa、Tarceva、OSI-774、CI-1033、EKB-569、GW-2016、E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3 或 E7.6.3、以及 W003/013541 中公开的 7H-吡咯并-[2,3-d]嘧啶衍生物、厄洛替尼和吉非替尼。厄洛替尼可以以例如其诸如商标 TARCEVA 的商品化形式进行施用;而吉非替尼可以以例如其诸如商标 IRESSA 的商品化形式进行施用;以及

[0377] xv) 靶向、降低或抑制丝氨酸/苏氨酸 mTOR 激酶活性的化合物尤其是抑制 mTOR 激酶家族成员化合物、蛋白质或抗体,例如 RAD、RAD001、CCI-779、ABT578、SAR543、雷帕霉素及其衍生物、来自 Ariad 的 AP23573、伊维莫司(CERTICAN)和西罗莫司。CERTICAN(伊维莫司, RAD)是防止 T 细胞和血管平滑肌细胞增殖的研究性新型增殖信号抑制剂。

[0378] 当提及抗体时,其包括完整的单克隆抗体、纳米抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体组成的多特异性抗体,以及抗体片段,只要它们呈现预期的生物学活性。

[0379] 本文所用的短语“靶向、降低或抑制蛋白质或脂质磷酸酶活性的化合物”包括但不限于,磷酸酶 1、磷酸酶 2A、PTEN 或 CDC25 的抑制剂,例如冈田酸或其衍生物。

[0380] 本文所用的术语“单克隆抗体”包括但不限于,贝伐单抗、西妥昔单抗、曲妥单抗、替伊莫单抗、狄诺塞麦、抗-CD40、抗-GM-CSF,以及托西莫单抗和碘 I131。贝伐单抗可以以例如 AVASTIN 的商品化形式进行施用;西妥昔单抗可以以例如 ERBITUX 的商品化形式进行施用;曲妥单抗可以以例如 HERCEPTIN 的商品化形式进行施用;利妥昔单抗可以以例如 MABTHERA 的商品化形式进行施用;替伊莫单抗可以以例如 ZEVULIN 的商品化形式进行施用;抗-RANKL 可以以例如狄诺塞麦(AMG162)的商品化形式进行施用、抗-CD40 可以以例如 HCD122(美国专利申请 2002-0106371)的商品化形式进行施用,并且托西莫单抗和碘 I131 可以以例如 BEXXAR 的商品化形式进行施用。

[0381] 短语“进一步的抗血管生成的化合物”包括但不限于具有它们的活性具有另一机制、例如与蛋白质或脂质激酶抑制无关的化合物,例如沙利度胺(THALOMID)和 TNP-470。

[0382] 本文所用的短语“诱导细胞分化过程的化合物”包括但不限于视黄酸、 α - γ -或 β -生育酚或 α - γ -或 δ -生育三烯酚。

[0383] 本文所用的术语“环加氧酶抑制剂”包括但不限于例如 Cox-2 抑制剂、5-烷基取代的 2-芳基氨基苯乙酸及衍生物,例如塞来考昔(CELEBREX)、罗非考昔(VIOXX)、艾托考昔、伐地考昔或 5-烷基-2-芳基氨基苯乙酸,例如 5-甲基-2-(2'-氯-6'-氟苯胺基)苯乙酸、鲁米昔布。

[0384] 本文所用的术语“二磷酸盐”包括但不限于 etridonic acid、氯膦酸、替鲁磷酸、帕米磷酸、阿仑磷酸、伊班磷酸、利塞磷酸和唑来磷酸。“Etridonic acid”可以以例如 DIDRONEL 的商品化形式进行施用。“氯膦酸”可以以例如 BONEFOS 的商品化形式进行施用。“替鲁磷酸”可以以例如 SKELID 的商品化形式进行施用。“帕米磷酸”可以以例如 ARELIA 的商品化形式进行施用。“阿仑磷酸”可以以例如 FOSAMAX 的商品化形式进行施用。“伊班磷酸”可以以例如 BONDRANAT 的商品化形式进行施用。“利塞磷酸”可以以例如 ACTONEL 的商

品化形式进行施用。“唑来磷酸”可以以例如 ZOMETA 的商品化形式进行施用。

[0385] 本文所用的术语“类肝素酶抑制剂”是指靶向、降低或抑制硫酸肝素降解的化合物。该术语包括但不限于 PI-88。

[0386] 本文所用的术语“生物反应调节剂”包括但不限于是指淋巴因子或干扰素，例如干扰素 γ 。

[0387] 本文所用的术语“Ras 致癌同种型的抑制剂”包括但不限于 H-Ras、K-Ras 或 N-Ras，如本文所用的，指靶向、降低或抑制 Ras 致癌活性的化合物，例如“法尼基转移酶抑制剂”，例如 L-744832、DK8G557 或 P115777 (ZARNE STRA)。

[0388] 本文所用的术语“端粒末端转移酶抑制剂”包括但不限于靶向、降低或抑制端粒末端转移酶活性的化合物。靶向、降低或抑制端粒末端转移酶活性的化合物尤其是抑制端粒末端转移酶受体的化合物，例如 telomestatin。

[0389] 本文所用的术语“基质金属蛋白酶抑制剂”或 (MMP 抑制剂) 包括但不限于胶原肽模拟抑制剂和非肽模拟抑制剂、四环素衍生物，例如异羟肟酸肽模拟抑制剂巴马司他及其口服的生物有效性类似物马立马司他 (BB-2516)、普琳司他 (AG3340)、metastat (NSC683551)、BMS-279251、BAY12-9566、TAA211、MM1270B 或 AAJ996。

[0390] 本文所用的术语“甲硫氨酸氨肽酶抑制剂”包括但不限于靶向、降低或抑制甲硫氨酸氨肽酶活性的化合物。靶向、降低或抑制甲硫氨酸氨肽酶活性的化合物例如 bengamide 或其衍生物。

[0391] 本文所用的术语“蛋白酶体抑制剂”包括靶向、降低或抑制蛋白酶体活性的化合物。靶向、降低或抑制蛋白酶体活性的化合物包括例如 PS-341、MLN341、硼替佐米或万珂。

[0392] 本文所用的短语“用于治疗血液性恶性肿瘤的物质”包括但不限于 FMS 样酪氨酸激酶抑制剂 (例如靶向、降低或抑制 FMS 样酪氨酸激酶受体 (F1t-3R) 活性的化合物)、干扰素、1- β -D-阿糖呋喃胞嘧啶 (ara-c) 和重硫酸盐 (bisulfan)、以及诸如靶向、降低或抑制退行性淋巴瘤激酶的化合物的 ALK 抑制剂。

[0393] 本文所用的短语“靶向，降低或抑制 F1t-3 活性的物质”包括但不限于抑制 F1t-3 的化合物、蛋白质或抗体，例如 N- 苯甲酰基 - 星孢菌素、米唑妥林、星孢菌素衍生物、SU11248 和 MLN518。

[0394] 本文所用的术语“HSP90 抑制剂”包括但不限于靶向、降低或抑制 HSP90 的内源 ATP 酶活性的化合物；通过泛素蛋白酶体途径降解、靶向、降低或抑制 HSP90 服务蛋白 (HSP90client protein) 的化合物。靶向、降低或抑制 HSP90 内源的 ATP 酶活性的化合物尤其是抑制 HSP90 的 ATP 酶活性的化合物、蛋白质和抗体，例如一种格尔德霉素衍生物 17- 烯丙氨基，17- 去甲氧基格尔德霉素 (17AAG)、格尔德霉素相关的其他化合物、根赤壳菌素抑制剂和 HDAC 抑制剂。

[0395] 本文所用的术语“抗增殖抗体”包括但不限于曲妥单抗 (HERCEPTIN)、曲妥单抗 -DM1、厄洛替尼 (TARCEVA)、贝伐单抗 (AVASTIN)、利妥昔单抗 (RITUXAN)、PR064553 (抗 CD40) 和抗体 2C4。抗体是指例如完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体组成的多特异性抗体、以及抗体片段，只要它们呈现目的生物学活性。

[0396] 本文所用的术语“HDAC 抑制剂”涉及抑制组蛋白脱乙酰酶和具有抗增殖活性的化合物。该化合物包括但不限于公开于 W002/22577 中的化合物，特别是 N- 羟

基-3-[4-[[2-(2-羟乙基)-2-(1H-咪唑-3-基)乙基-3-氨基]甲基]苯基]-2E-2-丙烯酰胺和N-羟基-3-[4-[[[2-(2-甲基-1H-咪唑-3-基)-乙基]-氨基]甲基]苯基]-2E-2-丙烯酰胺及其可药用盐(LBH589)。另外特别包括辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA);[4-(2-氨基-苯氨基)-苯甲基]-氨基甲酸吡啶-3-基甲基酯及其衍生物;丁酸、pyroxamide、曲古抑菌素A、Oxamflatin、apicidin、酯肽、depudecin和trapoxin。

[0397] 本文所用的短语“靶向、降低或抑制丝氨酸/苏氨酸mTOR激酶的活性/功能的化合物”包括但不限于靶向/抑制mTOR激酶家族成员的化合物、蛋白质或抗体,例如RAD、RAD001、CCI-779、ABT578、SAR543、雷帕霉素及其衍生物/类似物、来自Ariad的AP23573和AP23841、依维莫司(CERTICAN)和西罗莫司(RAPAMUNE)、CCI-779和ABT578。CERTICAN(依维莫司,RAD)是防止T细胞和血管平滑肌细胞增殖的研究性新型增殖信号抑制剂。

[0398] 本文所用的术语“生长素抑制素受体拮抗剂”包括但不限于靶向、治疗或抑制生长素抑制素受体的物质,例如奥曲肽和SOM230。

[0399] 本文所用的术语“抗白血病的化合物”包括但不限于嘧啶类似物Ara-C,所述嘧啶类似物为脱氧胞苷的2'- α -羟基核糖(阿糖胞苷)衍生物。还包括次黄嘌呤、6-巯基嘌呤(6-MP)和磷酸氟达拉滨的嘌呤类似物。

[0400] 短语“肿瘤细胞损伤方式”意指诸如电离辐射的方式。上文和下文所述术语“电离辐射”表示以电磁射线(例如X-射线和 γ -射线)或粒子(例如 α -粒子和 β -粒子)发生的电离辐射。电离辐射用于(但不局限于)辐射疗法,并在本领域是已知的。见Hellman, Principles of Radiation Therapy, Cancer, in Principles and Practice of Oncology, Devita等人编辑,第四版,第1卷,第248-275页(1993)。

[0401] 本文所用的术语“EDG结合剂”包括但不限于一类调节淋巴细胞再循环的免疫抑制剂,例如FTY720。

[0402] 本文所用的术语“核苷酸还原酶抑制剂”包括但不限于氟达拉滨和/或ara-C、6-硫代鸟嘌呤、5-FU、克拉曲滨、6-巯基嘌呤(尤其是与ara-C联用治疗ALL)和/或喷司他丁的嘧啶或嘌呤核苷类似物。核苷酸还原酶抑制剂尤其是羟基脲或2-羟基-1H-异咪唑-1,3-二酮衍生物,例如Nandy等人在Acta Oncologica,第33卷,第8期,第953-961页(1994)中提及的PL-1、PL-2、PL-3、PL-4、PL-5、PL-6、PL-7或PL-8。

[0403] 本文所用的术语“S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶抑制剂”包括但不限于公开于美国专利号5,461,076中公开的化合物。

[0404] 本文所用的短语“VEGF或VEGFR的单克隆抗体”包括但不限于W098/35958中公开的化合物,例如1-(4-氯苯胺)-4-(4-吡啶基甲基)-2,3-二氮杂萘或其可药用盐如琥珀酸盐,或W000/09495、W000/27820、W000/59509、W098/11223、W000/27819和EP0769947中公开的化合物;由W000/37502和W094/10202中由Prewett等人,Cancer Res,第59卷,第5209-5218页(1999),Yuan等人,Proc Natl Acad Sci USA,第93卷,第14765-14770页(1996),Zhu等人,Cancer Res,第58卷,第3209-3214页(1998),以及Mordenti等人,Toxicol Pathol,第27卷,第1期,第14-21页(1999)描述的那些化合物;由O'Reilly等人,Cell,第79卷,第315-328页(1994)描述的血管他丁(ANGIOSTATIN);由O'Reilly等人,Cell,第88卷,第277-285页(1997)描述的内皮他丁(ENDOSTATIN);邻氨基苯甲酸酰胺;ZD4190;ZD6474;SU5416;SU6668;贝伐单抗;或抗-VEGF抗体或抗-VEGF受体抗体如

rhuMAb 和 RHUFab ;VEGF 适体如 Macugon ;FLT-4 抑制剂 ;FLT-3 抑制剂 ;VEGFR-2IgG1 抗体 ;Angiozyme (RPI4610) 和 Avastan。

[0405] 本文所用的术语“光动力学治疗”意指使用某些已知为光增敏剂的化学物质来治疗或预防癌症的疗法。光动力学疗法的实例包括使用诸如 VISUDYNE 和卟吩姆钠的物质的疗法。

[0406] 本文所用的术语“血管稳定类固醇”包括但不限于阻止或抑制血管发生的试剂,例如阿奈可他、曲安西龙、氢化可的松、11- α -表氢化可的松、脱氧皮(甾)醇、17 α -羟孕酮、皮质酮、去氧皮质酮、睾酮、雌酮和地塞米松。

[0407] 本文所用的短语“血管稳定类固醇的植入物”包括但不限于诸如氟轻松、地塞米松的物质。

[0408] 本文所用的术语“ATI 受体拮抗剂”包括但不限于诸如 DIOVAN 的物质。

[0409] 本文所用的术语“ACE 抑制剂”包括但不限于 CIBACEN、贝那普利、enalapril (LOTENSIN)、卡托普利、依拉普利、复辛普利、赖诺普利、莫昔普利、喹那普利、雷米普利、培哚普利和群多普利。

[0410] 其他药用活性物质包括但不限于植物生物碱、激素试剂和拮抗剂、生物反应调节剂、优选淋巴因子或干扰素、反义寡核苷酸或寡核苷酸衍生物、或者混杂的试剂或具有其他或未知作用机理的试剂。

[0411] 在提供所引用的专利申请或科技出版物的情况,特别是这些公开物中的化合物权利要求、工作实施例的药物制剂和最终产品,其主题物质,药物制剂及其权利要求因此引入本申请作为参考。这里公开的同样包括相应的立体异构体以及相应的晶体变型,例如溶剂化物和多晶型物。在这里所公开的组合中用作活性成分的化合物可以分别如所引用文件中所描述的那样来进行制备和给药。

[0412] 通过代码编号、通用名称或商业名称鉴定的活性剂结构可以从实际版次的标准提纲“默克索引”或诸如“国际专利 (Patents International) (IMS 世界出版物)”的数据库中获得。其中相应的内容在此引用作为参考。

[0413] 应当清楚的是,在提及组分 (a) 和 (b) 是指也包括任一活性物质的可药用盐。例如,如果由组分 (a) 和 / 或 (b) 构成的活性物质含有,至少一个碱性中心,它们可以形成酸加成盐。如果需要,也可以形成含有另一个存在的碱性中心的相应的酸加成盐。含有酸根 (例如 COOH) 的化合物也可以与碱形成盐。组分 (a) 和 / 或 (b) 中所包含的活性物质或其可药用盐中也可以以氢氧化物的形式应用或包括其他用于结晶的溶剂。

[0414] 因此,一方面,本发明涉及用于预防或治疗哺乳动物 (优选人类患者) 中增殖性疾病或由持续血管生成引发的疾病的方法,该方法包括用药物有效量的下列组合共同或依次治疗患者:

[0415] (a) 中和抗 DKK1/4 的组合物 ;和

[0416] (b) 药用活性物质。

[0417] 在优选的实施方案中,本发明提供药物制剂,其包括:

[0418] (a) 中和抗 DKK1/4 的组合物 ;和

[0419] (b) 选自芳化酶抑制剂、抗雌激素药、抗雄激素药、促性激素释放素拮抗剂、拓扑异构酶 I 抑制剂、拓扑异构酶 II 抑制剂、微管活性剂、烷化剂、抗肿瘤的抗代谢物、铂化合物、

靶向 / 降低蛋白质或脂质激酶活性, 或者蛋白质或脂质磷酸酶活性的化合物、抗血管生成化合物、诱导细胞分化过程的化合物、单克隆抗体、环加氧酶抑制剂、二磷酸盐、类肝素酶抑制剂、生物反应调节剂、Ras 致癌同种型的抑制剂、端粒末端转移酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、甲硫氨酸氨肽酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、靶向, 降低或抑制 Flt-3 活性的物质、HSP90 抑制剂、抗增殖抗体、HDAC 抑制剂、靶向, 降低或抑制丝氨酸 / 苏氨酸 mTOR 激酶的活性 / 功能的化合物、生长素抑制素受体拮抗剂、抗白血病的化合物、肿瘤细胞损伤方式、EDG 结合剂、核苷酸还原酶抑制剂、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶抑制剂、VEGF 或 VEGFR 的单克隆抗体、光动力学治疗、血管稳定类固醇、含糖皮质激素的植入物、ATI 受体拮抗剂以及 ACE 抑制剂的一种或多种药用活性物质。

[0420] 组分 (a) 和 / 或 (b) 的任一组合, 包括施用这两种组分治疗温血动物的方法, 包括同时、分别或依次使用这两种组分的药物组合物, 该组合在增殖性疾病的进程延缓或治疗中的用途, 或制备用于该目的的药物制剂的用途, 或包括组分 (a) 和 / 或 (b) 的这类组合的商品, 全部如上所提及或定义, 随后提及作为本发明的组合 (因此该术语指可在适当时代替该术语的任一这些实施方案)。

[0421] 同时给药例如可以以两种或多种活性成分的一种固定的组合进行, 或通过同时施用独立配制的两种或多种活性成分。依次使用 (施用) 优选地指在一个时间点施用组合的一种 (或多种) 组分, 在不同的时间点施用其他组分, 即以按时间顺序交错的方式, 优选使该组合比单独施用单一化合物显示更有效 (尤其显示协同作用)。分别使用 (施用) 优选指在不同的时间点彼此单独地施用组合的组分, 优选指施用组分 (a) 和 (b) 以使在重叠时 (在相同时间), 两种化合物的可测量血液水平无重叠。

[0422] 两种或多种依次、分别和同时施用的组合也是可能的, 优选组合的药物成分显示联合治疗效果, 这种联合治疗效果远远超过以时间间隔单独使用组合药物成分时产生的效果 (在它们的治疗功效上不能发现相互作用的效果), 协同作用效果是尤其优选的。

[0423] 本文所用的术语“延缓进程”指向处于待治疗疾病的首发发作或复发的前期或早期的患者施用该组合, 其中, 例如诊断患者相应疾病的前期形式, 或哪些患者患有病症, 例如在医学治疗或由意外产生的病症期间, 在该情况下很可能产生相应的疾病。

[0424] “联合治疗活性”或“联合治疗效果”指化合物可以这样的时间间隔 (按时间顺序交错的方式, 尤其是特异时间顺序的方式) 分别施用, 以使它们优选在待治疗的温血动物特别是人类中仍然显示 (优选协同作用) 相互作用 (联合治疗效果)。不管是否如此, 其可由下述血液水平来测定, 所述血液水平显示至少在某些时段两种化合物都存在于待治疗的人类血液中。

[0425] “药物有效的”优选意指针对增殖性疾病进程在治疗上或在更广泛意义上也在预防上有效的量。

[0426] 本文所用的术语“商业包装”或“产品”定义的尤其是一种“成套的试剂盒 (kit of parts)”, 其指的是如上所定义的组分 (a) 和 (b) 可独立地进行给药或通过使用具有不同数量的组分 (a) 和 (b) 的不同固定组合来进行给药, 即可以同时或在不同的时间点进行给药。此外, 这些术语包括在增殖性疾病的进程延缓或治疗中同时、依次 (优选, 按时间顺序交错, 特异时间顺序) 或单独 (较不优选) 使用的, 包含有效成分组分 (a) 和 (b) 的商业包装, 及其说明书。然后试剂盒的各部分可以例如同时给药或按时间顺序交错给药, 即成套

的试剂盒的任何部分可以在不同的时间点以相同或不同的时间间隔进行给药。特别优选所选择的时间间隔可以使各部分的联合应用对所治疗疾病的效果大于仅使用该组合伴侣 (a) 和 (b) 中的任何一种所获得的效果 (如依据标准方法可测定的)。在联合制剂中用于进行给药的组合伴侣 (a) 与组合伴侣 (b) 的总量的比例可以变化,例如,为了符合所治疗的患者亚人群的需要或单个患者的需要 (这些患者由于年龄、性别、体重等的不同而具有不同的需要) 而进行变化。优选可以获得至少一种有益效果,例如组合伴侣 (a) 和 (b) 的作用相互增强,特别是具有协同作用,例如高于相加的作用、额外增加的有利作用、较少的副作用、在组合伴侣 (a) 和 (b) 中的一种或两种的非有效剂量下获得联合治疗效果,并且十分优选组合伴侣 (a) 和 (b) 具有强的协同作用。

[0427] 在使用组分 (a) 和 (b) 的组合以及商业包装两种情况下,同时、依次和分别使用任一组合也是可能的,指可在一个时间点同时施用组分 (a) 和 (b);接着在之后的时间点 (长期例如超过 3-4 周) 以日剂量施用低宿主毒性的仅仅一种组分,随后是另外的组分;或者在更晚的时间点施用两种组分的组合 (在后续的药物组合治疗过程中用于最佳的抗肿瘤效果) 等。

[0428] 本发明的组合也可与其他治疗组合施用,其他治疗例如外科手术、过热和 / 或放射治疗。

[0429] 根据本发明的药物组合物可通过常规方法制备,并且为那些经肠内 (例如口腔的或直肠的) 或肠胃外施用于哺乳动物 (包括人) 的那些组合物,包括治疗有效量的 VEGF 抑制剂,以及单独或与一种或多种可药用载体组合的至少一种药用活性物质,特别是那些适用于肠内的或肠胃外的应用。

[0430] 药物组合物包括从约 0.00002 至约 100%,特别例如在即用输注稀释液的情况下是 0.0001 至 0.02%,或例如在注射或输注浓缩物或特别是肠胃外制剂的情况下是从约 0.1% 至约 95%,优选从约 1% 至约 90%,更优选从约 20% 至约 60% 的活性成分 (每一情况下都是以重量计)。根据本发明的药物组合物可以是例如单位剂量的形式,例如安瓿剂、小瓶、糖锭剂、输液袋或者胶囊剂形式。

[0431] 本发明制剂中所用的每一组合伴侣的有效剂量可依据所用的具体化合物或药物组合物、给药模式、待治疗的病症和待治疗病症的严重性而变化。常规技术人员中的内科医师、临床医师或兽医可容易地确定预防、治疗或抑制病情进展所需的每一活性成分的有效剂量。

[0432] 酪氨酸磷酸化抑制剂,特别是 Adaphostin,以约 1-6000mg/天,更优选 25-5000mg/天,最优选 50-4000mg/天的剂量范围向温血动物尤其是人类优选施用。除非本文另作说明,该化合物优选以每天 1-5 次特别是 1-4 次来施用。

[0433] 用于肠内的或肠胃外施用的组合治疗的药物制剂是例如单位剂量形式如糖衣片剂、胶囊剂或栓剂以及另外的安瓿剂。如不另作说明,这些制剂通过常规方法制备,例如借助于常规混合、粒化、糖衣化、溶解或冻干过程。应理解包含在每一剂型各个剂量所含组合伴侣的单位含量本身不需构成有效量,因为需要的有效量可通过施用多个剂量单位来达到。本领域的专业技术人员具备确定组合组分的适宜药物有效量的能力。

[0434] 优选地,化合物或其可药用盐是以片剂、胶囊剂或糖浆剂的形式作为口服药物制剂,或如果合适作为肠胃外注射剂来施用的。

[0435] 在口服施用的组合物制备中,可施用任一可药用介质例如水、乙二醇、油、乙醇、调味剂、防腐剂、着色剂。可药用载体包括淀粉、糖类、微晶纤维素、稀释剂、粒化剂、润滑剂、结合剂、崩解剂。

[0436] 活性成分的肠胃外施用可使用活性成分的溶液、还有悬液、特别是等渗水溶液或悬液,在为仅包含活性成分或包含活性成分和载体(例如甘露醇)的冻干组合物时是可能的,所述溶液或悬液可在使用之前制备。该药物组合物可以进行灭菌,和/或包含诸如防腐剂、稳定剂、湿润剂和/或乳化剂、增溶剂、调节渗透压的盐和/或缓冲剂的赋形剂,并且通过本身已知的方式、例如通过常规的溶解或冻干过程的方式进行制备。所述溶液或悬液可以包含增加粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯吡咯酮或者明胶。油中悬液包含作为油成分的、通常用于注射目的的植物的、合成的或者半合成油。

[0437] 等渗制剂可选自本领域任一公知的那些例如甘露醇、葡聚糖、葡萄糖和氯化钠。输注制剂可用含水介质稀释。作为稀释剂应用的含水介质的量依据输注溶液中活性成分的需要浓度来选择。输注溶液可包括用于静脉内施用的制剂中通常应用的其他赋形剂例如抗氧化剂。

[0438] 本发明还涉及本文所用的术语“联合制剂”,其定义的尤其是一种“成套的试剂盒(kit of parts)”,其指的是如上所定义的组合伴侣(a)和(b)可独立地进行给药或通过使用具有不同数量的组合伴侣(a)和(b)的不同固定组合来进行给药,即可以同时或在不同的时间点进行给药。然后试剂盒的各部分可以例如同时给药或按时间顺序交错给药,即成套的试剂盒的任何部分可以在不同的时间点以相同或不同的时间间隔进行给药。在联合制剂中用于进行给药的组合伴侣(a)与组合伴侣(b)的总量的比例可以变化,例如,为了符合所治疗的患者亚人群的需要或单个患者的需要(这些患者由于年龄、性别、体重等的不同而具有不同的需要)而进行变化。

[0439] 本发明的用途和方法

[0440] 本发明的抗体(和免疫连接物和双特异性分子)具有体外和体内诊断和治疗效用。例如,可以将这些分子施用于例如体外或体内的培养细胞,或者施用于受试者(例如,体内)以治疗、预防或诊断多种障碍。如本文所用的术语“受试者”意在包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类、绵羊、狗、猫、奶牛、马、鸡、两栖动物和爬行类。所述方法尤其适于治疗具有与DKK1表达相关的病症的人类患者。当一起施用DKK1抗体与另一活性剂时,可以将两种以任一顺序或同时施用。

[0441] 在一个实施方案中,本发明的抗体(和免疫连接物和双特异性分子)可以用于检测DKK1的水平,或者含有DKK1的细胞水平。这可以例如,通过将样品(如体外样品)和对照样品与抗DKK1抗体在允许抗体和DKK1之间形成复合体的条件下接触。检测抗体和DKK1之间形成的任何复合体并在样品和对照中比较。非限定的例如,可以使用本发明的组合物进行本领域公知的标准检测方法,如ELISA和流式细胞测定法。

[0442] 因此,一方面,本发明还提供了检测样品中DKK1(例如,人DKK1抗原)的存在,或测量DKK1的量的方法,其包括将样品、对照样品与本发明的抗体或其特异结合DKK1的抗原结合部分在允许所述抗体或其部分与DKK1之间形成复合体的条件下接触。然后检测复合体的形成,其中样品与对照样品相比复合体形成的差异表明在该样品中存在DKK1。

[0443] 本发明的范围内还包括试剂盒,其由本发明的组合物(例如,抗体、人抗体、免疫

连接物和双特异性分子) 和使用说明书组成。试剂盒可以还含有至少一种额外试剂, 或者一种或多种本发明的额外抗体(例如, 具有互补活性的抗体, 其与第一种抗体结合靶抗原上不同的表位)。试剂盒通常包括标签, 指出该试剂盒内含物的预期用途。术语标签包括在试剂盒上提供或试剂盒提供或附随该试剂盒的任何书面或录音材料。

[0444] 已经完全描述了本发明, 通过下面的实施例和权利要求进一步阐明本发明, 所述实施例是说明性的并且不意在进一步限定。本领域技术人员将认识到或者能够仅仅使用常规实验确定本文所述具体步骤的许多等同方案。此类等同方案在本发明和权利要求的范围内。将本申请全文引用的所有参考文献, 包括出版的专利和公布的专利申请的内容都引入本文作为参考。

[0445] 实施例

[0446] 实施例 1: 从 HuCAL **GOLD**[®] 文库中制备人 DKK1 特异性抗体抗人 DKK1 蛋白质的治疗抗体可通过使用作为抗体变体蛋白质来源的市售噬菌体展示文库 MorphoSys HuCAL **GOLD**[®] 文库, 来挑选具有高结合亲和力的克隆来产生。HuCAL **GOLD**[®] 是 Fab 文库 (Knappik 等人, 2000J. Mol. Biol. 296:57-86; Krebs 等人, 2001J Immunol. Methods 254:67-84; Rauchenberger 等人, 2003J Biol Chem. 278(40):38194-38205), 其中所有六个 CDR 通过适当的突变而多样化, 并且应用 CysDisplay[™] 技术将 Fab 片段连接到噬菌体表面 (W001/05950L 8 hning2001)。

[0447] 常规程序: 噬菌粒回复、噬菌体扩增以及纯化

[0448] HuCAL **GOLD**[®] 文库在含有 34 μ g/ml 氯霉素和 1% 葡萄糖 (2xYT-CG) 的标准丰富细菌培养基 (2xYT) 中扩增。在 OD_{600nm} 为 0.5 时用 VCSM13 辅助噬菌体感染细胞 (于 37°C 静置温育细胞和噬菌体的混合物 30 分钟, 接着于 37°C 以 250 转/分钟振荡 30 分钟) 后, 将细胞离心 (4120g, 5 分钟, 4°C)、重悬于 2xYT/34 μ g/ml 氯霉素/50 μ g/ml 卡那霉素/0.25mM IPTG 中, 并于 22°C 生长过夜。在该阶段结束时通过离心将细胞移出, 且从上清液中用 PEG 沉淀噬菌体两次, 重悬于 PBS/20% 甘油中并于 -80°C 保存。

[0449] 两轮筛选之间的噬菌体扩增如下进行: 以 DKK1 蛋白质挑选后对用噬菌体感染的对数中期的大肠杆菌菌株 TG1 细胞进行洗脱, 并且涂布于补充有 1% 葡萄糖和 34 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂上 (LB-CG 平板)。该平板于 30°C 温育过夜后, 将细菌克隆从琼脂表面刮下, 并用于接种到 2xYT-CG 肉汤以使 OD_{600nm} 达到 0.5, 然后加入 VCSM13 辅助噬菌体以获得如上所述的生产性感染。

[0450] 使用 Strep-Tactin 磁珠进行溶液淘选 (solution panning) 的预试验

[0451] 已报道 Strep-tag II 对 Strep-Tactin 基质具有低亲和力 (依据 Voss 和 Skerra, 1997Protein Eng. 10:975-982, K_d 约 1 μ M), 因此, 进行预试验以评估使用 Strep-Tactin 包被的 MagStrep 小珠在抗体选择期间捕获抗原且在淘选期间避免抗原丢失的适宜性。

[0452] 为此, 8mg 的 MagStrep 小珠与 46 μ g 的 His-Strep 标记的 DKK1 于室温温育 1h 并且样品分装进四个预封盖的 Eppendorf 管中。一管作为阳性对照 (未洗涤) 并且依据 HuCAL **GOLD**[®] 手册的淘选部分以不同严格性洗涤其他三个样品。使用山羊抗 DKK1 抗体和铕标记的抗山羊检测抗体, 在 BioVeris 中对 His-Strep 标记的 DKK1 与 MagStrep 磁珠 (获自 IBA 的 Strep-Tactin 包被的磁珠, Göttingen, 德国) 的结合进行检测。

[0453] 如本文中图 1 所示, 当未洗涤的小珠与那些用不同 HuCAL[®] 严格性洗涤的小珠

比较时,没有检测到明显的 His-Strep 标记的 DKK1 从 Strep-Tactin 包被的小珠丢失。因此, His-Strep 标记的 DKK1 似乎适用于用 Strep-Tactin 包被的磁珠 (MagStrep 磁珠) 进行的溶液淘选。

[0454] 通过从文库中淘选 DKK1 特异性抗体来筛选

[0455] 为了筛选识别人 DKK1 的抗体,应用两种淘选策略。

[0456] 总的来说,将 HuCAL **GOLD**[®]噬菌体抗体分成包括 V_H 主基因的不同组合的四个集合 (包含 $V_H1/5 \lambda \kappa$ 的 1 集合;包含 $V_H3 \lambda \kappa$ 的 2 集合;包含 $V_H2/4/6 \lambda \kappa$ 的 3 集合;以及包含 $V_H1-6 \lambda \kappa$ 的 4 集合)。这些集合单独地接受两轮捕获于 Strep Tactin 磁珠 (Mega Strep 小珠, IBA) 上的 His-Strep 标记的 DKK1 的溶液淘选,并且仅对于第三轮挑选,在捕获于 Strep Tactin 磁珠上的 His-Strep 标记的 DKK1 上或在由 Streptavidin 小珠 (**Dynabeads**[®] M-280Streptavidin, Dynal) 捕获的 APP 标记的人 DKK1 蛋白质上都含生物素化的抗 APP 抗体。

[0457] 详细地,为了使用结合 StrepTactin 磁珠的 His-Strep 标记的 DKK1 进行溶液淘选,应用以下方案:通过将预封盖的管子 (1.5ml Eppendorf 管) 用以 PBS1:1 稀释的 1.5ml2x ChemiBLOCKER 于 4℃ 处理过夜来准备。预封闭的小珠通过如下处理来制备: 580 μ l (28mg 的小珠) StrepTactin 磁珠用 580 μ l PBS 洗涤一次并重悬于 580 μ l 1x ChemiBLOCKER (稀释于一倍体积的 1x PBS) 中。小珠的封闭在预封盖的管子中于 4℃ 过夜进行。

[0458] 为每一淘选条件而稀释于终体积为 500 μ l 的 PBS 中的噬菌体颗粒与 500 μ l 2x ChemiBLOCKER/0.1% Tween 混合,并且于室温下在摇床 (rotating wheel) 上保持 1 小时。为去除 StrepTactin 或小珠结合的噬菌体而进行两次噬菌体颗粒的预吸附:将 160 μ l 封闭的 StrepTactin 磁珠 (4mg) 加入到封闭的噬菌体颗粒中,并且于室温在摇床上温育 30 分钟。通过磁性装置 (Dynal MPC-E) 分离小珠后,噬菌体上清液 (约 1.1ml) 转移到新鲜的、封盖的反应管中,并且使用 160 μ l 封闭的小珠重复预吸附 30 分钟。然后,将 400nM 或 100nM His-Strep 标记的 DKK1 加入到新的、封盖的 1.5ml 反应管中的封闭的噬菌体颗粒中,并且混合物于室温下在摇床上温育 60 分钟。

[0459] 噬菌体抗原复合物可使用分别加入到 400nM 或 100nM 噬菌体淘选集合中的 320 μ l 或 160 μ l 封闭的 StrepTactin 磁珠来捕获,然后于室温下在摇床上温育 20 分钟。结合到 StrepTactin 磁珠的噬菌体颗粒再次用磁性颗粒分离器收集。

[0460] 小珠然后用 PBS/0.05% Tween (PBST) 洗涤七次,接着仅用 PBS 另外洗涤三次。噬菌体颗粒从 StrepTactin 磁珠中的洗脱通过向每一管中加入 10mM Tris-HCl、pH8.0 中的 200 μ l 20mM DTT 进行 10 分钟。收集洗脱液,小珠用 200 μ l PBS 洗涤一次并且将 PBS 洗脱液加入到 DTT 洗脱液中。该洗脱液样品用于感染 14ml 已生长到 OD_{600nm} 为 0.6-0.8 的大肠杆菌 TG-1 培养物。

[0461] 在感染以及之后的 5000 转 / 分钟离心 10 分钟后,每一细菌沉淀重悬于 500 μ l 2xYT 培养基中,涂布于 2xYT-CG 琼脂平板上并于 30℃ 温育过夜。第二天早上,将得到的克隆从平板上刮下并且通过上述的回复和扩增来制备噬菌体。

[0462] 对 His-Strep 标记的 DKK1 的第二轮溶液淘选依据第一轮的方案进行,除了使用减少量的抗原 (50nM 和 10nM) 和适当改变洗涤程序的严格性。

[0463] 两种不同的淘选策略应用于第三轮筛选：第二轮淘选的扩增噬菌体的产量是分开的并且接受用于两种不同筛选条件。第一半噬菌体产量用于从上述 StrepTactin 小珠上捕获的人 His-Strep 标记的 DKK1 的标准淘选策略（抗原量分别是 10nM 或 1nM）。

[0464] 第三轮挑选的第二种筛选变通方案是在人 APP 标记的 DKK1 上进行的。终浓度为 50nM 或 10nM 的 APP 标记的 DKK1 蛋白质与 1ml 预清洗的第二轮噬菌体颗粒混合，并且混合物于室温下在摇床上温育 1 小时。平行地，8mg 预封闭的 Dynabeads M-280Streptavidin(Dynal) 与 40 μ g 生物素化的小鼠抗 APP 抗体于室温下在摇床上温育 30 分钟，接着用 PBST 进行两步洗涤。由结合到 APP 标记的 DKK1 的噬菌体-抗体组成的预形成的复合物通过抗 APP 对包被的 M-280Streptavidin 磁珠于室温下 30 分钟。噬菌体的洗脱和扩增如上进行。

[0465] 可溶性 Fab 片段的亚克隆和表达

[0466] 将挑选的 HuCAL **GOLD**[®] 噬菌粒编码 Fab 的插入序列亚克隆进表达载体 **pMORPH**[®] X9_Fab_FH，以促进快速并有效地表达可溶性 Fab。为此，所选克隆的质粒 DNA 用限制性核酸内切酶 Xba I 和 EcoR I 消化，从而切除编码 Fab 的插入序列（ompA-VLCL 和 phoA-Fd）。然后将该插入序列克隆进 Xba I/EcoR I 消化的表达载体 **pMORPH**[®] X9_Fab_FH。

[0467] Fab 蛋白质从该载体中表达，并且从而携带用于检测和纯化的两个 C 末端标记（分别是 FLAG[™] 和 6xHis）。

[0468] 大肠杆菌中 HuCAL **GOLD**[®] Fab 抗体的微表达

[0469] 为获得足够量的由上述获得的每个克隆编码的蛋白质，在将挑选的 Fab 亚克隆进 **pMORPH**[®] X9_Fab_FH 表达载体后筛选耐受氯霉素的单一细菌克隆。然后每个这些克隆接种到灭菌的 96 孔微量滴定板的孔中，每个孔含有 100 μ l 2xYT-CG 培养基每孔，并且细菌于 37℃ 生长过夜。将每一大肠杆菌 TG-1 培养物的样品（5 μ l）转移到新鲜的、灭菌的、预填有补充了 34 μ g/ml 氯霉素和 0.1% 葡萄糖每孔的 100 μ l 2xYT 培养基的 96 孔微量滴定板中。微量滴定板于 30℃ 在微量滴定板摇床上以 400 转 / 分钟振荡温育直至培养物稍微浑浊（约 2-4 小时），OD_{600nm} 约 0.5。

[0470] 为以这些平板的形式表达，将补充了 34 μ g/ml 氯霉素和 3mMIPTG（异丙基- β -D-硫代半乳糖苷）的 20 μ l 2xYT 培养基加入到每个孔中（终浓度为 0.5mM 的 IPTG），微量滴定板用气体渗透带密封，并于 30℃ 以 400 转 / 分钟振荡温育过夜。

[0471] 全部细胞裂解物的制备（BEL 提取物）

[0472] 向表达平板的每个孔中加入含 2.5mg/ml 溶菌酶的 40 μ l BEL 缓冲液（2xBBS/EDTA:24.7g/l 硼酸、18.7g NaCl/l、1.49g EDTA/l，pH8.0），并且平板于 22℃ 在微量滴定板振荡器上（400 转 / 分钟）温育 1 小时。BEL 提取物用于通过 FMAT 的结合分析（参见实施例 2）。

[0473] 大肠杆菌中微量量的 HuCAL **GOLD**[®] Fab 抗体的表达和纯化

[0474] 在 50ml 的塑料管中进行由大肠杆菌 TG1F 细胞中的 **pMORPH**[®] X9Fab_FH 编码的 Fab 片段的表达。为此，用单一克隆接种的预培养物于 30℃ 在 2xYT-CG 培养基中生长过夜。第二天早上，50 μ l 的每一预培养物用于接种到灭菌的 50ml 塑料管中以补充了 4 μ g/

ml 氯霉素、1mM IPTG 和 0.1% 葡萄糖的 25ml 2xYT 培养基中,并于 30℃ 温育过夜。收获大肠杆菌细胞,冷冻细胞沉淀最终用 Bug Buster (Novagen) 裂解 (disrupt)。使用 Ni-NTA 琼脂糖 (Qiagen, Hilden, 德国) 分离 Fab 片段。

[0475] 大肠杆菌中毫克量的 HuCAL **GOLD**[®] Fab 抗体的表达和纯化

[0476] 在使用补充了 34 μg/ml 氯霉素的 750ml 2xYT 培养基的摇瓶培养物中进行由 TG1F 细胞中的 **pMORPH**[®] X9_Fab_FH 编码的 Fab 片段的表达。培养物于 30℃ 振荡直至 OD_{600nm} 达到 0.5。加入 0.75mM IPTG 诱导表达,接着于 30℃ 温育 20 小时。细胞使用溶菌酶裂解,并且 Fab 片段由 Ni-NTA 色谱 (Qiagen, Hilden, 德国) 分离。蛋白质浓度通过 UV- 分光光度计 (Krebs 等人, 2001) 测定。

[0477] 实施例 2 :DKK1 特异性的 **HuCAL**[®] 抗体的鉴定

[0478] 由上述淘选策略挑选的各个大肠杆菌克隆的 BEL 提取物通过微体积荧光试验技术 (FM AT[™], 8200 Cellular Detection System analyzer, Applied Biosystems, Foster City, Calif) 分析,以鉴定编码 DKK1 特异性 Fab 的克隆。FM AT[™] 8100 HTS 系统是共聚焦式高通量荧光筛选仪器,其自动检测活细胞或小珠的混合并读取、是非放射性试验 (Miraglia, J. Biomol. Screening (1999), 4(4) 193-204)。

[0479] 用于从细菌裂解物中检测 DKK1 结合的 Fab 的基于微体积荧光试验技术 (FMAT) 的结合分析

[0480] 为从大肠杆菌裂解物 (BEL 提取物) 中检测 DKK1 结合的 Fab 抗体,用 FMAT 8200 细胞检测系统 (Applied Biosystems) 来分析结合。为将 His-Strep 标记的 DKK1 结合到 M-450 Epoxy 小珠 (Dyna1) 上,将 300 μl M-450 Epoxy 小珠 (1.2x10⁸ 小珠) 的样品转移进反应管中并用磁性颗粒分离器捕获。移除上清液并且小珠用 1ml 100mM、pH7.4 的磷酸钠缓冲液洗涤四次。为包被抗原,向 150 μl 100mM、pH7.4 的磷酸钠缓冲液中的小珠悬浮液中加入 60 μg His-Strep 标记的 DKK1。抗原-小珠悬浮液于室温下在摇床上温育 16 小时。然后包被的小珠用 PBS 洗涤三次并且重悬于终体积为 250 μl 的 PBS 中。

[0481] 为每一 384 孔平板准备含 3% BSA、0.005% Tween-20、4 μl DKK1 包被的小珠 (1.9x10⁶ 小珠) 的 20ml PBS 和 4 μl Cy5[™] 检测抗体的混合物。45 μl 该溶液的样品分配到 384 孔 FMAT 黑色/透明的平板的 (Applied Biosystems) 各孔中。将含 Fab 的 BEL 提取物 (5 μl) 加入每一孔中。FMAT 平板于室温下温育过夜。第二天早上平板在 8200 Cellular Detection 系统 (Applied Biosystems) 中分析。

[0482] 获得阳性克隆,分析在 FMAT 中产生阳性的、特异性信号的克隆重链和轻链序列。据观测,鉴定显示对人 DKK1 强烈结合的 57 个独特的 (非冗余) 抗 DKK1 克隆。将这些克隆表达、纯化并测试亲和力以及进行功能性试验。

[0483] 使用表面等离子共振测定纳摩尔亲和力

[0484] 使用这些克隆,在 CM5 芯片 (Biacore, 瑞典) 上进行动力学的 SPR 分析,该芯片使用标准的 EDC-NHS 胺结合化学技术以 10mM、pH4.5 醋酸钠中的 400RU 密度的重组人 DKK1、小鼠 DKK1 (R&D System) 或食蟹猴 DKK1 包被。相当量的人血清白蛋白 (HSA) 固定在参考流动池上。PBS (136mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.76mM KH₂PO₄ pH7.4) 用作运转缓冲液。Fab 制剂以 20 μl/分钟流速、16-500nM 的浓度梯度应用。联合相设置于 60 秒且解离相设置于 120 秒。该方法测定的对每一人类、小鼠和食蟹猴 DKK1 的纳摩尔级亲和力的概述于本

文所示的表 1 中。

[0485] 表 1. 挑选的 Fab 对每一人类、小鼠和食蟹猴的亲合力

[0486]

抗体	KD[nM] 人 DKK1	KD[nM] 小鼠 DKK1 *	KD[nM] 食蟹猴 DKK1 *
MOR04470	3.2±2.0	3.6	1.7
MOR04516	2.6±0.7	2.4	1.9
MOR04454	3.2±0.4	6	2.7
MOR04456	7.9±0.9	11.6	8.1
MOR04461	7.6±3.3	12.8	7.3
MOR04455	1.6±0.3	n. d.	1.5

[0487] * 单一测定

[0488] n. d. :未检出

[0489] 实施例 3 :抑制 DKK1 的 Wnt 拮抗活性的抗人 DKK1Fab 候选物的鉴定

[0490] 使用得到的选自 HuCAL[®]GOLD[®]文库的 57 个不同的 DKK1 特异性抗体以获得纯化抗体,然后用于测试抑制人 DKK1 的 Wnt 拮抗活性的能力。这些抗体中的 17 个抗体候选物具有功能性活性,如图 2 和 4 所示。

[0491] 使用荧光素酶报告基因试验检测每一 HuCAL[®]Fab 的功能性活性。在表现出荧光素酶基因 TCF/Lef 应答的荧光素酶报告基因上游克隆 12 个 TCF/Lef 的结合位点。常规的规范 Wnt 蛋白质导致 β 联蛋白的稳定性,从而激活 TCF/Lef 的转录并产生荧光素酶蛋白质。DKK1 蛋白质的加入阻碍 Wnt 活性并因此也阻碍荧光素酶基因的转录。结果,期望由各个细胞产生的荧光素酶水平与挑选的 Fab 阻碍 DKK1 作用的能力相关。

[0492] 稳定的 TCF/Lef 应答的报告细胞系 HEK293T/17-12xSTF

[0493] 使用稳定的人胚胎肾细胞报告细胞系 HEK293T/17-12xSTF 来进行生物试验。细胞培养于含有 10% FCS(PAN 或 BioWhittaker) 和 1 μ g/ml 嘌呤霉素 (BD Biosciences) 的 DMEM 高葡萄糖培养基 (Invitrogen) 中,直至达到 90% 汇合。然后将细胞用胰蛋白酶消化、计数并稀释于不含嘌呤霉素的培养基中以达到 4×10^5 细胞 /ml 的浓度。随后,细胞接种到白色的、平底的 96 孔板中 (Corning, 每孔 100 μ l 细胞悬浮液),并于 37°C 和 5% CO₂ 中培养过夜。第二天,准备试验培养基:将 500ng/ml DKK1-APP 加入到 Wnt3a 条件培养基 (CM) 中。抗 DKK1 HuCAL[®]Fab (20 μ g/ml 的终浓度) 和用作阳性对照的山羊抗人 DKK1 抗体 (R&D Systems) (1.5 μ g/ml 的终浓度) 稀释于 CM 中。

[0494] 从试验平板的每一孔中移出 60 μ l 体积的培养基而不扰乱贴壁的细胞,并用稀释于 CM 中的 60 μ l 试验抗体或对照替代。细胞再培养 24 小时并向每孔加入 100 μ l 明亮 (Bright-Glo) 荧光素酶试剂。5 分钟温育时间后,在光度计 (GenioPro, Tecan) 上读取荧光。57 个 Fab 中的 20 个获得的结果显示于本文图 2 中。表达的荧光素酶范围是抗体存在范围的度量。

[0495] 实施例 4 :结合亲和力的定量分析 :抑制 DKK1 的 Wnt 拮抗活性的抗人 DKK1Fab 候选物的测定

[0496] 亲和力测定

[0497] 为进一步表征抗 DKK1 抗体,测定对人类、食蟹猴和小鼠 DKK1 的亲和力。重组 DKK1 蛋白质固定在 CM5Biacore 芯片上并将 Fab 应用于不同浓度的流动相。为了可信地测定单

价亲和力和, 仅仅将这批 Fab 用于 Biacore 测定, 所述这批 Fab 在大小排阻色谱中显示为大于 90% 的单体片段。

[0498] 人类、小鼠和食蟹猴 DKK1 的亲和力数据总结于表 2 中。发现所有 17 个待测 Fab 都具有对人 DKK1 的 100nM 以下的亲和力。另外, 产生抗体的 9 个克隆的亲和力低于 10nM。在所有测试情况下, 对食蟹猴和小鼠 DKK1 的亲和力几乎等同于对人 DKK1 的那些亲和力。

[0499] 表 2. 挑选的 Fab 对人类、小鼠和食蟹猴的亲和力数据

[0500]

抗体	KD[nM] 人 DKK1	KD[nM] 小鼠 DKK1 *	KD[nM] 食蟹 猴 DKK1 *
MOR04480	1.0±0.0	2	n. d.
MOR04455	1.6±0.3	n. d.	1.5
MOR04516	2.6±0.7	2.4	1.9
MOR04470	3.2±2.0	3.6	1.7
MOR04454	3.2±0.4	6	2.7
MOR04483	5.5±0.7	n. d.	n. d.
MOR04466	6.5±2.1	n. d.	n. d.
MOR04461	7.6±3.3	12.8	7.3
MOR04456	7.9±0.9	11.6	8.1
MOR04462	16.5±2.1	n. d.	n. d.
MOR04447	22*	n. d.	n. d.
MOR04469	36±0.0	n. d.	n. d.
MOR04482	36±5.7	n. d.	n. d.
MOR04468	41.5±21.9	n. d.	n. d.
MOR04476	44 *	n. d.	n. d.
MOR04481	65 *	n. d.	n. d.
MOR04503	93 *	n. d.	n. d.

[0501] * 单一测定

[0502] n. d. : 未检出

[0503] EC₅₀ 测定

[0504] 显示用于对 DKK1 具有最强亲和力的抗体克隆抑制达 50% 的有效浓度的数据本文显示于表 3 中。数据显示有效浓度 EC₅₀ 范围从 39 至 95nM, 具有 58 和 83nM 间的中值。

[0505] 表 3. 用于对挑选的 Fab 抑制达 50% 的有效浓度

[0506]

抗体	荧光素酶报道基因试验 EC ₅₀ [nM]
MOR04470	58
MOR04516	42
MOR04454	83
MOR04456	95
MOR04461	57
MOR04455	39

[0507] 实施例 5 : 通过 LCDR3 和 HCDR2 盒的平行交换的挑选的抗 DKK1Fab 的亲和力成熟

[0508] 为优化本文描述的抗体对 DKK1 的亲和力, 对于母本 Fab 片段的集合, 每一母本 Fab 的轻链的 LCDR3、构架 4 和恒定区使用 BpiI 和 SphI 来去除, 并且用多样化的 LCDR3 连同构架 4 和恒定域的所用组成成分来替换。将 0.5 μg 的结合集合载体 (binder pool vector) 样品结合到超过携带多样化 LCDR3 的 3 倍摩尔量插入片段。

[0509] 在相似的方法中,使用 XhoI 和 BssHII 位点将 HCDR2 多样化,并且连接构架区保持不变。为增加克隆效率,在插入多样化 HCDR2 盒前用 590bp 填充序列来取代母本 HCDR2。

[0510] 将 11 个不同文库的连接混合物电穿孔进入 4ml 大肠杆菌 TOP10F' 细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中,产生 2×10^7 至 2×10^8 的各个克隆。如前所述地进行文库扩增 (Rauchenberger 等人, 2003J Biol Chem. 278(40):38,194-38205)。为了控制质量,随机挑选每一文库中的几个克隆并使用引物 CFR84 (VL) 和 OCAL_Seq_Hp (VH) 进行测序 (SequiServe, Vaterstetten, 德国)。

[0511] 挑选亲和力成熟的候选物

[0512] 选出的六个挑选的成熟候选物 (“母本 Fab”) 表征为具有以下特征:对人 DKK1 的亲和力小于 10nM,食蟹猴和小鼠 DKK1 具有显著的交叉反应,EC₅₀ 小于 100nM,并且优于大肠杆菌中的 (中等) Fab 表达水平以及 Fab 纯化后缺乏聚集。

[0513] 在亲和力测定过程中,很显然 MOR04480 在高度稀释时极其不稳定。为此, MOR04480 从成熟候选物的列表中删除,虽然其在所有待测 Fab 中具有最高亲和力 (1nM) 和最好 EC₅₀ (7nM)。MOR04483 对人 DKK1 具有 5.5nM 的高亲和力,但是显示对小鼠 DKK1 交叉反应,且 MOR04453 包含纯化后高比例的 Fab 聚集。因此,这两种抗体也从成熟候选物中排除。

[0514] 在仔细评估所有可获得数据后,选出六个成熟候选物 (MOR04454、MOR04455、MOR04456、MOR04461、MOR04470 和 MOR04516)。这些候选物的特征在本文中列于表 4 中。

[0515] 表 4. 挑选的 Fab 的特征

[0516]

抗体	KD[nM] 人 DKK1	KD[nM] 小鼠 DKK1 *	KD[nM] 食蟹猴 DKK1 *	EC50 [nM]	交叉反应 性小鼠	Fab 表达 [mg/l]	大小排阻色谱
MOR04470	3.2±2.0	3.6	1.7	58	++	32.8	#
MOR04516	2.6±0.7	2.4	1.9	42	++	1.5	#
MOR04454	3.2±0.4	6	2.7	83	++	17.8	#
MOR04456	7.9±0.9	11.6	8.1	95	++	10.7	#
MOR04461	7.6±3.3	12.8	7.3	57	++	12	#
MOR04455	1.6±0.3	n. d.	1.5	39	++	9	#

[0517] * 单一测定

[0518] n. d. :未检出

[0519] # 单体部分大于 90%

[0520] 用于亲和力成熟的挑选的 Fab 文库的制备

[0521] 为了获得具有抗 DKK1 抗体的增强亲和力和抑制活性的克隆,前面实施例中所选的挑选的 Fab 克隆 MOR04454、MOR04455、MOR04456、MOR04461、MOR04470 和 MOR04516 接受另一轮的多样化和挑选,即称为亲和力成熟的过程。

[0522] 为此,使用由三核苷酸突变预建模的相应的 LCDR3 和 HCDR2 成熟盒来使 CDR 区多样化 (Virnekas 等人, 1994Nucleic Acids Res. 22:5600-5607; Nagy 等人, 2002Nature Medicine8:801-807)。本文的表 5 显示针对母本克隆 MOR04454、MOR04455、MOR04456、MOR061、MOR04470 和 MOR04516 的 LCDR3 序列。

[0523] 表 5. 针对挑选的 Fab 的 LCDR3 序列

[0524]

抗体	VL	LCDR3 序列	SEQ ID NO :
MOR04454	K1	LQYYGMPP	21
MOR04455	K1	QQYDSIPM	22
MOR04456	K3	QQYGDEPI	23
MOR04470	L2	QSYASGNTKV	25
MOR04461	L2	STWDMTVDF	24
MOR04516	L1	ASFDMGSPNV	26

[0525] 本文的表 6 显示针对母本克隆 MOR04454、MOR04455、MOR04456、MOR061、MOR04470 和 MOR4516 的 HCDR2 序列。

[0526] 表 6. 针对挑选的 Fab 的 HCDR2 序列

[0527]

抗体	VH	HCDR2 序列	SEQ ID NO :
MOR04454	H3	DGSHMDKPPGYVFAF	2
MOR04455	H3	HYMDH	3
MOR04456	H3	TIYMDY	4
MOR04461	H3	MGIDL DY	5
MOR04470	H3	HGIDFDH	6
MOR04516	H5	GIPFRMRGFDY	7

[0528] 将来自表达载体 **pMORPH**[®] X9_Fab_FH 的 Fab 片段亚克隆进噬菌粒载体 **pMORPH**[®] 25 (参见 US 专利号 6, 753, 136) 中。该载体提供 N 端融合半胱氨酸残基和 C 末端半胱氨酸也融合到 Fd 抗体链的噬菌体蛋白质 pIII, 并因此提供各个 Fab 片段在噬菌体表面的二硫化物连接的展示。两种不同的策略平行应用以优化母本 Fab 的亲力和功效。

[0529] 产生五个噬菌体抗体 Fab 文库, 其中六个母本克隆中的五个 LCDR3 由单独的轻链 CDR3 序列所用组成成分来取代。未进行 MOR04454 的 LCDR3 成熟, 因为该克隆在一个 CDR 区具有附加的 Bpi I 限制性位点并将 Bpi I 限制酶用于文库克隆程序。

[0530] 平行地, 每个母本克隆的 HCDR2 区由单独的重链 CDR2 序列所用组成成分来取代。将每个母本 Fab 切除并用 590bp 填充片段取代。在成熟淘选期间该 DNA 填充片段促进单消化载体从双消化载体条带中分离并且减少高亲和力母本 Fab 的背景。

[0531] 在后续步骤中, 填充片段从每个母本克隆的 Fab 编码噬菌粒中切除并用高度多样化的 HCDR2 成熟盒来取代。

[0532] 多于 2×10^7 个成员的巨大的亲和力成熟文库通过标准的克隆程序来产生, 并且将多样化的克隆转化进电感受态大肠杆菌 TOPI0F' 细胞 (Invitrogen)。如上述实施例 1 中描述地来制备含 Fab 的噬菌体。

[0533] 构建四个成熟集合以促进后续的挑选过程: 集合 1a 组成为 MOR04470 和 MOR04516LCDR3 文库; 集合 1b 组成为 MOR04470 和 MOR04516HCDR2 文库; 集合 2a 组成为 MOR04454、MOR04455、MOR04456 和 MOR04461LCDR3 文库; 以及集合 2b 组成为 MOR04454、MOR04455、MOR04456 和 MOR04461HCDR2 文库。

[0534] 在溶液中使用减少量的 His-Strep 标记的 DKK1 和由 Strep-Tactin 小珠捕获的噬菌体-抗原对每个组成为进行淘。平行地, 使用减少量的在 Neutravidin 包被的平板捕获的生物素化的 DKK1 将每个库应用于淘选。为增强淘选严格性并挑选出提高的解离率, 在延长温育期期间进行与纯化的母本 Fab 以及未标记抗原的竞争。

[0535] 筛选后立即将富集的噬菌粒集合亚克隆进 pMORPH X9_FH 表达载体。选出约 2300

个单克隆,并且以 IPTG 诱导 Fab。

[0536] 成熟筛选策略

[0537] 在溶液中分别以 His-Strep 标记的 DKK1 以及以生物素化的 His-Strep 标记的 DKK1 进行两轮或三轮使用四个抗体集合的筛选程序。对于每一筛选策略,应用与纯化的母本 Fab 蛋白质或与未标记的 APP 标记 DKK1 的竞争,以及低抗原浓度和大量的洗涤来增强严格性。

[0538] 通过主要依据描述于实施例 1 的标准方案的两轮挑选来进行对未标记的 His-Strep 标记的 DKK1 的溶液淘选。但是这些程序应用减量抗原(从 5nM 减少至 1nM)、含或不含竞争剂的洗涤程序的高严格性,以及抗体-噬菌体连同抗原的延长的温育期。

[0539] 对于第一轮挑选,使用生物素化的 DKK1,将 Neutravidin 平板的孔用 300 μ l PBS 洗涤两次。孔用 1:1 稀释于 PBS(封闭缓冲液)中的 2xChemiBLOCKER(**Chemicon**, Temecula, CA) 封闭。挑选前, HuCAL **GOLD**[®] 噬菌体也用一倍体积的含 0.1% Tween-20 的封闭缓冲液于室温下封闭 30 分钟。将封闭的噬菌体制剂以 100 μ l 等分量转移至于室温下经 30 分钟 Neutravidin 包被的平板的孔中。该预吸附步骤重复一次。封闭的和预清洗的噬菌体制剂与 5nM 生物素化的 DKK1 于 22°C 在摇床上温育 2 小时。加入母本 Fab、APP-DKK1 或非竞争剂并且样品于 4°C 在摇床上温育过夜。

[0540] 于室温经 20 分钟在 Neutravidin 平板的孔中捕获抗原噬菌体复合物。在大量洗涤步骤后,通过向每孔加入 200 μ l 的 10mM Tris 中的 20mMDTT(pH8.0) 于室温经 10 分钟来洗脱结合的噬菌体颗粒。将洗脱液移出并加入到 OD_{600nm} 为 0.6-0.8 的 14ml 大肠杆菌 TG1 细胞中。孔用 200 μ l PBS 洗涤一次并且该溶液也加入到大肠杆菌 TG1 细胞中。噬菌体感染大肠杆菌于 37°C 静置进行 45 分钟。5000 转/分钟离心 10 分钟后,细菌沉淀各自重悬于 500 μ l 2xYT 培养基中,涂布于 2xYT-CG 琼脂板上并于 30°C 温育过夜。通过从平板表面刮下来收获克隆并且如上所述将噬菌体颗粒回复和扩增。

[0541] 如上所述地对第一轮挑选进行第二轮和第三轮挑选,只是洗涤条件更加严格并且抗原浓度分别是 1 和 0.1nM。

[0542] 基于电化学发光(BioVeris)的结合 Fab 的 DKK1 的结合分析

[0543] 为了检测大肠杆菌裂解物(BEL 提取物)中亲和力增强的、DKK1 特异性抗体片段,使用 BioVeris M-384 **SERIES**[®] Workstation(BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK)。在 96 孔聚丙烯微量滴定板中完成进行该试验并且以补充 0.5% BSA 和 0.02% Tween-20 的 PBS 作为试验缓冲液。依据供应商的说明书将生物素化的人 DKK1 固定在 M-280Streptavidin 顺磁小珠(Dynal)上。每孔加入 1:25 稀释度的小珠贮备液。100 μ l 稀释的 BEL 提取物样品和小珠于室温下在振荡器上温育过夜。为了检测,依据供应商(BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK)的说明书,使用以 BV-tagTM 标记的抗人 (Fab)' 2(Dianova)。

[0544] 一组约 2300 个随机挑出的克隆通过上述方法分析。选择给出最高值的一组 160 个克隆用于溶液平衡滴定中的进一步分析。

[0545] 使用溶液平衡滴定(SET)的皮摩尔亲和力的测定

[0546] 对于 K_d 测定,使用 Fab 的单体片段(由分析性 SEC 分析的至少 90% 单体含量; Superdex75, Amersham Pharmacia)。如由 Haenel 等人,2005 描述地从基本上进行溶液中基

于电化学发光 (ECL) 的亲合力测定和数据评估。Fab 的恒定量以溶液中不同浓度 (3^n 的连续稀释) 的人 DKK1 (4nM 初始浓度) 平衡。加入连接顺磁小珠 (M-280Streptavidin, Dynal) 的生物素化的人 DKK1, 以及 BV-tag™ (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) 标记的抗人类 (Fab)'₂ (Dianova) 并且将混合物温育 30 分钟。随后, 未结合的 Fab 的浓度通过使用 **M-SERIES**® 384 分析仪 (BioVeris Europe) 的 ECL 检测来定量。

[0547] 为此, 挑选 160 个单一克隆并由 Ni-NTA 琼脂糖以 μ g 级进行纯化。初步的亲合力由 BioVeris 中的四点溶液平衡滴定 (SET) 来测定。从这些数据中挑选出显示亲和力的 20 个克隆。这些 Fab 以 mg 级进行纯化。由于在大小排阻色谱中检测到的 Fab 的局部聚集, MOR04950 从亲合力测定中排除并另行评估。使用八点 SET 测定和人类、小鼠和食蟹猴的 DKK1, 从每个 Fab 克隆的两个独立批次中检测最终的亲合力。

[0548] 基本上如上所述, 使用作为溶液中分析物的小鼠 DKK1 (R&D Systems) 和食蟹猴 DKK1 而不是人 DKK1 来进行对小鼠和食蟹猴 DKK1 的亲合力测定。为检测游离的 Fab, 使用连接顺磁小珠的生物素化的人 DKK1。依据 Haenel 等人, 2005 Anal Biochem 339.1:182-184 计算亲合力。

[0549] 使用上述的试验条件, 在溶液中测定亲合力优化的抗 DKK1Fab 的亲合力。测定对 MOR04910 和 MOR04946 的亲合力, 对人 DKK1 的 KD 低于 30pM 并且对小鼠和食蟹猴 DKK1 的 KD 在 36pM 和 42pM 之间。另外七个抗体显示对所有三种抗原低于 100pM 的亲合力。克隆 MOR04950 未显示对生物素化的 DKK1 的结合。亲合力总结于本文的表 7 中。

[0550] 表 7. Fab 亲合力

[0551]

	亲合力 [pM]: 溶液平衡滴定*		
抗体	人 DKK1	食蟹猴 DKK1	小鼠 DKK1
MOR04913	38 ± 8	51 ± 10	44 ± 48
MOR04946	25 ± 9	36 ± 9	41 ± 15
MOR04907	114 ± 7	170 ± 35	167 ± 68
MOR04945	69 ± 18	80 ± 31	74 ± 21
MOR04914	94 ± 5	140 ± 3	200 ± 261
MOR04920	53 ± 37	50 ± 20	40 ± 30
MOR04954	110 ± 54	112 ± 25	36 ± 4
MOR04952	100 ± 12	58 ± 17	71 ± 34
MOR04948	57 ± 8	67 ± 17	65 ± 25
MOR04910	24 ± 3	37 ± 11	42 ± 38
MOR04921	不同批次与批次之间高度		
MOR04947	32 ± 19	58 ± 35	30 ± 17
MOR04951	136 ± 120	62 ± 2	132 ± 90
MOR04918	110-690	236 ± 23	550-3144

[0552]

MOR04919	64 #	132 #	111 #
MOR04949	30 ± 23	55 ± 35	65 ± 36
MOR04922	90 #	70 #	50 #
MOR04911	140 #	190 #	650 #
MOR04950	无结合		

[0553] * :两个不同 Fab 批次之间至少进行两个独立的测定

[0554] # :仅单一测定

[0555] 实施例 6 :亲和力优化的抗人 DKK1Fab 的表征

[0556] 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 技术

[0557] 在 50% 人类血清 (HS) 存在下测定成熟 Fab 的结合特异性。TBS 中连续稀释的人类重组的、生物素化的 DKK1 于室温下经 2 小时包被到 Neutravidin 微量滴定板上,从每孔 8ng DKK1 至每孔 125ng DKK1 的浓度。抗原包被后,用 1% BSA 补充的 TBS/0.05% Tween(TBS-T) 于室温下经 1 小时将孔封闭。上述纯化的 Fab 以终浓度 1 μg/ml 稀释于 TBS/4% BSA 或 TBS/50% HS 中,加入到包被的和封闭的孔中并且平板于室温下温育 1 小时。为了检测,使用抗 FLAG 碱性磷酸酶 (AP) 缀合的抗体 (1:5000 稀释于 TBST 中) 和荧光底物 AttoPhos(Roche)。每次温育后,微量滴定板的孔用 TBST 洗涤五次,只是在使用标记的第二抗体的最终温育步骤中孔洗涤三次。

[0558] 在 TECAN Spectrafluor 平板读数器中测定荧光。示例性的结合曲线本文显示于图 3 中。表 8 总结与 4% BSA 中的结合活性相比在 50% 人类血清存在下优化的抗 DKK1Fab 的结合活性,其范围从 83% 至 100%。中值显示为 93%,因此发现抗 DKK1Fab 在人血清存在下充分结合到靶标。

[0559] 表 8. Fab 的结合活性

[0560]

抗体	结合活性 w/ 50%人血清 vs 4% BSA (%)
MOR04945	89 ± 6
MOR04910	84 ± 4
MOR04946	93 ± 2
MOR04913	89 ± 9
MOR04920	90 ± 7
MOR04948	100 ± 15
MOR04952	100 ± 5
MOR04921	93*
MOR04914	83*
MOR04907	> 83*
MOR04954	> 83*
MOR04937	95*
*单一测定	

[0561] 使用 U2OS 细胞系的人类血清存在下的荧光素酶报告细胞试验

[0562] 为另外测定优化的抗 DKK1Fab 的结合特异性,在 15% 人类血清存在下使用骨肉瘤细胞系 U2OS 重复荧光素酶报告基因细胞试验。依据供应商的方案 (ATCC, Manassas,

VA, USA) 培养 U2OS 细胞 (ATCC No. HTB-96)。将细胞用胰蛋白酶消化、计数并稀释于培养基中 (McCoy's 5a/10% FCS) 以达到 2×10^5 细胞 /ml 的浓度。对于每 2×10^4 个细胞, 制备 0.075 μ g pTA-LUC-12xSuperTopFlash 和 0.004 μ g pRL-SV40 的混合物溶液。将这些混合到终体积为 9.8 μ l 的 OPTI-MEM 中。然后加入 0.2 μ l FuGENE6 转染试剂 (Roche, Mannheim, 德国)。转染混合物简单温育并然后与预先制备的细胞混合。随后, 将细胞以 100 μ l 每孔接种到白色平底的 96 孔细胞培养皿中并于 37°C 和 5% CO₂ 中培养过夜。第二天, 从试验板的每孔中移出 75 μ l 培养基并替代为 10 μ l **HuCAL**[®] Fab 抗体稀释液 (10 至 0.01 μ g/ml 稀释于无血清培养基中)、15 μ l 70% FCS 或人血清, 并向每孔加入 50 μ l 含 600ng/ml DKK1-APP 的 Wnt3a 条件培养基。

[0563] 对于阴性对照, 加入无血清培养基以代替抗体稀释液。为获得大量的荧光素酶信号, 加入含代替抗体稀释液的 10 μ l 无血清培养基和不含 DKK1-APP 的 50 μ l Wnt3a CM 的对照。于 37°C、5% CO₂ 中培养 24 小时后, 依据制造商说明使用 Dual-Glo 荧光素酶试验系统 (Promega, Madison, WI, USA) 来测定荧光。

[0564] 表 9 显示在 15% 人类血清存在下优化的抗 DKK1Fab 的抑制活性 (与 15% FCS 中的抑制活性相比)。数据显示血清存在下获得的活性范围从 26% 至 90%, 中值为 70-74%。这些数据显示获得的抗 DKK1Fab 的克隆在人类血清存在下发挥作用。

[0565] 表 9. Fab 的抑制活性

[0566]

抗体	荧光素酶报告基因试验 w/o Kremen ; 在 15% 人血清中的活性 (%)
MOR04945	74%
MOR04910	90%
MOR04946	60%
MOR04913	88%
MOR04920	75%
MOR04948	70%
MOR04952	60%
MOR04921	26%
MOR04914	80%
MOR04907	54%
MOR04954	55%
MOR04937	84%

[0567] 通过荧光素酶报告基因细胞试验测定亲和力优化的抗 DKK1Fab 的 EC₅₀

[0568] 在使用 10nM DKK1 的标准 Wnt3a 依赖性 TCF/LEF 荧光素酶报告基因试验中测试亲和力改进的 Fab, 以便获得荧光素酶表达的抑制作用。由于试验的灵敏性太低, 可见无法通过该方法产生 EC₅₀ 值。通过本文图 4 中所示的所有待测 Fab 的陡峭的抑制曲线和相似的 EC₅₀ 值可见。

[0569] 开发了 TCF/LEF 荧光素酶报告基因试验的改良版本。DKK1 结合到 Kremen-1 和 -2 跨膜蛋白质并且该相互作用导致 Wnt 信号的强烈协同抑制作用 (Mao 等 2002Nature :417 : 664-67)。因此, Kremen cDNA 与 TCF/LEF 荧光素酶报告基因试验共转染。得到的 Wnt3a 依赖性报告试验显示由 Kremen 共受体蛋白质的共表达介导的对 DKK1 灵敏性的高度增强。在该试验中, 0.33nM DKK1 足够诱导 Wnt 信号的完全抑制。使用 0.33nM DKK1 重复 Fab 滴定 (以

10 倍浓度), 并且产生从中可计算 EC_{50} 值的 S 形抑制曲线 (本文图 5)。

[0570] 考虑到上述 EC_{50} 而分析亲和力优化的抗 DKK1Fab。如本文表 10 中所示, 由该方法获得的 EC_{50} 值范围从 0.2nM 至 5.6nM。

[0571] 表 10. Fab 的 EC_{50}

[0572]

抗体	TCF/LEF 萤光素酶试验 w/Kremen: EC_{50} [nM]
MOR04913	0.5
MOR04946	0.2
MOR04907	0.9
MOR04945	0.5
MOR04914	1.1
MOR04920	1.8
MOR04954	1.3
MOR04952	0.6
MOR04948	0.5
MOR04910	0.3
MOR04921	0.7
MOR04947	1.7
MOR04951	2.2
MOR04919	2.7
MOR04949	5.3
MOR04922	2
MOR04911	5.6

[0573] 亲和力优化的 Fab 的序列分析

[0574] 测定所有 20 个 Fab 的重链和 V_L 区 (V_H 和 V_L) 的核苷酸序列。互补决定区 (CDR) 的氨基酸序列列于本文表 11A 和表 11B 中。

[0575] Table11A. 重链 CDR 的氨基酸序列

[0576]

	Antibody	VH	HCDR1	SEQ ID No. HCDR1	HCDR2	SEQ ID No. HCDR2	HCDR3	SEQ ID No. HCDR3
P	MOR04455	VH3	GFTFSSYGMS	3	WVSGISGSGSYTTYADSVKG	3	HYMDH	3
1	MOR04918	VH3	GFTFSSYGMS	49	WVSGISERGVIIFYADSVKG	57	HYMDH	65
P	MOR04456	VH3	GFTFNNGMT	4	WVSGISGSGSYTTYADSVKG	4	TIYMDY	4
2	MOR04907	VH3	GFTFNNGMT	8	WVSGISGSGSYTTYADSVKG	8	TIYMDY	8
3	MOR04946	VH3	GFTFNNGMT	10	WVSGISGSGSYTTYADSVKG	10	TIYMDY	10
4	MOR04949	VH3	GFTFNNGMT	50	WVSGISGSGSYTTYADSVKG	58	TIYMDY	66
5	MOR04913	VH3	GFTFNNGMT	9	WVSGISGSGSYTTYADSVKG	9	TIYMDY	9
P	MOR04461	VH3	GFTFSSYWMS	5	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	5	MGIDL DY	5
6	MOR04911	VH3	GFTFSSYWMS	51	WVSDIEHKRRAGGATSYAASVKG	59	MGIDL DY	67
7	MOR04922	VH3	GFTFSSYWMS	52	WVSMIEHKTRGGTTDYAAPVKG	60	MGIDL DY	68
8	MOR04910	VH3	GFTFSSYWMS	11	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	11	MGIDL DY	11
9	MOR04948	VH3	GFTFSSYWMS	13	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	13	MGIDL DY	13
0	MOR04919	VH3	GFTFSSYWMS	53	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	61	MGIDL DY	69
11	MOR04921	VH3	GFTFSSYWMS	12	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	12	MGIDL DY	12
P	MOR04470	VH3	GFTFSSYWMS	6	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	6	HGIDFDH	6

2	MOR04914	VH3	GFTFSSYWMS	14	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	14	HGIDFDH	14
3	MOR04945	VH3	GFTFSSYWMS	16	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	16	HGIDFDH	16
14	MOR04951	VH3	GFTFSSYWMS	54	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	62	HGIDFDH	70
5	MOR04952	VH3	GFTFSSYWMS	55	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	63	HGIDFDH	71
6	MOR04950	VH3	GFTFSSYWMS	56	WVSVIEHKSFGSATFYAASVKG	64	HGIDFDH	72
7	MOR04954	VH3	GFTFSSYWMS	18	WVSVIEHKDKGGTTYAASVKG	18	HGIDFDH	18
8	MOR04920	VH3	GFTFSSYWMS	15	WVSSIEHKDAGYTTWYAAGVKG	15	HGIDFDH	15
P	MOR04516	VH5	GYSFTNYYIG	7	WMGI IYPTDSYTNYSFSGQ	7	GIPFRMRGFDY	7
9	MOR04947	VH5	GYSFTNYYIG	19	WMGI IYPGTSYTIYSFSGQ	19	GIPFRMRGFDY	19

[0577] Table11B. 轻链 CDR 的氨基酸序列

[0578]

MOR Antibody No.	VL	HCDR1	SEQ ID No.	HCDR2	SEQ ID No.	hCDR3	SEQ ID No.	Comment
P 04455	K1	RASQDISNYLH	22	LLIYGASNLQS	22	QQYDSIPM	22	

1	04918	K1	RASQDISNYLH	73	LLIYGASNLQS	81	QQYDSIPM	89	
P	04456	K3	RASQNLFSPYLA	23	LLIYGASNRAT	23	QQYGDEPI	23	
2	04907	K3	RASQNLFSPYLA	27	LLIYGASNRAT	27	QQYLSLPT	27	
3	04946	K3	RASQNLFSPYLA	29	LLIYGASNRAT	29	QQYTLPL	29	
4	04949	K3	RASQNLFSPYLA	74	LLIYGASNRAT	82	QQYLFPL	90	
5	04913	K3	RASQNLFSPYLA	28	LLIYGASNRAT	28	QQYMTLPL	28	FW4mutation
P	04461	L2	TGTSSDVGGFNYVS	24	LMIHGGSNRPS	24	STWDMTVDF	24	

[0579]

6	04911	L2	TGTSSDVGGF1NYVS	75	LMTHDGSNRPS	83	STWDMTVDF	91	
7	04922	L2	TGTSSDVGGFNYVS	76	LMTHDGSNRPS	84	STWDMTVDF	92	
8	04910	L2	TGTSSDVGGFNYVS	30	LMTHDGSNRPS	30	QSWDVSPITA	30	
9	04948	L2	TGTSSDVGGFNYVS	32	LMTHDGSNRPS	32	QTWDSLSPFF	32	
10	04919	L2	TGTSSDVGGFNYVS	77	LMTHDGSNRPS	85	QSWGVGPGGF	93	
11	04921	L2	TGTSSDVGGFNYVS	31	LMTHDGSNRPS	31	QTWATSPLSS	31	
P	04470	L2	TGTSSDLGGYNYVS	25	LMYDVNNRPS	25	QSYASGNTKV	25	
12	04914	L2	TGTSSDLGGYNYVS	33	LMYDVNNRPS	33	QSYTYTPISP	33	
13	04945	L2	TGTSSDLGGYNYVS	35	LMYDVNNRPS	35	QTYDQIKLSA	35	
14	04951	L2	TGTSSDLGGYNYVS	78	LMYDVNNRPS	86	QSYDPFLDVV	94	
15	04952	L2	TGTSSDLGGYNYVS	79	LMYDVNNRPS	87	QSYDSPITDSV	95	
16	04950	L2	TGTSSDLGGYNYVS	80	LMYDVNNRPS	88	QSYASGNTKV	96	
17	04954	L2	TGTSSDLGGYNYVS	37	LMYDVNNRPS	37	QSYASGNTKV	37	
18	04920	L2	TGTSSDLGGYNYVS	34	LMYDVNNRPS	34	QSYASGNTKV	34	HCDR2point mutation
P	04516	L1	SGSSSNIGSSFVN	26	LLIGNNSNRPS	26	ASFDMGSPNV	26	Potential N-glycosyl sites
19	04947	L1	SGSSSNIGSSFVN	38	LLIGNNSNRPS	38	ASFDMGSPNV	38	potential N-glycosyl site
	consensus1		RASQxxxxxYx	131	LLIYGASNxxx	132	QQYxxxPx	133	
	consensus2		TGTSSDVGGFNYVS	134	LM1xDxxNRPS	135	xxWDxxxxxx	136	

[0580] 序列分析显示六个母本 (P)Fab 中的五个产生亲和力增强的继承者 (successor)。在 HCDR2 以及在 LCDR3 中可优化 MOR04461 和 MOR04470。没有获得 MOR04454 的优化继承者。另外,如表 11B 中所示,各种 CDR 的共有序列 1 和共有序列 2 中完全不同的母本抗体间显示高度同源性。使用本领域技术人员众所周知的方法可为显示于表 10A 中的母本序列提供相似的共有序列。

[0581] 另外,已确定 MOR04920 在 HCDR2 区具有突变(在第 73 位丝氨酸残基突变为甘氨酸,依据 Honegger 和 Pluckthun,2001J MoI Biol309.3:657-670 公布的编号方案),因而偏离 **HuCAL**[®]设计。

[0582] 显示 MOR04913 具有在 k 轻链的构架 4 中的点突变(在第 148 位赖氨酸变为天冬酰胺)。因为不期望该位点影响抗体的结合特性,在 IgG 转变期间将突变回复成种系 **/HuCAL**[®]组合物,产生抗体 MOR05145。

[0583] MOR04947 在 LCDR2 中具有潜在的糖基化位点。由于 MOR04947 仅仅选作备选候选物之一,因而未去除该位点。

[0584] 实施例 7:制备 **HuCAL**[®]免疫球蛋白

[0585] 转换成 IgG 形式

[0586] 为表达全长免疫球蛋白 (Ig),对于人类 IgG1 或人类 IgG4,将重 (V_H) 和轻链 (V_L) 的可变区片段从 **pMORPH**[®] X9_FH Fab 表达载体中亚克隆进 **pMORPH**[®] _h_Ig 或 **pMORPH**[®] 2_h_Ig 载体系列。其他载体可用于人 IgG2。限制酶 EcoRI、MfeI 和 B1pI 用于将 V_H 域片段亚克隆进 **pMORPH**[®] _h_IgG1 和 **pMORPH**[®] _h_IgG4。限制酶 MfeI 和 B1pI 用于将 V_H 结构域片段亚克隆进 **pMORPH**[®] 2_h_IgG1f 和 **pMORPH**[®] 2_h_IgG4。使用 EcoRV 和 Bsi W1 位点将 V_L 结构域片段亚克隆进 **pMORPH**[®] _h_IgK 和 **pMORPH**[®] 2h_IgK, 而使用 EcoRV 和 Hpa 1 将 V_L 结构域片段亚克隆进 **pMORPH**[®] _h_Igλ 和 **pMORPH**[®] 2h_Igλ 2。

[0587] 人类 IgG 的瞬时表达和纯化

[0588] 用等摩尔量的 IgG 重链和轻链表达载体转染 HEK293 细胞。转染后 4 或 5 天时,收获细胞培养上清液。调节上清液的 pH 至 8.0 并且过滤灭菌后,将溶液进行标准的 A 蛋白柱层析 (Poros20A, PE Biosystems)。

[0589] 母本 Fab 转换成 IgG 形式

[0590] 平行于亲和力成熟的开始,将 MOR04454、MOR04456 和 MOR04470 克隆进 **pMORPH**[®] _h_IgG1 和 **pMORPH**[®] _h_IgG4 表达载体。备选的构建体可用于 IgG2 表达载体的产生。由 HEK293 细胞的瞬时转染进行小范围表达并且从细胞培养上清液中纯化全长免疫球蛋白。

[0591] 由大小排阻色谱显示的数据表明抗体是单体形式的。Wnt3a 依赖性报告基因试验中的测试证实蛋白质是有功能的。

[0592] 实施例 8:优化用于表达的氨基酸序列和基因的核苷酸序列

[0593] 为增强哺乳动物的表达,将改变引入本文中的 Fab 的重链和轻链中,以进行细胞中表达的密码子选择的优化。已知的几个负的顺式作用基序减少在哺乳动物中的表达。本

文的优化过程去除对表达起负作用的负的顺式作用位点（例如剪接位点或 poly(A) 信号）。本文的优化过程另外丰富 GC 含量以延长 mRNA 半寿期。

[0594] 使用本文通过噬菌体展示筛选分离到的 Fab 克隆 MOR04945（全长轻链母本核苷酸序列是 SEQ ID NO:98, 并且全长重链母本核苷酸序列是 SEQ ID NO:102）来优化可变轻链和重链区。然后使用这些方案来优化编码这种或其他克隆的每一完整轻链和重链的核苷酸序列。

[0595] 对于 MOR04945 的 V_H 和 V_L 链的优化过程

[0596] 为优化用于在哺乳动物细胞中表达的每一 V_L 和 V_H 链的核苷酸序列和氨基酸序列，使密码子选择适用于哺乳动物基因的密码子偏爱。另外，在可能的情况下减少或消除 GC 含量非常高（>80%）或非常低（<30%）的区域。备选地，对于细菌、酵母或杆状病毒中表达的优化，将基于它们各自基因改变密码子的选择。

[0597] 在哺乳动物表达的优化过程中，消除以下顺式作用序列基序：内在的 TATA 盒、Chi 位点和核糖体进入位点、富含 AT 或富含 GC 的序列片段、RNA 不稳定基序（ARE）序列元件、抑制 RNA 序列元件（INS）、cAMP 响应（CRS）序列元件、重复序列和 RNA 二级结构、包括隐蔽位点的剪接供体和受体位点，以及分支点。除另外说明，在优化 V_L 链的核苷酸序列过程中避免 Mlu I 和 Hind III 位点的引入。除另外说明，在优化 V_H 链的核苷酸序列过程中避免 Mly I 和 BstE II 位点的引入。

[0598] 优化用于表达的 MOR04945 的 V_H 和 V_L 链的氨基酸序列

[0599] 为了对上述克隆 MOR04945 的 V_H 和 V_L 链产生优化的氨基酸序列，改变密码子选择为哺乳动物的密码子选择，以使在哺乳动物细胞中具有更高和更稳定的表达速率。参见实施例 5。

[0600] 下面的表 12A 显示可变轻链（SEQ ID NO:120）的有义和反义（AS）核苷酸序列以及为表达而优化产生的可变轻链氨基酸（称为 AA）序列（SEQ IDNO:118）。

[0601] 表 12A 优化用于表达的 V_L 链的核苷酸有义和反义序列，以及氨基酸序列

[0602]

68


```

MlyI.
HinfI          BstNI PvuII
1  GAGTCCATTGGGAGTGCAGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCA (Sense)
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCAGGTAACCCTCACGTCCGGGTCCACGTCGACACCTCTCGCCGCCTCCTGACCACGT (AS)
       G V Q A Q V Q L V E S G G G L V Q (AA)

BstNI
61  GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTCAGCAGCTACTG (Sense)
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGGACCGCCGTCGGACTCTGACTCGACACGGCGGTGCGCCGAAGTGGAAGTCGTGATGAC (AS)
   P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y W (AA)

BstNI          BstNI          BclI
121 GATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCAGCAG (Sense)
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTACTCGACCCACTCCGTCCGGGGACCGTTCCCGGACCTCACCACAGGCACTAGTCGTC (AS)
   M S W V R Q A P G K G L E W V S V I S S (AA)

181 CGATAGCAGCAGCACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGA (Sense)
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GCTATCGTCGTGCTGGATGATGCGGCTATCGCACTTCCCGGCCAAGTGGTAGTCGGCCCT (AS)
   D S S S T Y Y A D S V K G R F T I S R D (AA)

241 CAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGT (Sense)
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GTTGTGCTTCTTGTGGGACATGGACGTCTACTTGTGCGACTCTCGGCTCCTGTGGCGGCA (AS)
   N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V (AA)

BstNI          BstNI          BstNI          BstEII
301 GTACTACTGTGCCAGGCACGGCATCGACTTCGACCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAC (Sense)
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CATGATGACACGGTCCGTGCCGTAGCTGAAGCTGGTGACCCCGGTCCCGTGGGACCAGTG (AS)
   Y Y C A R H G I D F D H W G Q G T L V T

361 C (Sense) (SEQ ID NO: 121)
   -
   G (AS)
   - (AA) (SEQ ID NO: 119)

```

[0606] 优化前和优化后的图表可分别对每一母本序列和优化的基因提供序列密码子的百分率,并分析编码 V_H 和 V_L 链的相关核苷酸序列的质量等级。本文所用的质量值指在期望的表达系统中用于给定氨基酸的最高频密码子设置为 100,并且余下的密码子依据使用频率按比例标度。(Sharp, P. M., Li, W. H., Nucleic Acids Res. 15(3), 1987)

[0607] 另外,密码子适应指数(CAI)是描述核苷酸序列的密码子与目的生物的优选密码子选择匹配程度的数值。CAI 的最大值设置为 1.0,因此认为大于 0.9 的 CAI 能够高表达。优化前的 V_L 链的 CAI 显示为 0.73,而优化后,CAI 测定为 0.95。同样地,优化前的 V_H 链的 CAI 显示为 0.74,而优化后,在优化的结构中测定为 0.98, V_L 链中的 GC 含量从 MOR04945 的母本序列的 51%增加到源自 MOR04945 的优化序列的 62%。如图 9A 和 9B 中所示, V_H 链中的 GC 含量从 MOR04945 的母本序列的 54%增加到 MOR04945 的优化衍生生物的 64%。

[0608] MOR04910、MOR04945、MOR04946 和 MOR05145 的全长轻链和重链用于表达的优化

[0609] 将优化过程应用于 MOR04910 (SEQ ID NO :97)、MOR04945 (SEQ ID NO :98)、MOR04946 (SEQ ID NO :99) 和 MOR05145 (SEQ ID NO :100) 的轻链的每一母本全长核苷酸序列以及 MOR04910 (SEQ ID NO :101)、MOR04945 (SEQ ID NO :102)、MOR04946 (SEQ ID NO :103) 和 MOR05145 (SEQ ID NO :103) 的重链的母本全长核苷酸序列。

[0610] 使用优化过程来构建与母本克隆数相关的的每一下列轻链核苷酸序列:对于克隆 MOR04910,优化的核苷酸序列是 SEQ ID NO :104;对于克隆 MOR04945,优化的核苷酸序列是 SEQ ID NO :105;对于克隆 MOR04946,优化的核苷酸序列是 SEQ ID NO :106;以及对于克隆 MOR05145,优化的核苷酸序列是 SEQ ID NO :107。另外,使用优化过程来构建与母本克隆数相关的的每一下列重链核苷酸序列:对于克隆 MOR04910,优化的核苷酸序列是 SEQ ID NO :108;对于克隆 MOR04945,优化的核苷酸序列是 SEQ ID NO :109;对于克隆 MOR04946,优化的核苷酸序列是 SEQ ID NO :110;以及对于克隆 MOR05145,优化的核苷酸序列是 SEQ ID NO :110。

[0611] 优化的轻链核苷酸序列与下列优化的轻链氨基酸序列相关:对于克隆 MOR04910,优化的氨基酸序列是 SEQ ID NO :111;对于克隆 MOR04945,优化的氨基酸序列是 SEQ ID NO :112;对于克隆 MOR04946,优化的氨基酸序列是 SEQ ID NO :113;以及对于克隆 MOR05145,优化的氨基酸序列是 SEQ ID NO :114。优化的重链核苷酸序列与下列优化的重链氨基酸序列相关:对于克隆 MOR04910,优化的氨基酸序列是 SEQ ID NO :115;对于克隆 MOR04945,优化的氨基酸序列是 SEQ ID NO :116;对于克隆 MOR04946,优化的氨基酸序列是 SEQ ID NO :117;以及对于克隆 MOR05145,优化的氨基酸序列是 SEQ ID NO :117。

[0612] 预期的全长轻链和重链序列的核苷酸和多肽序列的列表提供于表 13A 和表 13B 中。表 13A 提供优化的核苷酸序列和由它们编码的多肽。优化这些核苷酸序列以去除在哺乳动物表达系统中识别的潜在的剪接位点。表 13B 为列于表 13A 中的克隆提供母本核苷酸序列。

[0613] 表 13A :轻链 (LC) 和重链 (HC) 序列 - 优化的

[0614]

LC(opt)4910nucleotide	SEQ ID NO :97
GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACCATCTCGTGTACGGGTACTAGCAGCGA	
TGTTGGTGGTTTTAATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGCATCCCGGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTCATGATGGTTCTAATC	
GTCCCTCAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCTGCAAGCGGAA	
GACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATGTTTCTCCTATTACTGCTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGCTTACCGTCCT	
AGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGT	
GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACA	
ACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAG	
AAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGAAAAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTCATAG	
LC4910 (BHQ880) polypeptide	SEQ ID NO :111

DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYVSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE
 DEADYYCQSWDVSPITAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
 TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0615]

LC(opt)4945nucleotide SEQ ID NO :98

GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACCATCTCGTGACGGGTACTAGCAGCGA
 TCTTGGTGGTTATAATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGATGTTAATAATC
 GTCCCTCAGGCGTGAGCAACCGTTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCTGCAAGCGGAA
 GACGAAGCGGATTATTATTGCCAGACTTATGATCAGATTAAGTTGTCTGCTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGCTTACCGTCCT
 AGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGT
 GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACA
 ACCACACCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAG
 AAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGAAAAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTCATAG

LC4945 (BHQ892) polypeptide SEQ ID NO :112

DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDNNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE
 DEADYYCQTYDQIKLSAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
 TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

LC(opt)4946nucleotide SEQ ID NO :99

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGCGAACGTGCCACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAA
 TCTTTTTTCTCCTTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTAATCGTG
 CAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGAC
 TTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATCTTACTCTTCCTCTTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTCGAGATCAAACGAACTGT
 GGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA
 ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG
 CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
 CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

LC4946 (BHQ898) polypeptide SEQ ID NO :113

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPED
 FAVYYCQYLTPLTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

LC(opt)5145nucleotide SEQ ID NO :100

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCCACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAA	
TCTTTTTTCTCCTTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGTCTCTAATCGTG	
CAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGAC	
TTTGGCGGTGATTATTGCCAGCAGTATATGACTCTTCCTCTTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTCGAGATCAAACGAACGT	
GGGTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA	
ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG	
CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC	
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG	
LC5145 (BHQ901) polypeptide	SEQ ID NO :114
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSDFTLTISLLEPED	
FAVYYCQQYMTLPLTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE	
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
HC(opt) 4910nucleotide	SEQ ID NO :101
CAGGCACAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGCGGCCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCCTCCGG	
ATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTTATT	
CTGGTAGCAATACCCATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAATTGAAAAACACCCTGTATCTG	
CAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTATGGGTATTGATCTTGATTATTGGGGCCAAGG	
CACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG	
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC GG TGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGC	
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT	
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTG	
ACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAG	
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA	
CTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA	
GCGTCCTCACCGTCTGCAACGAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC	
ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC	
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC	
CGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTACCGTGGACAAG	
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC	
CCTGTCCCCGGGTAAATGA	

HC4910 (BHQ880) polypeptide	SEQ ID NO :115
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARMGIDLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFPSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
HC(opt)4945nucleotide	SEQ ID NO :102
CAGGCACAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGG ATTTACCTTTTCTTCTTATTGGATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCTTCTG ATTCTAGCTCTACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTGAAAAACACCCTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCATGGTATTGATTTGATCATTGGGGCCAAGG CACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTG TG ACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC ATCGAGAAAACATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCCCCGGGTAAATGA	
HC4945 (BHQ892) polypeptide	SEQ ID NO :116

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM	
NSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
HC(opt)4946 = 5145nucleotide	SEQ ID NO :103
CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAACCTACGGCATGACCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAGCGGCAGCGGCA	
GCTACACCTACTACGCCACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCGGACCATCTACATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT	
CACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG	
CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA	
GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAATC	
ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTC	
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCA	
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA	
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA	
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA	
ACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGG	
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA	
HC4946 = 5145 (BHQ898/901) polypeptide	SEQ ID NO :117
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM	
NSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK	
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	
QQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	

[0616] 表 13B :轻链 (LC) 和重链 (HC) 序列 – 母本的

[0617]

LC(parental) 4910nucleotide	SEQ ID NO :104
GATATCGCCCTGACCCAGCCCGCCAGCGTGTCGGCAGCCCTGGCCAGAGCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCAGCGA TGTGGGCGGCTTCAACTACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCTGGCAAGGCCCCAAGCTGATGATCCACGACGGCAGCAATA GACCCAGCGGCGTGTCGAATAGATTAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGCCTGCAGGCTGAG GACGAGGCCGACTACTACTGCCAGAGCTGGGATGTGAGCCCCATCACCGCCGTGTTTGGCGGCGGAACAAAGCTTACCGTCCT AGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGT GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACA ACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAG AAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGAAAAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATAG	
LC(Parental) 4945	SEQ ID NO :105
GATATCGCCCTGACCCAGCCCGCCAGCGTGTCGGCAGCCCTGGCCAGAGCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCAGCGA CCTGGGCGGCTACAACTACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCTGGCAAGGCCCCAAGCTGATGATCTACGACGTGAACAACA GACCTAGCGGCGTGTCGAACAGATTAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCTCTGGCCTGCAGGCTGAG GACGAGGCCGACTACTACTGCCAGACCTACGACCAGATCAAGCTGTCCGCCGTGTTTGGCGGCGGAACAAAGCTTACCGTCCT AGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGT GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACA ACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAG AAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGAAAAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATAG	
LC(parental) 4946nucleotide	SEQ ID NO :106
GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTTGAGGGCCAGCCAGAA CCTGTTTCAGCCCTTACCTGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGACTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGAG CCACCGGCGTGCCCGCCAGATTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCTGAGGAT TTCGCCGTGTAATACTGCCAGCAGTACCTGACCCTGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTCGAGATCAAACGAAGTGT GGCTGCACCATCTGTCTTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG	
LC(parental) 5145nucleotide	SEQ ID NO :107

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTGTAGGGCCAGCCAGAA
CCTGTTACGCCCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCAGACTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGAG
CCACCGGCGTGCCCGCCAGATTACAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCTGAGGAT
TTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACATGACCCTGCCTCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTCGAGATCAAACGAACGTG
GGGTGCACCATCTGTCTTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA
ACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG
CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

HC (parental) 4910nucleotide

SEQ ID NO :108

CAGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG
CTTCACCTTCAGCAGCTACTGGATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAGCTACA
GCGGCAGCAATACCCACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTG
CAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCGGATGGGCATCGACCTGGATTACTGGGGCCAGGG
CACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGTG
ACAAAAGTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAAACCCAAG
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC
CAAGAACAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAATAACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCCCCGGGTAAATGA

HC (parental) 4945nuoleotide

SEQ ID NO :109

CAGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG
CTTCACCTTCAGCAGCTACTGGATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCAGCAGCG
ATAGCAGCAGCACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTG
CAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGGCACGGCATCGACTTCGACCACTGGGGCCAGGG
CACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGTG
ACAAAAGTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAAACCCAAG
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACARAGCCCTCCAGCCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC

[0618]


```

CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCCCCGGGTAAATGA
HC(parental)4946 = 5145nucleotide                               SEQ ID NO :110
CAGGTGCAATTGGTGAAAGCGGCGGCCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGATTTAC
CTTTAATAATTATGGTATGACTTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTGGTTCTGGTA
GCTATACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTACTATTTATATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGT
CACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGAC
ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTC
ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
GGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAGAACA
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCC
GGGTAAATGA

```

[0619] 实施例 9 :生物活性试验

[0620] 在报告基因试验中测定中和抗 DKK1/4 抗体的生物活性,使用称为 SuperTopflash Krm17 的遗传修饰的细胞系 T/17STF_70IRES_Krm_(17)。细胞系源自人胚肾细胞 HEK293 并稳定转染有 i) 其中启动子 TCF 融合到萤火虫荧光素酶基因上游的报道基因构建体和 ii) 导致该细胞表面 Krm 过表达的构建体。在该细胞系中,暴露于 Wnt 蛋白质可刺激荧光素酶以剂量依赖性方式表达。在 Wnt 存在下向固定的、次最大剂量的 DKK1 中加入分级量的抗 DKK1/4 抗体,导致在 16 小时的温育期期间荧光素酶表达的增加。在末期,基于细胞裂解物中的酶活性来定量荧光素酶的量。荧光素酶催化底物荧光素向化学发光产物氧化虫荧光素的转变。然后用适当的光度计测定作为结果的发光型化学发光。

[0621] 中和抗 DKK1/4 抗体试验样品的生物潜能通过与参考标准物比较其增加荧光素酶表达的能力来测定。基于蛋白质含量来归一化样品和标准品。然后依据欧洲药典 1(European Pharmacopoeia1) 使用平行系试验来计算相对潜能。最终的结果表示成与参考标准相比的样品的相对潜能(以百分数)。

[0622] 实施例 10 :相关生物靶标的体外活性

[0623] 选择的前导 Fab 具有低纳摩尔范围的亲和力和细胞试验中的潜在活性。DKK1 的生理学上的结合配偶体是 LRP5/6($K_d \sim 340\text{pM}$) 以及 Kremen1 和 2($K_d \sim 280\text{pM}$) [Mao2001]

[Mao2002]。鉴于这些高亲和力相互作用,需要另外提高亲和力以便更好地与生理学上的 DKK1 相互作用竞争。为增加挑选的 Fab 的亲和力和生物活性,通过使用导致突变的三核苷酸的盒式突变来平行优化 CDR-L3 和 CDR-H2 区 [Virnekas1994] [Knappik2000] [Nagy2002]。

[0624] 亲和力成熟之后,挑选出具有低皮摩尔亲和力的、以低于 1nM 的 EC50 抑制 Wnt 信号发放的再激活 DKK1 的、并与食蟹猴、小鼠和大鼠 DKK1 交叉反应的 FAb。然后将该 FAb 的可变区改造成两个不同的人类 IgG1 构架。

[0625] 抗 DKK1/4 抗体具有对人 DKK1 的高亲和力 (2pM),具有特别针对该亲和力抗体的结合动力学。参见图 6。

[0626] 图 6. 方法:使用具有包含 CM5(S) 传感器芯片 (Cat#BR-1006-68) 的 Biacore T100(Biacore, Uppsala, 瑞典) 仪器的表面等离子体共振来测定前导候选物和 rhDKK1(重组人 DKK1)(批次 BTP7757) 的结合亲和力和动力学。将抗人 IgG1 Fc(Jackson Immuno Research, Cat#109-006-098) 固定在每一流动细胞上,随后以约 100RU 的期望捕获来捕获前导候选物。最后,六种浓度的 DKK1(范围 0.195-6.25nM) 以一种重复浓度在芯片上运行。将流动细胞激活用于 240 秒的 DKK1 结合,而接下来的解离达 30 分钟。在 BIA 评估 1.0 软件中使用动力学分析,使规范归一化的数据(减去背景的)适合与大量运输模式以 1:1 结合。该试验进行三次重复,并且得到的数据是具有标准偏差的这三个试验的平均值。

[0627] 实施例 11:表位作图

[0628] 成熟的 DKK1 是含两个半胱氨酸富集区 (Cys-1 和 Cys-2) 的 266 个氨基酸的蛋白质。Cys-2 域负责结合 LRP 和 Kremen 蛋白质并且对于 Wnt 信号发放的抑制是必需且充分的 [Li2002] [Brott2002]。免疫沉淀试验(图 7A、7B) 证实抗 DKK1/4 抗体特异性结合 Cys-2 结构域,而不是 Cys-1 结构域。抗 DKK1/4 抗体在用变性 DKK1 进行的 Western 印迹中的活性微弱,并且在肽作图试验中未发现特异结合包括蛋白质 (JTP) 长度的任一重叠的 15 个氨基酸肽,这提示抗 DKK1/4 抗体很可能识别 Cys-2 内的非线性表位。

[0629] 图 7(A) 图示全长和截短 DKK1。全长 (FL, 含有残基 1-266)、羧基端截短 (ΔC , 包含残基 1-185)、以及氨基端截短 (ΔN , 包含残基 1-60 以及残基 157-266), 在它们的 C 端与 HA 表位融合,并且克隆到巨细胞病毒 (CMV) 启动子控制下的哺乳动物表达载体中。图 7(B) 描述中和抗 DKK1/4 抗体和 DKK1 蛋白质的结合。来自表达包含全长的、氨基端截短的、羧基端截短的 DKK1 蛋白质的短暂转染的 Hek293 细胞的条件培养基与抗溶菌酶 IgG1 对照或抗 DKK1/4 抗体于室温下温育 2 小时,并且免疫复合物在 G 蛋白小珠上收集、由 SDS-PAGE 分离、转移并用抗 HA 抗体进行印迹。总输入量的 1/10 上样作为对照。

[0630] 实施例 11:表位作图 -N-糖基化

[0631] Wnt 信号发放途径内的大量蛋白质是通过调节它们的细胞活性的酶翻译后共价修饰。包括 DKK1 的 DKK 家族成员由 N-糖基化来修饰 [Krupnik1999]。DKK1 在 Cys-2 结构域内的第 256 位氨基酸具有一个理论上的 N 连接的糖基化位点。鉴于 Cys-2 结构域的高度保守特性,以及 DKK1 对 LRP6 和抗 DKK1/4 抗体对 DKK1 的潜在结合位点,我们试图确定抗 DKK1/4 抗体是否识别 DKK1 的 N-糖基化形式。ELISA 证实抗 DKK1/4 抗体识别 rhDKK1 的 N-糖基化形式,胜过 rhDKK1 的特异 N 连接的去糖基化形式。参见表 14A。而用直接针对重组蛋白质的融合表位标记区的第二抗体(抗 HIS) 完全等同地识别相同的蛋白质。通过使用表面等

离振子体共振来定量亲和力的差异,并且发现相对于去糖基化蛋白质,抗 DKK1/4 抗体对糖基化的 rhDKK1 具有 100 倍高的 KD,参见表 14B。

[0632] 表 14A. 结合百分比 – 结合到 DKK1 的抗 DKK1/4 抗体的糖基化依赖性

[0633]

抗体	WT DKK1	DKK1(去糖基化 (dyglycosylate))
抗 -HIS 标记	100%	100%
抗 -DKK1/4	100%	12-18%

[0634] 表 14B. 表面等离振子体共振

[0635]

蛋白质	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
WT DKK1	7.449E+6	2.319E-5	3.113E-12
DKK1(N- 去糖基化)	1.424E+6	3.071E-4	2.157E-10

[0636] 通过 ELISA 测定抗 DKK1/4 抗体与野生型 (WT)rhDKK1 (HEK HIS 表位标记的批次 #BTP7757) 和 N 连接的去糖基化的 (N-DEGLY,使用酶 PNGase F (Sigma,Cat#E-DEGLY) 的 N 连接的去糖基化) rhDKK1 的结合。简要地,高度结合 ELISA (Nunc#442404) 平板用 1 μ g/ml WT 或 N-DEGLYDKK1 包被。与它们分别结合 N-DEGLY 相比较,显示抗 DKK1/4 抗体和抗 HIS 抗体结合 WT DKK1 的比率。该试验以三种不同浓度进行 (显示一种代表性浓度的数据),所有浓度具有相似的结果。使用 Biacore T100 测定抗 DKK1/4 抗体与 WT 和 N-DEGLY DKK1 (HEK293 批次 #BTP7757) 的结合亲和力和动力学。与 WT DKK1 相比,抗 DKK1/4 抗体始终具有对 N-DEGLY DKK1 低 100 倍的亲和力。

[0637] 实施例 12 :DKK 家族成员的同源性百分比

[0638] 人 Dickkopf 家族包括四种侧向同源物 (参见表 15),其中三种 (DKK1、2 和 4) 结合 LRP6 和 Kremen 蛋白质,诱导 LRP5/6 的内化并抑制常规 Wnt 信号发放 [Mao2001] [Mao2003]。DKK2 也协同 LRP6 过表达以增强 Wnt 信号发放,但是 LRP6 和 Kremen2 的共表达恢复该途径的 DKK2 抑制作用 [Mao2003]。因此 DKK2 可充当激动剂和拮抗剂,这取决于细胞类型 (cell context)。DKK3 是最不保守的家族成员,其包括在负责 LRP5/6 和 Kremen 相互作用的 Cys-2 域内,而且由于其不结合 LRP 及 Kremen,并且不阻碍 Wnt 信号而区别于其他 DKK 家族成员 [Mao2001] [Mao2003]。

[0639] 表 15. 跨越整个蛋白质和 Cys-2 域内的 DKK 家族成员的百分比同源性

[0640]

完整蛋白质		DKK2	DKK3	DKK4
	DKK1	38.7	15.5	32.5
	DKK2	—	13.4	34.6
	DKK3	—	—	15.1
Cys-2 结构域		DKK2	DKK3	DKK4
	DKK1	69.3	23.0	56.6
	DKK2	—	24.1	54.7
	DKK3	—	—	20.8

[0641] 使用用于比较氨基酸同一性比率的配对序列比对的 AlignX 运算法则来评估 DKK 家族成员间的同源性。应用分别是 10 和 0.1 的空位开放罚分和空位延伸罚分。该评估包括整个蛋白质的比较,以及仅仅 Cys-2 域的比较。如上表中指出的,DKK1、2 和 4 在整个蛋白质上有 30-40%的氨基酸序列同源性。单独 Cys-2 结构域的比较显示 DKK1 和 2 在该区内有 69%的同源性,而 DKK4 与 DKK1 和 2 共有约 57%的相同结构域。DKK3 显示与其他家族成员最低水平的同源性。Cys-2 结构域内的所有成员间的同源性最大。

[0642] 实施例 13 :抗 DKK1/4 抗体与人 DKK 家族成员的亲和力

[0643] 除了结合 DKK1,抗 DKK1/4 抗体也结合 DKK4,参见表 16。虽然对 DKK4 的亲和力比对 DKK1 的亲和力低大约 100 倍,它仍然是次纳摩级并因此很可能是生物学上和临床上相关的。值得注意的,DKK2 和 DKK4 都没有保留预测的在 DKK1 的 Cys-2 域中靶向用于糖基化的天冬酰胺残基。初步的免疫沉淀试验提示抗 DKK1/4 抗体未特异结合 DKK2。结合 DKK2 的抗 DKK1/4 抗体的结合亲和力将在 DKK2 成功纯化后测定。与 DKK3 的独特功能和结合特性相一致,抗 DKK1/4 抗体不结合 DKK3。

[0644] 表 16. 抗 DKK1/4 抗体对人 DKK 家族成员的亲和力

[0645]

DKK 家族成员	K_D
DKK1	$2.0 \times 10^{-12} \text{M} (\pm 0.7)$
DKK2	ND
DKK3	NSB
DKK4	$2.97 \times 10^{-10} \text{M} (\pm 1.5)$

[0646] 使用 Biacore T100 测定抗 DKK1/4 抗体对人 DKK 家族蛋白质其他成员的结合亲和力和动力学。与以前一样,试验进行三次重复,针对显著结合抗 DKK1/4 抗体的蛋白质并报告为具有标准偏差的三次试验的平均值。同源性最少的家族成员 DKK3,在背景水平上不具有可检测结合并因此称为 NSB(无显著结合)。同样地,近期数据显示本发明的抗 DKK1/4 抗体也对 DKK2 具有无显著结合。

[0647] 实施例 14 :抗 DKK1/4 抗体阻碍 DKK1 对 LRP6 的结合

[0648] DKK1 通过与 LRP5/6 和 Kremen 的相互作用来介导它的 Wnt 拮抗剂活性,诱导内化并阻碍 Wnt 诱导的 LRP5/6 与 Frizzled 受体的相互作用。在图 8 的竞争性 ELISA 试验中抗

DKK1/4 抗体竞争性抑制 DKK1 与 LRP6 的结合。

[0649] HEK293T 细胞未表达足够水平的内源性 LRP5 或 6 以使 DKK1 结合显现。然而,可在细胞表面检测到 LRP6 与表面运输伴侣蛋白质、MESD、GFP 标记的 DKK1 的共转染,这表明 DKK1/LRP6 相互作用的特定性质。与抗 DKK1/4 抗体具有相同可变区的 MOR04910 特异性地阻碍该相互作用。

[0650] 抗 DKK1/4 抗体抑制 DKK1 与 LRP6 直接结合的能力由 ELISA 测定。简要地,未处理平板 (Fisher, Cat#12565501) 用 $1\mu\text{g/ml}$ 重组 LRP6 (R&D Systems Cat#1505-LR) 包被,然后将 500ng/ml rhDKK1 和抗 DKK1/4 抗体或 hIgG1 (抗溶菌酶 MOR3207, ACE10915) 的浓度曲线 (concentration curve) 在冰上预温育 30 分钟,然后将它们放置到 LRP6 包被的板上达 2 小时。洗涤平板并用抗 DKK1 抗体 (R&D Systems AF1096) 检测 DKK1 结合水平。显示的是原始 OD 值 (减去背景的)。增加浓度的抗 DKK1 抗体以剂量依赖方式抑制 DKK1 与 LRP6 的直接结合,而增加浓度的 hIgG1 未阻碍 DKK1 与 LRP6 的结合。

[0651] MOR04910 抑制 DKK1/LRP6 结合到细胞表面上的能力由荧光显微镜测定。HEK293T 细胞是以编码 LRP6 和 MESD 的质粒转染的或短暂转染的模拟体。细胞与 DKK1-GFP 条件培养基连同抗溶菌酶 Fab 或抗 DKK1 Fab MOR04910 于 37°C 温育 1 小时,并由荧光显微镜测定。GFP 荧光反映 DKK1-GFP 在质膜上对超量表达的 LRP6 的结合。抗 DKK1/4 抗体在细胞表面阻碍 DKK1 与 LRP6 相互作用。

[0652] 实施例 14 : 报告基因试验 - DKK1 抑制的 TCF/LEF 基因转录的再激活

[0653] 常规的 Wnt 信号发放在 β 联蛋白转移到细胞核中时终止,其中 β 联蛋白与导致 Wnt 应答基因转录增强的 TCF/LEF 家族的转录因子相关。报告基因试验使用驱动荧光素酶基因转录的 TCF/LEF 应答启动子来构建,以便于 Wnt 途径调节的检测。在该试验中 DKK1 有效地阻碍由 Wnt3A 条件培养基 (CM) 诱导的荧光素酶活性。抗 DKK1/4 抗体以明显的 0.16nM EC_{50} 重新激活 DKK1 抑制的 Wnt 信号发放,参见图 9。因为试验需要约 1nM 的 DKK1 用于完全抑制并且抗体亲和力是 2pM ,很可能该 EC_{50} 反映试验的灵敏性和每一蛋白质的相对量而不是抗 DKK1/4 抗体竞争的绝对限定。

[0654] 以 SuperTopflash 报道基因和 Kremen 稳定转染的 293T 细胞用 10ng/ml rhDKK、 50% Wnt3a 条件培养基,以及多种量的抗 DKK1/4 抗体来处理。18 小时后,荧光素酶活性由明亮荧光素酶试验试剂盒 (Promega) 测定。

[0655] 实施例 15 : 报告基因试验 - 在前成骨细胞样细胞中 DKK1 抑制的碱性磷酸酶分泌的反转

[0656] 为测定抗 DKK1/4 抗体是否以更加生理相关的状态阻碍 DKK1 功能,建立体外试验以测定多能性小鼠细胞系 C3H10T1/2 (10T1/2) 的 Wnt 介导的成骨细胞分化,参见图 10。成骨细胞分化后,10T1/2 细胞分泌碱性磷酸酶 (AP),该现象可由 DKK1 抑制。抗 DKK1/4 抗体但不是 IgG 对照,在 Wnt3A 条件培养基存在时阻碍 DKK1 对 10T1/2 分化的抑制作用。

[0657] 已报道 Wnt 诱导增殖和抑制许多细胞类型上的细胞凋亡和 Wnt 途径的激活,如由 β 联蛋白稳定性或核定位指示的,Wnt 途径的激活常与肿瘤发展相联系。此外,在某些癌症 (例如结肠癌和黑素瘤) 中 DKK1 的减量调节,已引导某些研究者提出 DKK1 对某些癌症可能是肿瘤抑制剂 [Gonzalez-Sancho2005] [Kuphal2006]。为测试 DKK1 对肿瘤增殖或存活是否具有影响,肿瘤细胞系用抗 DKK1/4 抗体处理并分析生长中的变化。未发现抗 DKK1/4 抗体

的加入显著影响测试的肿瘤细胞系。

[0658] 在体外评估抗 DKK1/4 抗体对若干肿瘤细胞系的存活或增殖的影响。在该试验中,抗 DKK1/4 抗体 (100 μ g/ml) 用肿瘤细胞系温育,3 天后细胞数量由 ATP (Promega, Cell Titer Glo **Assay**[®]) 的定量来评估,ATP 作为与细胞数量呈线性关系的代谢活性细胞的度量。以三种不同血清浓度 (无血清,最小生长,以及完全生长) 进行该试验。与未处理的和 hlgG1 处理的细胞相比未发现明显变化。通过 ELISA 分析细胞系上清液的 DKK1 表达。

[0659] 实施例 16 :种间交叉反应和 DKK1 的中和

[0660] 中和抗 DKK1/4 抗体的选择不是因其针对人 DKK1 的高亲和力和中和能力,而是基于其与其他物种的交叉反应,其中这些物种用于功效和安全研究。抗 DKK1/4 抗体以与对人 DKK1 相似的亲和力来与小鼠、大鼠和食蟹猴 (cyno, *Macaca fascicularis*) DKK1 交叉反应,见表 17。此外,抗 DKK1/4 抗体中和所有四个种的 D 与 KK1 介导的 Wnt 抑制活性 (表 17),暗示这些物种应该与安全 and 功效模式相关。

[0661] 表 17. 种间交叉反应和 DKK1 的中和

[0662]

DKK1 蛋白质	K _d [pM]	Wnt3a 信号发放的反应性 (TOPFlash) EC50 (pM)
人类	17	80.6
食蟹猴	7	54.2
小鼠	10	60.5
大鼠	16	255

[0663] 对人类、食蟹猴、小鼠和大鼠 DKK1 的亲和力测定通过使用 M-384 **SERIES**[®] 分析仪 (BioVeris, Europe) 的溶液平衡滴定 (SET) 来分析。对于由溶液平衡滴定 (SET) 测定的 KD,使用 IgG 蛋白质的单体片段 (至少 90% 单体含量,由分析性 SEC 分析的, Superdex75, Amersham Pharmacia)。在溶液中基于电化学发光 (ECL) 的亲和力测定和数据评估基本如描述于 [Haenel et al., 2005] 中进行,应用如依据 [Piehler 等人, 1997] 修饰改进的结合安装模型。恒量的 MOR4910 IgG 用溶液中不同浓度的 (3n 稀释) 人 DKK1 (4nM 初始浓度) 平衡。加入连接生物素化的人 DKK1 的顺磁小珠 (M-280 Streptavidin, Dynal) 和 BV-tag[™] (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) 标记的山羊抗人类 (Fab)' 2 多克隆抗体并温育 30 分钟。随后,经由采用 **M-384 SERIES**[®] 分析仪 (BioVeris, Europe) 的 ECL 检测来定量未结合的 IgG 浓度。在溶液中使用小鼠、大鼠和食蟹猴 DKK1 而不是人 DKK1 作为分析物来基本上如上所述进行对大鼠、小鼠和食蟹猴 DKK1 的亲和力测定。为检测游离的 IgG 分子,使用连接生物素化的人 DKK1 的顺磁小珠。MOR4910 和抗 DKK1/4 抗体以相同的 EC50 中和人 DKK1 (Novartis), 抗 DKK1/4 抗体也中和猴 (Novartis)、小鼠 (R&D Systems 1765-DK-010) 和大鼠 (Novartis) 的 DKK1。基本如上所述 (图 9) 使用每一种的重组 DKK1 而不是人 DKK1 作为 Wnt 条件培养基的抑制剂来进行对人类、大鼠、小鼠和食蟹猴 DKK1 的 TOPFLASH 报告基因试验。大鼠重组 DKK1 需要较高的蛋白质浓度以达到 TOPFLASH 试验的显著抑制。

[0664] 实施例 17 :抗 DKK1/4 抗体对 PC3M2AC6 异种移植物的胫骨内生长的影响

[0665] 前列腺肿瘤转移由于它们主要是成骨细胞的而不是溶骨细胞的,因而在骨转移中是独特的 [Keller 2001]。然而,甚至主要的成骨细胞性骨转移具有潜在的骨质溶解区并经

常具有低骨质密度 (BMD), 特别是当患者正接受雄性激素撤除治疗时 [Saad2006]。最近, 证实 DKK1 可充当开关, 由此 DKK1 的表达增强混合的成骨性的 / 溶骨性的前列腺肿瘤细胞系 (C4-2B) 的溶骨细胞特征。另外, DKK1 的 shRNA 抑制作用抑制主要的溶骨性前列腺肿瘤细胞系 (PC3) 的溶骨活性 [Hall2005] [Hall2006]。DKK1 敲除也抑制肿瘤异种移植物的胫骨内生长, 导致本发明人推测溶骨活性可能对建立转移生境很重要, 但随后在前列腺转移中 DKK1 的损失将肿瘤转变为成骨细胞表现型。

[0666] 溶骨性前列腺肿瘤模式由 [Kim2003] 的方法来改进。将稳定表达荧光素酶的溶骨性前列腺肿瘤细胞系 (PC3M) 的变体注入小鼠胫骨。肿瘤的生长由荧光素酶来监测, 而骨中变化由微计算机处理 X 线断层摄影术 (micro-CT) 和组织学来监测。抗 DKK1/4 抗体倾向于抑制肿瘤生长, 而非促进肿瘤生长。当在任一研究中抑制作用都不显著时, 目前它在实施的 5/5 研究中一致发生, 显示 3 倍剂量的抗 DKK1/4 抗体对肿瘤生长影响的代表性研究显示于图 11 中。具有皮下 PC3M2AC6 异种移植物的抗 DKK1/4 抗体处理的小鼠产生针对抑制作用的相似的非显著性趋势。

[0667] 植入 (0.2 百万个细胞 / 动物) 后第 5 天开始处理。以 20、60 和 200 μ g / 小鼠 / 天的剂量, 每天、一周 3 次地静脉内注射施用抗 DKK1/4 抗体持续两周。以 200 μ g / 小鼠 / 天, 每天、一周 3 次地静脉内注射施用对照 IgG 持续两周。处理后计算最终功效数据和体重变化。

[0668] 使用该模式, 我们发现抗 DKK1/4 抗体抑制肿瘤诱导的骨皮质损伤。在该模式中通过肿瘤移植物和虚拟移植对骨造成机械损伤的观测无法区分对骨小梁的影响, 其造成随后重塑的编织骨中的初始增加, 因此引起表观骨容量上的减少。新形成的编织骨和小梁对整体骨容量 / 小梁容量比率的相对影响因而不明显。然而, 抗 DKK1/4 抗体在肿瘤和虚拟移植的胫骨中增加骨的产生, 并抑制或延缓伴随重塑的骨容量的减少是明显的。使用相同的肿瘤诱导的溶骨性模式, 抗 DKK1/4 抗体显示与唑来膦酸当量的抗溶骨活性, 参见图 12。抗 DKK1/4 抗体的骨代谢效果在 20-200 μ g / 小鼠的范围内是剂量应答的, 最低有效剂量在 20 至 60 μ g / 小鼠之间, 参见图 13。综合这些数据, 提示抗 DKK1/4 抗体对肿瘤诱导的溶骨性疾病应具有效果, 但可能也对非肿瘤性骨疾病如骨质疏松症或增强骨折修复有效。

[0669] 实施例 18 : 在肿瘤和虚拟移植的胫骨中抗 DKK1/4 抗体维持增加的骨密度

[0670] 为了评估小鼠药效学标记中的功效, 分析了骨代谢的三种血清标记: 骨钙蛋白 (OC)、护骨蛋白 (OPG) 以及核因子 κ B 配体分泌型受体活化因子 (sRANKL)。由于预期的抗体作用机理, 使用这些成骨细胞标记而非更典型的破骨细胞标记。然而, 在与正常动物相对的患肿瘤的动物中未检测到一致的改变。如由 micro-CT 或 IHC 测定的, 以任一这些标记始终未观测到骨丢失的相关性。

[0671] 待治疗小鼠胫骨的 MicroCT 再建的典型实例显示于图 12A 中。皮质损伤划分成从 0 = 无损伤至 3 = 严重损伤。参见图 12B。由 microCT 分析来人工划分肿瘤移植的胫骨中的皮质损伤, 其对于研究的组是未知的。在任一虚拟移植的胫中未观测到皮质损伤。

[0672] 方法: 12 周龄的雌性裸鼠在左胫骨中用 2×10^5 PC-3M2AC6 细胞进行胫骨内移植并且在右胫骨中进行虚拟注射。处理开始于移植后的第 5 天。以 200 μ g / 小鼠 / 天的剂量, 每天、一周 3 次地静脉内注射施用 NVP- 抗 -DKK1/4 抗体 -NX (抗 DKK1/4 抗体) 和 IgG 对照持续两周。也每天、一周 3 次地静脉内注射施用载体 (PBS) 对照持续两周。在肿瘤移植后

的第 7、14 和 18 天采用 μ -CT VivaCT40 扫描仪 (SCANCO, 瑞士) 来扫描动物。如方法中描述地来分析小梁的骨密度 (BV/TV)。星号 (*) 指载体和 IgG 对照在相同时间点上统计学显著差异 ($n = 12$), $p < 0.05$ 。

[0673] 在图 13 中, 为测定骨密度, 胫骨的次级松质骨 (spongiosa) 用基于吉姆萨染色剂的 Zeiss Imager Z.1 和 Axiovision 软件进行作图。读数基于整个视野中钙化骨的百分比。每个柱形代表规定数目动物的平均值和标准偏差。在 PBS、IgG 和抗 DKK1/4 抗体处理组中, 仅分析患肿瘤的动物。右胫没有虚拟注射而左胫有肿瘤。统计分析: Dunnett 试验单因素方差分析。左胫或右胫与 PBS 组中的对应胫进行比较, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p > 0.05$ 无显著差异。

[0674] 图 14 显示抗 DKK1/4 抗体的代谢骨功效是剂量依赖性的, 最低有效剂量在 20 至 60 μ g/小鼠 3x/周之间。12 周龄的雌性裸鼠在左胫骨中用 2×10^5 PC-3M2AC6 细胞进行胫骨内移植并且在右胫骨中进行虚拟注射。治疗开始于移植后的第 6 天。以 20、60 和 200 μ g/小鼠/天的剂量, 每天、一周 3 次地静脉内注射施用 NVP-抗-DKK1/4 抗体-NX (抗 DKK1/4 抗体) 持续两周。每天、一周 3 次地静脉内注射施用载体对照 (PBS) 持续两周。在肿瘤移植后的第 7 和 20 天使用 μ -CT VivaCT40 扫描仪 (SCANCO, 瑞士) 来扫描动物。如方法中描述地来分析小梁的骨密度 (BV/TV)。*指包括载体、IgG、仅钻孔和正常动物的所有对照在相同时间点上统计学显著差异, $p < 0.05$ 。

[0675] 实施例 18: 生物标记情况

[0676] DKK1 生物标记

[0677] 已描述 DKK1 的 RNA 表达模式。Krupnik (1999) 通过 Northern 印迹分析显示在胎盘中的表达, 在心脏、脑、肺、肝、骨骼肌或胰腺中未检测到表达。Wirths (2003) 显示在肝、肾和乳腺中缺乏 RNA 表达, 尽管在肝胚细胞 (hepatoblastomas) 瘤和 Wilms 肿瘤亚种中可见 RNA 表达。技术人员通过 RNA 原位杂交检测的 DKK1 胃肠道表达显示在不管是正常的或恶性的胃和结肠内均未表达 (Byun 2006)。

[0678] 小鼠中 RNA 表达分析显示骨中的高 DKK1 表达水平, 胎儿和胎盘中的中等表达, 以及褐色脂肪组织、胸腺和十二指肠中的微弱表达 [Li 2006]。

[0679] 使用应用于当前研究中的相同的山羊抗体在骨髓瘤样本中评估 DKK1 蛋白质表达 (Tian, 2003)。本文中, 在具有低级形态学的患者的骨髓瘤细胞中可见表达, 在五种对照受试者的骨髓活组织切片样本中未检测到 DKK1 蛋白质表达。

[0680] 通过对一系列正常人类和猴子组织的筛选来进行治疗性抗体抗 DKK1/4 抗体的组织分布和物种间交叉反应研究。评估全部的组织切片和组织微阵列。阳性对照包括在相同组织体系中评估的抗 DKK1 的市售抗体。

[0681] DKK1_15 (FITC 缀合的抗 DKK1/4 抗体) 和 DKK1_8 (FITC 缀合的山羊抗 DKK1, R&D Systems, #AF1096, lots GBL013101 和 GBL14111)。

[0682] 其他生物标记

[0683] 由于很少了解关于 DKK1 的病理生理作用, 相当大的努力正在并已经集中于通过生物标记研究来构建关于抗 DKK1/4 抗体的体内效果的知识基础, 以及如何利用和进一步发展这一知识基础。关注的重点领域包括

[0684] 1) 在正常的和转移性的骨代谢中通过测定破骨细胞和成骨细胞活性的循环标记

来理解抗 DKK1/4 抗体的效果。

[0685] 2) 在多发性骨髓瘤和其他肿瘤中用以确定和扩大靶标指示的 DKK1 的可比较的表达水平。

[0686] 3) 在重要组织如结肠、骨髓、肺、皮肤和乳腺中用以评估 β 联蛋白活性的基因表达水平上的效果。

[0687] 初步的分子流行病学研究已证实在患有多发性骨髓瘤的患者中具有增加的 DKK1 血清水平并在该迹象中支持 POC。

[0688] 基于现有知识,表 18 为抗 DKK1/4 抗体提供建议的潜在生物标记。

[0689] 表 18. 针对 DKK1 和 DKK4 靶标的生物标记物

[0690]

类别	肿瘤	血液	替代组织
药物动力 (PD)	N/A	无以及抗 -DKK1/4Ab 结合	脂肪 / 皮肤
- 靶标		DKK-1 水平	
- 下游		β - 联蛋白活性	
作用机理		NTx、CTx、PINP、骨钙蛋白、 RANKL、OPG、PTH、维生素 D3、降钙素	
功效	血清 M 蛋白、尿总 M 蛋白、b2 微珠蛋白、LDH	NTx、CTx、PINP、骨钙蛋白、 RANKL、OPG、PTH、降钙素骨 - ALP、CICP、CTx、NTx 等	
预测标记分层	DKK1 表达	DKK-1、CTx、PINP、RANKL、 OPG、PTH、维生素 D3、降钙素	
预筛选		DKK1 血清水平	
安全性		免疫原性	
药物动力		抗 -DKK1/4Ab	

[0691] 实施例 19 :抗 DKK1 抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列

[0692] 抗 DKK1 抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列全部提供于表 19 中,其中抗体的 CDR 区显示于表 5、6、11A 和 11B 中。

[0693] 表 19. 抗 DKK1 抗体重链和轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO :2-39)

[0694]

MOR04454VH : (SEQ ID NO :2)
QVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGLHWVRQAPGKGLEWVSSISYYGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSHMDKPPGYVFAFWGQGTLVTVSS
MOR04454VL : (SEQ ID NO :21)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINKYLNWYQQKPGKAPKLLIGAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCLQYYGMPPTFGQGTKVEIKRT

MOR04455VH : (SEQ ID NO :3)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYMDHWGQGTTLTVSS
MOR04455VL : (SEQ ID NO :22)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLHWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLPEDFAVYYCQQYDSIPMTFGGQTKVEIKRT
MOR04456VH : (SEQ ID NO :4)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGTTLTVSS
MOR04456VL : (SEQ ID NO :23)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFATYYCQYGDPIITFGGQTKVEIKRT
MOR04461VH : (SEQ ID NO :5)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDL DYWGQGTTLTVSS
MOR04461VL : (SEQ ID NO :24)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDADYYCSTWDMTVDFVFGGGTKLTVLGQ
MOR04470VH : (SEQ ID NO :6)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGTTLTVSS
MOR04470VL : (SEQ ID NO :25)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDADYYCQSYASGNTKVVFGGGTKLTVLGQ
MOR04516VH : (SEQ ID NO :7)
QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPTDSYTNYSFQGGVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGIPFRMRGFDYWGQGTTLTVSS
MOR04516VL : (SEQ ID NO :26)
DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSNIGSSFNWYQQLPGTAPKLLIGNNSNRPSGVDPDRFSGSKSGTSASL AITGLQSEADYYCASFDMGSPNVVFGGGTKLTVLGQ
MOR04907VH : (SEQ ID NO :8)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGTTLTVSS
MOR04907VL : (SEQ ID NO :27)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQYLSLPTTFTFGGQTKVEIKRT
MOR04913VH : (SEQ ID NO :9)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGTTLTVSS
MOR04913VL : (SEQ ID NO :28)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQYMTLPLTFGGQTKVEINRT

MOR04946VH : (SEQ ID NO :10) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGLTVTVSS
MOR04946VL : (SEQ ID NO :29) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQYLTPLTFGQGTKVEIKRT
MOR04910VH : (SEQ ID NO :11) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDL DYWGQGLTVTVSS
MOR04910VL : (SEQ ID NO :30) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQSWDVSPITAVFGGGTKLTVLGQ
MOR04921VH : (SEQ ID NO :12) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDL DYWGQGLTVTVSS
MOR04921VL : (SEQ ID NO :31) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQTWATSPLSSVFGGGTKLTVLGQ
MOR04948VH : (SEQ ID NO :13) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDL DYWGQGLTVTVSS
MOR04948VL : (SEQ ID NO :32) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQTWDSLSFFVFGGGTKLTVLGQ
MOR04914VH : (SEQ ID NO :14) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGLTVTVSS
MOR04914VL : (SEQ ID NO :33) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIIDVNNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQSYTYTPIPVFGGGTKLTVLGQ
MOR04920VH : (SEQ ID NO :15) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGLTVTVSS
MOR04920VL : (SEQ ID NO :34) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIIDVNNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQSYASGNTKVVFGGGTKLTVLGQ
MOR04945VH : (SEQ ID NO :16) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGLTVTVSS
MOR04945VL : (SEQ ID NO :35). DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIIDVNNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQTYDQIKLSAVFGGGTKLTVLGQ
MOR04952VH : (SEQ ID NO :17) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGLTVTVSS

MOR04952VL : (SEQ ID NO :36) DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDADYYCQSYDSPTDSVVFSGGKLTVLGQ
MOR04954 • VH : (SEQ ID NO :18) QVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSVIEHKDKGGTTYAASVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGTLLTVSS
MOR04954VL : (SEQ ID NO :37) DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDADYYCQSYASGNTKVVFGGKLTVLGQ
MOR04947VH : (SEQ ID NO :19) QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYFTNYYIGWVRQMPGKGLEWVGIIIVPGTSYTIYSPSFQGGVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGIPFRMRGFDYWGQGTLLTVSS
MOR04947VL : (SEQ ID NO :38) DIVLTQPPSVSGAPGQRTISCSGSSSNIGSSSFVNWYQQLPGTAPKLLIGNNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AITGLQSEADADYYCASFDMGSPNVVFGGKLTVLGQ
MOR05145VH : (SEQ ID NO :20) QVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFNYYGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGTLLTVSS
MOR05145VL : (SEQ ID NO :39) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRAATGVPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQYMTLPLTFGQGTKEIKRT

[0695] 将表 19 中的可变区的 CDR 和 FR 片段排列于针对重链 (SEQ IDNO:2-20 ;VH3 是 SEQ ID NO :125,VH5 是 SEQ ID NO :126) 的表 20A、针对 κ 轻链 (SEQ ID NO :21、22、23、27、28 和 29 ;VK1 是 SEQ ID NO :127 并且 VK3 是 SEQ ID NO :128) 的表 20B 以及针对 λ 轻链 (SEQ ID NO :24、25、30、31、32、33、34、35、36 和 37 ;VL2 是 SEQ ID NO:129 并且 VL1 是 SEQ ID NO :130) 的表 20C 中。

[0696]

[0700] 等同方案

[0701] 从上述本发明具体实施方案的详细说明,显而易见的是已对新抗体及其免疫学的片段进行了描述。尽管本文已详细公开了具体的实施方案,也要经由仅仅示例性的实施例来完成该描述。特别地,本发明人预期可对本发明进行多种替换、更改和修饰,而不背离本发明的精神或范围。

[0001]

序 列 表

<110> 诺瓦提斯公司

<120> 使用 Dickkopf-1 和/或-4 抗体的组合物和方法

<130> ON4-34783

<150> USSN 60/759216

<151> 2006-01-13

<160> 136

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 266

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Met Met Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ala Thr Arg Val Phe Val Ala Met
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Leu Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Val Ser Ala Thr
20 25 30

Leu Asn Ser Val Leu Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro Pro
35 40 45

Leu Gly Gly Ala Ala Gly His Pro Gly Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro
50 55 60

Gly Ile Leu Tyr Pro Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Ile Asp Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Pro Thr Arg Gly Gly Asp Ala Gly Val Gln Ile Cys Leu
100 105 110

Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys
115 120 125

Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn
130 135 140

His Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn
145 150 155 160

[0002]

Asp His Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Leu Ser Ser
165 170 175

Lys Met Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser
180 185 190

Ser Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys
195 200 205

Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg
210 215 220

Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Tyr Cys Gly
225 230 235 240

Glu Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn
245 250 255

Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
260 265

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> 人

<400> 2
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Tyr Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ser His Met Asp Lys Pro Pro Gly Tyr Val Phe Ala
100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0003]

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Met Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0004]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 116
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 116
<212> PRT
<213> 人

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0005]

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Thr Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ile Pro Phe Arg Met Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 115

[0006]

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0007]

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

[0008]

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

[0009]

<213> 人

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 116

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0010]

Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> 人

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Glu His Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Thr Trp Tyr Ala Ala
50 55 60

Gly Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 116
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0011]

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

[0012]

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Glu His Lys Asp Lys Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Val Pro Gly Thr Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ile Pro Phe Arg Met Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

[0013]

	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115		120	
<210> 20			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 20			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr			
20	25	30	
Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr			
100	105	110	
Val Ser Ser			
115			
<210> 21			
<211> 109			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 21			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Lys Asn Tyr			
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	

[0014]

Gly Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Tyr Gly Met Pro Pro
85 90 95

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

<210> 22
<211> 109
<212> PRT
<213> 人
<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Ile Pro Met
85 90 95

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

<210> 23
<211> 110
<212> PRT
<213> 人

<400> 23

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

[0015]

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asp Glu Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Trp Asp Met Thr
85 90 95

Val Asp Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

[0016]

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Gly
85 90 95

Asn Thr Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Phe Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Gly Asn Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Met Gly Ser
85 90 95

Pro Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

[0017]

<210> 27
<211> 110
<212> PRT
<213> 人

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ser Leu Pro
85 90 95

Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 28
<211> 110
<212> PRT
<213> 人

<400> 28

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Thr Leu Pro
85 90 95

[0018]

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Asn Arg Thr
 100 105 110

<210> 29
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Thr Leu Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 30
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 30

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

[0019]

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Val Ser
85 90 95

Pro Ile Thr Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

<400> 31

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Ala Thr Ser
85 90 95

Pro Leu Ser Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> 人

<400> 32

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

[0020]

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Phe Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 33

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

<400> 33

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Thr Tyr Thr
85 90 95

Pro Ile Ser Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 34

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

[0021]

<400> 34

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Gly
85 90 95

Asn Thr Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 35

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

<400> 35

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Gln Ile
85 90 95

Lys Leu Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

[0022]

Gln

<210> 36
<211> 113
<212> PRT
<213> 人

<400> 36

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Pro
85 90 95

Thr Asp Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 37
<211> 113
<212> PRT
<213> 人

<400> 37

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

[0023]

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Gly
85 90 95

Asn Thr Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> 人

<400> 38

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Phe Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Gly Asn Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Met Gly Ser
85 90 95

Pro Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 39

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 39

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

[0024]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Thr Leu Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 40

Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Phe

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 41

Gly Ile Ser Tyr Tyr Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Phe

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 42

[0025]

Gly Ile Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Phe

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 43

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Thr
1 5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr Gly Met Thr
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 45

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Thr
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Thr
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 47

[0026]

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Thr
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 48

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 49

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 50

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly Met Thr
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 51

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
1 5 10

[0027]

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 53

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 54

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 55

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 56

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 57
<211> 20
<212> PRT
<213> 人

<400> 57
Trp Val Ser Gly Ile Ser Glu Arg Gly Val Tyr Ile Phe Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

[0028]

<210> 58
<211> 20
<212> PRT
<213> 人

<400> 58

Trp Val Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 59
<211> 23
<212> PRT
<213> 人

<400> 59

Trp Val Ser Asp Ile Glu His Lys Arg Arg Ala Gly Gly Ala Thr Ser
1 5 10 15

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly
20

<210> 60
<211> 22
<212> PRT
<213> 人

<400> 60

Trp Val Ser Met Ile Glu His Lys Thr Arg Gly Gly Thr Thr Asp Tyr
1 5 10 15

Ala Ala Pro Val Lys Gly
20

<210> 61
<211> 20
<212> PRT
<213> 人

<400> 61

Trp Val Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

[0029]

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 62

Trp Val Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 63

Trp Val Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 64

<211> 22

<212> PRT

<213> 人

<400> 64

Trp Val Ser Val Ile Glu His Lys Ser Phe Gly Ser Ala Thr Phe Tyr
1 5 10 15

Ala Ala Ser Val Lys Gly
20

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 65

His Tyr Met Asp His
1 5

<210> 66

<211> 6

[0030]

<212> PRT

<213> 人

<400> 66

Thr Ile Tyr Met Asp Tyr

1 5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 67

Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr

1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 68

Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr

1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 69

Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 70

His Gly Ile Asp Phe Asp His

1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

[0031]

<400> 71

His Gly Ile Asp Phe Asp His
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 72

His Gly Ile Asp Phe Asp His
1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 74

Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 75

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 76

[0032]

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 77
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 77

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 78
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 78

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 79
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 79

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 80
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 80

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 81

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5 10

[0033]

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 82

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5 10

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 83

Leu Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 84

Leu Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 85

Leu Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 86

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 87

[0034]

<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 87

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 88

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 89

Gln Gln Tyr Asp Ser Ile Pro Met
1 5

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 90

Gln Gln Tyr Leu Phe Pro Leu
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 91

Ser Thr Trp Asp Met Thr Val Asp Phe
1 5

<210> 92
<211> 9

[0035]

<212> PRT

<213> 人

<400> 92

Ser Thr Trp Asp Met Thr Val Asp Phe

1 5

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 93

Gln Ser Trp Gly Val Gly Pro Gly Gly Phe

1 5 10

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 94

Gln Ser Tyr Asp Pro Phe Leu Asp Val Val

1 5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 95

Gln Ser Tyr Asp Ser Pro Thr Asp Ser Val

1 5 10

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 96

Gln Ser Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Lys Val

1 5 10

<210> 97

<211> 654

<212> DNA

<213> 人

[0036]

<400> 97
 gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt ggttttaatt atgtgtcttg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgccaac acttatgatt catgatggtt ctaatcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc cagtcttggg atgtttctcc tattactgct 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggetgc cccctcggtc 360
 actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
 ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtg aagtcacaca gaagctacag ctgccaggtc 600
 acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 654

<210> 98

<211> 654

<212> DNA

<213> 人

<400> 98
 gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatcttggt ggttataatt atgtgtcttg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgccaac acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc cagacttatg atcagattaa gttgtctgct 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggetgc cccctcggtc 360
 actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
 ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtg aagtcacaca gaagctacag ctgccaggtc 600
 acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 654

[0037]

<210> 99
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 99
 gatatcgtgc tgacccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60
 ctgagctgca gagcgagcca gaatcttttt tctccttata tggcttggta ccagcagaaa 120
 ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggtgcttcta atcgtgcaac tggggtcccg 180
 gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
 cctgaagact ttgcggtgta ttattgccag cagtatctta ctcttcctct tacctttggc 300
 cagggtacga aagtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccttg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggccctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 100
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 100
 gatacgtgc tgacccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60
 ctgagctgca gagcgagcca gaatcttttt tctccttata tggcttggta ccagcagaaa 120
 ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggtgcttcta atcgtgcaac tggggtcccg 180
 gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
 cctgaagact ttgcggtgta ttattgccag cagtatatga ctcttcctct tacctttggc 300
 cagggtacga aagtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccttg 540

[0038]

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag	600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag	648
<210> 101	
<211> 1347	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 101	
caggcacagg tgcaattggt ggaaagcggc ggcggcctgg tgcaaccggg cggcagcctg	60
cgtctgagct gcgcgccctc cggatttacc tttttctctt attggatgtc ttgggtgcgc	120
caagccctg ggaagggtct cgagtgggtg agcggtatct cttattctgg tagcaatacc	180
cattatgcgg atagcgtgaa aggccgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc	240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt	300
atgggtattg atcttgatta ttggggccaa ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
accaagggcc catcgtctt cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca	420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc	540
tactccctca gcagcgtcgt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacca gacctacac	600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gccccaatct	660
tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	720
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	780
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200
tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1260

[0039]

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cagcagaag	1320
agcctctccc tgtccccggg taaatga	1347
<210> 102	
<211> 1347	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 102	
caggcacagg tgcaattggt ggaaagcggc ggcggcctgg tgcaaccggg cggcagcctg	60
cgtctgagct gcgcggcctc cggatttacc ttttcttctt attggatgtc ttgggtgcgc	120
caagcccctg ggaagggtct cgagtgggtg agcgttatct cttctgattc tagctctacc	180
tattatgcgg atagcgtgaa aggccgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc	240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt	300
catggtattg attttgatca ttggggccaa ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
accaagggcc catcgtctt cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca	420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac	480
tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc	540
tactccctca gcagcgtcgt gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaatct	660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	720
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgaggtc	780
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	960
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg	1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200
tccgacgget ccttcttct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1260

[0040]

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cagcagaag	1320
agcctctccc tgtccccggg taaatga	1347
<210> 103	
<211> 1338	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 103	
caggtgcagc tggtagagag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg	60
agctgtgccg ccagcggcctt caccttcaac aactacggca tgacctgggt gaggcaggcc	120
cctggcaagg gcctggagtg ggtgtccggc atcagcggca gcggcagcta cacctactac	180
gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac	240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc ccggaccatc	300
tacatggact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc	360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg	420
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540
agcagcgtcg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaac ttgtgacaaa	660
actcacacat gccacccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttccctc	720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag	960
gltccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccatcccgga aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tccttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca gggaacgtc	1260

[0041]

tctcatgct cctgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
ctgtccccgg gtaaatga	1338
<210> 104	
<211> 654	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 104	
gatatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg tccggcagcc ctggccagag catcaccatc	60
agctgtaccg gcaccagcag cgatgtgggc ggcctcaact acgtgtcctg gtatcagcag	120
caccccgga agggcccaaa gctgatgac cagcagcga gcaatagacc cagcggcgtg	180
tccaatagat tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacct cagcggcctg	240
caggctgagg acgaggccga ctactactgc cagagctggg atgtgagccc catcaccgcc	300
gtgtttggcg gcggaacaaa gcttacgctc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc	360
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggcacact ggtgtgtctc	420
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagcccgctc	480
aaggcgggag tggagacaac cacaccctc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtg aagtccaca gaagctacag ctgccaggtc	600
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	654
<210> 105	
<211> 654	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 105	
gatatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg tccggcagcc ctggccagag catcaccatc	60
agctgtaccg gcaccagcag cgacctgggc ggctacaact acgtgtcctg gtatcagcag	120
caccccgga agggcccaaa gctgatgac tacgacgtga acaacagacc tagcggcgtg	180
tccaacagat tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacct ctctggcctg	240
caggctgagg acgaggccga ctactactgc cagacctacg accagatcaa gctgtccgcc	300
gtgtttggcg gcggaacaaa gcttacgctc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc	360
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggcacact ggtgtgtctc	420

[0042]

ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagcccccgtc	480
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc	600
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	654
<210> 106	
<211> 648	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 106	
gacatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc	60
ctgtcttgta gggccagcca gaacctgttc agcccttacc tggcctggta tcagcagaag	120
cccgccagg cccccagact gctgatctac ggccgagca acagagccac cggcgtgccc	180
gccagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggag	240
cctgaggatt tcgccgtgta ctactgccag cagtacctga ccctgcccct gaccttcggc	300
cagggcacca aggtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccttg	540
acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cgcctgcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag	648
<210> 107	
<211> 648	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 107	
gacatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc	60
ctgtcttgta gggccagcca gaacctgttc agcccttacc tggcctggta tcagcagaag	120
cccgccagg cccccagact gctgatctac ggccgagca acagagccac cggcgtgccc	180
gccagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggag	240

[0043]

cctgaggatt tcgccgtgta ctactgccag cagtacatga cctgcctct gaccttcggc	300
cagggcacca aggtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaa gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccttg	540
acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag	648
<210> 108	
<211> 1347	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 108	
caggcccagg tgcagctggt ggagagcggc ggaggactgg tgcagcctgg cggcagcctg	60
agactgagct gtgccgccag cggcttcacc ttcagcagct actggatgag ctgggtgagg	120
caggcccctg gcaagggcct ggagtgggtg tccggcatca gctacagcgg cagcaatacc	180
cactacgccg acagcgtgaa gggcaggttc accatcagcc gggacaacag caagaacacc	240
ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgcccg	300
atgggcatcg acctggatta ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
accaagggcc catcggtctt ccccttgga cctctctcca agagcacctc tgggggcaca	420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac tccccgaac cggtagcgtg gtcgtggaac	480
tcaggcgecc tgaccagcgg cgtgcacacc tccccggctg tcctacagtc ctcaggactc	540
tactccctca gcagcgtcgt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc	600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaaatct	660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	720
gtcttctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	780
acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	960

[0044]

aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggtttct atcccagcga catcgccgtg	1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200
tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cagcagaag	1320
agcctctccc tgtccccggg taaatga	1347

<210> 109

<211> 1347

<212> DNA

<213> 人

<400> 109

caggcccagg tgcagctggt ggagagcggc ggaggactgg tgcagcctgg cggcagcctg	60
agactgagct gtgccgccag cggtctcacc ttacgagct actggatgag ctgggtgagg	120
caggcccctg gcaagggcct ggagtgggtg tccgtgatca gcagcgatag cagcagcacc	180
tactacgccg atagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagaacacc	240
ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgccagg	300
cacggcatcg acttcgacca ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
accaagggcc catcgtctt ccccttgga cctctctcca agagcacctc tgggggcaca	420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtagcgtg gtcgtggaac	480
tcaggcggcc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc	540
tactccctca gcagcgtcgt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc	600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gccc aaatct	660
tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	720
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	780
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	960

[0045]

aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttct atcccagcga catcgccgtg	1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200
tccgacggct ctttttctct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag	1320
agcctctccc tgtccccggg taaatga	1347

<210> 110
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 110	
caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg	60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttaat aattatggta tgacttgggt gcgccaagcc	120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgg atctctggtt ctggtagcta tacctattat	180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtactatt	300
tatatggatt attggggcca aggcaccctg gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc	360
ccatcggctt tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg	420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540
agcagcgtcg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaata ttgtgacaaa	660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc	720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atccaagac aaagccgagg gagagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag	960

[0046]

```

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggtctt tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtcttg cacaaccact acacgcagaa gacccctctcc 1320
ctgtccccgg gtaaatga 1338

```

<210> 111

<211> 217

<212> PRT

<213> 人

<400> 111

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Val Ser

85 90 95

Pro Ile Thr Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

165 170 175

[0047]

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 112
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 112

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Gln Ile
 85 90 95

Lys Leu Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

[0048]

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 113

<211> 215

<212> PRT

<213> 人

<400> 113

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Thr Leu Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

[0049]

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 114

<211> 215

<212> PRT

<213> 人

<400> 114

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Thr Leu Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

[0050]

<210> 115
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 115
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

[0051]

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
245	250		255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
260	265		270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
275	280		285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
290	295		300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
325	330		335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro			
340	345		350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val			
355	360		365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			
370	375		380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp			
385	390	395	400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			
405	410		415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
420	425		430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440		445
<210> 116			
<211> 446			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 116			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25		30

[0052]

Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
35							40		45							
Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
50							55		60							
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65						70		75							80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85							90		95			
Ala	Arg	His	Gly	Ile	Asp	Phe	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100							105		110				
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
115							120		125							
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
130							135		140							
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145						150		155							160	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165							170		175			
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
			180							185		190				
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
195							200		205							
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
210							215		220							
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
225						230		235							240	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245							250		255			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			260							265		270				
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
275							280		285							
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
290							295		300							

[0053]

Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305	310	315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	325 330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	340 345	350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	355 360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	370 375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	385 390	395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	405 410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	420 425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	435 440	445
<210> 117		
<211> 445		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 117		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr	20 25 30	
Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35 40 45	
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	50 55 60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	65 70 75 80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85 90 95	

[0054]

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
100	105	110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro		
115	120	125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val		
130	135	140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala		
145	150	155
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly		
165	170	175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly		
180	185	190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
195	200	205
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365

[0055]

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 118

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<400> 118

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

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu
20 25 30

Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser
50 55 60

Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr
85 90 95

Asp Gln Ile Lys Leu Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

<210> 119

<211> 117

<212> PRT

<213> 人

<400> 119

Gly Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
1 5 10 15

[0056]

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 20 25 30
 Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45
 Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 65 70 75 80
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 85 90 95
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr
 115

<210> 120

<211> 333

<212> DNA

<213> 人

<400> 120

acgcgttgcg atatcgccct gaccagccc gccagcgtgt ccggcagccc tggccagagc 60

atcaccatca gctgtaccgg caccagcagc gacctgggcg gctacaacta cgtgtcctgg 120

tatcagcagc accccggcaa ggcccccaag ctgatgatct acgacgtgaa caacagacct 180

agcggcgtgt ccaacagatt cagcggcagc aagagcggca acaccgccag cctgaccatc 240

tctggcctgc aggctgagga cgaggccgac tactactgcc agacctacga ccagatcaag 300

ctgtccgccg tgtttggcgg cggaacaaag ctt 333

<210> 121

<211> 361

<212> DNA

<213> 人

<400> 121

gagtccattg ggagtgcagg cccaggtgca gctggtggag agcggcggag gactggtgca 60

gcctggcggc agcctgagac tgagctgtgc cgccagcggc ttcacctca gcagctactg 120

gatgagctgg gtgaggcagg cccctggcaa gggcctggag tgggtgtccg tgatcagcag 180

[0057]


```

cgatagcagc agcacctact acgccgatag cgtgaagggc cggttcacca tcagccggga      240

caacagcaag aacaccctgt acctgcagat gaacagcctg agagccgagg acaccgccgt      300

gtactactgt gccaggcacg gcatcgactt cgaccactgg ggccagggca ccctggtcac      360

c                                                                              361

<210> 122
<211> 259
<212> PRT
<213> 人

<400> 122
Met Ala Ala Leu Met Arg Ser Lys Asp Ser Ser Cys Cys Leu Leu Leu
1          5          10          15

Leu Ala Ala Val Leu Met Val Glu Ser Ser Gln Ile Gly Ser Ser Arg
          20          25          30

Ala Lys Leu Asn Ser Ile Lys Ser Ser Leu Gly Gly Glu Thr Pro Gly
          35          40          45

Gln Ala Ala Asn Arg Ser Ala Gly Met Tyr Gln Gly Leu Ala Phe Gly
          50          55          60

Gly Ser Lys Lys Gly Lys Asn Leu Gly Gln Ala Tyr Pro Cys Ser Ser
65          70          75          80

Asp Lys Glu Cys Glu Val Gly Arg Tyr Cys His Ser Pro His Gln Gly
          85          90          95

Ser Ser Ala Cys Met Val Cys Arg Arg Lys Lys Lys Arg Cys His Arg
          100         105         110

Asp Gly Met Cys Cys Pro Ser Thr Arg Cys Asn Asn Gly Ile Cys Ile
          115         120         125

Pro Val Thr Glu Ser Ile Leu Thr Pro His Ile Pro Ala Leu Asp Gly
          130         135         140

Thr Arg His Arg Asp Arg Asn His Gly His Tyr Ser Asn His Asp Leu
145         150         155         160

Gly Trp Gln Asn Leu Gly Arg Pro His Thr Lys Met Ser His Ile Lys
          165         170         175

Gly His Glu Gly Asp Pro Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ile Glu Gly
          180         185         190

Phe Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu
          195         200         205

```

[0058]

His Gln Gly Glu Val Cys Thr Lys Gln Arg Lys Lys Gly Ser His Gly
210 215 220

Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Asp Cys Ala Lys Gly Leu Ser Cys Lys
225 230 235 240

Val Trp Lys Asp Ala Thr Tyr Ser Ser Lys Ala Arg Leu His Val Cys
245 250 255

Gln Lys Ile

<210> 123

<211> 350

<212> PRT

<213> 人

<400> 123

Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
20 25 30

Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
35 40 45

Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Met Glu Asp Thr Gln His Lys
50 55 60

Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys
65 70 75 80

Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
85 90 95

Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
100 105 110

Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe
115 120 125

Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
130 135 140

His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
145 150 155 160

Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
165 170 175

[0059]

Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
180 185 190

Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
195 200 205

Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
210 215 220

Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
225 230 235 240

Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu
245 250 255

Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu
260 265 270

Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe
275 280 285

Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val
290 295 300

Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu
305 310 315 320

Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Gly Glu
325 330 335

Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile
340 345 350

<210> 124

<211> 224

<212> PRT

<213> 人

<400> 124

Met Val Ala Ala Val Leu Leu Gly Leu Ser Trp Leu Cys Ser Pro Leu
1 5 10 15

Gly Ala Leu Val Leu Asp Phe Asn Asn Ile Arg Ser Ser Ala Asp Leu
20 25 30

His Gly Ala Arg Lys Gly Ser Gln Cys Leu Ser Asp Thr Asp Cys Asn
35 40 45

[0060]

Thr Arg Lys Phe Cys Leu Gln Pro Arg Asp Glu Lys Pro Phe Cys Ala
 50 55 60

Thr Cys Arg Gly Leu Arg Arg Arg Cys Gln Arg Asp Ala Met Cys Cys
 65 70 75 80

Pro Gly Thr Leu Cys Val Asn Asp Val Cys Thr Thr Met Glu Asp Ala
 85 90 95

Thr Pro Ile Leu Glu Arg Gln Leu Asp Glu Gln Asp Gly Thr His Ala
 100 105 110

Glu Gly Thr Thr Gly His Pro Val Gln Glu Asn Gln Pro Lys Arg Lys
 115 120 125

Pro Ser Ile Lys Lys Ser Gln Gly Arg Lys Gly Gln Glu Gly Glu Ser
 130 135 140

Cys Leu Arg Thr Phe Asp Cys Gly Pro Gly Leu Cys Cys Ala Arg His
 145 150 155 160

Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu Leu Glu Gly Gln Val Cys
 165 170 175

Ser Arg Arg Gly His Lys Asp Thr Ala Gln Ala Pro Glu Ile Phe Gln
 180 185 190

Arg Cys Asp Cys Gly Pro Gly Leu Leu Cys Arg Ser Gln Leu Thr Ser
 195 200 205

Asn Arg Gln His Ala Arg Leu Arg Val Cys Gln Lys Ile Glu Lys Leu
 210 215 220

<210> 125
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(116)
 <223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 125
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

[0061]

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 126

<211> 127

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99).. (116)

<223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 126

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

[0062]

<210> 127

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (90).. (97)

<223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 127

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 128

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (91).. (98)

<223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 128

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

[0063]

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 129

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (91)..(100)

<223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 129

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 130

<211> 112

<212> PRT

[0064]

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (90).. (99)

<223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 130

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (11)

<223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 131

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa
1 5 10

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<220>

[0065]

<221> MISC_FEATURE

<222> (9).. (11)

<400> 132

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (8)

<223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 133

Gln Gln Tyr Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
1 5

<210> 134

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 134

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (7)

<223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 135

Leu Met Ile Xaa Asp Xaa Xaa Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

[0066]

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> 其中 X 可以是任意氨基酸

<400> 136

Xaa Xaa Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

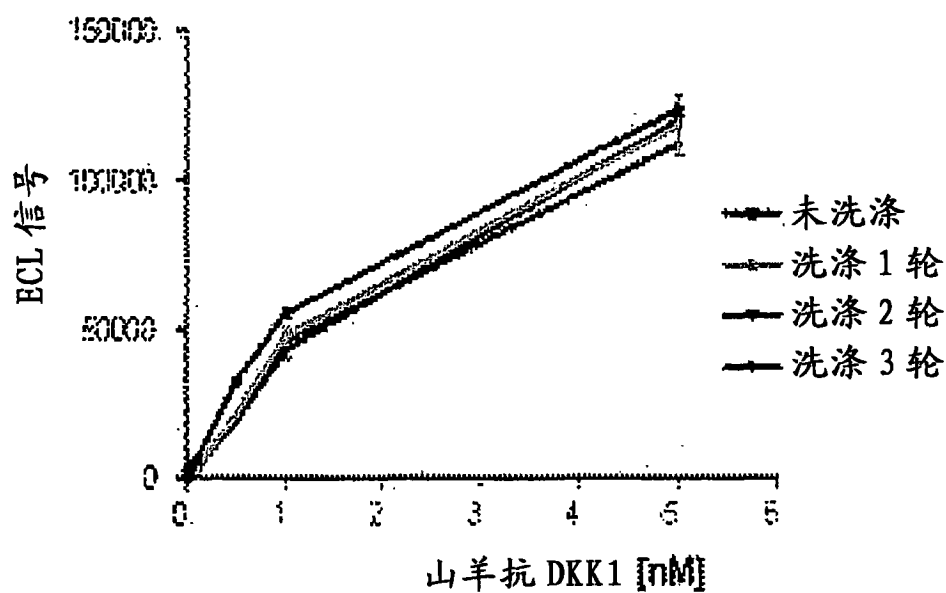


图 1

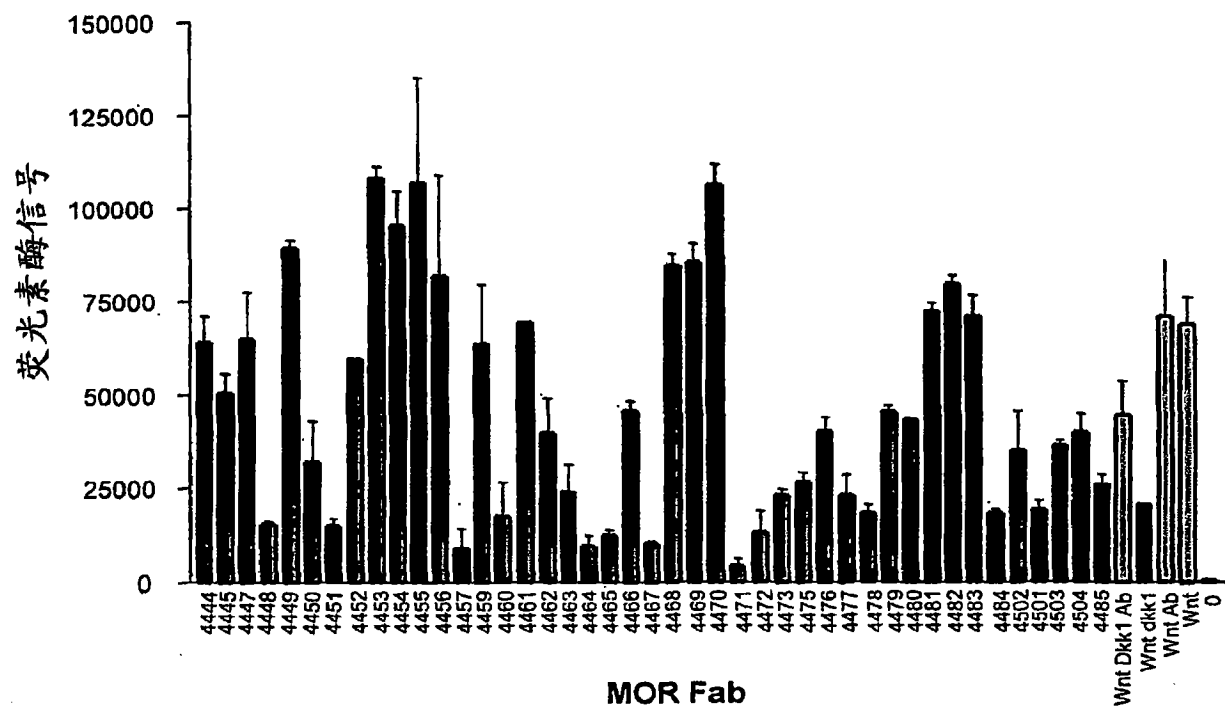
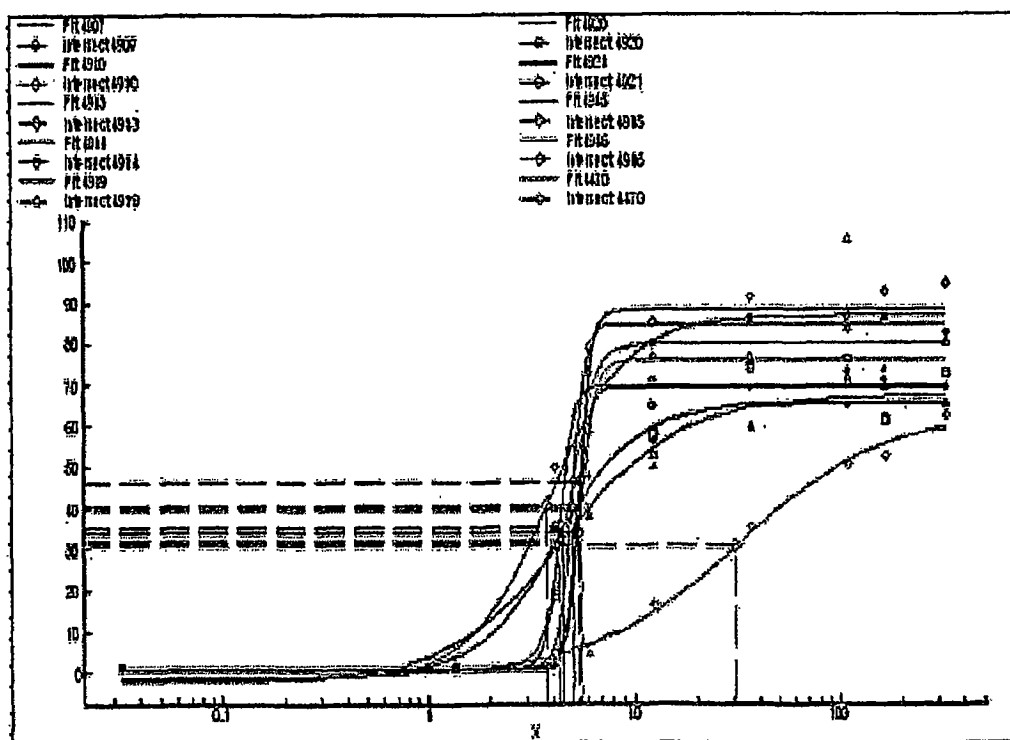
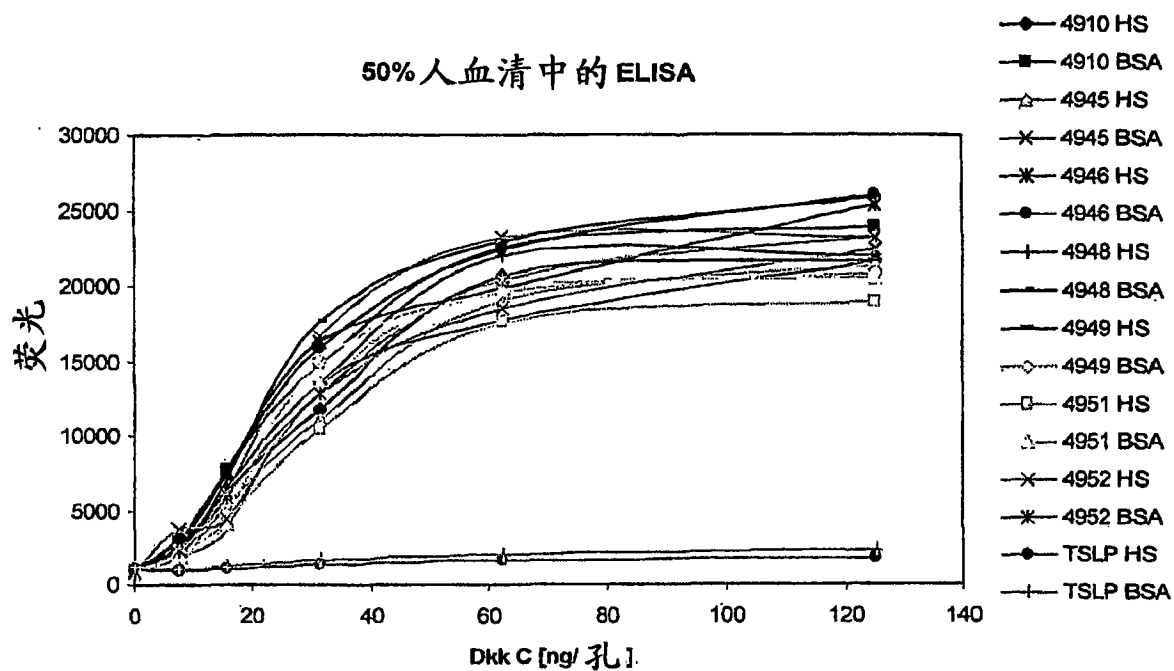


图 2



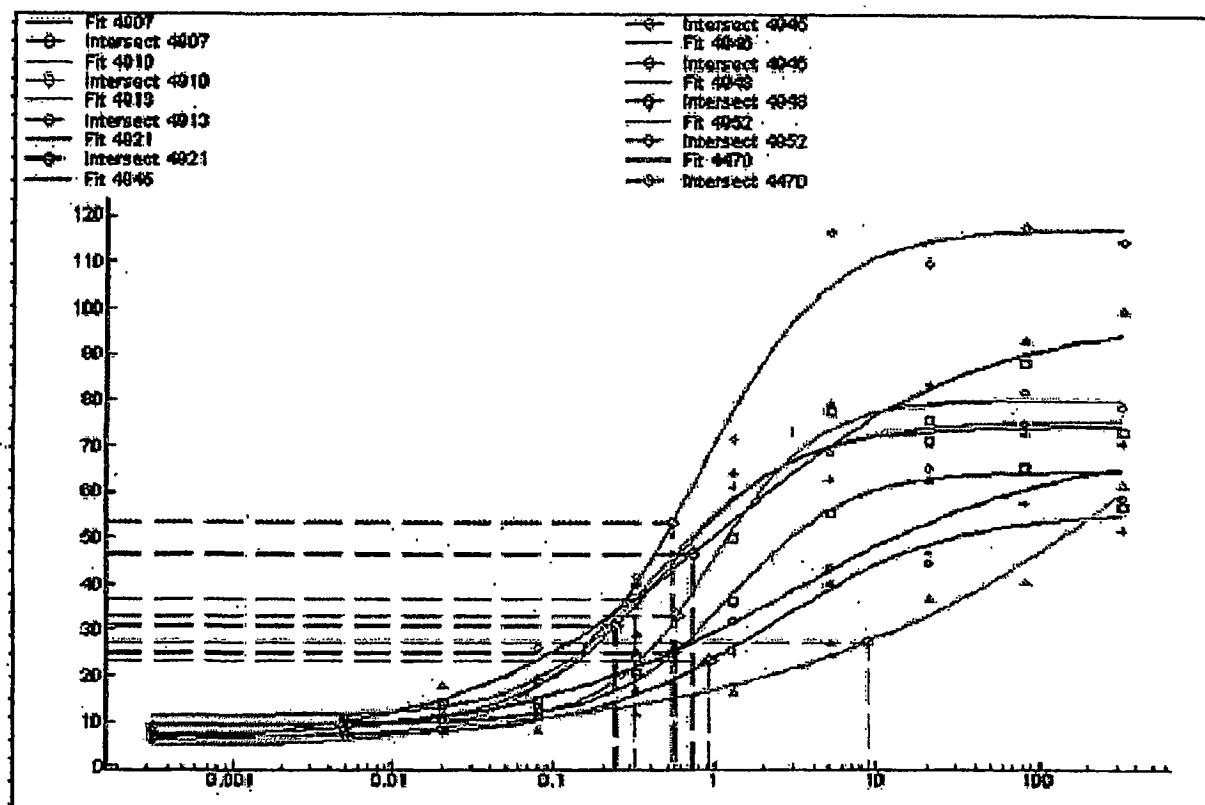


图 5

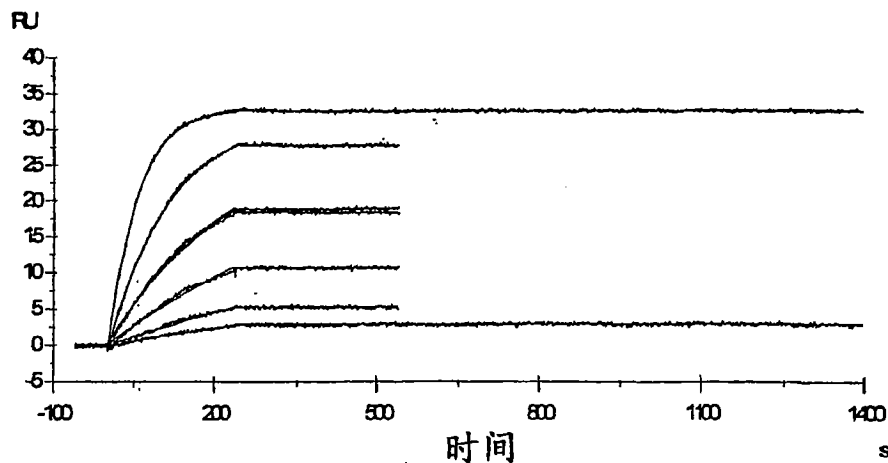


图 6A

K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
$4.6 \times 10^6 (\pm 0.4)$	$9.0 \times 10^{-6} (\pm 2.6)$	$2.0 \times 10^{-12} (\pm 0.7)$

图 6B

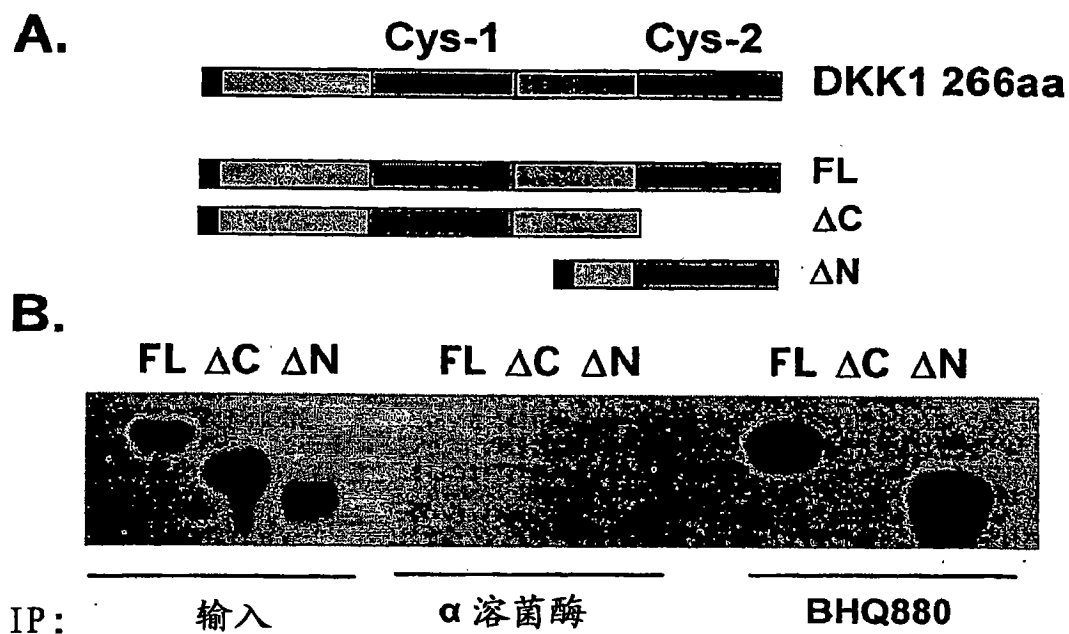


图 7

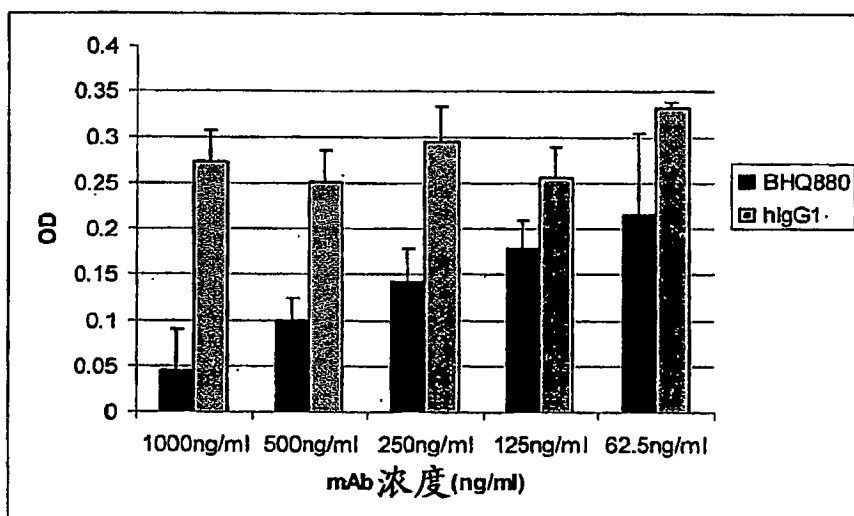


图 8

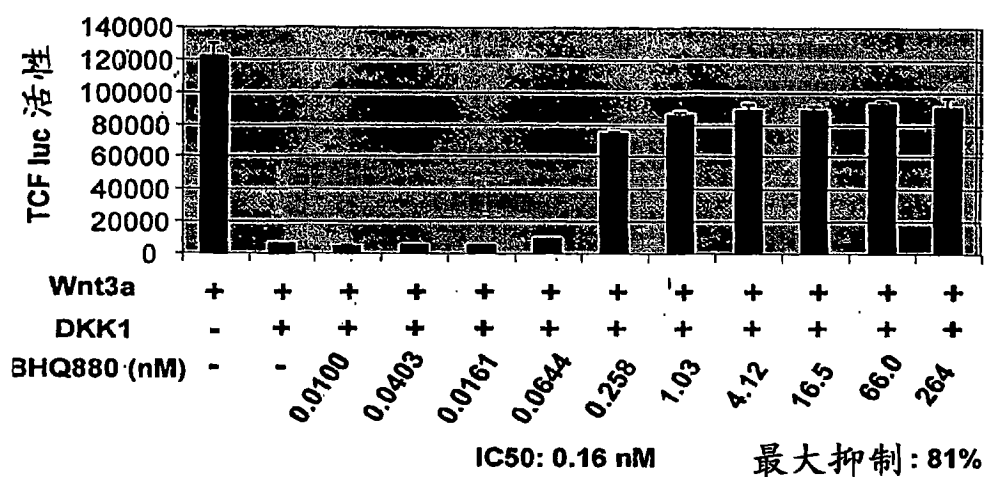


图 9

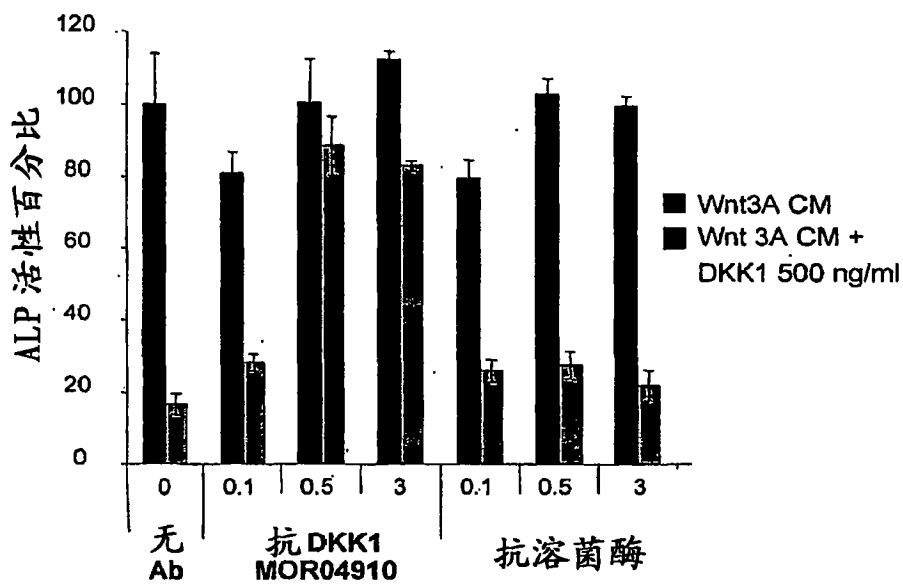


图 10

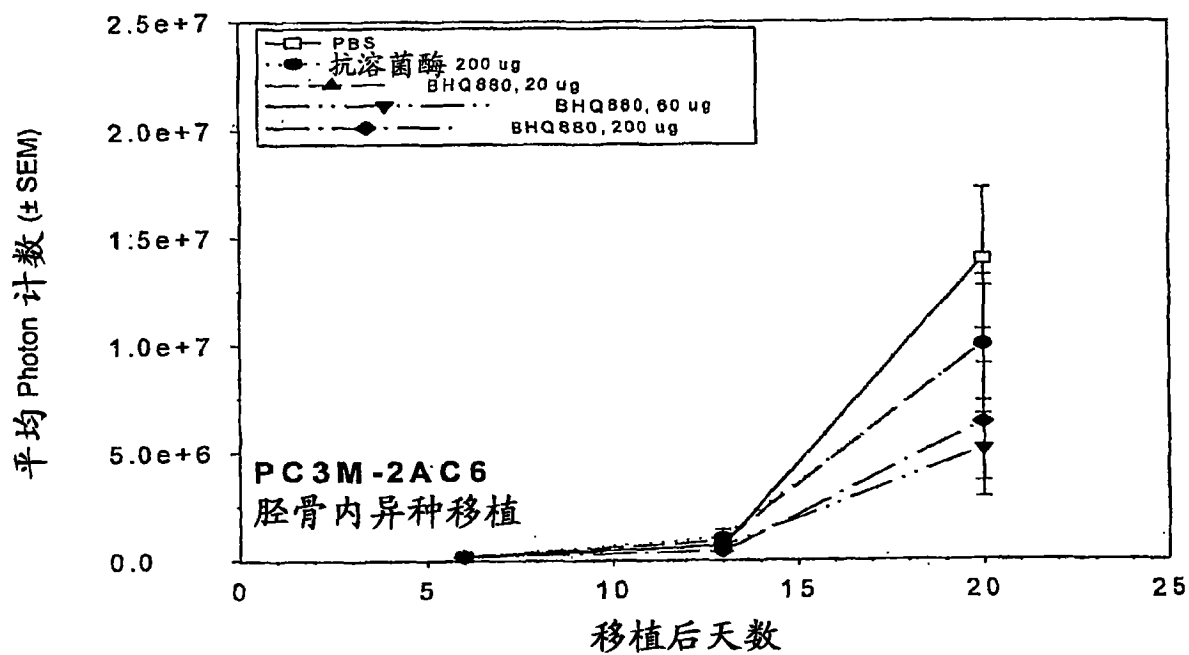


图 11

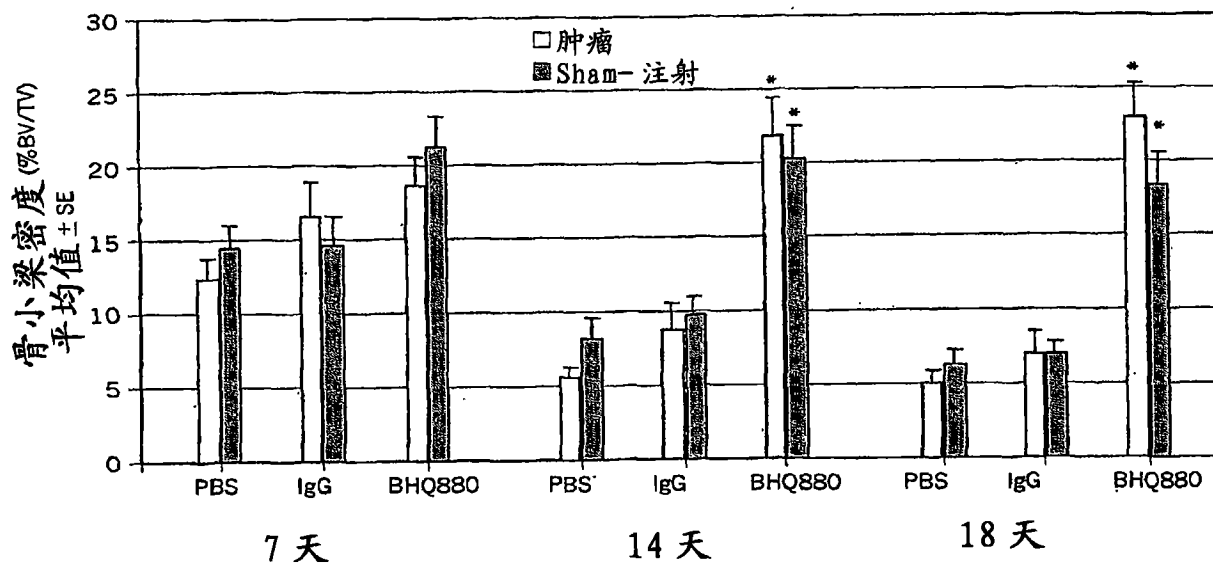


图 12

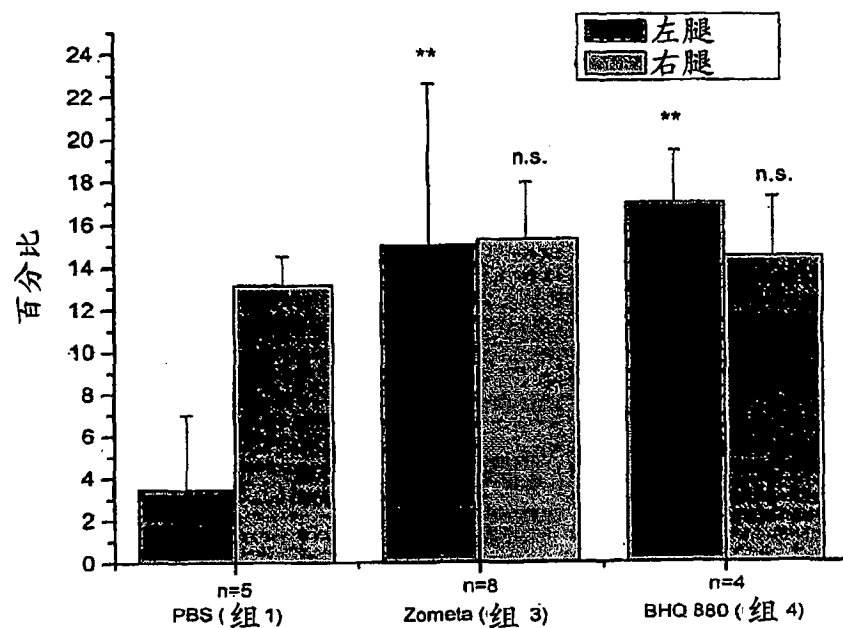


图 13

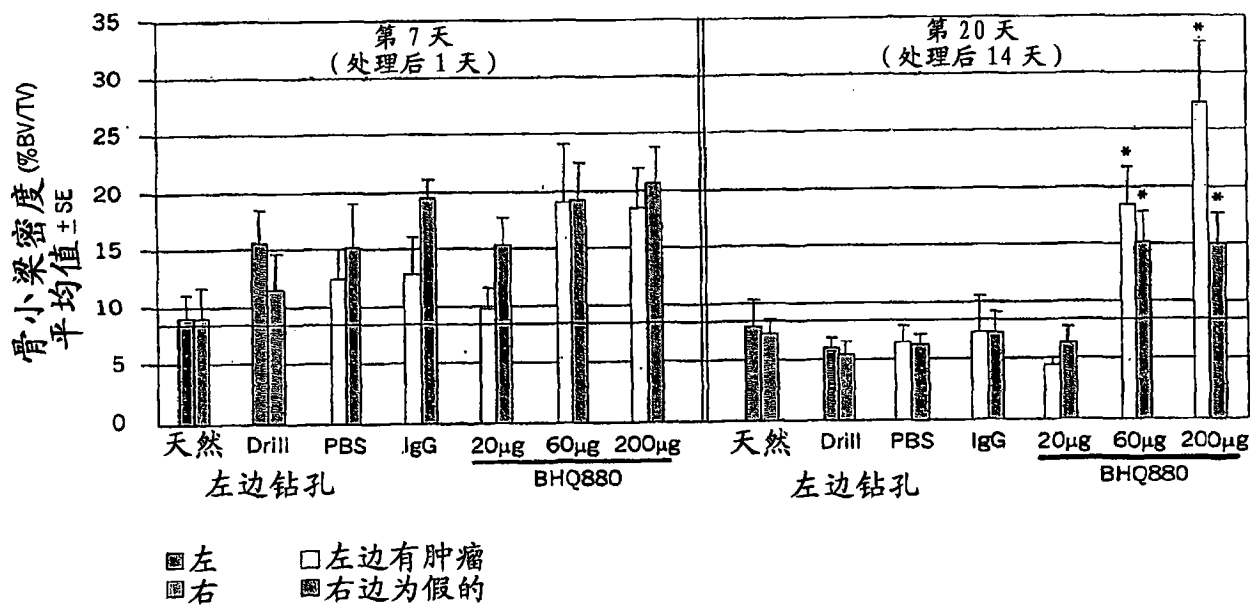


图 14