(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115515632 A
(43)申请公布日 2022.12.23

(21)申请号 202180031535.3
(22)申请日 2021.03.01
(30)优先权数据
62/983,374 2020.02.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/020291 2021.03.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/174198 EN 2021.09.02
(71)申请人 布里格姆妇女医院
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 P·B·于 L·特龙科尼 S·金
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)

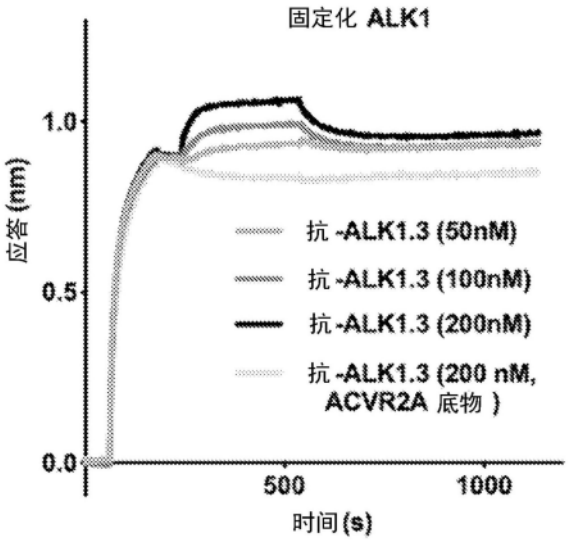
权利要求书4页 说明书89页 附图40页

(54)发明名称

通过多特异性抗体选择性调节转化生长因子β超家族信号传导

(57)摘要

使用异聚复合体选择性靶向BMP/TGF?信号传导的组合物和方法,所述异聚复合体优选地包含靶向BMP I型和II型受体的胞外结构域的单链可变结构域(scFv)抗体(Ab)。



CN 115515632 A

1.一种多-或双-特异性抗体分子,其至少包含:

第一抗原结合结构域,其与骨形态发生蛋白受体(BMPR)I型(BMPRI)结合;和

第二抗原结合结构域,其与骨形态发生蛋白受体(BMPR)II型(BMPRII)结合,

其中所述第一和第二抗原结合结构域通过柔性接头连接在一起,并且可以为任何顺序,

其中各个抗原结合结构域可激动其所结合的BMPR,和

优选地其中各个抗原结合结构域是scFv。

2.根据权利要求1所述的抗体分子,其中所述抗体分子与细胞的结合起始BMP/TGF-β/激活素/GDF信号传导。

3.根据权利要求1所述的抗体分子,其中所述第一抗原结合结构域与选自由以下组成的组的BMPRI结合:ALK1(ACVRL1);ALK2(ACVR1A);ALK3(BMPR1A);ALK4(ACVR1B);ALK5(TGFBR1);ALK6(BMPR1B);或ALK7(ACVR1C)。

4.根据权利要求3所述的抗体分子,其中所述第一抗原结合结构域与ALK1结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:146、148、150或152中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:146、148、150或152至少95%相同的序列。

5.根据权利要求3所述的抗体分子,其中所述第一抗原结合结构域与ALK2结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:160、162、164、166或168中的互补决定区相同的VH CDR1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:160、162、164、166或168至少95%相同的序列。

6.根据权利要求3所述的抗体分子,其中所述第一抗原结合结构域与ALK3结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:156或158中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:156或158至少95%相同的序列。

7.根据权利要求3所述的抗体分子,其中所述第一抗原结合结构域与ALK4结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:178中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:178至少95%相同的序列。

8.根据权利要求3所述的抗体分子,其中所述第一抗原结合结构域与ALK6结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:180中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:180至少95%相同的序列。

9.根据权利要求3所述的抗体分子,其中所述第一抗原结合结构域与ALK7结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:182、184、186或188中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NOs:182、184、186或188至少95%相同的序列。

10.根据权利要求1所述的抗体分子,其中所述第二抗原结合结构域与选自由以下组成的组的BMPRII结合:ACTRIIA(ACVR2A);ACTRIIB(ACVR2B);BMPRII(BMPR2);TGFBRII

(TGFBR2)；或AMHRII(AMHR2)。

11.根据权利要求10所述的抗体分子，其中所述第二抗原结合结构域与BMPR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NO:154或212中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NO:154或212至少95％相同的序列。

12.根据权利要求10所述的抗体分子，其中所述第二抗原结合结构域与ACTRIIA(ACVR2A)结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NOs:170和172中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NOs:170或172至少95％相同的序列。

13.根据权利要求10所述的抗体分子，其中所述第二抗原结合结构域与ACTRIIB(ACVR2B)结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NOs:174或176中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NOs:174或176至少95％相同的序列。

14.根据权利要求1所述的抗体分子，其中：

(i)所述第一抗原结合结构域与BMPR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列，和/或所述第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；

(ii)所述第一抗原结合结构域与ACVR2A结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列，和/或所述第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；

(iii)所述第一抗原结合结构域与ACVR2B结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列，和/或所述第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；

(iv)所述第一抗原结合结构域与TGFBR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列，和/或所述第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；

(v)所述第一抗原结合结构域与AMHR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列，和/或所述第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列。

15.一种抗体或其抗原结合部分，其与ALK1结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NOs:146、148、150或152中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NOs:146、148、150或152至少95％相同的序列。

16.一种抗体或其抗原结合部分，其与ALK2结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NOs:160、162、164、166或168中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NOs:160、162、164、166或168至少95％相同的序列。

17.一种抗体或其抗原结合部分，其与ALK3结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NOs:156或158中的互补决定区相同的VH CDR 1、

2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:156或158至少95%相同的序列。

18.一种抗体或其抗原结合部分,其与ALK4结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:178中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:178至少95%相同的序列。

19.一种抗体或其抗原结合部分,其与ALK6结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:180中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:180至少95%相同的序列。

20.一种抗体或其抗原结合部分,其与ALK7结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:182、184、186或188中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NOs:182、184、186或188至少95%相同的序列。

21.一种抗体或其抗原结合部分,其与BMPR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:154或212中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:154或212至少95%相同的序列。

22.一种抗体或其抗原结合部分,其与ACTRIIA(ACVR2A)结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:170或172中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:170和172至少95%相同的序列。

23.一种抗体或其抗原结合部分,其与ACTRIIB(ACVR2B)结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:174或176中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:174或176至少95%相同的序列。

24.根据权利要求1-14任一项所述的抗体分子或根据权利要求15-23任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其用于治疗受试者中血管病况的方法,任选地其中所述血管病况是肺动脉高压或遗传性出血性毛细血管扩张(HHT)综合征。

25.根据权利要求1-14任一项所述的抗体分子或根据权利要求15-23任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其用于治疗肺血管渗漏综合征的方法,任选地其中所述肺血管渗漏综合征是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)或急性肺损伤(ALI)。

26.根据权利要求1-14任一项所述的抗体分子或根据权利要求15-23任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其用于治疗具有缺陷型肝内BMP9信号传导的受试者中肝纤维化的方法。

27.一种核酸,其编码根据权利要求1-14任一项所述的抗体分子或根据权利要求15-23任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

28.一种宿主细胞,其包含根据权利要求11所述的核酸,和任选地表达根据权利要求1-14任一项所述的抗体分子或根据权利要求15-23任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

29.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-14任一项所述的抗体分子或根据权利要求15-23任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

30.一种治疗受试者中血管病况的方法,任选地其中所述血管病况是肺动脉高压或遗传性出血性毛细血管扩张(HHT)综合征,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据权利要求1-14任一项所述的抗体分子或根据权利要求15-23任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

31.一种治疗肺血管渗漏综合征的方法,任选地其中所述肺血管渗漏综合征是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)或急性肺损伤(ALI),所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据权利要求1-14任一项所述的抗体分子或根据权利要求15-23任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

32.一种治疗具有缺陷型肝内BMP9信号传导的受试者中肝纤维化的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据权利要求1-14任一项所述的抗体分子或根据权利要求15-23任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

通过多特异性抗体选择性调节转化生长因子β超家族信号传导

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求2020年2月28日提交的美国临时专利申请序列号62/983,374的权益。前述的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 联邦赞助的研究或开发

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号AR057374和HL131910下在美国政府支持下完成的。美国政府享有本发明的一定的权利。

技术领域

[0005] 本文描述了用于选择性靶向骨形态发生蛋白(BMP)/转化生长因子-β(TGF-β)信号传导的组合物和方法,任选地使用靶向BMP I型和II型受体的胞外结构域的单链可变结构域(scFv)抗体(Ab)的异聚复合体。

背景技术

[0006] BMP/TGF-β/激活素/生长分化因子(GDF)信号传导途径广泛调节发育模式和出生后组织重构(Waite和Eng,Nat Rev Genet.2003Oct;4(10):763-73)。该途径的33种已知配体与细胞表面上的5种组成型活性II型和7种条件型活性I型受体相互作用以起始下游信号传导。该双受体信号传导系统以受体对赋予组合多样性(至少5x7种潜在的异四聚体复合体),受体对中的每一个应答于有限数量的配体。该信号传导的生理学结果高度依赖于组织和时空环境,并且可以包括调节骨形成或纤维化,并且更普遍地包括调节细胞可塑性、细胞肥大、细胞增殖、和细胞凋亡。重组BMP/TGF-β/激活素/GDF配体可在治疗上用于各种疾病病况的治疗、或用于组织工程应用。然而,许多这些配体在循环中可能具有短的半衰期、或者可能经由肝素结合结构域隔绝在细胞外基质中,使得难以递送至靶组织。

[0007] TGF-β信号传导需要多聚体复合体中I型和II型受体的交联以起始信号传导。二聚配体分子促进II型和I型受体的异聚复合体的组装,其中II型受体的组成型活性激酶结构域反式磷酸化并激活I型受体的激酶结构域。然后,I型受体可以通过包括SMAD的多种信号级联模仿信号传导。SMAD是类似于果蝇基因“mothers against decapentaplegic”(Mad)和秀丽隐杆线虫(C.elegans)基因Sma的基因产物的蛋白质家族;SMAD包括介导BMP、激活素、GDF、和TGF-配体的功能的效应蛋白。这些SMADS包括TGF-β和许多激活素和GDF配体下游的SMAD 2和3,以及大部分BMP配体和一些GDF配体下游的SMAD1、5、和9,它们在其C-末端被I型受体激酶磷酸化,然后选择性保留在细胞核中以调节基因转录活性。由BMP/TGF-β/激活素/GDF受体复合体靶向的其它信号传导途径包括MAP激酶、PI3K/Akt、蛋白激酶G、和其它信号转导级联。广泛地,这些配体、受体、及其下游效应子信号起到协调细胞生长、细胞凋亡、分化、和可塑性的作用。这些配体、它们的受体、共受体、和拮抗剂用于编码发育模式和组织重构所必需的时空梯度。这些配体和受体还起到调节成熟生物体中的生理机能(包括铁内稳态)的作用。这些配体和受体被认为是多功能生长因子细胞因子。

发明内容

[0008] BMP/TGFβ组合双受体系统允许了细胞信号传导的功能特异性和时空调节。这些功能由II型和I型受体的特异性配对决定,这决定了SMAD(SMAD1/5/9相对于SMAD2/3)和非SMAD(即丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和/或蛋白激酶G(PKG))效应子途径的激活。II型和I型受体的表达是组织特异性的并且动态调节以允许环境敏感功能(context-sensitive function)。本文描述了使用靶向BMP/TGF-β/激活素/GDF家族的I型和II型受体的胞外结构域的抗体或其抗原结合片段的异聚复合体选择性靶向BMP/TGFβ信号传导的组合物和方法,所述抗体或其抗原结合片段优选为单链可变片段(scFv)抗体。

[0009] 因此,本文提供了多-或双-特异性抗体分子,其至少包含:第一抗原结合结构域,其与骨形态发生蛋白受体(BMPR)I型(BMPRI)结合;和第二抗原结合结构域,其与骨形态发生蛋白受体(BMPR)II型(BMPRII)结合,其中BMPRI或BMPRII可分别指BMP/TGF-β/激活素/GDF信号传导途径的I型和II型受体中任意者,并且其中第一和第二抗原结合结构域通过柔性接头连接在一起,其中各个抗原结合结构域可激动(agonise)其所结合的BMPR,优选地其中各个抗原结合结构域是scFv。第一和第二抗原结合结构域可以以任何顺序存在于分子中,例如,分子可包含N-末端-第一结构域-接头-第二结构域-C末端,或N-末端-第二结构域-接头-第一结构域-C末端(参见,例如,图10A-D)。在一些实施方案中,BMPRII抗原结合结构域在BMPRI抗原结合结构域的N末端。还提供了四聚体或较大的(例如,六聚体、八聚体或十聚体或更大)多聚体阵列,其包含通过柔性接头结构域分开的第一和第二抗原结合结构域,其中抗原结合结构域以任何顺序存在于分子中。通常,结构域成对存在,例如,对于每个BMPRII结合结构域有一个BMPRI结合结构域,但比例也可变化,例如,从1:1至2:1至3:1或更多(在任一方向上)。

[0010] 在一些实施方案中,抗体分子与细胞的结合起始BMP/TGF-β/激活素/GDF信号传导。

[0011] 在一些实施方案中,第一抗原结合结构域与BMPRI结合,所述BMPRI例如选自由以下组成的组:ALK1(也称为激活素A受体样1型,或ACVRL1);ALK2(ACVR1A);ALK3(BMPR1A);ALK4(ACVR1B);ALK5(TGFBR1);ALK6(BMPR1B);或ALK7(ACVR1C)。

[0012] 在一些实施方案中,第一抗原结合结构域与ALK1结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:146、148、150或152中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ IDNO:146、148、150或152至少95%相同的序列。

[0013] 在一些实施方案中,第一抗原结合结构域与ALK2结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:160、162、164、166或168中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ IDNO:160、162、164、166或168至少95%相同的序列。

[0014] 在一些实施方案中,第一抗原结合结构域与ALK3结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95%相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:156或158中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95%相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:156或158至少95%相同的序列。

[0015] 在一些实施方案中,第一抗原结合结构域与ALK4结合并任选地包含与表1或图7中

的CDR序列至少95％相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:178中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:178至少95％相同的序列。

[0016] 在一些实施方案中,第一抗原结合结构域与ALK6结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:180中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:180至少95％相同的序列。

[0017] 在一些实施方案中,第一抗原结合结构域与ALK7结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:182、184、186或188中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NOs:182、184、186或188至少95％相同的序列。

[0018] 在一些实施方案中,第二抗原结合结构域与选自由以下组成的组的BMPRII结合:ACTRIIA(ACVR2A);ACTRIIB(ACVR2B);BMPRII(BMPR2);TGFBRII(TGFBR2);或AMHRII(AMHR2)。

[0019] 在一些实施方案中,第二抗原结合结构域与BMPR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列;包含与SEQ ID NO:154或212中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NO:154或212至少95％相同的序列。

[0020] 在一些实施方案中,第二抗原结合结构域与ACTRIIA(ACVR2A)结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:170和172中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NOs:170或172至少95％相同的序列。

[0021] 在一些实施方案中,第二抗原结合结构域与ACTRIIB(ACVR2B)结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列;包含与SEQ ID NOs:174或176中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3;包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列;或包含与SEQ ID NOs:174或176至少95％相同的序列。

[0022] 在一些实施方案中,第一和第二抗原结合结构域包括可能的5x7＝35种组合中的任意者,例如,BMPR2与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6或ALK7;ACVR2A与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6或ALK7;ACVR2B与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6或ALK7;TGFBR2与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6或ALK7;或AMHR2与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6或ALK7。

[0023] 在一些实施方案中:

[0024] (i)第一抗原结合结构域与BMPR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列,和/或第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列;

[0025] (ii)第一抗原结合结构域与ACVR2A结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列,和/或第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列;

[0026] (iii)第一抗原结合结构域与ACVR2B结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少

95％相同的CDR序列，和/或第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；

[0027] (iv)第一抗原结合结构域与TGFBR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列，和/或第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；

[0028] (v)第一抗原结合结构域与AMHR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列，和/或第二抗原结合结构域与ALK1、ALK2、ALK3、ALK4、ALK5、ALK6、和ALK7结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列。

[0029] 本文还提供了抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分与ALK1结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NOs:146、148、150或152中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NOs:146、148、150或152至少95％相同的序列。

[0030] 本文还提供了抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分与ALK2结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NOs:160、162、164、166或168中的互补决定区相同的VH CDR1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NOs:160、162、164、166或168至少95％相同的序列。

[0031] 本文还提供了抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分与ALK3结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NOs:156或158中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NOs:156或158至少95％相同的序列。

[0032] 本文还提供了抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分与ALK4结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NO:178中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ IDNO:178至少95％相同的序列。

[0033] 本文还提供了抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分与ALK6结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NO:180中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ IDNO:180至少95％相同的序列。

[0034] 本文还提供了抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分与ALK7结合并任选地包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NOs:182、184、186或188中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NO:182、184、186或188至少95％相同的序列。

[0035] 本文还提供了抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分与BMPR2结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NO:154或212中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ IDNO:154或212至少95％相同的序列。

[0036] 本文还提供了抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分与ACTRIIA(ACVR2A)结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NO:170或172中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NO:170和172至少95％相同的序列。

[0037] 本文还提供了抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分与ACTRIIB(ACVR2B)结合并包含与表1或图7中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包含与SEQ ID NO:174或176中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR 1、2、3；包含与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包含与SEQ ID NO:174或176至少95％相同的序列。

[0038] 此外，提供了药物组合物，其含有本文所述的抗体分子以及抗体或其抗原结合部分，任选地具有药学上可接受的载体。

[0039] 本文还提供了使用本文所述的抗体分子以及抗体或其抗原结合部分(或组合物)用于治疗受试者中血管病况的方法；任选地其中所述血管病况是肺动脉高压(PAH)或遗传性出血性毛细血管扩张(HHT)综合征；更普遍地用于治疗肺高压(PH)的方法；用于治疗肺血管渗漏综合征的方法，任选地其中所述肺血管渗漏综合征是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)或急性肺损伤(ALI)；和/或用于治疗具有缺陷型肝内BMP9信号传导的受试者中肝纤维化的方法。在一些实施方案中，第一抗原结合结构域与ALK1结合和第二抗原结合结构域与BMPR2结合。所述方法可以包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体分子。

[0040] 此外，本文提供了编码本文所述的抗体分子的核酸、包含所述核酸和任选地表达所述抗体分子的宿主细胞。

[0041] 除非另外指出，否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。本文所描述的方法和材料用于本发明；也可以使用本领域已知的其它的合适的方法和材料。材料、方法、和实例仅是说明性的而不旨在进行限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目、和其它参考文献通过引用以其整体并入本文。在冲突的情况下，本说明书(包括定义)将占主导。

[0042] 本发明的其它方面和优点将从以下详细描述和附图、以及从权利要求书中显而易见。

附图说明

[0043] 图1A-D.scFv蛋白与ALK1和BMPR2的结合。(A-B)Octet Red生物膜干涉技术(BLI)揭示了scFv克隆ALK1.3和ALK1.8与固定化ALK1的结合。(C-D)BLI揭示了scFv克隆BMPR2.12和BMPR2.23与固定化BMPR2的结合。

[0044] 图2A-C.scFv蛋白与ALK1和BMPR2的特异性结合。(A)Octet Red生物膜干涉技术(BLI)揭示了克隆ALK1.3和ALK1.8与ALK1的结合，但克隆BMPR2.12或BMPR2.23不结合。(B)Octet Red生物膜干涉技术(BLI)揭示了克隆BMPR2.12和BMPR2.23与BMPR2的结合，但克隆ALK1.3或ALK1.8不结合；(C)克隆ALK1.3、ALK1.8、BMPR2.12或BMPR2.23均不与固定化ACVR2A结合。

[0045] 图3.对ALK1和BMPR2为特异性的scFv抑制内皮细胞中BMP9结合。与BMP9配体陷阱ALK1-Fc相比，通过TIME(人端粒酶永生化微血管内皮细胞)中BMP应答元件(BRE-荧光素酶)报告子活性测定的，各种scFv表现BMP9(1ng/mL，持续18h)介导的转录活性的剂量依赖性抑

制。

[0046] 图4A-D.生物素化scFv克隆保留与ALK1和BMPR2的选择性结合。(A)使用链霉亲和素-HRP的各种scFv蛋白的免疫印迹确证了25Kd的物质(species)的生物素化。(B)使用BLI，未修饰的和生物素化的scFv ALK1.3二者均表现与固定化ALK1的结合，然而未修饰的和生物素化的scFv BMPR2.12不表现。(C)使用BLI，未修饰的和生物素化的scFv BMPR2.12二者均表现与固定化BMPR2的结合，然而未修饰的和生物素化的scFv ALK1.3不表现。(D)使用BLI，未修饰的和生物素化的scFv ALK1.8二者均表现与固定化ALK1的结合，然而未修饰的和生物素化的scFv BMPR2.23不表现。

[0047] 图5.生物素化scFv克隆ALK1.8和BMPR2.12的组装型链霉亲和素复合体诱导微血管内皮细胞中BMP信号传导。免疫印迹法揭示了了，在用BMP9(1ng/mL，30’，37C)刺激人肺微血管内皮细胞(PMVEC)后，SMAD1和3、以及较小程度的SMAD2的激活，通过与单克隆抗BMP9中和抗体(mAb3209，10ng/mL)共同处理而抑制。在存在链霉亲和素(1μg/mL)的情况下、而不在不存在链霉亲和素(1μg/mL)的情况下，使用生物素化scFv克隆ALK1.8和BMPR2.12(分别为1nm，30’，37C)的等摩尔混合物对细胞处理诱导SMAD 1和3的激活。通过链霉亲和素-组装型生物素化ALK1.8:BMPR2.12复合体对SMAD1/3的激活，不受到与抗BMP9中和抗体共同处理的抑制，表明配体-非依赖性信号传导活性。

[0048] 图6A-B.生物素化scFv克隆ALK1.8和BMPR2.12的链霉亲和素-组装型复合体以需要ALK1但不需要BMP9配体的方式在肺微血管内皮细胞中诱导SMAD1/3信号传导。(A)用链霉亲和素-组装型(1μg/mL)生物素化ALK1.8:BMPR2.12克隆(分别为1nM)处理野生型(WT)、但不是Acvrl1-/-(KO)培养的小鼠肺微血管内皮细胞(PMVEC)，导致通过免疫印迹法检测的SMAD1/3(30’，37C)的激活，与ALK1表达的要求一致。重组人BMP9(rhBMP9，1ng/mL，30’，37C)以被mAb3209抑制的方式在野生型(WT)和Acvrl1 KO细胞中诱导Smad1/3的激活。相反，链霉亲和素-组装型生物素化ALK1.8:BMPR2.12复合体的活性被mAb3209(10ng/mL)抑制，再次与配体-非依赖性信号传导一致。(B)在培养的人肺微血管内皮细胞(PMVEC)中使用细胞内免疫印迹检测的磷酸化SMAD1/5的定量测量揭示了了通过重组人BMP9(rhBMP9)、和链霉亲和素-组装型(1μg/mL)生物素化ALK1.8:BMPR2.12(分别为1nM)复合体的SMAD1/5的激活。用BMP9/BMP10配体陷阱ALK1-Fc对细胞的处理抑制了BMP9介导的SMAD1/5激活、但不抑制链霉亲和素-组装型ALK1.8/BMPR2.12复合体介导的SMAD1/5激活。

[0049] 图7.CDR序列。显示本文所描述的示例性抗体各自的重链和轻链序列，其中使用如本文所描述的不同的定义标识CDR序列。

[0050] 图8.TIME细胞中BMP转录活性。指定双特异性和四特异性构建体的体外活性检测数据。His标记的双特异性体(bispecific)除非交联形成四聚体，否则不产生活性。当IgG Fc融合双特异性体表达为二硫键连接的同二聚体(homodimer)以形成抗原结合结构域的四聚体时，正如它们一样引发信号传导。

[0051] 图9.静脉内重组人BMP9和四价Fc融合分子在小鼠体内引发BMP转录活性。在尾静脉注射盐水(50uL)、重组人BMP9(rhBMP9，50uL中150ug/kg)、或重组四聚体Fc融合蛋白ACVRL1.8-L-BMPR2.12-短-Fc(50uL中150ug/kg)后24小时，在来自8周龄小鼠的全肺组织中检验基于Id1基因转录活性的BMP信号传导活性。与全肺组织中的盐水相比，BMP9或ACVRL1.8-L-BMPR2.12-短-Fc的注射引发BMP转录活性的增加。

[0052] 图10A-F.示例性构建体的示意图。(A)四价或多价信号传导分子(signaling molecule)可包括通过柔性接头区分开的抗I型BMP受体抗原结合区和抗II型BMP受体抗体结合区,并表达为具有免疫球蛋白G恒定结构域(IgG Fc)的融合分子。抗原结合区可以是交替的,并且可以通过两个相同的IgG Fc融合分子经由二硫键的同二聚体(homodimeric)组合来形成功能性异四聚体。可选地,异四聚体可以包括两个不同的IgG Fc融合分子(B)的异二聚体(heterodimeric)组合,每个融合分子表达I型和II型抗原结合区的独特组合。较大的多价分子可以包括多于两个抗原结合区,它们以各种重复或非重复序列出现、并且以不同的数目出现,可能但不是必须具有偶数个抗体结合区(C)。这些分子可以包括相同的IgG Fc融合分子的同二聚体组合,或者可以包括两个不同的IgG Fc融合分子(D)的异二聚体组合。

具体实施方式

[0053] BMP/TGFβ信号传导途径也包括激活素和生长分化因子(GDF)家族的配体,起到器官发生、胚胎模式形成、和出生后组织重构和再生的关键调节子的作用。BMP/TGFβ/激活素/GDF信号传导途径的内源配体表现出混杂性(promiscuity),经常与几种II型和I型受体结合并形成具有不同功能结果的不同配体-受体信号复合体。这些配体通常由于其肝素结合结构域而被隔绝在细胞外基质中,因此作为治疗性分子表现出不良的药代动力学。靶向单个I型受体的简单化功能增加和功能丧失研究已经证实了单个配体和受体在软骨分化、成骨分化和骨量调节、成脂分化、纤维化、和肌腱分化中的普遍作用,[4,5]但是结果是矛盾的,并且关于哪些信号传导复合体参与哪些组织以产生这些结果缺乏明确的数据。该家族中配体和受体配对的组合多样性使将BMP/TGFβ家族信号传导输入(inputs)全面映射至细胞功能的努力混乱。

[0054] 本文描述了识别表面BMP/TGF-b/激活素/GDF受体的细胞外结构域以促进其异二聚化并起始信号传导的工程化双特异性抗体。在一些实施方案中,这样的抗体可以表达为具有或不具有C-末端IgG Fc结构域以在循环中具有更有限的或更长的半衰期,并且可以通过循环递送至靶组织,或者结合至归巢肽或其它归巢分子以靶向特定组织,或者吸附或结合至固体基质以促进特定组织的移植或生长。

[0055] 还描述了四价或多价信号传导分子,其可包括通过柔性接头区分开的抗I型BMP受体抗原结合区和抗II型BMP受体抗体结合区,并表达为具有免疫球蛋白G恒定结构域的融合分子(IgG Fc,其中Fc结构域可以来自野生型IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4序列,或者来自经修饰以改变与Fcγ-受体的结合、改变补体固定、改变抗体依赖性细胞毒性、改变二聚化、或其它功能性质的序列)。工程化Fc结构域的方法是本领域已知的,参见,例如,Yang等人,Front Immunol.2018Jan 8;8:1860。抗原结合区可以是交替的,并通过两个相同的IgG Fc融合分子经由二硫键的同二聚体组合来形成功能性异四聚体(图10A)。可选地,异四聚体可包括两个不同的IgG Fc融合分子的异二聚体组合(图10B),每个融合分子表达I型和II型抗原结合区的独特组合。较大的多价分子可以包含多于两个抗原结合区,其以各种重复或非重复序列出现、并且以不同的数目出现,可能但不是必须具有偶数个抗体结合区(图10C)。这些分子可以包括相同的IgG Fc融合分子的同二聚体组合,或者可以包括两个不同的IgG Fc融合分子的异二聚体组合(图10D)。单链多聚体信号传导分子可以以交替、连续、或回文构型、并

以重复或非重复序列包含抗I型和抗II型抗原结合区，作为二价或多价分子，但更典型的是四价分子(图10E)。多聚体单链信号传导分子可以以交替、连续、或回文、或非重复序列包含多于2个或4个信号传导分子。这些分子可能但不必须包括偶数个抗体结合区。这些单链多聚体信号传导分子也可表达为单体IgG Fc融合蛋白(图10F)。

[0056] 因此，本文所述的这些分子可包括Fc区。IgG Fc CH3是同二聚化所需的，但对于特定的临床应用，可以对其进行修饰以防止这一点。工程化Fc结构域的方法是本领域已知的，参见，例如，Yang等人，Front Immunol.2018Jan8;8:1860。可选地或另外地，本文的分子可包括其它结构域以促进它们靶向特定细胞、组织、或功能环境，例如使所述分子保留在表达如下变化的组织中：由于存在炎症导致的变化，增殖或肿瘤变化，或者其它疾病相关的蛋白质表达、pH、与任何溶质或离子相关的细胞外液组成、细胞外基质表达、糖基化、或糖萼(glycocalyx)结构或组成中的变化。

[0057] 因此，四聚体可以是不具有Fc区的单个分子，例如，如果优选的话，具有短的半衰期。还描述了同二聚体Fc融合体，其中各个Fc链具有双特异性scFv对。Fc区也可以附加至任何四聚体、六聚体、八聚体等。还描述了具有Fc的二硫键连接的四聚体。

[0058] 本文还描述了使用识别该途径的受体的工程化双特异性或多特异性抗体来选择性激动、信号传导激活、或信号传导调节骨形态发生蛋白(BMP)、激活素、生长分化因子(GDF)、和转化生长因子(TGF)-β信号传导超家族的特异性成员的方法。

[0059] I.定义

[0060] 应注意，术语“一”或“一个(种)”实体是指一个(种)或更多个(种)该实体；例如，“一个(种)抗体”被理解为代表一个(种)或更多个(种)抗体。因此，术语“一”(或“一个(种)”)、“一个(种)或更多个(种)”和“至少一个(种)”在本文可交换使用。

[0061] 如本文所用，术语“多肽”旨在包括单数“多肽”以及复数“多肽”，并且是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)构成的分子。术语“多肽”是指两个或更多个氨基酸的任何一条或更多条链，而不是指产物的具体长度。因此，用于指代两个或更多个氨基酸的一条或更多条链的肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或任何其它术语包括在“多肽”的定义中，术语“多肽”可以用于代替这些术语中的任何一个或与这些术语交换使用。

[0062] 术语“多肽”还旨在是指多肽的表达后修饰的产物，包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、或通过非天然存在的氨基酸修饰。多肽可以衍生自天然生物来源或通过重组技术产生，但不必须翻译自指定核酸序列。它可以以任何方式产生，包括通过化学合成。

[0063] 本文所述多肽的大小可为约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个、或2,000个或更多个氨基酸。多肽可以具有限定的三维结构，尽管它们不必须具有这样的结构。具有限定的三维结构的多肽被称为折叠的，并且不具有限定的三维结构、而是可采用大量的不同构象的多肽被称为未折叠的。如本文所用，术语糖蛋白是指与至少一个糖类部分(carbohydrate moiety)结合的蛋白，所述糖类部分通过例如丝氨酸残基或天冬酰胺残基等氨基酸残基的含氧或含氮侧链连接至所述蛋白质。

[0064] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物是指不在其天然环境中的多肽。不需要特

定纯化水平。例如，分离的多肽可以从其天然或自然环境移出。在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白被认为是出于本文所述目的分离的，已经通过任何合适的技术分离、分级、或者部分地纯化或基本上纯化的天然或重组多肽也是如此。

[0065] 作为多肽还包括前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体、及其任意组合。当涉及本文所述的抗体或抗体多肽时，术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保留相应的天然结合分子、抗体、或多肽的至少一些抗原结合性的任何多肽。除了本文其它地方讨论的特定抗体片段以外，本文所述多肽的片段还包括蛋白水解片段以及缺失片段。本文所述的抗体和抗体多肽的变体包括如上所述的片段，并且还包括由于氨基酸取代(例如，保守或非保守氨基酸取代)、缺失、或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。变体可以天然存在或非天然存在。非天然存在的变体可以使用本领域已知的诱变技术产生。变体多肽可以包括保守或非保守氨基酸取代(例如，保守或非保守氨基酸取代)、缺失、或插入。例如本文所述的抗体和抗体多肽等BMPRI/BMPRII特异性结合分子的衍生物是已经改变以表现出天然多肽上未发现的附加特征的多肽。实例包括融合蛋白。变体多肽在本文中也可称作“多肽类似物”。如本文所用，结合分子或其片段、抗体、或抗体多肽的“衍生物”是指具有一个或更多个通过官能侧基的反应而化学衍生的残基的主题多肽。作为“衍生物”还包括包含20个标准氨基酸的一个或更多个天然存在的氨基酸衍生物的那些肽。例如，4-羟基脯氨酸可以替换脯氨酸；5-羟基赖氨酸可以替换赖氨酸；3-甲基组氨酸可以替换组氨酸；高丝氨酸可以替换丝氨酸；和鸟氨酸可以替换赖氨酸。

[0066] 术语“多核苷酸”旨在包括单数核酸以及复数核酸，并且是指分离的核酸分子或构建体，例如信使RNA(mRNA)或质粒DNA(pDNA)。多核苷酸可包含常规的磷酸二酯键或非常规键(例如，酰胺键，诸如在肽核酸(PNA)中发现的)。术语“核酸”是指存在于多核苷酸中的任何一个或更多个核酸片段，例如，DNA或RNA片段。“分离的”核酸或多核苷酸是指从其天然环境移出的核酸分子、DNA或RNA。例如，编码包含在载体中的抗体的重组多核苷酸被认为是出于本文所述目的分离的。分离的多核苷酸的其它实例包括保持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或溶液中的(部分或基本上)纯化的多核苷酸。分离的RNA分子包括本文所述多核苷酸的体内或体外RNA转录本。本文所述分离的多核苷酸或核酸还包括合成产生的此类分子。此外，多核苷酸或核酸可为或者可以包括例如启动子、核糖体结合位点、或转录终止子等调节元件。

[0067] 如本文所用，“编码区”是由翻译成氨基酸的密码子组成的核酸的一部分。尽管“终止密码子”(TAG、TGA、或TAA)不翻译成氨基酸，但是它可以被认为是编码区的一部分，但是例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、和内含子等任何侧翼序列不是编码区的一部分。两个或更多个本文所述编码区可以存在于单个多核苷酸构建体中，例如在单个载体上，或者存在于分别的多核苷酸构建体中，例如在分别的(不同的)载体上。此外，任何载体可以包含单个编码区、或可以包含两个或更多个编码区，例如单个载体可分别地编码免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。此外，本文所述载体、多核苷酸、或核酸可编码异源编码区，与编码结合分子、抗体、或其片段、变体、或衍生物的核酸融合或未融合。异源编码区包括但不限于特化元件或基序，例如分泌信号肽或异源功能结构域。

[0068] 在一些实施方案中，多核苷酸或核酸是DNA。在DNA的情况中，包括编码多肽的核酸的多核苷酸通常可包含与一个或更多个编码区可操作地结合的启动子和/或其它转录或翻

译控制元件。可操作地结合是，当用于例如多肽等基因产物的编码区与一个或更多个调控序列时，以使得将基因产物的表达处于调控序列(一个或更多个)的影响或控制之下的方式结合。如果启动子功能的诱导导致编码所需基因产物的mRNA的转录，和如果两个DNA片段之间的结合的性质不干扰表达调控序列指导基因产物的表达的能力或不干扰DNA模板被转录的能力时，两个DNA片段(例如，多肽编码区和与其连接的启动子)是“可操作地结合”或“可操作地连接”的。因此，如果启动子能够影响编码多肽的核酸的转录，那么启动子区域将与编码多肽的核酸可操作地结合。启动子可以是仅在预定细胞中指导DNA的大量转录的细胞特异性启动子。除了启动子以外，例如增强子、操作子、阻遏物(repressor)、和转录终止信号等其它转录控制元件可与多核苷酸可操作地结合以指导细胞特异性转录。本文公开了合适的启动子和其它转录控制区。

[0069] 各种转录控制区是本领域技术人员已知的。这些包括但不限于在脊椎动物细胞中起作用的转录控制区，例如但不限于，来自巨细胞病毒(立即早期启动子，与内含子-A结合)、猴病毒40(早期启动子)、和逆转录病毒(例如劳斯肉瘤病毒)的启动子和增强子片段。其它转录控制区包括源于脊椎动物基因的那些，例如肌动蛋白、热休克蛋白、牛生长激素、和兔β-球蛋白，以及能够控制真核细胞中基因表达的其它序列。附加的合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及淋巴因子诱导型启动子(例如，由干扰素或白细胞介素诱导的启动子)。

[0070] 类似地，本领域普通技术人员已知各种翻译控制元件。这些包括但不限于核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子、和衍生自小核糖核酸病毒的元件(特别是内部核糖体进入位点，或IRES，也称作CITE序列)。

[0071] 在一些实施方案中，本文所述多核苷酸是RNA，例如以信使RNA(mRNA)的形式。

[0072] 本文所述多核苷酸和核酸编码区可以与编码分泌肽或信号肽的附加编码区结合，所述附加编码区指导由本文所述多核苷酸编码的多肽的分泌。根据信号假说，哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列，一旦生长的蛋白质链跨粗面内质网的输出开始，该信号肽或分泌前导序列就从成熟蛋白质上切割下来。本领域普通技术人员意识到通过脊椎动物细胞分泌的多肽通常具有融合至多肽的N-末端的信号肽，该信号肽从完整的或“全长”多肽切割以产生分泌的或“成熟的”形式的多肽。在一些实施方案中，使用例如免疫球蛋白重链或轻链信号肽等天然信号肽，或者所述序列的保留指导与其可操作地结合的多肽的分泌的能力的功能性衍生物。可选地，可以使用异源哺乳动物信号肽、或其功能性衍生物。例如，野生型前导序列可以被人组织纤溶酶原激活剂(TPA)或小鼠β-葡糖醛酸酶的前导序列取代。

[0073] 除非另有说明，否则术语“病症”和“疾病”在本文中可交换使用。

[0074] 如本文所用的“结合分子”主要涉及抗体、及其片段，但是也可以指代与BMPRI/BMPRII结合的其它非抗体分子，包括但不限于激素、受体、配体、主要组织相容性复合体(MHC)分子、伴侣蛋白如热休克蛋白(HSP)以及细胞-细胞粘附分子如钙粘附蛋白、整合素、C型凝集素和免疫球蛋白(Ig)超家族的成员。因此，仅为了清楚起见而不限制本公开的范围，大部分的以下实施方案是针对代表用于治疗剂和诊断剂的开发的结合分子的具体实施方案的抗体和抗体样分子进行讨论的。

[0075] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可交换使用。抗体或免疫球蛋白是BMPRI/

BMPRII结合分子,其至少包含重链的可变结构域,并且通常至少包含重链和轻链的可变结构域。相对良好地理解了脊椎动物系统中基础免疫球蛋白结构;参见,例如,Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版,1988)。如本文所用,术语"抗体"是指包含至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或六个)互补决定区(CDR)(例如,来自免疫球蛋白轻链的三个CDR的任意者或来自免疫球蛋白重链的三个CDR的任意者)并且能够与表位特异性结合的任何抗原结合分子。抗体的非限制性实例包括:单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单链抗体、嵌合抗体、人抗体、和人源化抗体。在一些实施方案中,抗体可以包含人抗体的Fc区。术语抗体还包括衍生物,例如,双特异性抗体、单链抗体、双体抗体(diabody)、线性抗体、和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0076] 如下文中将更详细讨论的,术语"免疫球蛋白"包括可以生化地区分的各种广泛种类的多肽。本领域技术人员将理解,重链分为伽马、缪、阿尔法、德尔塔、或伊普西龙(γ、μ、α、δ、ε),其中具有一些亚类(例如,γ1-γ4)。该链的性质决定了抗体的"类"分别为IgG、IgM、IgA、IgG、或IgE。例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等免疫球蛋白亚类(同种型)被良好地表征并且已知赋予功能特化。鉴于本公开内容,本领域技术人员可以容易地辨别这些类和同种型中的每一种的修饰版本,并且相应地,在本公开内容的范围之内。所有免疫球蛋白类都清楚地在本公开的范围内,以下讨论将一般涉及免疫球蛋白分子的IgG类。关于IgG,标准免疫球蛋白分子包含分子量约23,000道尔顿的两条相同的轻链多肽和分子量53,000-70,000的两条相同的重链多肽。这四条链通常通过二硫键以"Y"构型连接,其中轻链从"Y"的开口处开始支托(bracket)重链并连续穿过可变区。

[0077] 轻链分为卡帕或兰姆达(κ、λ)。每个重链类可以与κ或λ轻链结合。通常,当免疫球蛋白通过杂交瘤、B细胞或基因工程化宿主细胞产生时,轻链和重链彼此共价结合,并且两条重链的"尾"部通过共价二硫键或非共价键彼此共价结合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的叉形端的N-末端延伸至每条链的底部的C-末端。

[0078] 轻链和重链二者被分为结构和功能同源的区域。术语"恒定"和"可变"在功能上使用。在这点上,应理解,轻(VL)链和重(VH)链部分二者的可变结构域决定了抗原识别和特异性。相反地,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要的生物学性质,例如分泌、经胎盘迁移、Fc受体结合、和补体结合等。按照常规,恒定区结构域的数量随着它们变得更远离抗体的抗原结合位点或氨基-末端而增加。N-末端部分是可变区,C-末端部分是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基-末端。

[0079] 如上所述,可变区允许抗体选择性识别并特异性结合抗原上的表位。即,抗体的VL结构域和VH结构域、或互补决定区(CDR)的子集组合以形成限定三维抗原结合位点的可变区。该四级抗体结构形成存在于Y的各个臂的末端处的抗原结合位点。更具体地,抗原结合位点由各个VH和VL链上的三个CDR限定。包含足以特异性结合BMPRI/BMPRII的结构的任何抗体或免疫球蛋白片段在本文中可交换地表示为"结合片段"或"免疫特异性片段"。

[0080] 在天然存在的抗体中,抗体包含存在于各个抗原结合结构域中的六个高变区,有时称作"互补决定区"或"CDR",它们是短的、非连续的氨基酸序列,当抗体在水性环境中呈现其三维构造时,所述高变区被特异性地定位以形成抗原结合结构域。"CDR"的侧翼是显示出较小的分子间可变性的四个相对保守的"构架"区或"FR"。框架区主要采用β-折叠构象,

CDR形成连接β-折叠结构的环，并且在一些情况中形成β-折叠结构的一部分。因此，框架区起到形成用于通过链间、非共价相互作用来将CDR定位于正确的方向上的支架的作用。由定位的CDR形成的抗原结合结构域限定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进抗体与其同源表位的非共价结合。本领域普通技术人员对于任何给定的重链或轻链可变区可以容易地识别分别包含CDR和框架区的氨基酸，因为它们已经被精确地定义，参见，“Sequences of Proteins of Immunological Interest，”Kabat，E.等人，U.S.Department of Health and Human Services，(1983)；和Chothia和Lesk，J.Mol.Biol.，196(1987)，901-917，前述文献以其整体通过引用并入本文。

[0081] 除非明确说明为相反的，否则在本领域中使用和/或接受的术语存在两个或更多个定义的情况下，本文所用术语的定义旨在包含所有这些含义。一个具体实例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)来描述在重链和轻链多肽二者的可变区中发现的非连续的抗原结合位点。该特定区域已由Kabat等人，U.S.Dept.of Health and Human Services，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”(1983)描述和由Chothia和Lesk，J.Mol.Biol.，196(1987)，901-917描述，前述文献通过引用并入本文，其中定义包括相互比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而，使用任一定义以指代抗体或其变体的CDR旨在处于本文所定义和使用的术语的范围内。包含由各个上述引用的参考文献定义的CDR的合适的氨基酸残基列于下表A中作为比较。包含特定CDR的精确残基数将取决于CDR的序列和大小而变化。给定抗体的可变区氨基酸序列，本领域技术人员可以常规地确定哪些残基包含抗体的人IgG亚型的特定高变区或CDR。

[0082] 表A：示例性CDR定义[1]

[0083]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[0084] [1]表A中所有CDR定义的编号根据Kabat等人记载的编号规则。(参见下文)。

[0085] Kabat等人还定义了适用于任何抗体的可变结构域序列的编号系统。本领域普通技术人员可以明确地将该“Kabat编号”系统分配给任何可变结构域序列，而不依赖于序列自身以外的任何实验数据。如本文所用，“Kabat编号”是指Kabat等人，U.S.Dept.of Health and Human Services，"Sequence of Proteins of Immunological Interest"(1983)记载的编号系统。除非另外说明，否则本文所述的抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物中特定氨基酸残基位置的编号是根据Kabat编号系统进行的，然而，Kabat编号系统是理论上的并且不可能等同地用于本文所述的每种抗体。例如，根据第一CDR的位置，随后的CDR可以在任一方向上移动。

[0086] 为了避免混淆，在使用术语CDR而不指定用于识别CDR的方法的情况中，术语指代使用Paratome预测法识别的CDR，例如，如表1所示。

[0087] 本文所述的抗体或其抗原结合片段、免疫特异性片段、变体、或衍生物包括但不限

于单克隆、双特异性、多特异性、人、人源化、灵长类化(primatized)、鼠源化、或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段如Fab、Fab'和F(ab')2、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、通过Fab表达文库产生的片段、和抗独特型(抗-Id)抗体(包括,例如针对本文公开的抗体的抗-Id抗体)。ScFv分子在本领域是已知的并且描述于例如美国专利5,892,019。本文所述免疫球蛋白或抗体分子可以是免疫球蛋白分子的任何种类(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、和IgY)、类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0088] 在一些实施方案中,抗体不是具有五价结构的IgM或其衍生物。特别地,在特定的应用中,特别是治疗用途中,IgM较不如IgG和其它二价抗体或相应的结合分子有用,因为IgM由于其五价结构和缺乏亲和力成熟而经常表现出非特异性交叉反应性和非常低的亲和力。

[0089] 在一些实施方案中,抗体是具有五价结构的IgM或其衍生物。

[0090] 在一些实施方案中,抗体不是多克隆抗体,即它基本上由一种特定抗体种类组成,而不是获得自血浆免疫球蛋白样品的混合物。

[0091] 包括单链抗体的抗体片段可包含单独的可变区(一个或更多个)或可变区(一个或更多个)与以下的整体或一部分的组合:铰链区、CH1、CH2、和CH3结构域。本文还提供了还包含可变区(一个或更多个)与铰链区、CH1、CH2、和CH3结构域的任何组合的BMPRI/BMPRII结合片段。本文所述的抗体或其免疫特异性片段可以来自包括鸟类和哺乳动物的任何动物来源。在一些实施方案中,抗体是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马、或鸡抗体。在另一实施方案中,可变区可以是软骨鱼纲(condricthoid)来源(例如,来自鲨鱼)。

[0092] 在一些实施方案中,抗体是分离自人的人单克隆抗体。任选地,根据数据库中相关人种系可变区序列对人抗体的框架区进行比对和采用;参见,例如,MRC Centre for Protein Engineering(Cambridge,UK)主办的Vbase(vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk)。例如,被认为可能偏离真实种系序列的氨基酸可能是由于克隆过程中引入的PCR引物序列。与例如来自噬菌体展示抗体文库或异种小鼠的单链抗体片段(scFv)等人工产生的人样抗体相比,本文所述人单克隆抗体的特征在于(i)是使用人免疫应答而不是动物替代物的免疫应答获得的,即抗体是应答于天然BMPRI/BMPRII在人体内的相关构象而产生的,(ii)保护了个体或至少对于BMPRI/BMPRII的存在为显著的,和(iii)由于抗体是人源的,所以针对自身抗原的交叉反应的风险被最小化。因此,如本文所用,术语"人单克隆抗体"、"人单克隆自身抗体"、和"人抗体"等用于表示人源的BMPRI/BMPRII结合分子,即它已从例如B细胞或其杂交瘤等人细胞分离、或其cDNA已从例如人记忆B细胞等人细胞的mRNA直接克隆。即使在抗体中进行氨基酸取代,例如以改善结合特性,人抗体仍然是"人的"。

[0093] 如下文中和例如在Kucherlapati等人的美国专利号5,939,598中所述的,源自人免疫球蛋白文库或源自对一种或更多种人免疫球蛋白转基因且不表达内源性免疫球蛋白的动物的抗体指定为人样抗体,以便将它们与本文所述的真正的人抗体区别开来。

[0094] 例如,诸如通常分离自噬菌体展示的合成和半合成抗体等人样抗体的重链和轻链的配对,不一定反映了原始人B细胞中发生的原始配对。因此,从现有技术中常用的重组表达文库获得的Fab和scFv片段可被认为是人工的,具有对免疫原性和稳定性的所有可能的相关作用。

[0095] 如本文所用，术语“重链部分”包括源自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。含有重链部分的多肽包含以下的至少一者：CH1结构域、铰链(例如，上、中、和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域、或其变体或片段。例如，用于本文所述方法的结合多肽可包括含有CH1结构域的多肽链；含有CH1结构域、至少一部分的铰链结构域、和CH2结构域的多肽链；含有CH1结构域和CH3结构域的多肽链；含有CH1结构域、至少一部分的铰链结构域、和CH3结构域的多肽链，或含有CH1结构域、至少一部分的铰链结构域、CH2结构域、和CH3结构域的多肽链。在另一实施方案中，本文所述多肽包括含有CH3结构域的多肽链。此外，用于本文所述方法的结合多肽可缺少至少一部分的CH2结构域(例如，所有或一部分的CH2结构域)。如上所述记载的，本领域普通技术人员将理解，这些结构域(例如，重链部分)可经修饰使得它们与天然存在的免疫球蛋白分子在氨基酸序列方面有差异。

[0096] 在本文所公开的某些抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物中，多聚体的一条多肽链的重链部分与多聚体的第二条多肽链上的那些相同。可选地，本文所述的含有重链部分的单体是不同的。例如，各个单体可包含不同的靶结合位点，形成例如双特异性抗体或双体抗体。

[0097] 在一些实施方案中，本文公开的抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物由例如scFv等单个多肽链构成并细胞内表达(胞内抗体(intrabodies))用于潜在的体内治疗和诊断应用。

[0098] 用于本文公开的诊断和治疗方法的结合多肽的重链部分可以源自不同的免疫球蛋白分子。例如，多肽的重链部分可以包括源自IgG1分子的CH1结构域和源自IgG3分子的铰链区。在另一实例中，重链部分可以包括部分地源自IgG1分子和部分地源自IgG3分子的铰链区。在另一实例中，重链部分可以包括部分地源自IgG1分子和部分地源自IgG4分子的嵌合铰链。

[0099] 如本文所用，术语“轻链部分”包括源自免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。在一些实施方案中，轻链部分包括VL或CL结构域中的至少一种。

[0100] 用于抗体的肽或多肽表位的最小尺寸被认为是约4至5个氨基酸。肽或多肽表位可包含至少七个、至少九个或至少约15至约30个之间的氨基酸。由于CDR可以识别抗原肽或其三级形式的多肽，包含表位的氨基酸不必须为连续的，并且在一些情况下，甚至可以不在同一肽链上。在一些实施方案中，由本文所述的抗体识别的肽或多肽表位包含BMPRI/BMPRII的至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、或约5个至约30个之间、约10个至约30个之间或约15个至约30个之间的连续或非连续氨基酸。

[0101] 本文可交换使用的“特异性结合”或“特异性识别”通常是指例如抗体等结合分子经由其抗原结合结构域与表位结合，并且该结合需要抗原结合结构域与表位之间的一些互补性。根据该定义，当抗体经由其抗原结合结构域与表位结合时，相比于其与随机的、非相关表位结合，，认为所述抗体更容易地与该表位“特异性结合”。本领域技术人员理解，抗体可以特异性结合或特异性识别分离的多肽，所述分离的多肽包含对应于非连续表位的线性部分的氨基酸残基或由其组成。本文使用术语“特异性”来限定特定抗体与特定表位结合的相对亲和力。例如，抗体“A”可以被认为对于给定表位具有比抗体“B”更高的特异性，或者可以认为抗体“A”以比对于相关表位“D”更高的特异性与表位“C”结合。

[0102] 如果存在的话，术语“免疫学结合特性”或抗体与抗原的其它结合特性，在其所有的语法形式中，指代抗体的特异性、亲和力、交叉反应性、和其它结合特性。

[0103] “优先结合”是指与相关的、类似的、同源的、或同功(analogous)表位的结合相比，例如抗体等结合分子更容易地与某表位特异性结合。因此，与给定表位“优先结合”的抗体将更可能与该表位而非相关表位结合，即使这样的抗体可能与相关表位发生交叉反应。

[0104] 作为非限制性实例，如果例如抗体等结合分子以小于所述抗体对于第二表位的解离常数(K_D)的K_D结合第一表位，则可以认为所述抗体优先结合所述第一表位。在另一非限制性实例中，如果抗体以小于所述抗体对于第二表位的K_D至少一个数量级的亲和力结合第一表位，则可以认为所述抗体优先结合第一抗原。在另一非限制性实例中，如果抗体以小于所述抗体对于第二表位的K_D至少两个数量级的亲和力结合第一表位，则可以认为抗体优先结合第一表位。

[0105] 在另一非限制性实例中，如果例如抗体等结合分子以小于抗体对于第二表位的解离速率(off rate，k(off))的k(off)结合第一表位，则可以认为所述抗体优先结合第一表位。在另一非限制性实例中，如果抗体以小于抗体对于第二表位的k(off)至少一个数量级的亲和力结合第一表位，则可以认为所述抗体优先结合第一表位。在另一非限制性实例中，如果抗体以小于抗体对于第二表位的k(off)至少两个数量级的亲和力结合第一表位，则可以认为所述抗体优先结合第一表位。

[0106] 如果例如抗体等结合分子以在一定程度上阻断参考抗体与给定表位的结合的程度优先与所述表位结合，则认为所述结合分子竞争性抑制参考抗体与给定表位的结合。竞争性抑制可以通过本领域已知的任何方法测定，例如竞争ELISA测定。可以认为抗体竞争性抑制参考抗体与给定表位的结合至少90％、至少80％、至少70％、至少60％、或至少50％。本领域技术人员理解，抗体与其表位的结合也可以被不是抗体的结合分子竞争性抑制。

[0107] 如本文所用，术语“亲和力”是指单个表位与例如免疫球蛋白分子等结合分子的CDR的结合的强度的量度；参见，例如，Harlow等人，Antibodies:A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory Press，第2版(1988)第27-28页。如本文所用，术语“亲合力”是指免疫球蛋白群体和抗原之间的复合体的整体稳定性，即免疫球蛋白混合物与抗原的功能性结合强度；参见，例如，Harlow第29-34页。亲合力与群体中单个免疫球蛋白分子和特定表位的亲和力、以及免疫球蛋白和抗原的化合价二者相关。例如，二价单克隆抗体与例如聚合物等具有高度重复表位结构的抗原之间的相互作用将是高亲合力的。抗体对抗原的亲和力或亲合力可使用任何合适的方法实验地确定；参见，例如，Berzofsky等人，"Antibody-Antigen Interactions"In Fundamental Immunology，Paul，W.E.，Ed.，Raven Press New York，N Y(1984)，Kuby，Janis Immunology，W.H.Freeman and Company New York，N Y(1992)，和其中描述的方法。用于测定抗体对抗原的亲和力的通用技术包括ELISA、RIA、和表面等离子体共振。如果在例如盐浓度、pH等不同条件下进行测定，所测定的特定抗体-抗原相互作用的亲和力可以变化。因此，亲和力和例如K_D、IC50等其它抗原结合参数的测量优选用抗体和抗原的标准化溶液以及标准化缓冲液来进行。

[0108] 本文所述结合分子如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，也可以根据它们的交叉反应性来描述或指定。如本文所用，术语“交叉反应性”是指对一种抗原为特异性的抗体与第二种抗原反应的能力；两种不同的抗原物质之间的相关性的度量。因此，如果抗体与

诱导其形成的表位以外的其它表位结合，则所述抗体是交叉反应性的。交叉反应性表位通常包含许多与诱导表位相同的互补结构特征，并且在一些情况中，可能实际上比原始表位更好地适配。

[0109] 例如，某些抗体具有一定程度的交叉反应性，因为它们结合相关但不相同的表位，例如，与参考表位具有至少95％、至少90％、至少85％、至少80％、至少75％、至少70％、至少65％、至少60％、至少55％、和至少50％同一性(如使用本领域已知和本文所描述的方法计算的)的表位。如果抗体不结合与参考表位具有小于95％、小于90％、小于85％、小于80％、小于75％、小于70％、小于65％、小于60％、小于55％、和小于50％同一性(如使用本领域已知和本文所描述的方法计算的)的表位，则可以认为所述抗体具有少的交叉反应性或无交叉反应性。如果抗体不结合表位的任何其它类似物、直向同源物、或同源物，则可以认为所述抗体对于特定表位为“高度特异性的”。

[0110] 本文所述结合分子如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物，也可以根据它们与BMPRI/BMPRII的结合亲和力来描述或指定。

[0111] 如前所述，各种免疫球蛋白类型的恒定区的亚基结构和三维构型是众所周知的。如本文所用，术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变结构域，术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一个(最氨基末端)恒定区结构域。CH1结构域邻近VH结构域并且是免疫球蛋白重链分子的铰链区的氨基末端。

[0112] 如本文所用，术语“CH2结构域”包括Fc结构域中例如从使用常规编号方案的抗体的约残基244至残基360(残基244至360，Kabat编号系统；残基231-340，EU编号系统；参见Kabat EA等人，同上文所引用的)延伸的重链分子的部分。CH2结构域的独特之处在于它不与另一个结构域紧密配对。相反，两个N-连接的支链糖链插入至完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间。还充分证明CH3结构域从IgG分子的CH2结构域至C-末端延伸并且包含约108个残基。

[0113] 如本文所用，术语“铰链区”包括将CH1结构域连接至CH2结构域的重链分子的部分。该铰链区包含约25个残基并且是柔性的，因此允许两个N-末端抗原结合区独立地移动。铰链区可再分为三个不同的结构域：上、中和下铰链结构域；参见Roux等人，J.Immunol.161(1998)，4083。

[0114] 如本文所用，术语“二硫键”包括在两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含可与第二硫醇基团形成二硫键或与之桥接的硫醇基团。在大部分天然存在的IgG分子中，CH1和CL区通过二硫键连接并且两条重链在对应于使用Kabat编号系统的239和242的位置处(位置226或229，EU编号系统)通过二硫键连接。

[0115] 如本文所用，术语“连接的”、“融合的”或“融合”可交换使用。这些术语是指通过包括化学缀合或重组手段的任何方法将两个或更多个元素或组分连接在一起。“框内融合”指两个或更多个多核苷酸开放阅读框(ORF)以保持原始ORF的正确翻译阅读框的方式连接以形成连续的较长的ORF。因此，重组融合蛋白是含有两个或更多个对应于由原始ORF编码的多肽的片段的单个蛋白(所述片段本质上通常不这样连接)。尽管由此使得阅读框在整个融合片段中是连续的，但是片段可以通过例如框内接头序列而在物理上或空间上分开。例如，编码免疫球蛋白可变区的CDR的多核苷酸可以是融合的、框内的，但通过编码至少一个免疫球蛋白框架区或另外的CDR区的多核苷酸分开，只要“融合的”CDR作为连续多肽的一部分共

翻译即可。

[0116] 如本文所用的术语“表达”是指基因产生例如RNA或多肽等生物化学物质的过程。该过程包括细胞内基因的功能性存在的任何表现，包括但不限于，基因敲低以及瞬时表达和稳定表达二者。其包括但不限于将基因转录为信使RNA(mRNA)、转移RNA(tRNA)、小发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)或任何其它RNA产物，和将这样的mRNA翻译为多肽(一种或更多种)。如果最终期望的产物是生物化学物质，表达包括产生该生物化学物质和任何前体。基因的表达产生“基因产物”。如本文所用，基因产物可以是例如由基因的转录产生的信使RNA等核酸、或由转录本翻译的多肽。本文所述基因产物还包括具有例如多腺苷酸化等转录后修饰的核酸，或具有例如甲基化、糖基化、脂质的添加、与其它蛋白亚基的结合、和蛋白水解切割等翻译后修饰的多肽。

[0117] 如本文所用，术语“样品”是指获得自受试者或患者的任何生物材料。一方面，样品可以包括血液、血浆、或尿。在其它方面，样品可以包括全血、血浆、从血液样品富集的B细胞、和培养的细胞(例如，来自受试者的B细胞)。样品还可以包括活组织检查或组织样品，包括神经组织。还在其它方面，样品可以包括全细胞和/或细胞的裂解物。血液样品可以通过本领域已知的方法收集。一方面，可通过在200μl缓冲液(20mM Tris，pH.7.5，0.5％Nonidet，1mM EDTA，1mM PMSF，0.1M NaCl，IX Sigma蛋白酶抑制剂，和IX Sigma磷酸酶抑制剂1和2)中、在4℃下涡旋来重悬浮沉淀。悬浮液可保持在冰上20分钟并间歇涡旋。在约4℃下以15,000x g离心5分钟后，可将小份的上清液保存在约-70℃下。

[0118] 如本文所用，术语“治疗”或“处理”指的是治疗性处理和预防性或防御性措施，其中目的是预防或减慢(减轻)本文所述的不期望的生理变化或病症。有益的或期望的临床结果包括但不限于缓解症状、减轻疾病程度、稳定(即不恶化)疾病状态、延迟或减慢疾病进展、改善或减轻疾病状态、以及缓解(部分或全部的)，无论可检测还是不可检测的。“治疗”还可以指与未接受治疗的预期存活相比延长的存活。有治疗需要的那些包括已经患有病况或病症的那些、以及易于患有病况或病症的那些、或者要预防病况或病症的表现的那些。

[0119] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指任何需要诊断、预后、预防、或治疗的受试者，特别是哺乳动物受试者，例如人类患者。

[0120] 包含组分或步骤的本文所述的组合物或方法也可以基本上由那些组分或步骤组成，或由那些组分或步骤组成。

[0121] II.抗体

[0122] 提供了抗-BMPRI/II抗体及其抗原结合片段，例如抗原结合结构域，及其融合体/多聚体。本文还提供了抗-BMPRI/II抗体或其抗原结合片段的衍生物或变体。本文还提供了含有这样的抗体或其BMPRI/BMPRII结合片段或其衍生物或变体的缀合物。在一些实施方案中，本文所述的抗体或其BMPRI/BMPRII结合片段表明了下文中实施例部分所述的对于抗体提出的结合特性和/或生物学特性。

[0123] 抗体及其抗原结合片段如抗原结合结构域可通过在其可变区如结合结构域中包含含有任一条本文所述的氨基酸序列的VH和/或VL可变区的至少一个互补决定区(CDR)来表征。本文记载了编码上述可变区的示例性相应核苷酸序列(参见下文)。下文中提供了VH和/或VL区的上述氨基酸序列的示例性CDR组。本文还提供了CDR的示例性相应框架区。然而，如下文中所讨论的，本领域技术人员很好地认识到，也可以使用另外或者可选的CDR，在

CDR2和CDR3的情况中，其氨基酸序列与本文所记载的氨基酸序列相差一个、两个、三个、或甚至更多个氨基酸的CDR。

[0124] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或其抗原结合片段如抗原结合结构域包含至少一个CDR，所述CDR包含实施例、表1、或图7中所示的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中，本文所述的抗体或其抗原结合片段包含一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR，所述CDR包含实施例、表1、或图7中所示的氨基酸序列或由其组成。下表提供了示例性scFv序列。

[0125]

	克隆	**Scfv SEQ ID NO:**
BMPRI 靶标		
ALK1 (ACVRL1);	克隆 ALK1.2 (抗-ACVRL1/ALK1)	146
	克隆 ALK1.3 (抗-ACVRL1/ALK1)	148
	克隆 ALK1.8 (抗-ACVRL1/ALK1)*	150
	克隆 ALK1.8b (抗-ACVRL1/ALK1)	152
ALK2 (ACVR1A);	克隆 RI-2 (抗-ACVR1/ALK2)	160
	克隆 RI-3 (抗-ACVR1/ALK2)	162
	克隆 RI-4 (抗-ACVR1/ALK2)	164
	克隆 RI-2-7 (抗- ACVR1/ALK2)	166
	克隆 RI-9 (抗-ACVR1/ALK2)	168
ALK3 (BMPR1A);	克隆 B15 (抗-BMPR1A/ALK3)	156
	克隆 B16 (抗-BMPR1A/ALK3)	158
ALK4 (ACVR1B);	克隆 H5-2 (抗-ACVR1B/ALK4)	178
ALK5 (TGFBR1);		--
ALK6 (BMPR1B);	克隆 H3-2 (抗-BMPR1B/ALK6)	180
ALK7 (ACVR1C).	克隆 H4-1 (抗-ACVR1C/ALK7)	182
	克隆 H4-4 (抗-ACVR1C/ALK7)	184
	克隆 H4-7 (抗-ACVR1C/ALK7))	186
	克隆 H4-8 (抗-ACVR1C/ALK7)	188
BMPRII 靶标		
ACTRIIA (ACVR2A);	克隆 RII-19 (抗-ACVR2A/ACTRIIA)	170
	克隆 H1-2 (抗-ACVR2A/ACTRIIA)	172
ACTRIIB (ACVR2B);	克隆 H2-11 (抗-ACVR2B/ACTRIIB)	174
	克隆 H2-15 (抗-ACVR2B/ACTRIIB)	176

[0126]

BMPRII (BMPR2);	克隆 BMPR2.12 (抗-BMPR2/BMPRII)	154
	克隆 BMPR2.23 (抗-BMPR2/BMPRII)	212

[0127] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段如抗原结合结构域包括含有本文中如在实施例中、图7、和/或表1中所示的氨基酸序列的重链可变区(VH)互补决定区1(CDR1)、VH CDR2、和VH CDR3，并且任选地进一步包括如本文中如在实施例中、图7、和/或表1中所示的轻链可变区(VL)CDR1、VL CDR2、和VL CDR3氨基酸序列。

[0128] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或其抗原结合片段如抗原结合结构域包括含有本文记载的重链框架区1(FR1)的VH(即，SEQ ID NOs:146、148、150、152、154、160、162、164、166、168、156、158、178、180、182、184、186、188、170、172、174、176、或212的框架部分的一些或全部。

[0129] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或其抗原结合片段如抗原结合结构域包括与实施例、图7、和/表1中的CDR序列至少95％相同的CDR序列；包括与实施例、图7、和/或表1中的互补决定区相同的VH CDR 1、2、3和VL CDR1、2、3；包括与图7中的序列至少95％相同的VH和/或VL序列；或包括与实施例、图7、和/或表1中的序列至少95％相同的序列。

[0130] 在一些实施方案中，本文所述抗原结合结构域、抗体或其抗原结合片段包括含有VH CDR1、CDR2、或CDR2的VH、或VL CDR1、CDR2、或CDR3，其包含与本文记载的氨基酸序列具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、或100％序列同一性的序列、或由其组成。

[0131] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段如抗原结合结构域包含，相对于参考氨基酸序列具有0或1至10个(例如，多至1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个)改变，即氨基酸取代、添加或缺失的序列，例如在VH和LH中。在一些实施方案中，氨基酸取代是保守氨基酸取代。在一些实施方案中，所述改变不在CDR中；在一些实施方案中，在一个CDR中有1或2个改变，例如在一个CDR如一个轻链CDR中有多至2个改变。这些变体保留了与亲本抗体或其抗原结合片段相同的结合抗原的能力。

[0132] “保守氨基酸取代”是指其中氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。本领域中已经定义了具有带相似电荷的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(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(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)、非极性侧链(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、色氨酸)，β-支链侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0133] 在一些实施方案中，本文所述的抗体的变体(例如，相对于本文记载的氨基酸序列的VH和/或VL，具有氨基酸取代、添加、或缺失的抗体或其抗原结合片段保留了结合BMPRI/BMPRII的能力和/或保留了下文实施例中所述的抗体的一个或更多个特性。

[0134] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)，所述重链可变区包含本文所记载的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中，本文所述的抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区(VH)，所述轻链可变区包含本文所记载的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中，本文所述的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区

(VH),所述重链可变区包含本文所记载的氨基酸序列或由其组成,和进一步包含轻链可变区(VH),所述轻链可变区包含本文所记载的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含本文所记载的序列的VH和VL。

[0135] 在一些实施方案中,本文所述的抗体包括含有本文所述VH的重链。在一些情况中,所述重链包含IgG恒定区。在一些情况中,所述重链包含人IgG恒定区。

[0136] 在一些实施方案中,本文所述的抗体包括含有本文所述VL的轻链。在一些情况中,所述轻链包含κ恒定区。在一些情况中,所述轻链包含人κ恒定区。在一些情况中,所述轻链包含λ恒定区。在一些情况中,所述轻链包含人λ恒定区。

[0137] 在一些实施方案中,本文所述的抗体包括含有本文所述VH的重链和含有本文所述VL的轻链,其中所述重链和/或轻链包含IgG(例如,人IgG)恒定区。

[0138] 可选地,本文所述的抗体是抗体或其抗原结合片段、衍生物或变体,其与具有本文所记载的VH CDR 1-3的抗体竞争结合BMPRI/BMPRII。可选地,本文所述的抗体是抗体或其抗原结合片段、衍生物或变体,其与具有本文所记载的VL CDR 1-3的抗体竞争结合BMPRI/BMPRII。可选地,本文所述的抗体是抗体或其抗原结合片段、衍生物或变体,其与具有本文所记载的VH CDR1-3和VL CDR 1-3的抗体竞争结合BMPRI/BMPRII。可选地,本文所述的抗体是抗体或其抗原结合片段、衍生物或变体,其与具有本文所记载的VH和/VL的抗体竞争结合BMPRI/BMPRII。这些抗体可以是人、啮齿动物(例如鼠)、嵌合的或人源化的,特别是用于治疗应用。

[0139] 可选地,本文所述的抗体是抗体或其抗原结合片段、衍生物或变体,其与含有本文所记载的VH和VL的抗BMPRI/BMPRII抗体结合相同的表位。

[0140] 抗体之间的竞争通过如下检测来确定,其中被测免疫球蛋白抑制参考抗体与例如BMPRI/BMPRII等共同抗原的特异性结合。许多类型的竞争性结合测定是已知的,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析(EIA)、夹心竞争测定;参见Stahli等人,Methods in Enzymology9(1983),242-253;固相直接生物素-亲和素EIA;参见Kirkland等人,J.Immunol.137(1986),3614-3619和Cheung等人,Virology 176(1990),546-552;固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定;参见Harlow和Lane,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press(1988);使用I125标记的固相直接标记RIA;参见Morel等人,Molec.Immunol.25(1988),7-15和Moldenhauer等人,Scand.J.Immunol.32(1990),77-82。典型地,这样的测定涉及使用结合至固体表面上的纯化的BMPRI/BMPRII或其聚集体或带有这些任一者的细胞、未标记的试验免疫球蛋白和标记的参考免疫球蛋白,即本文所述人单克隆抗体。竞争性抑制是通过确定在存在试验免疫球蛋白的情况下结合至固体表面或细胞上的标记物的量来测定的。通常试验免疫球蛋白过量存在。在一些实施方案中,竞争性结合测定在本领域已知的条件下进行。通过竞争测定鉴定的抗体(竞争抗体)包括与参考抗体结合相同的表位的抗体和与参考抗体所结合的表位足够接近以发生空间位阻的邻近表位结合的抗体。通常,当竞争抗体过量存在时,它将抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合至少50%或75%。因此,本发明进一步涉及抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物,其中所述抗体竞争性抑制含有本文所记载的SEQ ID的VH和VL的参考抗体与BMPRI/BMPRII的结合。

[0141] 在一些实施方案中,本文提供了含有免疫球蛋白重链可变区(VH)的分离的多肽,

其中重链可变区的至少一个VH-CDR或重链可变区的至少两个VH-CDR与来自本文公开的抗体的参考重链VH-CDR1、VH-CDR2或VH-CDR3氨基酸序列为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同(参见,例如,表1和实施例的VH CDR序列)。可选地,VH的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3区与来自本文公开的抗体的参考重链VH-CDR1、VH-CDR2或VH-CDR3氨基酸序列为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同(参见,例如,表1、图7、和实施例的VH CDR序列)。因此,本文所述重链可变区可具有与表1、图7、和实施例的序列相关的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3多肽序列。

[0142] CDR由本领域技术人员通过各种方法/系统来定义。这些系统和/或定义已经发展和细化了许多年,并且包括Kabat、Chothia、IMGT、AbM、和Contact。Kabat定义是基于序列可变性并且通常是最常用的。Chothia定义是基于结构环区域的位置。IMGT系统是基于序列可变结构域的结构内的可变性和位置。AbM是Kabat和Chothia之间的折衷。Contact定义是基于可用抗体晶体结构的分析。示例性系统是Kabat和Chothia的组合。软件程序(例如,abYsis(bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)和Paratome,Kunik等人.PLoS Comput Biol 8(2):e1002388(2012);Kunik等人,Nucleic Acids Res.2012Jul;40(网络服务器发行):W521-4(2012))对于本领域技术人员是可获得且已知的,用于分析抗体序列和确定CDR。

[0143] 表1中定义的特定CDR序列通常是基于Paratome预测。然而,应理解,提及特定抗体的一个或更多个重链CDR和/或一个或更多个轻链CDR将包括本领域技术人员已知的所有CDR定义。

[0144] 虽然表1示出了通过Paratome系统定义的CDR,例如图7中所示的由Kabat、AbM、Contact、IMGT、或Chothia系统定义的CDR等其它CDR定义也包含在本发明中,并且本领域普通技术人员可以使用图7和实施例所示的序列容易地识别。

[0145] 本文所述的分离的多肽可包含免疫球蛋白重链可变区(VH),其中VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3区具有与本文所示的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3序列相同的多肽序列。

[0146] 进一步地,分离的多肽可包含免疫球蛋白重链可变区(VH),其中,除了任一个VH-CDR中的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、或十个氨基酸取代以外,VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3区具有与表1或实施例中所示的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3序列相同的多肽序列。在一些实施方案中,氨基酸取代是保守的。

[0147] 分离的多肽可包含免疫球蛋白轻链可变区(VL),其中轻链可变区的至少一个VL-CDR或轻链可变区的至少两个VL-CDR与来自本文公开的抗体的参考轻链VL-CDR1、VL-CDR2或VL-CDR3氨基酸序列为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同(参见,例如,实施例、表1和图7的VL CDR序列)。可选地,VL的VL-CDR1、VL-CDR2或VL-CDR3区可与来自本文公开的抗体的参考轻链VL-CDR1、VL-CDR2或VL-CDR3氨基酸序列为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同(参见,例如,实施例、表1和图7的VL CDR序列)。因此,轻链可变区可具有与表1或实施例的序列相关的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3多肽序列。虽然表1示出了VL-CDR,例如由Kabat或Chothia系统限定的VL-CDR等其它CDR定义也包含在本发明内。

[0148] 本文还提供了包含免疫球蛋白轻链可变区(VL)的分离的多肽,其中VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3区具有与表1和图7的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3序列相同的多肽序列。

[0149] 分离的多肽还可包含免疫球蛋白轻链可变区(VL),其中,除了任一个VL-CDR中的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、或十个氨基酸取代以外,VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3区具有与表1或图7的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3序列相同的多肽序列。在一些实施方案中,氨基酸取代是保守的。

[0150] 通常,各个抗原结合结构域将包含来自如表1或图7列出的来自单个克隆的所有CDR。在一些实施方案中,抗原结合结构域可以包含来自多个克隆的CDR,只要它们保留抗原结合能力即可。

[0151] 可以修饰免疫球蛋白或其编码cDNA。因此,本文所述方法可以包括产生嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、Fab片段、双特异性抗体、融合抗体、标记抗体、或这些中任一种的类似物的步骤(一个或更多个)的任何一个。相应方法是本领域技术人员已知的并且描述于,例如Harlow和Lane″Antibodies,A Laboratory Manual″,CSH Press,Cold Spring Harbor (1988)。当通过噬菌体展示技术来获得所述抗体的衍生物时,如在BIAcore系统中所采用的表面等离子体共振可用于提高噬菌体抗体的效率,所述噬菌体抗体与本文所述的任何一种抗体结合相同的表位(Schier,Human Antibodies Hybridomas 7(1996),97-105;Malmborg,J.Immunol.Methods 183(1995),7-13)。嵌合抗体的生产方法描述于例如国际申请WO89/09622。人源化抗体的生产方法描述于例如欧洲申请EP-A1 0 239 400和国际申请WO90/07861。根据本发明使用的抗体的进一步的来源是所谓的异种抗体。产生例如小鼠中的人样抗体等异种抗体的一般原理描述于例如国际申请WO91/10741、WO94/02602、WO96/34096和WO 96/33735。如上所述,除了完整抗体以外,本文所述的抗体还可以以多种形式存在;例如,Fv、Fab和F(ab)2,以及单链形式;参见,例如,国际申请WO88/09344。本文还提供了通过这样的方法制备的抗体。

[0152] 本文所述的抗体或其相应免疫球蛋白链(一条或更多条)可使用本领域已知的常规技术进一步修饰,例如通过单独或组合地使用氨基酸缺失(一个或更多个)、插入(一个或更多个)、取代(一个或更多个)、添加(一个或更多个)和/或重组(一个或更多个)和/或本领域已知的任何其它修饰(一个或更多个)。在免疫球蛋白链的氨基酸序列之下的DNA序列中引入这样的修饰的方法是本领域技术人员公知的;参见,例如,Sambrook,Molecular Cloning A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1989)N.Y.和Ausubel,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.(1994)。本文所述的抗体的修饰包括在一个或更多个组成氨基酸处的化学和/或酶衍生化,包括侧链修饰、骨架修饰、和N-和C-末端修饰包括乙酰化、羟基化、甲基化、酰胺化、以及糖或脂质部分、辅因子的连接等。同样地,本发明包括嵌合蛋白的生产,其在氨基末端包含所述抗体或其一些片段融合至例如免疫刺激性配体等异源分子的羧基末端;相应的技术详情参见例如国际申请WO00/30680。

[0153] 另外,本文提供了肽,所述肽包括含有如上所述的结合分子的那些,例如包含所提及的抗体中任一者的可变区的CDR3区,特别是重链的CDR3,因为经常观察到重链CDR3(HCDR3)是具有较大程度的变异性并且主要参与抗原-抗体相互作用的区域。这样的肽可以通过重组手段容易地合成或产生以产生本文所述的结合剂。这样的方法是本领域普通技术人员公知的。可以例如使用市售可得的自动肽合成器来合成肽。所述肽也可以通过重组技术、通过将表达所述肽的DNA混入表达载体并用所述表达载体转化细胞以生产所述肽来生

产。

[0154] 因此,本文所描述的是结合分子,例如,结合本文所述的抗-BMPRI/BMPRII抗体并表现所提及的特性、即特异性识别BMPRI/BMPRII(与之结合)的抗体或其结合片段。这样的抗体和结合分子可通过本文所述的ELISA和免疫印迹法和免疫组织化学试验其结合特异性和亲和力,参见例如实施例。

[0155] 作为从永生化B细胞或B记忆细胞的培养物直接获得免疫球蛋白的替代方案,本文所述的永生化细胞可用作重排的重链和轻链基因座的来源用于随后的表达和/或基因操作。重排的抗体基因可以从合适的mRNA逆转录以产生cDNA。根据需要,重链恒定区可以与不同的同种型的重链恒定区交换或一起消除。可以连接可变区以编码单链Fv区。可以连接多个Fv区以赋予结合多于一个靶的能力,或者可以使用嵌合的重链和轻链组合。一旦遗传物质为可获得的,保留它们与期望的靶标结合的能力的上述类似物的设计是直截了当的。克隆抗体可变区和产生重组抗体的方法是本领域技术人员已知的并且描述于,例如,Gilliland等人,Tissue Antigens 47(1996),1-20;Doenecke等人,Leukemia 11(1997),1787-1792。

[0156] 一旦获得合适的遗传物质,并根据需要对其进行修饰以编码类似物,则包括至少编码重链和轻链可变区的编码序列可以插入至载体上所包含的表达系统中,所述载体可转染至标准重组宿主细胞。可以使用各种这样的宿主细胞;然而,为了有效处理,可以考虑哺乳动物细胞。用于此目的的典型哺乳动物细胞系包括但不限于CHO细胞、HEK293细胞、或NSO细胞。

[0157] 然后,通过在适于宿主细胞的生长和编码序列的表达的培养条件下培养修饰的重组宿主来进行抗体或类似物的生产。然后,通过从培养物分离抗体来回收抗体。表达系统设计成包括信号肽,使得所得抗体被分泌至培养基中;然而,细胞内生产也是可能的。

[0158] 根据上述,本发明还涉及编码本文所述的抗体或等同结合分子的多核苷酸。在一些实施方案中,所述多核苷酸至少编码上述抗体的免疫球蛋白链的可变区。典型地,由多核苷酸编码的所述可变区包含所述抗体的可变区的VH和/或VL的至少一个互补决定区(CDR)。

[0159] 本领域技术人员将容易地理解,具有上述可变结构域的抗体的可变结构域可用于构建期望的特异性和生物学功能的其它多肽或抗体。因此,本文提供了含有上述可变结构域的至少一个或更多个CDR、例如所有CDR、并且有利地具有与所附实施例中所描述的抗体基本上相同或类似的结合性质的多肽和抗体。本领域技术人员已知结合亲和力可通过在CDR内或在高变环内进行氨基酸取代来增强(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196(1987),901-917),所述高变环与CDR部分重叠,如由Kabat所定义的;参见,例如,Riechmann,等人,Nature 332(1988),323-327。因此,本文还提供了其中一个或更多个所提及的CDR包含一个或更多个、或不超过两个氨基酸取代的抗体。在一些实施方案中,本文所述的抗体在其免疫球蛋白链的一条或两条中包含如表1所记载的可变区的两个或所有三个CDR。

[0160] 如本领域普通技术人员已知的,本文所述的结合分子如抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可以包含介导一种或更多种效应子功能的恒定区。例如,补体的C1组分与抗体恒定区的结合可以激活补体系统。补体的激活在细胞病原体的调理素作用(opsonization)和裂解中是重要的。补体的激活还刺激炎症应答并且还可能涉及自身免疫超敏反应。进一步地,抗体经由Fc区与各种细胞上的受体结合,抗体Fc区上的Fc受体结合位

点与细胞上的Fc受体(FcR)结合。存在许多对于不同类型的抗体为特异性的Fc受体,包括IgG(γ受体)、IgE(ε受体)、IgA(α受体)和IgM(μ受体)。抗体与细胞表面上Fc受体的结合引发许多重要且多样的生物反应,包括抗体包被颗粒的吞噬细胞和破坏、免疫复合体的清除、由杀伤细胞的抗体包被靶细胞的裂解(称作抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或ADCC)、炎性介质的释放、胎盘转移和免疫球蛋白生产的控制。

[0161] 因此,本文所述的一些实施方案包括抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物,其中删除或以其它方式改变了至少一部分的一个或更多个恒定区结构域,以便提供期望的生化特性,例如与具有近似相同免疫原性的完整的未改变的抗体相比,降低的效应子功能、非共价二聚化的能力、增加的在BMPRI/BMPRII位点处定位的能力、减少的血清半衰期、或增加的血清半衰期。例如,用于本文所述诊断和治疗方法的一些抗体是结构域缺失的抗体,其包含与免疫球蛋白重链类似的多肽链,但是缺少一个或更多个重链结构域的至少一部分。例如,在某些抗体中,将删除经修饰的抗体的恒定区的一个完整结构域,例如,将删除CH2结构域的全部或一部分。在其它实施方案中,用于本文所述诊断和治疗方法的某些抗体具有恒定区,例如IgM重链恒定区,其被改变以消除糖基化,在本文的其它地方称作无糖基化(aglycosylated)或“agly”抗体。这样的“agly”抗体可以酶促地制备以及通过工程化恒定区中共有糖基化位点(一个或更多个)来制备。不受理论的约束,认为“agly”抗体可具有体内的改善的安全性和稳定性。生产具有所期望的效应子功能的无糖基化抗体的方法可见于例如国际申请WO2005/018572,其通过引用以其整体并入本文。

[0162] 在本文所述的某些抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物中,可以使用本领域已知的技术使Fc部分突变以降低效应子功能。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其它手段)可以降低循环修饰的抗体的Fc受体结合,从而增加BMPRI/BMPRII定位。在其它情况中,与本发明一致的恒定区修饰可缓和补体结合,从而降低血清半衰期和缀合的细胞毒素的非特异性结合。恒定区的其它修饰可以用于修饰二硫键或寡糖部分,由于抗原特异性或抗体柔性增加,使得定位增强。修饰的所得生理性质、生物利用度和其它生物化学作用,例如BMPRI/BMPRII定位、生物分布和血清半衰期,可以使用众所周知的免疫学技术容易地测量和定量,而不需要过多的实验。

[0163] 在本文所述的一些抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物中,可以使Fc部分突变或将其替换为替代蛋白质序列以增加抗体的细胞摄取,例如通过增强经由Fcγ受体、LRP、或Thy1受体的抗体的受体介导的内吞作用、或通过“超级抗体技术(SuperAntibody Technology)”,其被认为能够使抗体穿梭进入活细胞而不伤害它们(Expert Opin.Biol.Ther.(2005),237-241)。例如,抗体结合区与细胞表面受体的同源蛋白配体的融合蛋白或具有与BMPRI/BMPRII以及细胞表面受体结合的特异性序列的双特异性或多特异性抗体的产生可以使用本领域已知的技术进行工程化。

[0164] 在本文所述的一些抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物中,可以使Fc部分突变或将其替换为替代蛋白质序列、或者抗体可以被化学修饰以增加其血脑屏障穿透。

[0165] 本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物的修饰形式可使用本领域已知的技术由完整前体或亲本抗体制备。本文中更详细地讨论了示例性技术。本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可以使用本领域已知的技术制备或制造。在一些实施方案中,抗体分子或其片段是“重组产生的”,即是使用重组DNA技术产生的。用于制备抗

体分子或其片段的示例性技术在本文的其它地方详细讨论。

[0166] 本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物还包括例如通过将任何类型的分子共价连接至抗体使得共价连接不阻止抗体与其同源表位特异性结合来修饰的衍生物。例如但不限于，抗体衍生物包括经修饰的抗体，例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、由已知的保护/封闭基团衍生、蛋白水解切割、与细胞配体或其它蛋白质的连接等。许多化学修饰中的任何一种都可以通过已知技术进行，包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，衍生物可以包含一个或更多个非经典氨基酸。

[0167] 在一些实施方案中，本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物将不会在要治疗的动物中、例如人中引起有害的免疫应答。在一些实施方案中，本文所述结合分子如抗体、或其抗原结合片段源自例如人患者等患者，并且随后用于它们源自的相同物种，例如人，减轻或最小化有害免疫应答的发生。

[0168] 去免疫(De-immunization)也可用于降低抗体的免疫原性。如本文所用，术语“去免疫”包括改变抗体以修饰T细胞表位；参见，例如国际申请WO98/52976和WO00/34317。例如，分析来自起始抗体的VH和VL序列，并且来自各个V区的人T细胞表位“映射(map)”显示了表位相对于序列内互补决定区(CDR)和其它关键残基的位置。分析来自T细胞表位映射的单个T细胞表位以鉴定具有低风险的改变最终抗体活性的替代氨基酸取代。设计了一系列的替代VH和VL序列，包括氨基酸取代的组合，随后将这些序列并入一系列的结合多肽，例如BMPRI/BMPRII-特异性抗体或其免疫特异性片段用于本文公开的诊断和治疗方法，然后试验其功能。典型地，产生并试验了12和24种之间的变体抗体。然后将含有修饰的V和人C区的完整重链和轻链基因克隆至表达载体，随后将质粒引入细胞系用于生产全抗体。然后，在适当的生化和生物学测定中比较抗体，并鉴定最佳变体。

[0169] 单克隆抗体可使用本领域已知的多种技术来制备，包括使用杂交瘤、重组、和噬菌体展示技术、或其组合。例如，可以使用杂交瘤技术生产单克隆抗体，所述杂交瘤技术包含本领域已知的那些并教导于例如Harlow等人，Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2nd ed.(1988)；Hammerling等人，in:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier,N.Y.,563-681(1981)，其通过引用以其整体并入本文。本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指源自包括任何真核、原核、或噬菌体克隆的单个克隆的抗体，而不是其生产方法。因此，术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。

[0170] 在公知的杂交瘤方法中(Kohler等人，Nature 256(1975)，495)，来自哺乳动物的相对较短寿命的或致死的淋巴细胞，例如源自本文所述的鼠受试者的B细胞，与永生化肿瘤细胞系(例如，骨髓瘤细胞系)融合，从而产生既是永生化的又能够产生B细胞的遗传编码抗体的杂交细胞或“杂交瘤”。通过选择、稀释和再生长，将所得杂交体分离为单个遗传株，各个单独的株包含用于形成单个抗体的特定基因。它们产生针对所需抗原的同源抗体，并且就它们的纯遗传亲本而言，被称为“单克隆”。

[0171] 将如此制备的杂交瘤细胞接种并生长在合适的培养基中，所述培养基包含一种或更多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞的生长或存活的物质。本领域技术人员将认识到，用于杂交瘤的形成、选择和生长的试剂、细胞系和培养基可从许多来源商购获得，并且已良好

确立标准化方案。通常，检测杂交瘤细胞在其中生长的培养基以产生针对所需抗原的单克隆抗体。通过杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性是通过体外测定来确定的，例如本文所述的免疫沉淀法、放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)。在鉴定杂交瘤细胞产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体后，可以通过有限稀释过程对克隆进行亚克隆并通过标准方法进行生长；参见，例如，Goding，Monoclonal Antibodies: Principles and Practice，Academic Press，pp 59-103(1986)。将进一步认识到，通过亚克隆分泌的单克隆抗体可以通过例如蛋白-A、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析、或亲和色谱法等常规纯化方法从培养基、腹水液或血清中分离。

[0172] 在一些实施方案中，淋巴细胞可以通过显微操作进行选择并分离可变基因。例如，外周血单核细胞可以从例如人等免疫的或天然免疫的哺乳动物中分离出来，并体外培养约7天。可以对培养物筛选满足筛选标准的特异性免疫球蛋白。可以分离来自阳性孔的细胞。可通过FACS或通过在补体介导的溶血蚀斑分析中鉴定它们来分离单个的产生Ig的B细胞。可以将产生Ig的B细胞显微操作至管中，并且可以使用例如RT-PCR扩增VH和VL基因。VH和VL基因可克隆至抗体表达载体中并转染至细胞(例如，真核细胞或原核细胞)中进行表达。

[0173] 可选地，可以使用本领域技术人员公知的技术来选择和培养产生抗体的细胞系。这些技术描述在各种实验室手册和原始出版物中。在这方面，适用于下文中所述方法和组合物的技术描述于Current Protocols in Immunology，Coligan等人，Eds.，Green Publishing Associates and Wiley-Interscience，John Wiley and Sons，New York (1991)，其通过引用以其整体(包括补充)并入本文。

[0174] 识别特异性表位的抗体片段可以通过已知技术产生。例如，Fab和F(ab')2片段可以重组地产生、或通过使用例如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')2片段)等酶的免疫球蛋白分子的蛋白水解切割来产生。F(ab')2片段包含可变区、轻链恒定区和重链的CH1结构域。这样的片段足以用于例如涉及使免疫球蛋白的免疫特异性部分偶联至例如放射性同位素等检测试剂的免疫诊断过程。

[0175] 在一些实施方案中，本文所述的抗体包含抗体分子的至少一个重链或轻链CDR。在另一实施方案中，本文所述的抗体包含来自一个或更多个抗体分子的至少两个CDR。在另一实施方案中，本文所述的抗体包含来自一个或更多个抗体分子的至少三个CDR。在另一实施方案中，本文所述的抗体包含来自一个或更多个抗体分子的至少四个CDR。在另一实施方案中，本文所述的抗体包含来自一个或更多个抗体分子的至少五个CDR。在另一实施方案中，本文所述的抗体包含来自一个或更多个抗体分子的至少六个CDR。含有至少一个CDR的示例性抗体分子可包括在本文所描述的主题抗体中。

[0176] 本文所述的抗体可通过本领域已知的用于合成抗体的任何方法、特别是通过化学合成或通过本文所述的重组表达技术来生产。

[0177] 在一些实施方案中，本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物包括其中一个或更多个结构域部分或全部缺失的合成恒定区(“结构域缺失抗体”)。在一些实施方案中，相容性修饰抗体将包括其中去除整个CH2结构域的结构域缺失的构建体或变体。对于其它实施方案，可以用短连接肽取代缺失的结构域以提供可变区的灵活性和运动自由度。本领域技术人员将理解，由于CH2结构域对抗体的分解代谢速率的调节性质，这样的构建体是特别优选的。结构域缺失的构建体可使用编码IgG1人恒定结构域的载体衍生，参见，例如

国际申请WO02/060955和WO02/096948A2。工程化该载体以删除CH2结构域，并提供表达结构域缺失的IgG1恒定区的合成载体。

[0178] 在一些实施方案中，本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物是微型抗体(minibody)。可以使用本领域所述的方法制造微型抗体，参见，例如美国专利5,837,821或国际申请WO 94/09817。

[0179] 在一些实施方案中，本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物包括具有几个或甚至单个氨基酸的缺失或取代的免疫球蛋白重链，只要其允许单体亚基之间的缔合并保持与BMPRI/BMPRII的结合即可。例如，CH2结构域的选定区域中的单个氨基酸的突变可足以显著降低Fc结合，从而增加BMPRI/BMPRII定位。类似地，可期望简单地删除一个或更多个恒定区结构域的控制要调节的效应子功能(例如补体结合)的那部分。恒定区的这种部分缺失可以改善抗体的所选特性(血清半衰期)，同时使得与主题恒定区结构域相关的其它所需功能不变。此外，如上所述，所公开的抗体的恒定区可以通过增强了所得构建体的性质的一个或更多个氨基酸的突变或取代来合成。在这方面，可以破坏由保守结合位点(例如Fc结合)提供的活性，同时基本上保持修饰抗体的构造和免疫原性特征。而其它实施方案包括向恒定区添加一个或更多个氨基酸以增强例如效应子功能等所需特性或提供更多的细胞毒素或糖附着。在这样的实施方案中，可期望插入或复制源自所选恒定区结构域的特定序列。

[0180] 本发明还提供了包含本文所述的抗体分子(例如VH区和/或VL区)的变体(包括衍生物)的抗体、基本上由其组成的抗体、或由其组成的抗体，所述抗体或其片段免疫特异性结合BMPRI/BMPRII。本领域技术人员已知的标准技术可用于在编码抗体的核苷酸序列中引入突变，包括但不限于导致氨基酸取代的定点诱变和PCR介导诱变。在一些实施方案中，相对于参考VH区、VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL区、VL-CDRL、VL-CDR2、或VL-CDR3，变体(包括衍生物)编码少于50个氨基酸取代、少于40个氨基酸取代、少于30个氨基酸取代、少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代、或少于2个氨基酸取代。可选地，突变可以沿着全部或部分的编码序列随机引入，例如通过饱和诱变，并且可以筛选所得突变体的生物活性以鉴定保留活性(例如结合BMPRI/BMPRII的能力)的突变体。

[0181] 例如，可以仅在抗体分子的框架区或仅在CDR区中引入突变。引入的突变可以是沉默突变或中性错义突变，例如对抗体结合抗原的能力没有影响或影响很小的，实际上一些这样的突变根本不改变氨基酸序列。这些类型的突变可用于优化密码子使用、或改善杂交瘤抗体产生。本文的其它地方公开了编码本文所述的抗体的密码子优化的编码区。可选地，非中性错义突变可以改变抗体结合抗原的能力。大多数沉默突变和中性错义突变的位置可能在框架区域中，而大多数非中性错义突变的位置可能在CDR中，虽然这不是绝对的要求。本领域技术人员能够设计和测试具有所需性质的突变体分子，例如不改变抗原结合活性或改变结合活性(例如，改善抗原结合活性或改变抗体特异性)。在诱变之后，可以常规地表达编码的蛋白质，并且编码的蛋白质的功能和/或生物学活性(例如，免疫特异性结合BMPRI/BMPRII的至少一个表位的能力)可以使用本文所述的技术或通过本领域已知的常规修饰技术来确定。

[0182] BMPRI/BMPRII-结合剂，例如但不限于，本文所述的BMPRI/BMPRII-结合抗体，可以

使用任何体内或体外模型来表征。本领域技术人员容易理解，本文所述BMPRI/BMPRII结合剂(例如，抗体)可在本文所述的小鼠模型中表征。

[0183] III.编码抗体的多核苷酸

[0184] 本文还提供了编码本文所述的抗体、或抗原结合片段、变体、或衍生物的多核苷酸。编码抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物的多核苷酸可以由任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸组成，所述多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸可以是未经修饰的RNA或DNA或修饰的RNA或DNA。例如，编码抗体、或其抗原结合片段、变体、或其衍生物的多核苷酸可由以下构成：单链和双链DNA、作为单链和双链区的混合物的DNA、单链和双链RNA、以及作为单链和双链区的混合物的RNA、含有可为单链的或、更典型地双链的或单链和双链区的混合物的DNA和RNA的杂交分子。另外，编码抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物的多核苷酸可由含有RNA或DNA或者RNA和DNA二者的三链区构成。编码抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物的多核苷酸也可以包含出于稳定性或其它原因而修饰的一个或更多个修饰的碱基或DNA或RNA骨架。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化碱基和例如肌苷等不常见的碱基。可以对DNA和RNA进行各种修饰；因此，“多核苷酸”包括化学地、酶促地、或代谢地修饰的形式。

[0185] 编码源自免疫球蛋白(例如，免疫球蛋白重链部分或轻链部分)的多肽的非天然变体的分离的多核苷酸可以通过以下来产生：将一个或更多个核苷酸取代、添加或缺失引入至免疫球蛋白的核苷酸序列，使得将一个或更多个氨基酸取代、添加或缺失引入至编码的蛋白质中。突变可以通过标准技术引入，例如定点诱变和PCR介导的诱变。在一些实施方案中，对一个或更多个非必需氨基酸残基进行保守氨基酸取代。

[0186] 众所周知，RNA可以通过标准技术从原始B细胞、杂交瘤细胞或从其它转化的细胞中分离，例如异硫氰酸胍提取和沉淀、随后离心或色谱法。根据需要，mRNA可以通过例如oligo dT纤维素上的色谱法等标准技术从总RNA中分离。合适的技术是本领域所熟悉的。在一些实施方案中，编码抗体的轻链和重链的cDNA可以根据众所周知的方法、使用逆转录酶和DNA聚合酶同时或分别地制备。基于公布的重链和轻链DNA和氨基酸序列，PCR可以由共有恒定区引物或由更特异性引物起始。如上所述，PCR也可用于分离编码抗体轻链和重链的DNA克隆。在这种情况下，文库可以通过共有引物或较大同源探针如人恒定区探针来筛选。

[0187] DNA，通常是质粒DNA，可以使用本领域已知的技术从细胞分离，根据详细记载于例如涉及重组DNA技术的前述参考文献中的标准的公知技术进行限制性图谱绘制和测序。当然，DNA可以在分离过程或随后的分析期间的任何点上根据本发明合成。

[0188] 在一些实施方案中，本文提供了一种分离的多核苷酸，其包含编码免疫球蛋白重链可变区(VH)的核酸、基本上由其组成、或由其组成，其中所述重链可变区的至少一个CDR或重链可变区的至少两个VH-CDR与来自本文所公开的抗体的参考重链VH-CDR1、VH-CDR2、或VH-CDR3氨基酸序列为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同。可选地，VH的VH-CDR1、VH-CDR2、或VH-CDR3区与来自本文所公开的抗体的参考重链VH-CDR1、VH-CDR2、或VH-CDR3氨基酸序列为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同。因此，根据该实施方案，本文所述的抗体或其抗原结合片段的重链可变区具有与实施例中所示多肽序列相关的VH-CDR1、VH-CDR2、或VH-CDR3多肽序列。

[0189] 在一些实施方案中，本文提供了一种分离的多核苷酸，其包含编码免疫球蛋白重

链可变区(VH)的核酸、基本上由其组成、或由其组成，其中除了在任一个VH-CDR中具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、或十个氨基酸取代以外，VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3区具有与实施例中所示VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3组相同的多肽序列。在一些实施方案中，氨基酸取代是保守的。

[0190] 在另一实施方案中，本文提供了一种分离的多核苷酸，其包含编码免疫球蛋白轻链可变区(VL)的核酸、基本上由其组成、或由其组成，其中所述轻链可变区的至少一个CDR或轻链可变区的至少两个VL-CDR与来自本文所公开的抗体的参考轻链VL-CDR1、VL-CDR2、或VL-CDR3氨基酸序列为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同。可选地，VL的VL-CDR1、VL-CDR2、或VL-CDR3区与来自本文所公开的抗体的参考轻链VL-CDR1、VL-CDR2、或VL-CDR3氨基酸序列为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同。因此，根据该实施方案，本文所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区具有与实施例中所示多肽序列相关的VL-CDR1、VL-CDR2、或VL-CDR3多肽序列。

[0191] 在另一实施方案中，本文提供了一种分离的多核苷酸，其包含编码免疫球蛋白轻链可变区(VL)的核酸、基本上由其组成、或由其组成，其中除了在任一个VL-CDR中具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、或十个氨基酸取代以外，VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3区具有与实施例中所示VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3组相同的多肽序列。在一些实施方案中，氨基酸取代是保守的。

[0192] 在另一实施方案中，本文提供了一种分离的多核苷酸，其包含编码免疫球蛋白重链可变区(VH)的核酸、基本上由其组成、或由其组成，其中VH-CDR1、VH-CDR2、和VH-CDR3区具有与实施例中所示VH-CDR1、VH-CDR2、和VH-CDR3组相同的多肽序列。

[0193] 在另一实施方案中，本文提供了一种分离的多核苷酸，其包含编码免疫球蛋白轻链可变区(VL)的核酸、基本上由其组成、或由其组成，其中VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3区具有与实施例中所示VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3组相同的多肽序列。

[0194] 如本领域已知的，两个多肽或两个多核苷酸之间的“序列同一性”是通过将一个多肽或多核苷酸的氨基酸或核酸序列与第二个多肽或多核苷酸的序列进行比较来确定的。当在本文进行讨论时，可以使用本领域已知的方法和计算机程序/软件来确定特定多肽是否与另一多肽为至少约40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％或95％相同，例如但不限于BESTFIT程序(Wisconsin序列分析包，用于Unix的版本8，Computer Group，University Research Park，575Science Drive，Madison，WI 53711)。BESTFIT使用Smith和Waterman，Advances in Applied Mathematics 2(1981)，482-489的局部同源性算法(local homology algorithm)，以找出两条序列之间的最佳同源性片段。当使用BESTFIT或任何其它序列比对程序以确定特定序列是否与本文所述的参考序列(例如，本文所述的抗体或其抗原结合片段)为例如95％相同时，当然，这些参数被设定成使得在参考多肽序列的全长上计算同一性的百分比，并且允许多至参考序列中氨基酸总数的5％的同源性中的空位。

[0195] 在一些实施方案中，多核苷酸包含具有本文所述的抗-BMPRI/BMPRII抗体的VH或VL区的多核苷酸序列的核酸、基本上由其组成、或由其组成。在这方面，本领域技术人员将容易地理解，编码至少轻链和/或重链的可变结构域的多核苷酸可以编码两条免疫球蛋白链或仅一条的可变结构域。本文还提供了一种多核苷酸，其包含编码本文如实施例、图7、或

表1中所示的抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列的核苷酸序列、基本上由其组成、或由其组成。

[0196] 在一些实施方案中，本文提供了一种分离的多核苷酸，其包含编码免疫球蛋白重链可变区的核酸、基本上由其组成、或由其组成，所述免疫球蛋白重链可变区与参考重链VH为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％或95％相同。在一些实施方案中，参考重链可变区的氨基酸序列如本文所示。

[0197] 在一些实施方案中，本文提供了一种分离的多核苷酸，其包含编码免疫球蛋白轻链可变区的核酸、基本上由其组成、或由其组成，所述免疫球蛋白轻链可变区与参考轻链VL为至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％或95％相同。在一些实施方案中，参考轻链可变区的氨基酸序列如本文所示。

[0198] 如在其它地方所描述的，本文还提供了本文所述多核苷酸的片段。也考虑了如本文所述的编码融合多核苷酸、Fab片段、和其它衍生物的另外的多核苷酸。

[0199] 多核苷酸可以通过本领域已知的任何方法生产或制造。例如，如果抗体的核苷酸序列是已知的，编码抗体的多核苷酸可由化学合成的寡核苷酸组装而成，例如，如Kutmeier等人，BioTechniques 17(1994)，242中所述，简言之，涉及含有部分编码抗体的序列的重叠寡核苷酸的合成、这些寡核苷酸的退火和连接、和通过PCR扩增连接的寡核苷酸。

[0200] 可选地，编码抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物的多核苷酸可由来自合适来源的核酸产生。如果含有编码特定抗体的核酸的克隆不可用，但是抗体分子的序列是已知的，则编码抗体的核酸可以化学地合成或通过使用与序列的3'和5'端杂交的合成引物的PCR扩增、或通过使用对特定基因序列为特异性的寡核苷酸探针的克隆以鉴定例如来自编码抗体的cDNA文库的cDNA克隆来获得自合适的来源(例如，抗体cDNA文库、或产生自表达BMPRI/BMPRII特异性抗体的组织或细胞的cDNA文库、或分离自表达BMPRI/BMPRII特异性抗体的组织或细胞的核酸、优选地polyA+RNA，例如杂交瘤细胞选择用于表达抗体)。然后可以使用本领域公知的任何方法将通过PCR产生的扩增的核酸克隆至可复制的克隆载体中。

[0201] 一旦确定了抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物的核苷酸序列和相应的氨基酸序列，其核苷酸序列可以使用本领域公知的操纵核苷酸序列的方法来操纵，例如重组DNA技术、定点诱变、PCR等(参见，例如，Sambrook等人，Molecular Cloning,A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1990)和Ausubel等人，eds.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY(1998)中描述的技术，其二者通过引用以其整体并入本文)，以产生具有不同氨基酸序列的抗体，例如以产生氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0202] IV.融合蛋白和缀合物

[0203] 在一些实施方案中，抗体多肽包含通常不与抗体相关的氨基酸序列或一个或更多个部分。下文中更详细地描述示例性修饰。例如，本文所述的单链fv抗体片段可以包含柔性接头序列、或者可以被修饰以添加功能性部分(例如，PEG、药物、毒素、或标签如荧光、放射性、酶、核磁、和重金属等)

[0204] 本文所述的抗体多肽可包含融合蛋白、基本上由其组成、或由其组成。融合蛋白是嵌合分子，其包含例如具有至少一个靶结合位点的免疫球蛋白BMPRI/BMPRII-结合结构域、和至少一个异源部分，即其在自然界中不天然连接的部分。氨基酸序列可通常存在于在融

合多肽中结合在一起的分别的蛋白质中，或者它们可通常存在于同一蛋白质中，但是在融合多肽中以新的排列放置。融合蛋白可以通过例如化学合成来产生、或通过产生和翻译其中肽区域以所需关系编码的多核苷酸来产生。

[0205] 当用于多核苷酸或多肽时，术语“异源(heterologous)”是指多核苷酸或多肽源自不同于与其进行比较的其它实体的实体。例如，如本文所用，要融合至抗体、或其抗原结合片段、变体、或类似物的“异源多肽”源自同一物种的非免疫球蛋白多肽、或不同物种的免疫球蛋白或非免疫球蛋白多肽。

[0206] 如本文其它地方更详细讨论的，本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可以进一步在N-或C-末端处与异源多肽重组融合、或与多肽或其它组分化学缀合(包括共价和非共价缀合)。例如，抗体可以重组融合或缀合至检测分析中用作标签的分子和效应分子，例如异源多肽、药物、放射性核素、或毒素；参见，例如国际申请WO92/08495；WO91/14438；WO89/12624；美国专利号5,314,995；和欧洲专利申请EP 0 396 387。

[0207] 在一些情况中，抗体或其抗原结合片段与药物缀合。生产这种药物缀合物的方法是本领域已知的并且在本文进行了描述(参见，例如下文中实施例)。在一些情况中，所述药物是免疫抑制药物(例如，参见，对于免疫抑制药物的实例，下文中“免疫抑制或免疫调节药物”节。在一些情况中，药物是紫杉醇。在一些情况中，药物与抗体或其抗原结合片段直接缀合。在一些情况中，药物通过接头与抗体或其抗原结合片段缀合。可用于将药物缀合至本文所述的抗体或其抗原结合片段的接头的实例包括4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)或马来酰亚胺己基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(mc-vc-PAB)。在一些情况中，药物与抗体或其抗原结合片段共价结合。药物与抗体或其抗原结合片段的共价结合可以如下文中实施例部分所述进行。例如，药物可以是使用例如戊二醛进行化学改性以产生羧酸基团，然后使用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺磺酸盐(NHS)化学物质激活该羧酸基团；所得药物优先与抗体或其抗原结合片段上的伯胺(例如，赖氨酸上的那些)反应(即缀合至伯胺)。

[0208] 本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可以由通过肽键或修饰肽键相互连接的氨基酸组成，即肽等排物(isostere)，并且可以包含除了20种基因编码的氨基酸以外的氨基酸。抗体可以通过例如翻译后加工等天然加工、或通过本领域公知的化学修饰技术进行修饰。这些修饰在基本文本和更详细的专题论文、以及在大量的研究文献中被很好的描述。修饰可以发生在抗体中的任何地方，包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端，或者发生在例如糖等部分上。将理解，相同类型的修饰可以以相同或不同的程度存在于给定抗体中的几个位点处。而且，给定的抗体可以包含许多类型的修饰。抗体可以是支链的，例如作为泛素化的结果，并且它们可以是环状的、具有或不具有支链。环状的、支链的和支链环状的抗体可以由翻译后的天然加工产生、或者可以通过合成方法来产生。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ-羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化(prenylation)、外消旋化、硒酰化、硫酸化、转移RNA介导的氨基酸向蛋白质的添加如精氨酰化、和泛素化；参见，例如，Proteins-Structure And Molecular

Properties,T.E.Creighton,W.H.Freeman and Company,New York 2nd Ed.,(1993);Posttranslational Covalent Modification Of Proteins,B.C.Johnson,Ed.,Academic Press,New York,pgs.1-12(1983);Seifter等人,Meth.Enzymol.182(1990),626-646;Rattan等人,Ann.NY Acad.Sci.663(1992),48-62)。

[0209] 本文还提供了含有抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物、以及异源多肽的融合蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白包含具有本文所述的抗体的任何一个或更多个VH区的氨基酸序列或本文所述的抗体或其片段或变体的任何一个或更多个VL区的氨基酸序列的多肽、以及异源多肽序列,基本上由其组成,或由其组成。在另一实施方案中,用于本文公开的诊断和治疗方法的融合蛋白包括具有抗体、或其片段、变体、或衍生物的任何一个、两个、三个VH-CDR的氨基酸序列或抗体、或其片段、变体、或衍生物的任何一个、两个、三个VL-CDR的氨基酸序列的多肽、以及异源多肽序列,基本上由其组成,或由其组成。在一些实施方案中,融合蛋白包含具有本文所述的抗体、或其片段、衍生物、或变体的VH-CDR3的氨基酸序列的多肽和异源多肽序列,所述融合蛋白特异性结合BMPRI/BMPRII。在另一实施方案中,融合蛋白包含具有本文所述的抗体的至少一个VH区的氨基酸序列和本文所述的抗体、或其片段、衍生物或变体的至少一个VL区的氨基酸序列的多肽,以及异源多肽序列。在一些实施方案中,融合蛋白的VH和VL区对应于特异性结合BMPRI/BMPRII的单源抗体(或scFv或Fab片段)。在另一实施方案中,用于本文公开的诊断和治疗方法的融合蛋白包含具有抗体的任何一个、两个、三个或更多个VH CDR的氨基酸序列和抗体、或其片段或变体的任何一个、两个、三个或更多个VL CDR的氨基酸序列的多肽,以及异源多肽序列。在一些实施方案中,两个、三个、四个、五个、六个或更多个VH-CDR或VL-CDR对应于本文所述的单源抗体(或scFv或Fab片段)。本文还提供了编码这些融合蛋白的核酸分子。

[0210] 文献中报道的示例性融合蛋白包括以下的融合:T细胞受体(Gascoigne等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84(1987),2936-2940;CD4(Capon等人,Nature 337(1989),525-531;Traunecker等人,Nature 339(1989),68-70;Zettmeissl等人,DNA Cell Biol.USA 9(1990),347-353;和Byrn等人,Nature 344(1990),667-670);L-选择素(归巢受体)(Watson等人,J.Cell.Biol.110(1990),2221-2229;和Watson等人,Nature 349(1991),164-167);CD44(Aruffo等人,Cell 61(1990),1303-1313);CD28和B7(Linsley等人,J.Exp.Med.173(1991),721-730);CTLA-4(Lisley等人,J.Exp.Med.174(1991),561-569);CD22(Stamenkovic等人,Cell 66(1991),1133-1144);TNF受体(Ashkenazi等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88(1991),10535-10539;Lesslauer等人,Eur.J.Immunol.27(1991),2883-2886;和Peppel等人,J.Exp.Med.174(1991),1483-1489(1991);和IgE受体a(Ridgway和Gorman,J.Cell.Biol.115(1991),Abstract No.1448)。

[0211] 如本文中其它地方所讨论的,本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可以与异源多肽融合以增加多肽的体内半衰期、或者用于使用本领域已知方法的免疫测定。例如,在一些实施方案中,PEG可与本文所述的抗体缀合以增加它们的体内半衰期;参见,例如Leong等人,Cytokine 16(2001),106-119;Adv.in Drug Deliv.Rev.54(2002),531;或Weir等人,Biochem.Soc.Transactions 30(2002),512。

[0212] 此外,本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可以与例如肽等标记序列融合以便于它们的纯化或检测。在特定实施方案中,标记物氨基酸序列是六-组氨酸肽

(HIS),例如在pQE载体(QIAGEN,Inc.,9259Eton Avenue,Chatsworth,Calif.,91311)中提供的标签,除了其它的以外,许多是市售可得的。如Gentz等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86(1989),821-824中所述,提供六-组氨酸便于融合蛋白的方便纯化。可用于纯化的其它肽标签包括但不限于,"HA"标签,其对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson等人,Cell 37(1984),767),和"FLAG"标签。

[0213] 融合蛋白可以使用本领域公知的方法制备;参见,例如美国专利号5,116,964和5,225,538。进行融合的确切位置可根据经验选择以优化融合蛋白的分泌或结合特性。然后将编码融合蛋白的DNA转染至宿主细胞进行表达。

[0214] 本文所述的抗体可以以非缀合形式使用,或者可以与多种分子的至少一种缀合,例如以改善分子的治疗性质、促进靶标检测、或者用于患者的成像或治疗。当进行纯化时,本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可以在纯化之前或之后被标记或缀合。特别地,本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可以与治疗剂、前药、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药物、或PEG缀合。

[0215] 本领域中已被广泛描述作为包括常规抗体的免疫毒素的缀合物。毒素可以通过常规偶联技术与抗体偶联,或者含有蛋白毒素部分的免疫毒素可以作为融合蛋白产生。本文所述的抗体可以以相应的方式使用以获得这样的免疫毒素。这样的免疫毒素的实例是由Byers,Seminars Cell.Biol.2(1991),59-70和Fanger,Immunol.Today 12(1991),51-54描述的那些。

[0216] 本领域技术人员将理解,根据要缀合的所选试剂,也可以使用多种技术来组装缀合物。例如,通过例如使BMPRI/BMPRII结合多肽与例如生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯等生物素的活化酯反应来制备具有生物素的缀合物。类似地,具有荧光标记物的缀合物可以在例如本文所列出的那些等偶联剂的存在下制备、或者通过与异硫氰酸酯或荧光素-异硫氰酸酯反应来制备。本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物的缀合物以类似的方式制备。

[0217] 本文还提供了与诊断剂或治疗剂缀合的本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物。抗体可以在诊断上使用以例如表明BMPRI/BMPRII相关疾病的存在、表明获得BMPRI/BMPRII相关疾病的风险、监测BMPRI/BMPRII相关疾病的发展或进展,即作为临床测试过程的一部分,以例如确定给定治疗和/或预防方案的功效。可以通过将抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物与可检测物质结合来促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料,使用各种正电子发射断层显像的正电子发射金属、和非放射性顺磁性金属离子;参见,例如美国专利号4,741,900,关于可与抗体缀合用作诊断剂的金属离子。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合体的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮(umbelliferone)、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素(dichlorotriazinylamine fluorescein)、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、荧光素、和水母发光蛋白(aequorin);合适的放射性材料的实例包括125I、131I、111In或99Tc。

[0218] 抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物也可以通过将其与化学发光化合物结合而可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中产生的发光的存在来确定化学发光标记

的抗体的存在。特别有用的化学发光标记化合物的实例是鲁米诺、异鲁米诺、热吖啶鎓酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吖啶鎓盐和草酸酯。

[0219] 抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可被可检测地标记的方法之一是通过将其连接至酶并在酶免疫测定(EIA)中使用连接的产物(Voller,A.,"The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)"Microbiological Associates Quarterly Publication,Walkersville,Md.,Diagnostic Horizons 2(1978),1-7);Voller等人,J.Clin.Pathol.31(1978),507-520;Butler,Meth.Enzymol.73(1981),482-523;Maggio,E.(ed.),Enzyme Immunoassay,CRC Press,Boca Raton,Fla.,(1980);Ishikawa,E.等人,(eds.),Enzyme Immunoassay,Kgaku Shoin,Tokyo(1981)。与抗体结合的酶将与合适的底物、优选显色底物以产生可例如通过分光光度法、荧光法或通过目视方法检测的化学部分的方式反应。可用于可检测地标记抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、δ-5-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、α-甘油磷酸酯、脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、β-半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。此外,所述检测可以通过使用所述酶的显色底物的比色法来完成。检测也可以通过将底物的酶反应程度与类似制备的标准物进行视觉比较来完成。

[0220] 检测也可以使用任何各种其它免疫测定来完成。例如,通过放射性标记抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物,可以通过使用放射免疫测定(RIA)来检测抗体(参见,例如,Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,(1986年三月)),其通过引用并入本文。放射性同位素可以通过包括但不限于伽马计数器、闪烁计数器、或放射自显影术(autoradiography)的方法来检测。

[0221] 抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物也可以使用例如152Eu或镧系的其它等荧光发射金属可检测地标记。这些金属可以使用例如二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)等金属螯合基团与抗体连接。

[0222] 用于将各种部分与抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物缀合的技术是公知的,参见,例如,Arnon等人,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy",in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(eds.),pp.243-56(Alan R.Liss,Inc.(1985);Hellstrom等人,"Antibodies For Drug Delivery",in Controlled Drug Delivery(2nd Ed.),Robinson等人(eds.),Marcel Dekker,Inc.,pp.623-53(1987);Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review",in Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(eds.),pp.475-506(1985);"Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy",in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(eds.),Academic Press pp.303-16(1985),和Thorpe等人,"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates",Immunol.Rev.62(1982),119-158。

[0223] 如所提及的,在一些实施方案中,可以缀合增强结合分子的稳定性或功效的部分,

所述结合分子例如结合多肽，例如抗体或其免疫特异性片段。例如，在一些实施方案中，PEG可以缀合至本文所述结合分子以增加它们的体内半衰期。Leong等人，Cytokine 16(2001)，106；Adv.in Drug Deliv.Rev.54(2002)，531；或Weir等人，Biochem.Soc.Transactions 30(2002)，512。

[0224] 双特异性和多特异性抗体

[0225] 本文所述的双特异性和多特异性抗体试剂可用作替代配体以组装该途径的I型和II型受体的复合体。这些试剂起始I型和II型受体的组装以磷酸化下游的SMAD蛋白，并以与内源配体类似的方式调节信号传导。由于受体的重叠特异性，大部分内源配体可与大量的不同的I型和II型配体配对，与内源配体相反，本申请的双特异性和多特异性试剂靶向特定I型和II型受体对。通过靶向特定受体对，这些试剂可以引发那些受体对的下游的特定功能，而不结合内源配体通常结合的其它受体对。受体的该选择性靶向可以招募通过激活特定受体对来产生的活性，同时避免通过给定内源配体以其它方式激活的其它受体对的激活。受体的该选择性靶向可以富集给定TGF-β超家族配体的所需活性，同时消除不希望的作用，用于治疗目的。

[0226] 本文所述的对于表面BMP/TGF-β受体的各种组合为特异性的双特异性抗体可以在广泛的背景中使用，例如治疗地使用。识别TGF-β超家族的I型和II型受体的多特异性或双特异性抗体可引发SMAD效应子的特异性BMP或TGF-β途径特异性激活、基因转录、和细胞生物学和命运，类似于内源性BMP、激活素、GDF、和TGF-β配体。

[0227] 信号传导双特异性抗体不具有天然配体的混杂性，提供了一种尽管全身施用，但引发特定靶组织中的特定细胞效应的方法。代替与多种II型和多种I型受体结合(这通常是天然配体的情况)，双特异性靶向单个II型和I型对。这将限制信号传导和靶向的组织的生物学效应。与在循环中具有测定为数分钟至数小时的半衰期的天然配体不同，双特异性信号传导分子具有可根据所需生物学效应而调节的药代动力学。预期双特异性IgG Fc分子具有数周的半衰期，如治疗性IgG分子或其它IgG Fc融合分子的一般情况。但是如果表达为不具有Fc的双特异性分子、即F(ab')2片段、或双特异性单链Fv(scFv)分子，也可以设计成具有更短的分钟或小时数量级的半衰期。双特异性IgG Fc可针对基于ADCC或补体固定功能的特定作用，这取决于天然IgGFc结构域或突变型IgGFc结构域的使用。

[0228] 天然配体具有导致它们与细胞外基质氨基葡聚糖结合、由此从循环或从靶细胞隔绝的硫酸乙酰肝素结合结构域，与天然配体不同，工程化的双特异性信号传导分子可以全身施用以靶向不同的组织用于更有利的分布和药效动力学。

[0229] BMP/TGF-β信号传导途径的突变蛋白配体，也称为突变蛋白(mutein)，可以设计成具有更多选择性的受体靶向、组织靶向、或药代动力学和药效动力学。虽然可以产生BMP/TGF-β信号传导途径的突变蛋白以选择性的方式参与它们的一些功能，但是这些突变蛋白可能是免疫原性的，并且抗药物抗体应答不仅可以中和那些治疗试剂的效果、减少或消除它们重复使用或暴露时的效果，但也可以引起针对内源配体的致病性自身免疫应答、抑制其基本功能并引起内源性生理功能的永久损害。

[0230] 然而，工程化的多特异性和双特异性抗体试剂可引起抗药物抗体应答，与其它治疗性抗体类似，这些反应、及其相应的效果可以通过序列优化以匹配内源性抗体独特型和肽序列、以及通过优化蛋白表达和蛋白折叠、配制和递送系统而最小化。我们预期与其它治

疗性抗体类似地，如果存在抗药物抗体应答，在许多病因中将不破坏治疗功效。

[0231] 该途径的许多内源配体通过硫酸乙酰肝素结合结构域由细胞外基质蛋白天然地结合、或由其它细胞外基质蛋白天然地结合，起到在通过调节活性的那些组织中通过生物化学变化来激活之前、在潜在的活性位点处隔绝这些蛋白的作用。这些相互作用还可以限制施用的内源配体作用于靶细胞的能力。因此，这些蛋白可能不适于全身施用。靶向该途径的双特异性或多特异性抗体试剂可以全身施用，并且可以扩散至不同的组织隔室用于治疗效果。工程化的双特异性信号传导分子可以全身施用以靶向不同的组织用于更有利的分布和药效动力学。靶向该途径的双特异性或多特异性抗体试剂可选择地靶向归巢结构域以将它们的效果集中在特定的组织隔室。

[0232] 本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子或其免疫活性部分，即抗原结合部分。免疫球蛋白分子的免疫活性部分的实例包括F(ab)和F(ab')$_2$片段，其保持结合抗原的能力。这样的片段可以商购获得、或者使用本领域已知的方法获得。例如，F(ab)2片段可以通过用例如胃蛋白酶等酶处理抗体来产生，所述胃蛋白酶是通常产生一个F(ab)2片段和许多Fc部分的小肽的非特异性内肽酶。所得的F(ab)2片段由两个二硫键连接的Fab单元构成。Fc片段被广泛降解，并且可以通过透析、凝胶过滤或离子交换色谱法从F(ab)2分离。F(ab)片段可以使用木瓜蛋白酶产生，所述木瓜蛋白酶是一种非特异性硫醇-内肽酶，其在还原剂的存在下，将IgG分子消化为三个相似大小的片段：两个Fab片段和一个Fc片段。当Fc片段为目标时，木瓜蛋白酶是精选的酶，因为它产生50,00道尔顿Fc片段；为了分离F(ab)片段，可以例如通过使用蛋白A/G的亲和纯化来去除Fc片段。许多试剂盒可商购用于产生F(ab)片段。另外，可以使用用于产生抗原结合片段的商购服务，例如BioExpress，West Lebanon，NH。所述抗体至少是双特异性的(即，识别相同或不同抗原上的两个不同表位；参见，例如Brinkmann和Kontermann,MAbs.2017Feb-Mar;9(2):182-212)或多特异性的(即，显示识别多于2个表位；参见，例如Egan等人,MAbs.2017Jan;9(1):68-84)。

[0233] 抗体可以是去免疫化的或人源化的、完全人的、非人的如鼠的、或单链抗体。在一些实施方案中，所述抗体具有效应子功能并且能够固定补体。在一些实施方案中，抗体具有降低的与Fc受体结合的能力或没有。例如，抗体可以是不支持与Fc受体结合的同种型或亚型、片段或其它突变体，例如它具有诱变或缺失的Fc受体结合区。

[0234] 在优选实施方案中，抗体是单链抗体。可以工程化单链抗体(scFV)(参见，例如，Colcher等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.880:263-80(1999)；和Reiter,Clin.Cancer Res.2:245-52(1996)；Ahmad等人,Clin Dev Immunol.2012;2012:980250;Brinkmann和Kontermann,MAbs.2017Feb-Mar;9(2):182-212)。单链抗体可被二聚化或多聚化以产生对同一靶蛋白的不同表位为特异性的多价抗体。

[0235] 在一些实施方案中，本文所述的双特异性和多特异性试剂包含两种或更多种不同的scFV，每种scFV结合不同的蛋白靶标；每种scFv包括通过胞内抗体柔性肽接头连接在一起的重链(VH)和轻链(VL)的可变区。该胞内抗体接头应足够长以使VH和VL链适当地折叠和相互作用，并包含亲水性结构域。在一些实施方案中，胞内抗体接头包括Gly和Ser残基的延伸部(stretch)，任选地散布有带电的Glu和Lys以提高溶解性。参见，例如，Ahmad等人,Clin Dev Immunol.2012;2012:980250。

[0236] 然后，用柔性介体(interbody)接头将scFV连接在一起，例如5-50、15-40、或20-30

个氨基酸的柔性介体(interbody)接头(例如,至少5、10、15、或20个氨基酸,多至25、35、40或50个氨基酸,以及以前述数字为端点的所有范围)。介体接头可包括工程化接头,例如短丙氨酸接头(Ala3)、亲水性接头、富含甘氨酸-丝氨酸接头、螺旋接头、和衍生自各种免疫球蛋白和非免疫球蛋白分子的天然接头。Brinkmann和Kontermann,MAbs.2017Feb-Mar;9(2):182-212。在一些实施方案中,使用了20个残基$(G_4S)_4$接头或以下的一种或更多种情况:GGGGSG(SEQ ID NO:103);GGGGSGGGS(SEQ ID NO:104);GSGGGGDGGGGSG(SEQ ID NO:194);GGGGSGGGGSGDGSS(SEQ ID NO:195)、EGKSSGSGSDSKAS(SEQ ID NO:105)或EGKSSGSGSESKAS(SEQ ID NO:106);SGGGGSGGGGSSGSGGGGDGGGGSG(SEQ ID NO:192);SGGGGSGGGGSSGSGGGGDGGGGSGGT(SEQ ID NO:107);SGGSGGGGSSGGGGSGGGGSSGGGGDGGGGSG(SEQ ID NO:193);GSGGGGDSGGGGSGGGGSSGGGGSG(SEQ ID NO:195);GSGGGGDSGGGGSGGSGGSGGSGGSGGGGSG(SEQ ID NO:196);或SGGSGGGGSSGGGGSGGGGSSGGGGDGGGGSGGT(SEQ ID NO:108)。在一些实施方案中,接头之一还包括一个或更多个如两个、四个、六个或更多个组氨酸残基,例如,GGHHHHHHHHGG(SEQ ID NO:198);SGGGGSHHHHHHHHSGGGGS(SEQ ID NO:199);或SGGGGSGGHHHHHHHHGGSGGGGS(SEQ ID NO:200)。双特异性scFV可以是排列的VH-VL或VL-VH;高阶倍数同样可以以任何顺序排列。

[0237] 本领域已知的方法可用于产生抗原结合结构域用于I型和II型受体的每一种。例如,方法可包括从先前已用感兴趣的抗原(例如,I型或II型受体的全部或一部分)体内或体外免疫的哺乳动物(例如,小鼠)的脾脏获得分泌抗体的免疫细胞(淋巴细胞)。然后,分泌抗体的淋巴细胞与能够在细胞培养中无限复制的骨髓瘤细胞或转化的细胞融合,从而产生永生化的分泌免疫球蛋白的细胞系。培养所得融合细胞或杂交瘤,并筛选所得菌落以产生所需单克隆抗体。克隆产生这样的抗体的菌落,并在体内或体外生长以产生大量抗体。在Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975)中记载了融合这样的细胞的理论基础和实践方法,其通过引用并入本文。克隆的抗原结合区的序列可以用已知的方法确定。

[0238] 人I型或II型受体蛋白的示例性序列示于表A。

[0239] 表A-I型和II型BMPR

[0240]

受体	类型	NCBI GenBank RefSeq 登录号
激活素 A 受体样 1 型, ALK1, ACVRL1	I	NP_000011.2
激活素 A 受体 1 型, ALK2, ACVR1	I	NP_001096.1
骨形态发生蛋白受体 1A 型, ALK3, BMPR1A	I	NP_004320.2
激活素 A 受体 1B 型, ALK4, ACVR1B	I	NP_004293.1 亚型 (isoform) a NP_064732.3 亚型 b NP_064733.3 亚型 c
转化生长因子 β 受体 1, ALK5, TGFBR1	I	NP_004603.1 亚型 1 NP_001124388.1 亚型 2 NP_001293139.1 亚型 3
骨形态发生蛋白受体 1B 型, ALK6, BMPR1B	I	NP_001243722.1 亚型 a NP_001194.1 亚型 b
激活素 A 受体 1C 型, ALK7, ACVR1C	I	NP_660302.2 亚型 1 NP_001104501.1 亚型 2 NP_001104502.1 亚型 3 NP_001104503.1 亚型 4
激活素 A 受体 2A 型, ACTRIIA, ACVR2	II	NP_001607.1 亚型 1 NP_001265508.1 亚型 2
激活素 A 受体 2B 型, ACTRIIB, ACVR2B	II	NP_001097.2
骨形态发生蛋白受体 2 型, BMPR2, BMPR2	II	NP_001195.2
转化生长因子 β 受体 2, TGFBR2, TGFBR2	II	NP_001020018.1 亚型 a NP_003233.4 亚型 b
抗-缪勒氏管激素受体 2 型, AMHR2, AMHR2	II	NP_065434.1 亚型 1 NP_001158162.1 亚型 2 NP_001158163.1 亚型 3

[0241] 本文如在表1中提供了CDR和scFV的示例性序列。用于本抗体的序列可以与本文提供的序列为至少80％、85％、90％、95％、97％、或99％相同，只要它们保留结合靶标的能力和参考抗体的激动活性即可，例如参考抗体的活性水平的至少50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、或95％。两个序列之间的“同一性”的计算可以如下进行。为了最佳比较的目的，对序列进行对齐(例如，为了最佳对齐，可以在第一条和第二条核酸序列中的一条或两条中引入空位，并且为了比较的目的，可以忽略不相同的序列)。为了比较目的而对齐的序列的长度是参考序列的长度的至少70％(例如，至少80％、90％或100％)。然后比较相应核苷酸位置处的核苷酸。当第一条序列中的一个位置被与第二条序列中相应位置处相同的核苷酸占据时，那么所述分子在该位置是相同的。两条序列之间的百分比同一性是序列共享的相同位置的数量的函数，考虑到为了两条序列的最佳对齐而需要引入的空位的数量和每个空位的长度。

[0242] 序列的比较和两条序列之间的百分比同一性的确定可以使用数学算法来完成。在一些实施方案中，使用已整合至GCG软件包(可获得自gcg.com)中的GAP程序Needleman和Wunsch((1970)J.Mol.Biol.48:444-453)算法、使用任意Blossum 62矩阵、PAM250矩阵、NWSgapdna.CMP矩阵确定两条核苷酸序列之间的百分比同一性。在一些实施方案中，可以使用已整合至ALIGN程序(2.0版本)的E.Meyers和W.Miller((1989)CABIOS,4:11-17)的算法、使用PAM120权重残基表、12空位长度罚分和14空位罚分来确定两条氨基酸或核苷酸序列之间的百分比同一性。

[0243] 在一些实施方案中，本文所述的双特异性和多特异性试剂还可以包括或不包括来自已知抗I型或抗II型受体抗体的一个或更多个抗原结合结构域，例如，如表B或C中所提供的。

[0244] 表B-示例性抗I型或抗II型受体抗体序列

[0245]

公布号/期刊	作者/发明人/申请人	靶标	日期
Nature Structural Biology, 7(6):492-496	Kirsch T, Sebald W, 和 Dreyer MK	抗-BMPRIA	2000
US 2013/0089560	Chartier-Courtaud BC 和 Gurney AL	形态发生蛋白受体结合剂及其使用方法	2013
WO 2018/183376	Rigel Pharmaceuticals, Inc.	ACVR2A-特异性抗体及其使用方法	2018
US 2013/0344067	Acceleron Pharma, Inc.	ACVRL1 受体和配体拮抗剂及其用途	2013
US 7,537,762	Amgen Fremont Inc., Pfizer Inc.	针对激活素受体样激酶-1的人单克隆抗体	2009
US 10,428,148	Saitama Medical University, Daiichi Sankyo Company	抗-ACVR1	2019

[0246]

公布号/期刊	作者/发明人/申请人	靶标	日期
US 2016/0075772	Regeneron Pharmaceuticals	进行性骨化性纤维发育不良的治疗(抗-ACVR1)	2016
US 2015/0125471	INSERM, Universite Paul Sabater Toulose III, Centre National De La Recherche Scientifique	用于炎症的贫血的治疗和诊断的方法和药物组合物	2015
US 9,611,321	Fox Chase Cancer Center	合理设计的抗缪勒氏管已知物质 Ii 型受体抗体	2017
WO 2019/086331	BAYER AKTIENGESELLSCHAFT	双特异性抗体结合 ACVRL1 和 BMPR2	2019
US 9,969,806	Novartis AG	施用 BIMAGRUMAB 用于在髋骨折手术后改善肌肉质量和功能(抗-ACVR2A/B)	2018
WO 2011/056497	Genentech Inc.	激活素受体 IIB 型组合物及其使用方法	2010
US 10,260,068	Sumitomo Dainippon Pharma Co. Lt., Kyoto University	用于进行性骨化性纤维发育不良的预防剂和治疗剂(抗-ACVR1)	2019
US 9,493,556	Acceleron Pharma Inc.	ACVR2A 结合剂及其用途	2016
WO 95/30003	Creative Biomolecules Inc.,The Ludwig Institute for Cancer Research	形态发生蛋白-特异性细胞表面受体及其用途(I 和 II 型受体靶标)	1995
US 2011/0182904	Zimmerman D, Selby M, Srinivasan M, Bell M, Singh S, Leblanc HN, Zens KD, Sproul TW	针对骨形态发生蛋白的抗体及其受体和它们的使用方法	2011
EP 3345921	Knopf J, Seehra J, Kumar R	抗-ACTRIIB 抗体	2018
US 9,365,65	Feige J, Glass D, Hatakeyama S, Richardson BP, Trifilieff E	抗-ACTRIIB 抗体	2016
US 2017/0306027	Knopf J, Kumar R, Grinberg A, Pearsall RS, Sako DS, Castonguay R, Li G, Dagon Y	抗-ALK7 抗体	2017

[0247] 表C-来自WO2019086331的序列

[0248]

CDR	序列	SEQ ID NO:
第一双特异性抗体构建体(TPP-14696)		
链1 (TPP-13654/ 抗-ACVRL1)		
CDR H1	IYAMS	184.
CDR H2	AISGSGGSTYYADSVKG	185.
CDR H3	DFDY	186.
CDR L1	SGSSSNIGSNYVY	187.
CDR L2	GNINRPS	188.
CDR L3	AAWDDSLNGRV	189.
链2 (TPP-13667/ 抗-BMPR2)		
CDR H1	NAWMN	190.
CDR H2	SISSSSSYIYYADSVKG	191.
CDR H3	AVAAGGMFWGLDQ	192.
CDR L1	SGSRSNIGSNSVH	193.
CDR L2	GNSNRPS	194.
CDR L3	QSYDSSLNDHVV	195.

[0249]

CDR	序列	SEQ ID NO:
	第二双特异性抗体构建体 (TPP-14719)	
链1 (TPP-13660/抗-ACVRL1)		
CDR H1	SYAMS	196.
CDR H2	NINQDGSEKNYVDSMRG	197.
CDR H3	EFDY	198.
CDR L1	SGSSSNIGSNYVY	199.
CDR L2	GNNKRPS	200.
CDR L3	AAWDDSLNGRV	201.
链2 (TPP-13469/抗-BMPR2)		
CDR H1	DYYMT	202.
CDR H2	SISGGSTYYADSRKG	203.
CDR H3	DFGVAGWFGQYGMDV	204.
CDR L1	TGSSSNIGAGYDVH	205.
CDR L2	RSNQRPS	206.
CDR L3	SSYAGNYNLV	207.
	单个抗-ACVRL1抗体克隆	
TPP-13660		
CDR H1	SYAMS	208.
CDR H2	NINQDGSEKNYVDSMR	209.
CDR H3	EFDY	210.
CDR L1	SGSSSNIGSNYVY	211.
CDR L2	GNNKRPS	212.
CDR L3	AAWDDSLNGRV	213.

CDR	序列	SEQ ID NO:
TPP-13654		
CDR H1	IYAMS	214.
CDR H2	AISGSGGSTYYADSVKG	215.
CDR H3	DFDY	216.
CDR L1	SGSSSNIGSNYVY	217.
CDR L2	GNINRPS	218.
CDR L3	AAWDDSLNGRV	219.
	单个抗-BMPR2抗体克隆	
TPP-13667		
CDR H1	NAWMN	220.
CDR H2	SISSSSSYIYYADSVKG	221.
CDR H3	AVAAGGMFWGLDQ	222.
CDR L1	SGSRSNIGSNSVH	223.
CDR L2	GNSNRPS	224.
CDR L3	QSYDSSLNDHVV	225.
TPP-13469		
CDR H1	DYYMT	226.
CDR H2	SISGGSTYYADSRKG	227.
CDR H3	DFGVAGWFGQYGMDV	228.
CDR L1	TGSSSNIGAGYDVH	229.
CDR L2	RSNQRPS	230.
CDR L3	SSYAGNYNLV	231.

[0250]

[0251] 双特异性和多特异性抗体可例如在基因工程化细胞或动物中从例如包含编码所述抗体的序列的核酸表达，然后纯化。因此，本文还提供了编码所述抗体的核酸以及含有编码本文所述的抗体的核酸的载体，优选表达载体。如本文所用，术语“载体”指一种能够运输与其连接的另一核酸的核酸分子，并且可以包括质粒、粘粒、或病毒载体。载体能够自主复制或其可以整合至宿主DNA中。病毒载体包括例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒。

[0252] 载体可以包括适于在宿主细胞中表达核酸的形式的编码本文所述的抗体的核酸。优选地，重组表达载体包括一个或更多个与要表达的核酸序列可操作地连接的调控序列。术语“调控序列”包括启动子、增强子和其它表达控制元件(例如，多腺苷酸化信号)。调控序列包括指导核苷酸序列的组成型表达的那些、以及组织特异性调控和/或诱导序列。表达载

体的设计可取决于诸如要转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白质的表达水平等因素。本发明的表达载体可被引入宿主细胞中，从而产生由编码本文所述的抗体的本文所述核酸编码的蛋白质或多肽、包括融合蛋白质或多肽。

[0253] 重组表达载体可被设计用于在原核或真核细胞中表达本文所述的抗体。例如，本发明的多肽可以在大肠杆菌(E.coli)、昆虫细胞(例如，使用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。合适的宿主细胞进一步讨论于Goeddel,(1990)Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,CA。可选地，重组表达载体可以体外转录和翻译，例如使用T7启动子调控序列和T7聚合酶。本领域已知的方法可用于在表达或翻译后纯化本文所述的抗体，用于本文所述的方法或组合物。

[0254] 可选地，可以将编码本文所述的抗体的核酸、或用于表达核酸的载体(例如，病毒载体)递送至有需要的受试者。

[0255] V.抗体多肽的表达

[0256] 在操纵分离的遗传物质以提供本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物之后，通常将编码抗体的多核苷酸插入至表达载体中用于引入至可用于产生所需量的抗体的宿主细胞中。本文描述了抗体、或其片段、衍生物或类似物例如与靶分子结合的抗体的重链或轻链的重组表达。一旦获得了本文所述的编码抗体分子或抗体的重链或轻链、或其部分(优选含有重链或轻链可变结构域)的多核苷酸，用于生产抗体分子的载体可以使用本领域公知的技术通过重组DNA技术来产生。因此，本文描述了通过表达含有编码核苷酸序列的抗体的多核苷酸来制备蛋白质的方法。本领域技术人员公知的方法可用于构建含有抗体编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括，例如，体外重组DNA技术、合成技术、和体内基因重组。因此，本文提供了可复制载体，其包含可操作地连接至启动子的、编码本文所述的抗体分子、或其抗原结合片段、或其重链或轻链、或重链或轻链可变结构域的核苷酸序列。这样的载体可以包括编码抗体分子恒定区的核苷酸序列(参见，例如国际申请WO 86/05807和WO 89/01036;和美国专利号5,122,464)并且可以将抗体的可变结构域克隆至这样的载体中用于表达整个重链或轻链。

[0257] 本文所用的术语“载体”或“表达载体”是指根据本文所述的方法用作将所需基因导入宿主细胞并在宿主细胞中表达的运载体的载体。如本领域技术人员已知的，这样的载体可以容易地选自由质粒、噬菌体、病毒和逆转录病毒组成的的组。通常，本文所述载体将包含选择标记物、促进所需基因的克隆的合适的限制性位点和进入真核细胞或原核细胞和/或在真核细胞或原核细胞中复制的能力。可以使用多种表达载体系统。例如，一类载体利用源自动物病毒如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)或SV40病毒的DNA元件。其它的涉及使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。另外，可以通过引入允许转染的宿主细胞的选择的一种或更多种标记物来选择已将DNA整合至其染色体中的细胞。标记物可以提供营养缺陷型宿主的原营型(prototrophy)、杀微生物剂抗性(例如，抗生素)或对例如铜等重金属的抗性。可选择标记基因可以直接与要表达的DNA序列连接、或者通过共转化引入至同一细胞中。mRNA的最佳合成也可能需要额外的元件。这些元件可以包括信号序列、剪接信号、以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0258] 在特定实施方案中，如上所述，将克隆的可变区基因与重链和轻链恒定区基因(例

如,人重链和轻链恒定区基因)一起插入至表达载体中。可以使用任何能够在真核细胞中引起表达的表达载体。合适的载体的实例包括但不限于,质粒pcDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、和ZeoSV2(可获得自Invitrogen,San Diego,CA)、和质粒pCI(可获得自Promega,Madison,WI)。通常,对于表达合适的高水平的免疫球蛋白重链和轻链的那些的大量转化的细胞的筛选是可例如通过机器人系统进行的常规实验。载体系统也在美国专利号5,736,137和5,658,570中教导,其通过引用以其整体并入本文。该系统提供高表达水平,例如>30pg/细胞/天。其它示例性载体系统公开于例如美国专利号6,413,777。

[0259] 在其它实施方案中,本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物可以使用多顺反子构建体表达,例如在美国专利申请公开号2003-0157641A1中公开的那些,其以其整体并入本文。在这些表达系统中,多个感兴趣的基因产物如抗体的重链和轻链,可以从单个多顺反子构建体产生。这些系统有利地使用内部核糖体进入位点(IRES)以提供相对高的抗体水平。相容的IRES序列公开于美国专利号6,193,980,其也并入本文。本领域技术人员将理解,这样的表达系统可用于有效地产生本申请公开的全部抗体。

[0260] 更通常地,一旦制备了编码抗体的单体亚基的载体或DNA序列,可以将表达载体引入至合适的宿主细胞。质粒至宿主细胞的引入可通过本领域技术人员公知的各种技术来完成。这些包括但不限于,包括使用例如Fugene®或lipofectamine的脂转染的转染、原生质体融合、磷酸钙沉淀、包膜DNA的细胞融合、显微注射和完整病毒的感染。通常,质粒引入宿主是通过标准磷酸钙共沉淀法。携带表达构建体的宿主细胞在适合于生产轻链和重链的条件下生长,并测定重链和/或轻链蛋白的合成。示例性测定技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、或荧光激活细胞分选仪分析(FACS)、免疫组织化学等。

[0261] 通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生用于本文所述方法的抗体。因此,本文还提供了包含可操作地连接至异源启动子的、编码本文所述的抗体或其抗原结合片段、或其重链或轻链的多核苷酸的宿主细胞。在特定实施方案中,为了表达双链抗体,编码重链和轻链二者的载体可以在宿主细胞中共表达以表达完整免疫球蛋白分子,如下文中详细描述。

[0262] 宿主细胞可由两种本文所述表达载体共转染,第一种载体编码重链衍生多肽,第二种载体编码轻链衍生多肽。这两种载体可包含能够等量表达重链多肽和轻链多肽的相同的可选择标记物。可选地,可以使用编码重链和轻链二者的单一载体。在这种情况下,轻链有利地放置在重链之前以避免无毒重链过量;参见,Proudfoot,Nature 322(1986),52;Kohler,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(1980),2197。重链和轻链的编码序列可以包括cDNA或基因组DNA。

[0263] 如本文所用,“宿主细胞”是指含有使用重组DNA技术构建的并且编码至少一种异源基因的载体的细胞。在从重组宿主分离抗体的方法的描述中,除非另外明确说明,否则术语“细胞”和“细胞培养物”可交换地用于表示抗体的来源。换言之,从“细胞”中回收多肽可以意味着从离心(spun down)的全细胞、或者从含有培养基和悬浮细胞二者的细胞培养物中回收多肽。

[0264] 可以使用各种宿主表达载体系统以表达用于本文所述方法的抗体分子。这样的宿主表达系统代表可以通过其产生并随后纯化感兴趣的编码序列的载体,但是也代表当用适

当的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本文所述的抗体分子的细胞。这些包括但不限于,微生物,例如用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(B.subtilis));用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酵母菌属,毕赤酵母属(Pichia));用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染的或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或携带重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、NSO、BLK、293、3T3细胞),所述重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。在一些实施方案中,使用例如大肠杆菌等细菌细胞、更优选真核细胞、特别是用于表达整个重组抗体分子的,用于重组抗体分子的表达。例如,诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞等哺乳动物细胞与例如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件等载体的结合,是抗体的有效表达系统;参见,例如,Foecking等人,Gene 45(1986),101;Cockett等人,Bio/Technology 8(1990),2。

[0265] 用于蛋白表达的宿主细胞系通常是哺乳动物来源的;本领域技术人员被认为有能力确定最适合在其中表达所需基因产物的特定宿主细胞系。示例性宿主细胞系包括但不限于,CHO(中国仓鼠卵巢)、DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢系,DHFR减)、HeLa(人宫颈癌)、CVI(猴肾系)、COS(CVI与SV40T抗原的衍生物)、VERY、BHK(幼仓鼠肾)、MDCK、WI38、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、P3x63-Ag3.653(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)和293(人肾)。在特定实施方案中,宿主细胞系是CHO或293细胞。宿主细胞系通常可从商业服务、美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection)或公开文献中获得。

[0266] 此外,可以选择调节插入的序列的表达、或者以所需特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这样的修饰(例如糖基化)和加工(例如切割)对于蛋白质的功能可为重要的。不同的宿主细胞具有蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特性和特定机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此,可以使用具有用于基因产物的初级转录本的适当的加工、糖基化、和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。

[0267] 对于重组蛋白的长期、高产率生产,优选稳定表达。例如,可以工程化稳定表达抗体分子的细胞系。不使用含有病毒复制原点的表达载体,可以用通过适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)、和可选择标记物来控制的DNA转化宿主细胞。在引入外源DNA后,可使工程化细胞在富集培养基中生长1-2天,然后切换到选择性培养基。重组质粒中的可选择标记物赋予选择抗性,并允许细胞稳定地将质粒整合至它们的染色体中并生长形成焦点(foci),所述焦点反过来可被克隆和扩增至细胞系中。该方法可有利地用于工程化稳定表达抗体分子的细胞系。

[0268] 可以使用许多选择系统,包括但不限于,单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,Cell 11(1977),223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska&Szybalski,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48(1992),202)、和胸嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等人,Cell 22(1980),817)基因可分别用于tk-、hgprt-或aprt-细胞。此外,抗代谢物抗性可用作以下基

因的选择的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等人,Natl.Acad.Sci.USA 77(1980),357;O'Hare等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78(1981),1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78(1981),2072);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性Goldspiel等人,Clinical Pharmacy 12(1993),488-505;Wu和Wu,Biotherapy 3(1991),87-95;Tolstoshev,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32(1993),573-596;Mulligan,Science 260(1993),926-932;和Morgan和Anderson,Ann.Rev.Biochem.62(1993),191-217;TIB TECH 11(1993),155-215;和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,Gene 30(1984),147。可使用的重组DNA技术的本领域通常已知的方法描述于Ausubel等人(eds.),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY(1993);Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);和在章节12和13中,Dracopoli等人(eds),Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY(1994);Colberre-Garapin等人,J.Mol.Biol.150:1(1981),其通过引用以其整体并入本文。

[0269] 抗体分子的表达水平可以通过载体扩增来提高,对于综述,参见Bebbington和Hentschel,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,Academic Press,New York,Vol.3.(1987)。当表达抗体的载体系统中的标记物为可扩增的时,存在于宿主细胞的培养物中的抑制剂的水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体基因相关,抗体的产生也将增加;参见Crouse等人,Mol.Cell.Biol.3(1983),257。

[0270] 体外生产允许扩大以得到大量的所需多肽。本领域已知组织培养条件下的哺乳动物细胞培养的技术,包括均匀悬浮培养,例如在气升式反应器或连续搅拌器反应器中,或固定化或截留细胞培养,例如在中空纤维、微胶囊中、在琼脂糖微珠或陶瓷盒上。根据需要和/或期望的,多肽的溶液可通过常规色谱法纯化,例如凝胶过滤、离子交换色谱法、DEAE-纤维素上的色谱法或(免疫-)亲和色谱法,例如在合成铰链区多肽的优先生物合成之后或在本文所述的HIC色谱法步骤之前或之后。

[0271] 编码本文所述的抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物的基因也可在例如细菌或昆虫或酵母或植物细胞等非哺乳动物细胞中表达。容易摄取核酸的细菌包括肠杆菌科的成员,例如大肠杆菌或沙门氏菌的菌株;芽孢杆菌科,例如枯草芽孢杆菌;肺炎球菌;链球菌、和流感嗜血杆菌。进一步将理解地,当在细菌中表达时,异源多肽通常成为包涵体的一部分。异源多肽必须被分离、纯化、然后组装成功能性分子。当需要四价形式的抗体时,则亚基将自组装成四价抗体;参见,例如国际申请WO02/096948。

[0272] 在细菌系统中,可以根据用于表达的抗体分子的用途有利地选择许多表达载体。例如,当为了生产抗体分子的药物组合物要大量生产这样的蛋白质时,指导易于纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体可以是理想的。这样的载体包括但不限于,大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等人,EMBO J.2(1983),1791),其中抗体编码序列可以在具有lacZ编码区的框内单独地连接至载体,使得产生融合蛋白;pIN载体(Inouye&Inouye,核酸s Res.13(1985),3101-3109;Van Heeke&Schuster,J.Biol.Chem.24(1989),5503-5509);等。pGEX载体也可用于表达外源多肽作为与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白。通常,这样的融合蛋白是可溶的,并且可以通过吸附和结合谷胱甘肽-琼脂糖珠的基质,然后在游离谷胱甘肽的

存在下洗脱而容易地从裂解的细胞纯化。pGEX载体设计成包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点，使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0273] 除了原核生物以外，也可以使用真核微生物。酿酒酵母或普通面包酵母是真核微生物中最常用的，尽管通常可获得许多其它菌株，例如毕赤酵母。对于在酵母菌中的表达，通常使用质粒YRP7，例如(Stinchcomb等人，Nature 282(1979)，39；Kingsman等人，Gene 7(1979)，141；Tschemper等人，Gene 10(1980)，157)。该质粒已经包含TRP1基因，其为缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变株提供选择标记物，例如ATCC No.44076或PEP4-1(Jones，Genetics 85(1977)，12)。Trpl损害的存在作为酵母宿主细胞基因组的特征，然后提供了用于检测在缺少色氨酸的情况中通过生长转化的有效环境。

[0274] 在昆虫系统中，苜蓿尺蠖核型多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus，AcNPV)通常用作表达外源基因的载体。所述病毒在草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞中生长。可以将抗体编码序列单独地克隆至病毒的非必需区域(例如多角体蛋白基因)中，并且置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制之下。

[0275] 一旦重组表达了本文所述的抗体，可以根据本领域的标准方法、或通过用于纯化蛋白的任何其它标准技术纯化本文所述的完整抗体、它们的二聚物、单个轻链和重链、或其它免疫球蛋白，所述标准方法包括例如通过色谱法(例如，离子交换、亲和、特别是蛋白质A后对特定抗原的亲和力、和定径柱(sizing column)色谱法)、离心、不同溶解度，例如硫酸铵沉淀；参见，例如Scopes，"Protein Purification"，Springer Verlag，N.Y.(1982)。可选地，美国专利公开2002-0123057A1中公开了增加本文所述的抗体的亲和力的另一种方法。

[0276] VI.使用方法

[0277] 本发明的组合物和方法可以多种方式使用，包括用于研究和治疗。

[0278] 例如，异位骨化(HO)，骨骼肌和软组织中异位软骨内骨的形成，是来自关节不活动和疼痛的发病率的重要原因。负责HO的准确机理尚不清楚；然而，其与创伤、炎症和生物力学应激的关联提示了紊乱的损伤修复和内稳态的过程。我们探索了通过激活骨形态发生蛋白(BMP)I型受体ALK2的突变导致的HO、进行性骨化性纤维发育异常(FOP)的单基因病因的根本机制，然而，创伤诱导的HO似乎由ALK2、ALK3和潜在的ALK6调节。FOP和获得形式的HO共享不适当的BMP信号传导的共同机制，但是BMP信号被解释为调节骨化与组织再生的方式仍然不完全清楚。

[0279] BMP9是一种多功能配体，在肺动脉高压的动物模型中，它能引起血管内皮的静止并且有针对肺血管疾病的保护作用。然而，在一些情况中，用BMP9治疗动物可导致异位骨化、或在注射部位处的软组织中的不希望的异位骨形成。BMP9与II型受体BMPRII，ACTRIIA和ACTRIIB结合。并与I型受体ALK1和ALK2结合。提出了通过使BMPR2和ALK1结合，双特异性抗体试剂可引起BMP9的血管内皮静止效应，这归因于BMPR2和ALK1的激活，而不会引起异位骨化，这归因于例如组织-驻留纤维脂肪生成祖细胞等具有成骨潜能的细胞中任何这些II型受体与ALK2结合的激活，并且没有潜在地由于肝脏中任何II型受体与ALK2的激活而导致肝脏坏死。通过靶向ALK1来调节功能的特异性，这是内皮受限的，并且与内皮BMP9信号传导功能结合，与ALK2相比，这在整个所有组织中表达并且特别是在负责异位骨化的间充质干细胞上表达，并且与例如BMP6和BMP7等高成骨分子的信号传导相关。

[0280] 因此，提供了识别BMPR2和ALK1以复制BMP9的信号传导的示例性双特异性抗体，用于治疗血管病况包括肺动脉高压和遗传性出血性毛细血管扩张(HHT)综合征。其它实例列于下表D。

[0281] 表D-双特异性BMP/TGFβ信号传导Ab的潜在肌肉骨骼和结缔组织疾病应用

靶标组合	治疗用途
抗-ACTRIIA + 抗-ALK2	软骨生成，软骨修复；骨折愈合，不粘连，假体工程；血色沉着症
抗-ACTRIIA + 抗-ALK3	褐色脂肪脂肪生成；代谢综合征；肾纤维化
抗-BMPRII + 抗-ALK3	骨生成；骨折愈合；不粘连；假体骨工程；血色沉着症
抗-BMPRII + 抗-ALK6	腱修复，愈合，和重构
抗-TGFBRII + 抗-ALK5	马凡综合征，Loeys-Dietz 综合征；实体瘤
抗-BMPRII + 抗-ALK7	用于重构或美容手术的脂肪生成
抗-AMHRII + 抗-ALK6	卵巢癌；调节生育力/避孕

[0282]

[0283] 因此，本文提供了包含抗-BMPRII/抗-ALK1双特异性抗体的治疗性分子，其可用于例如通过抗-BMPRII/抗-ALK1双特异性抗体增强该疾病中缺乏的BMP9信号传导来治疗肺动脉高压，而没有由于ALK2信号传导导致的BMP9的异位骨化作用，通过避免也与内源BMP9相关的ALK2信号传导的招募，从而避免对肝坏死和再生的不良影响。

[0284] 本文所述的方法还可包括通过抗-BMPRII/抗-ALK1双特异性抗体增强该疾病中缺陷型BMP9信号传导来治疗遗传性出血性毛细血管扩张症；通过抗-BMPRII/抗-ALK1双特异性抗体复制缺陷型BMP9信号传导来治疗急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ALI)或其它肺血管渗漏综合征；治疗各种其它血管疾病，其中内皮功能障碍可以通过抗-BMPRII/抗-ALK1双特异性抗体复制缺陷型BMP9信号传导来进行调节；通过抗-BMPRII/抗-ALK1双特异性抗体复制缺陷型肝内BMP9信号传导来治疗肝纤维化。

[0285] 所述方法还可包括通过抗-BMPRII/抗ALK3、抗-BMPRII/抗ALK2、抗ACTRIIA/抗ALK3、或抗ACTRIIA/抗ALK2双特异性抗体来治疗肾纤维化。理想的靶向分子的鉴定将取决于具有最抗纤维化作用和最小异位成骨作用的信号传导分子的鉴定。

[0286] 所述方法还可包括治疗骨折、矫正骨折不粘连、或骨融合的诱导，使用抗-BMPR2/抗-ALK3双特异性抗体复制BMP2、BMP4、或BMP6信号传导，以促进成骨细胞分化和骨矿化，从而促进软骨内骨形成。

[0287] 所述方法还可包括治疗骨折、矫正骨折不粘连、或骨融合的诱导，使用抗-BMPR2或抗ACTRIIA与抗ALK2双特异性抗体复制BMP6、BMP7或BMP8信号，以通过软骨细胞分化促进软骨形成，从而促进软骨内骨形成。

[0288] 所述方法还可包括使用抗-BMPR2/抗-ALK3或抗-BMPR2/抗-ALK2双特异性抗体离体或体外诱导成骨或软骨分化用于软骨或骨组织的工程。

[0289] 治疗性分子包括抗-BMPR2/抗-ALK3、抗-BMPR2/抗-ALK2、抗-ACTRIIA/抗-ALK3、或

抗-ACTRIIA/抗-ALK2双特异性抗体，可用于例如通过激活BMPRII和ALK3(或ALK2)、或通过激活ACTRIIA和ALK2(或ALK3)体外诱导骨形成，用于创伤、重建手术、或矫形、脊柱或神经外科手术后的骨的治疗工程。本文还提供了治疗性分子包括抗-BMPR2/抗-ALK3或抗-ACTRIIA/抗-ALK2双特异性抗体用于诱导肝脏中铁调素(hepcidin)表达，和通过刺激肝脏中BMPRII和ALK3、或ACTRIIA和ALK2的活性，降低例如输液依赖性贫血、β-地中海贫血和血色沉着症等病况中的铁过载(iron overload)。

[0290] 包括抗-ACTRIIB/抗-ALK7双特异性抗体的示例性治疗性分子可用于经由ACTRIIB和ALK7的激活诱导脂肪生成，用于重建和美容手术应用。这些试剂可原位用于整形手术、矫形和重建外科应用、或离体用于来自患者来源的或人祖细胞的生物植入物的制造。

[0291] 用于靶向BMPRII或ACTRIIA与ALK2一起的、包括抗-BMPR2/抗-ALK2或抗-ACTRIIA/抗-ALK2的治疗性分子可用于促进褐色脂肪脂肪生成，以通过提高能量利用率来改善或纠正代谢综合征、肥胖、或糖尿病和相关病症。

[0292] 包括抗-BMPR2/抗-ALK6或抗ACTRIIA/抗-ALK6双特异性抗体的治疗性分子，可以用于例如经由BMPRII或ACTRIIA和ALK6的激活，通过模拟具有腱电位的腱祖组织或间充质干细胞中GDF5、GDF6、和GDF7的组织特异性作用，诱导腱形成。这些试剂可原位用于矫形和重建手术应用、或离体用于来自患者来源的或人祖细胞的生物植入物的制造。

[0293] 包括抗-TGFBRII/抗-ALK5、抗-TGFBRII/抗-ALK4、抗-ACTRIIA/抗-ALK5或抗-ACTRIIA/抗-ALK4、抗-ACTRIIB/抗-ALK5或抗-ACTRIIB/抗-ALK4双特异性抗体的治疗性分子，可以用于例如通过激活TGFBRII和ALK5、或经由激活TGFBRII和ALK4、或可选地ACTRIIA或ACTRIIB和ALK4或ALK5来诱导肿瘤细胞的生长停滞。

[0294] 包括抗-TGFBRII/抗-ALK5抗-TGFBRII/抗-ALK4双特异性抗体的治疗性分子，可以用于例如经由激活TGFBRII和ALK5、或经由激活TGFBRII和ALK4诱导纤维化组织的形成用于重构或美容手术应用，或经由激活TGFBRII和ALK5、或经由激活TGFBRII和ALK4用于治疗马凡病、Loeys-Dietz综合征、和由于失调的或缺陷型TGFBRII信号传导导致的其它主动脉病。

[0295] 包括抗-ACTRIIA/抗-ALK5或抗-ACTRIIA/抗-ALK4双特异性抗体的治疗性分子，可以用于例如靶向ACTRIIA和ALK4或ALK5，以抑制病理性肥大，例如肥厚性心肌病、或高血压性心脏病中所见的。

[0296] 经由双特异性抗体可以靶向受体的其它组合以在组织和细胞中诱导新的生理效应。例如：抗-TGFBR2/抗-ALK3；抗-BMPR2/抗-ALK4；抗-BMPR2/抗-ALK5可以诱导由I型受体所决定的生理机制(分别通过ALK3模拟BMP2/4、通过ALK4模拟GDF8/11、和通过ALK5模拟TGFb1/3的骨生成、抗肌生成、或纤维化)，但是在表达II型和I型受体的该特异性补体的高度受限的组织亚群中。可选地，这些新的或非天然信号传导组合可以引起由内源配体所没有看到的独特生物学，但是可以是治疗上有用的。这样的生物学可诱导不与矿化相关的软骨生成、或矿化不与软骨生成相关。

[0297] 在任何上述双特异性抗体或应用中，抗-AMHRII、抗-ACTRIIA或抗-ACTRIIB可以和抗-BMPRII与给定抗I型受体抗体组合交换，以实现类似的、更有效的、或更多的组织选择性作用。

[0298] 如在本文中所用，“治疗”是指改善病症的至少一种症状的手段。施用治疗有效量的本文所述化合物用于治疗病况将导致至少一种症状或临床参数的改善。

[0299] VII.药物组合物和施用方法

[0300] 本文所述的方法包括使用含有本文所述的双特异性抗体作为活性成分的药物组合物。

[0301] 药物组合物通常包含药学上可接受的载体。本文所用的语言“药学上可接受的载体”包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。补充活性化合物也可混入组合物中。

[0302] 通常将药物组合物配制成与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外、例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、经皮(局部)、经粘膜和直肠施用。

[0303] 配制合适药物组合物的方法是本领域已知的,参见,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,2005;和Drugs and the Pharmaceutical Sciences:a Series of Textbooks and Monographs(Dekker,NY)系列丛书。例如,用于肠胃外、皮内、或皮下施用的溶液或悬浮液可以包含以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂如氯化钠或葡萄糖。pH可以用例如盐酸或氢氧化钠等酸或碱调节。肠胃外制剂可封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0304] 适用于可注射用途的药物组合物可包括无菌水溶液(其中为水溶性的)或用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的分散体和无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况中,组合物必须是无菌的,并且应当是达到容易注射的程度的流体。它在制造和储存条件下应当是稳定的,并且必须保存免于例如细菌和真菌等微生物的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其包括例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、及其合适的混合物。可以维持适当的流动性,例如通过使用诸如卵磷脂等涂层、通过在分散的情况下保持所需的颗粒尺寸和通过使用表面活性剂。通过例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、和硫柳汞等各种抗细菌和抗真菌剂可以实现防止微生物的活动。在许多情况下,组合物中优选包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇、氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包括例如单硬脂酸铝和明胶等延迟吸收的试剂来实现。

[0305] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物与上述枚举的一种成分或多种成分的组合根据需要混入适当的溶剂中、然后过滤除菌来制备。通常,分散体是通过将活性化合物混入无菌溶媒来制备的,所述无菌溶媒含有基础分散介质和所需的来自上述枚举的那些的其它组分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从先前无菌过滤的溶液中产生活性成分和任何附加的所需成分的粉末。

[0306] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。出于口服治疗施用的目的,活性化合物可与赋形剂混合、并以片剂、锭剂、或胶囊如明胶胶囊的形式使用。口服组合物也可使用用作漱口剂的流体载体制备。可以包含药学上相容的结合剂、和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以包含任何以下成分、或类似性质的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖,崩解剂,例如海藻酸、

Primogel或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或矫味剂,例如薄荷、水杨酸甲酯或柑橘调味品。

[0307] 对于通过吸入施用,所述化合物可以以来自含有适当的推进剂例如气体如二氧化碳的压力容器或分配器、或喷雾器的气溶胶喷雾剂的形式递送。这样的方法包括美国专利号6,468,798中所述的那些。

[0308] 本文所述的治疗性化合物的全身施用也可以通过经粘膜或经皮方法。对于经粘膜或经皮施用,适于要渗透的屏障的渗透剂用于制剂中。这样的渗透剂在本领域中通常是已知的,并且包括例如,用于经粘膜施用的渗透剂、洗涤剂、胆盐、和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来完成。对于经皮施用,活性化合物被配制成软膏剂、药膏、凝胶剂、或霜剂,如本领域中通常已知的。

[0309] 药物组合物也可以制备成栓剂(例如,用例如可可脂和其它甘油酯等常规栓剂基质)或用于直肠施用的保留灌肠剂。

[0310] 可以通过任何适于施用例如DNA疫苗等核酸试剂的方法施用作为或包含核酸的治疗性化合物。这些方法包括基因枪、生物注射器、和皮肤贴剂以及无针方法,例如美国专利号6,194,389中公开的微颗粒DNA疫苗技术,和美国专利号6,168,587中公开的使用粉末形式疫苗的哺乳动物经皮无针疫苗接种。此外,鼻内递送也是可能的,除了其它的以外,如Hamajima等人,Clin.Immunol.Immunopathol.,88(2),205-10(1998)中所述。也可以使用脂质体(例如,如美国专利号6,472,375中所述)和微胶囊。也可以使用可生物降解的可靶向微粒递送系统(例如,如美国专利号6,471,996中所述)。

[0311] 在一个实施方案中,治疗性化合物用将保护所述治疗性化合物免于从体内迅速消除的载体制备,例如控释制剂,包括植入物和微胶囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、和聚乳酸。这样的制剂可以使用标准技术制备,或者市售可得,例如来自Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals,Inc。脂质体悬浮液(包括具有针对细胞抗原的单克隆抗体的靶向所选细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备,例如,如美国专利号4,522,811中所述。

[0312] 药物组合物可与施用说明一起包含在容器、包装或分配器中。

[0313] 实施例

[0314] 在以下实施例中进一步描述了本发明,这些实施例并不限制权利要求中所述的本发明的范围。

[0315] 材料和方法

[0316] 在下文中的实施例中使用以下材料和方法。

[0317] 细胞培养和免疫印迹分析

[0318] 将肺动脉内皮细胞(PAEC,患者#593089,Lonza)以每孔400,000个细胞接种在12孔板(Falcon™聚苯乙烯微板,Corning#353043)上的完全培养基(Lonza#CC-3156和#CC-4178)中。在37℃和5.0% CO_2下孵育过夜后,用PBS(GIBCO#14190-144)洗涤细胞,用新鲜培养基补料,并孵育24小时。用PBS漂洗PAEC两次,并在具有0.1% FBS(GIBCO#A3160402)的基础培养基中饥饿(starved)24小时。用两种最有前途的生物素化scFv组合(ALK1.8和BMPR2.12)各自以10ng/mL预孵育所选孔60分钟;然后在各种共处理中,用1ng/mL的rhBMP9(R&D

3209BP-CF)、1mg/mL链霉亲和素(ThermoFisher#21122)、和10ng/mL单克隆BMP9中和抗体(R&D MAB3209)处理1小时。用PBS洗涤孔并在80mL的1x NuPAGE LDS样品缓冲液(ThermoFisher#NP0007)中收获。在100℃下孵育样品5分钟,然后通过电泳分离,并通过免疫印迹法、使用识别磷酸化形式的SMAD1/3(Abcam 52903)、SMAD1/5/8(Cell Signaling,Technology,CST#9516)、和SMAD2(CST#3108)的特异性抗体、使用总Smad1(CST#6944)和GAPDH(Thermo Fisher MA5-15738-HRP)作为管家标记物进行分析。用SuperSignal™ West Femto最高灵敏度底物(ThermoFisher#34096)和Kodak Carestream体内MS-FX Pro多光谱成像系统检测免疫印迹。

[0319] 将来自野生型和Acvrl1 KO小鼠的肺微血管内皮细胞(PMVEC)以每孔400,000个细胞接种在12孔板(Falcon™聚苯乙烯微板,Corning#353043)上的完全培养基(Lonza#CC-3156和#CC-4178)中。在37℃和5.0% CO_2下孵育过夜后,用PBS(GIBCO#14190-144)洗涤细胞,用新鲜培养基补料,并孵育24小时。用PBS漂洗PAEC两次,并在具有0.1% FBS(GIBCO#A3160402)的基础培养基中饥饿24小时。用两种最有前途的生物素化scFv组合(ALK1.8和BMPR2.12)各自以10ng/mL预孵育所选孔60分钟;然后在各种共处理中,用1ng/mL的rhBMP9(R&D 3209BP-CF)、1ug/mL链霉亲和素(ThermoFisher#21122)、和10ng/mL单克隆BMP9中和抗体(R&D MAB3209)处理1小时。用PBS洗涤孔并在80mL的1x NuPAGE LDS样品缓冲液(ThermoFisher#NP0007)中收获。在100℃下孵育样品5分钟,然后通过电泳分离,并通过免疫印迹法、使用识别磷酸化形式的SMAD1/3(Abcam#52903)、SMAD1/5/8(CST#9516)、和SMAD2(CST#3108)的特异性抗体、使用总Smad1 SMAD1(CST#6944)和GAPDH(Thermo Fisher MA5-15738-HRP)作为管家标记物进行分析。用SuperSignal™ West Femto最高灵敏度底物(ThermoFisher#34096)和Kodak Carestream体内MS-FX Pro多光谱成像系统检测免疫印迹。

[0320] 生物素化过程

[0321] 生物素化最有前途的scFv克隆,从而在用链霉亲和素刺激时交联受体。使用具有截留为7KDa的Zeba™离心脱盐柱(ThermoFisher#89889)透析,然后使用DSB-X™生物素蛋白标记试剂盒(ThermoFisher#D20655)缀合。

[0322] 通过免疫印迹法、使用链霉亲和素-HRP(ThermoFisher#21130)证明了生物素化过程的功效。通过生物膜干涉技术(BLI,Octet Red)分析证明了结合亲和力和特异性的保持,以确证生物素化-scFv蛋白以特定方式结合固定化ALK1和BMPR2受体的能力。

[0323] 细胞内蛋白质免疫(In-Cell Western)

[0324] 将端粒酶-永生化微血管内皮(TIME)细胞培养物接种在高结合96孔板(Corning#3340)上的完全培养基(ATCC#100-030和100-041)中,生长至汇合,并去除血清24小时。在各种共处理中,用rhBMP9(20pM)、scFv蛋白(500pg/mL)、和链霉亲和素(1mg/mL)处理TIME细胞。用PBS洗涤板两次,并用冷甲醇(Fisher#412)固定、洗涤、渗透、洗涤、用TBS(ThermoFisher#J75892)中2% BSA(Fisher#BP1600)封闭。添加对p-SMAD1/5(CST#9516)或p-SMAD2(CST#8828)为特异性的一抗(1:1000稀释),然后添加二抗(HRP抗-兔IgG,CST 1:10000)。洗涤后,使用BioFx超灵敏化学发光底物(Surmodics)进行分析,并在SpectraMax板光度计上以0.25秒积分进行分析。

[0325] 荧光素酶测定

[0326] 将牛主动脉内皮细胞(BAEC,Sigma-Aldrich#B304-05)以每孔31,000个细胞的浓度接种在96孔板(Corning#3340)上的完全培养基(Lonza,#CC-3156和CC-4176)中。第二天,如转染试剂方案中所述,使用每孔60ng/mL的PolyJet(SignaGen,SL100688)和20ng/mL的BRE-LUC质粒转染细胞。16小时后,用PBS洗涤细胞两次,用还原型血清培养基补料用于24小时恢复。次日,用PBS洗涤BAEC,并使其饥饿6小时(FBS 0.1%);用20pM rhBMP9、20nM的ALK1-Fc(R&D#370AL)和20nM的不同scFv进行处理;然后在37℃和5.0%CO_2下孵育过夜。

[0327] 第二天,我们使用MTS测定(Promega#G3582)测试细胞活力,并进行如Promega试剂盒(#1500)所述的荧光素酶活性测定。在SpectraMax板光度计上以0.25秒积分对板进行读数。

[0328] Octet Red

[0329] 为了表征scFv克隆与重组人ALK1和BMPR2受体的生物化学相互作用,我们使用生物膜干涉技术(Octet Red 384,ForteBio)。将表达为IgG Fc融合蛋白(即,ALK1-Fc、和BMPR2-Fc)的受体在PBS中HEPES 20mM(GIBCO#15630)、0.05% Tween-20(Promega#H5151)、和咪唑25mM(SIGMA #I0250)的平衡缓冲液中、以10μg/mL的浓度固定在抗人IgG Fc捕获传感器(ForteBio,#18-0015)上。所有克隆以平衡缓冲液中的不同浓度范围进行试验:50nM、100nM、200nM、和400nM。ForteBio程序方法如下设定:基线平衡60s,加载时间60s,洗涤时间120s,结合时间300s,和解离时间600s。使用ForteBio数据分析软件分析结合动力学。

[0330] 实施例1.用于BMP/TGFβ受体胞外结构域的单链Fv(scFv)Ab可以调节信号传导和形成功能性配体

[0331] 我们进行筛选以鉴定一组与ALK1和BMPR2即I型和II型受体的胞外结构域结合、形成用于内皮特异性配体BMP9的信号传导复合体的人scFv Ab。[6,7]对表达源自人种系V_H和V_L基因的单链可变区(scFv)Ab的～10^{12}个不同噬菌体颗粒的组合多样性文库筛选与重组人ALK1-Fc或BMPR2-Fc胞外结构域-IgG Fc融合蛋白结合、而不与IgG Fc自身结合的噬菌体克隆,对于固定化重组ALK1或BMPR2蛋白使用顺序亲和纯化,并耗竭非特异性克隆,揭示了了几个感兴趣的克隆。三轮富集产生了一组与ALK1或BMPR2结合而不与二者结合、并且具有独特序列的scFv。将这些噬菌体序列亚克隆至scFV表达载体中用于在大肠杆菌中放大和纯化。对于各个靶标,基于Octet Red生物膜干涉技术(BLI,Fortebio),几个scFv片段对其预期靶标表现出中等至高的亲和力(K_D～20-200nM),并且即使在低取代比生物素化(平均每分子1.5-2个位点)之后,也保持了这种亲和力和特异性,保留了与一种受体而不是另一种受体的结合,并且不控制ACTRIIA-Fc蛋白。使用PARATOME在线工具预测CDR序列(Kunik等人,PLoS Comput Biol 8(2):e1002388(2012);Kunik等人,Nucleic Acids Res.2012Jul;40(Web Server发行):W521-4(2012))。因此,选择与各抗原结合的几个scFv候选物,通过ELISA证明其活性,并将序列克隆至表达载体中,并以单链Fv蛋白的形式表达。

[0332] 通过生物膜干涉技术(BLI)筛选单链可变片段阳性克隆针对ALK1和BMPR2的结合效率。

[0333] 生物膜干涉技术用于确定scFv克隆对人BMPR2和ALK1受体的亲和力。示出了scFv克隆ALK1.3(图1A)和ALK1.8(图1B)相对于固定化ALK1;和BMPR2.12(图1C)和BMPR2.23(图1D)相对于BMPR2的结合动力学。还试验了这些克隆针对固定化ALK1(图2A)相对于BMPR2(图2B)的特异性,表明这些克隆中的每一个都显示出对其预期靶标、而不是高度同源的对照蛋

白人ACVR2A受体的亲和力(图1和2C)。

[0334] 针对BMPR2或ALK1的scFv体外抑制BMP9信号传导。

[0335] 为了测试所选单链抗体识别人ALK1和BMPR2受体的胞外配体结合结构域的能力，经由通过从人ID1基因克隆的BMP应答元件启动子序列调控的表达萤火虫荧光素酶的质粒，我们使用利用BMP应答元件荧光素酶(BRE-荧光素酶)报告子的BMP转录活性的基于细胞的检测。在存在/不存在不同浓度的scFv蛋白的情况下，用rhBMP9(1ng/mL)刺激转染的细胞过夜。BMP9配体陷阱ALK1-Fc也用作阳性对照。scFV克隆BMPR2.12、BMPR2.23、ALK1.3、和ALK1.8表现出BRE-荧光素酶活性的最有效抑制，表明这些scFv蛋白结合人ALK1和BMPR2受体的与配体结合相关的区域(图3)。

[0336] scFv蛋白的生物素化

[0337] 如材料和方法部分所述，生物素化ALK1.3、ALK1.8、BMPR2.12、和BMPR2.23 scFv。通过免疫印迹分析试验所得生物素化scFv以表明它们成功的生物素化(图4A)。

[0338] 生物素化scFv针对ALK1和BMPR2的结合效率和特异性

[0339] 为了证实scFv的生物素化不干扰其结合能力，使用生物膜干涉技术再次筛选阳性生物素化克隆和野生型克隆。生物素化ALK1.3和ALK1.8 scFv蛋白(ALK1.3-Bio、ALK1.8-Bio，图4B和4D)和BMPR2.12 scFv蛋白(BMPR2.12-Bio，图4C)保留了对其预期靶标的亲和力，同时基于缺少对高度同源的对照蛋白的亲和力而维持特异性。

[0340] 靶向ALK1和BMPR2的生物素化scFV复合体诱导与内皮细胞中BMP9的活性相当的SMAD1/5/9激活

[0341] 为了体外证实BMPR2:ALK1信号传导的特异性激活，用不同的生物素化scFv的组合预孵育人和鼠微血管内皮细胞系，并用链霉亲和素处理。在37C下、在链霉亲和素的存在下、用生物素化ALK1.8/BMPR2.12 scFv复合体处理所培养的人肺微血管内皮细胞(PMVEC)30'，诱导了SMAD1/5/9的磷酸化，而单独地用生物素化ALK1.8或BMPR2.12孵育不激活信号传导(图5)。如通过免疫印迹法(图5)和细胞内蛋白质免疫分析(图6B)所见，通过生物素化ALK1.8/BMPR2.12链霉亲和素复合体的信号传导类似于在用重组人BMP9处理后看到的信号传导，但是与rhBMP9相反，BMP9中和抗体(mAb3209)或BMP9配体陷阱ALK1-Fc不受影响。使用野生型(WT)和Acvrl1 KO鼠PMVEC重复类似的实验，显示了WT鼠细胞中应答于ALK1.8/BMPR2.12复合体的SMAD1/5/9信号传导的激活与人PMVEC中的结果相当，但不与Acvrl1 KO PMVEC中的结果相当(图6A)，符合ALK1经由双特异性scFv复合体的信号传导的要求。

[0342] 一些鉴定的scFV CDR的示例性序列示于表1。

[0343] 表1.单链Fv BMPRI/BMPRII抗体CDR的序列

[0344]

CDR	序列	SEQ ID NO
克隆ALK1.2 (抗-ACVRL1/ALK1) *		
CDR L1	KLGDKYAS	1.
CDR L2	LVIYQDSKRPS	2.
CDR L3	QAWDSSTA	3.
CDR H1	GSISSDDYYWS	4.
CDR H2	WIGYIYYSGITYY	5.
CDR H3	REGCNDGVCYNGVFDY	6.
克隆ALK1.3 (抗-ACVRL1/ALK1)		
CDR L1	SSDVGTYNYVS	7.
CDR L2	LMIYDVSKRPS	8.
CDR L3	YSYTTSSTW	9.
CDR H1	DSIGSGDYYWS	10.
CDR H2	WIGYSYHTGSTDY	11.
CDR H3	RDYYGYLGY	12.
克隆 ALK1.8 (抗-ACVRL1/ALK1)*		
CDR L1	QSISSYLN	13.
CDR L2	LLIYAASSLQS	14.
CDR L3	QQSYSTPR	15.
CDR H1	GSISSDDYYWS	16.
CDR H2	WIGYIYYSGITYY	17.
CDR H3	REGCNDGVCYNGVFDY	18.
克隆ALK1.8b (抗-ACVRL1/ALK1)		
CDR L1	SSNIGGNTVN	19.
CDR L2	LLIYGDDLRPS	20.
CDR L3	AAWDDSLNAY	21.
CDR H1	FTFSNYAMHS	22.
CDR H2	WVAVISYDGSNKYY	23.
CDR H3	RVRYYGSGSPIGY	24.
克隆BMPR2.12 (抗-BMPR2/BMPRII)		
CDR L1	SSDVGGYKSVS (26-36)	25.
CDR L2	LMIYDVSNRPS (48-58)	26.
CDR L3	SSYTSSSSLW (91-100)	27.
CDR H1	GTFSSYAIS	28.
CDR H2	WMGRIIPILGIANY	29.
CDR H3	TDLWGVGAD	30.
克隆B15 (抗-BMPR1A/ALK3)		
CDR L1	NTDIGYYNYVS	31.
CDR L2	LLIFEVDNRPS	32.
CDR L3	SSYSTYNIL	33.
CDR H1	YTFTGYYMH	34.
CDR H2	WMGRINPNSGGTNYA	35.
CDR H3	RDPTYYDILTGPEY	36.

[0345]

CDR	序列	SEQ ID NO
克隆 B16 (抗-BMPR1A/ALK3)		
CDR L1	QSVSSNLA	37.
CDR L2	LLIYGASSRAT	38.
CDR L3	QQYIYSPY	39.
CDR H1	YNFAGYYVH	40.
CDR H2	WMGWINPNSGGTDYA	41.
CDR H3	RNLQFFRP	42.
克隆 RI-2 (抗-ACVR1/ALK2)		
CDR L1	NIGSKNVH	43.
CDR L2	LVIYDDSDRPS	44.
CDR L3	QAWDSSTAV	45.
CDR H1	GSISSSSYYWG	46.
CDR H2	WIGSIYYSGSTYY	47.
CDR H3	RQVGPVLKSVS	48.
克隆 RI-3 (抗-ACVR1/ALK2)		
CDR H1	FTFSSYAMS	49.
CDR H2	WVSAISGSGGSTYY	50.
CDR H3	KSASFFDY	51.
CDR L1	QSVSSSYLA	52.
CDR L2	LLIYGASSRAT	53.
CDR L3	QQHFRWPW	54.
克隆 RI-4 (抗-ACVR1/ALK2)		
CDR L1	SSNIGSNTVN	55.
CDR L2	LLIYSNNQRPS	56.
CDR L3	AAWDDSLNGV	57.
CDR H1	ASISSGGYYWS	58.
CDR H2	WIGYSYYSGSTYY	59.
CDR H3	RGGVRFDL	60.
克隆 RI-2-7 (抗- ACVR1/ALK2)		
CDR L1	ALPKKYAY	61.
CDR L2	LVIYEDSKRPS	62.
CDR L3	YSTDSSGNP	63.
CDR H1	FTFSSYAMS	64.
CDR H2	WVSAISGSGGSTYY	65.
CDR H3	KIPWGDYDFWSGYYTRPGHSGMDV	66.
克隆 RI-9 (抗-ACVR1/ALK2)		
CDR L1	SSNIGAGYDVH	67.
CDR L2	LLIFDSSNRPS	68.
CDR L3	QSYDFRLSGSM	69.
CDR H1	FTFRAYPMS	70.
CDR H2	WVSSITSSGSYY	71.
CDR H3	RVGVTDFDY	72.

[0346]

CDR	序列	SEQ ID NO
克隆RII-19 (抗-ACVR2A/ACTRIIA)		
CDR L1	SSNIGTNYVY	73.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	74.
CDR L3	AAWDDSLSGW	75.
CDR H1	FTFSSYAMS	76.
CDR H2	WVSAISGSGGSTYYA	77.
CDR H3	AKSIRTGSGYFDY	78.
克隆H1-2 (抗-ACVR2A/ACTRIIA)		
CDR L1	SSNIGSNYVY	79.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	80.
CDR L3	AAWDDSLSGW	81.
CDR H1	YTFTSYYMH	82.
CDR H2	WMGIINPSGGSTSYA	83.
CDR H3	RDLLLYGRGGGFQH	84.
克隆H2-11 (抗-ACVR2B/ACTRIIB)		
CDR L1	SLRSYYAS	85.
CDR L2	LVIYGKNNRPS	86.
CDR L3	NSRDNSGKHLW	87.
CDR H1	FTFDDYGMS	88.
CDR H2	WVSGINWNGGSTGY	89.
CDR H3	RKSTGDY	90.
克隆H2-15 (抗-ACVR2B/ACTRIIB)		
CDR L1	SSNIGAGYDVH	91.
CDR L2	LLIYGNSNRPS	92.
CDR L3	AAWDDSLNGPRM	93.
CDR H1	FTFSDYYMS	94.
CDR H2	WVSYISSSSSYTNY	95.
CDR H3	RVNYYYGMDV	96.
克隆H5-2 (抗-ACVR1B/ALK4)		
CDR L1	SLRKYYAS	97.
CDR L2	LVIYGKNKRPS	98.
CDR L3	NSWDSSGNHV	99.
CDR H1	GSISSGGYYWS	100.
CDR H2	WIGYIYYSGSTYY	101.
CDR H3	REEVGDWFDP	102.
克隆H3-2 (抗-BMPR1B/ALK6)		
CDR L1	QGDSLRKYYAS	109.
CDR L2	LVIYGKSKRPS	110.
CDR L3	NSWDSSGNHVV	111.
CDR H1	GGSISSGGYYWS	112.
CDR H2	WIGYIYYSGSTYY	113.
CDR H3	REEVGDWFDP	114.

[0347]

CDR	序列	SEQ ID NO
克隆BMPR2.23 (抗-BMPR2/BMPRII)		
CDR L1	TLHSGINVATYRIY	115.
CDR L2	YKSDLDKHQGS	116.
CDR L3	LIWHDYVWY	117.
CDR H1	CAASGFTFDDYAMH	118.
CDR H2	WVSGISWNSGSIGY	119.
CDR H3	KGGWGSSTHYYYGMDV	120.
克隆H4-1 (抗-ACVR1C/ALK7)		
CDR L1	SSNIGSNYVY	121.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	122
CDR L3	AAWDDSLSGV	123
CDR H1	YTFTGYYMH	124.
CDR H2	WMGWINPNGGGTKYA	125.
CDR H3	TLSDYSSGGP	126.
克隆H4-4 (抗-ACVR1C/ALK7)		
CDR L1	SSNIGSNYVY	127.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	128.
CDR L3	AAWDDSLSGV	129.
CDR H1	YTFTGYHVH	130.
CDR H2	WMGWINPDSGGTNFA	131.
CDR H3	RRSLDY	132.
克隆H4-7 (抗-ACVR1C/ALK7))		
CDR L1	SSNIGSNYVY	133.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	134.
CDR L3	AAWDDSLNGV	135.
CDR H1	FTFSNAWMS	136.
CDR H2	WVGRIKSKTDGGTTDY	137.
CDR H3	ASLVDY	138.
克隆H4-8 (抗-ACVR1C/ALK7)		
CDR L1	SSNIGSNYVY	139.
CDR L2	LLIYRNNQRPS	140.
CDR L3	AAWDDSLSGP	141.
CDR H1	YTFTKYGIS	142.
CDR H2	WMGWISAYNVDTKY	143.
CDR H3	RRGLDY	144.

[0348] *Alk1.2和Alk1.8共享重链CDR的98％同一性,但是具有不同的轻链CDR。

[0349] 下文中示出了抗BMPRI/BMPRII抗体的序列的实例。序列显示为VL-接头-VH,其中接头为粗体。

[0350] 克隆ALK1.2(抗-ALK1(ACVRL1))

[0351] 核苷酸序列(SEQ ID NO:145)

CAGCTGANTACNGNCGACGATGACAAGCTTTCCTATGAGCTGACACAGCCAC
CCTCAATGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGA
TAAATTGGGAGATAAATATGCTTCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCC
CCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATAGCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGC
GATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGAC
CCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACT
GCGGTATTCGGTGGAGGGACCAAGCTCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCT**
TCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC
GGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT
CTGGTGGCTCCATCAGCAGTGATGATTACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGAC
CCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGATCACC
TACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCGA
AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCCAGAGAGGGGTGTAATGATGGTGTATGCTATAATGGGGTC
TTTGACTACTGNGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGTCGACCCATT
CGTTTCTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATG
CTGGCGGCGGCTCTGANGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGA
TTTTGATTATGAAAAGATGGC

[0352]

[0353] 氨基酸序列(SEQ ID NO:146)

SYELTQPPSMSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLG**EG**

[0354] **KSSGSGSESKAS**QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTP
GKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA
REGCNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSS

[0355] 克隆ALK1.3(抗-ALK1(ACVRL1))

[0356] 核苷酸序列(SEQ ID NO:147)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGAT
CACCATCTCCTGCGCTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTACTTATAACTATGTCT
CCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGATGT
CAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA
ACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTA
TTACTGCTACTCATATACAACCAGCAGCACTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACC
[0357] AAGGTCACCGTCCTAGGA**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAAAG**
CAAGGCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGCTGAAGCC
TTCGCAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCCGGTGACTCCATCGGCAGTG
GTGATTACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGCCTGGAATG
GATTGGGTACAGCTATCACACTGGGAGCACCGACTACAACCCGTCCCTCAAG
AGTCGAGTTTCCATATCAGTGGACAGGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTTAAACT
GAGGTCTGTGACTGCCGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGATTAT
TATGGATATTTGGGTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0358] 氨基酸序列(SEQ ID NO:148)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGTYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSK
RPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCYSYTTSSTWVFGGGTKVTVL

[0359] G**EGKSSGSGSESKAS**QVQLQESGPGLLKPSQTLSLTCTVSGDSIGSGDYYWSWIR
QPPGKGLEWIGYSYHTGSTDYNPSLKSRVSISVDRSKNQFSLKLRSVTAADTAVY
YCARDYYGYLGYWGQGTLVTVSS

[0360] 克隆ALK1.8(抗-ALK1(ACVRL1))

[0361] 核苷酸序列(SEQ ID NO:149)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGG

[0362] TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA
GTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGA
TTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACT

[0363] GTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCGAACGTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGA
TATCAAA**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGCTAGC**C
AGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGATGATTACTACT
GGAGTTGGATCCGCCAGACCCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACAT
CTATTACAGTGGGATCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACC
ATATCAGTAGACACGTCGAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGA
CTGCCGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGAGAGGGGTGTAATGATGG
TGTATGCTATAATGGGGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

[0364] 氨基酸序列(SEQ ID NO:150)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVDIK**EGKSS**

[0365] **GSGSESKAS**QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTPGKG
LEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREG
CNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSS

[0366] 克隆ALK1.8b(抗-ALK1(ACVRL1))

[0367] 核苷酸序列(SEQ ID NO:151)

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCGGGGACCCCCGGGCAGAGGG
TCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAGGTAATACTGTAAAC
TGGTATCACCAACTCCCAGGATCGGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTGATGA
TCTGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCACGT
CAGCCTCCCTGGCCATCAGTAGGTTCCAGTCTGGGGATGAGGCTGATTATTAC
TGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGCTTATGTCTTCGGAACTGGGACCA
AGCTCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGACTCC**
AAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGGGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT
GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTA
TGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA
GTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTCCGCTAC

[0369] TATGGTTCGGGGAGTCCCATTGGGTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

[0370] 氨基酸序列(SEQ ID NO:152)

LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGGNTVNWYHQLPGSAPKLLIYGDDLRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISRFQSGDEADYYCAAWDDSLNAYVFGTGTKLTVL

[0371] G**EGKSSGSGSDSKAS**EVQLVGSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVR
QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARVRYYGSGSPIGYWGQGTLVTVSS

[0372] 克隆BMPR2.12(抗-BMPR2(BMPRII))

[0373] 核苷酸序列(SEQ ID NO:153)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGAT
CACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAAGTCTGTCT
CCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGATGT
CAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA
ACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTA
TTACTGCAGCTCTTACACAAGCAGCAGCTCCCTTTGGGTGTTCGGCGGAGGG
ACCAAGCTCACCGTCCTAGGA**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGA**

[0374] **AAGCAAGGCTAGC**CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA
GCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGC
AGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGA
TGGGAAGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCA
GGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGA
GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAGAT
CTGTGGGGAGTGGGAGCAGATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT
CA

[0375] 氨基酸序列(SEQ ID NO:154)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSN

[0376] RPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWVFGGGTKLTV
LG**EGKSSGSGSESKAS**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR

[0377] QAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAV
YYCATDLWGVGADWGQGTLVTVSS

[0378] 克隆BMPR2.23(抗-BMPR2(BMPRII))

[0379] 核苷酸序列(SEQ ID NO:211)

[0380] GACGACGATGACAAGCTTCAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTCTTCCCTCTCTGC
ATCTCCTGGAGCTTCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTACACAGTGGCATCAATG
TTGCTACCTACAGGATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCCTCCCCA
GTATCTGCTGACTTATAAGTCAGACTTAGATAAACATCAGGGGTCTGGAGTC
CCCAGTCGCTTCTCTGGATCCAAAGATGCGTCGGCCAATGCAGGCATATTGCT
CATTTCTGGACTCCAGTCTGACGACGAGGGTGACTATTATTGTTTAATCTGGC
ACGACTACGTCTGGTACTTCGGCGGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGT**GA**
GGGTAAATCGTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGCTAGCGAGGTGCAG
CTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCT
CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGG
CAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTG
GTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA
CAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGAC
ACGGCTCTGTATTATTGTGCAAAAGGCGGGTGGGGCAGCTCGACCCACTACT
ACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGT
CGACCCATTCGTTTCTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTC
CTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGANGGAGGCGGGTNCCGGTGGTGGCTCTG
GTTCCGG

[0381] 氨基酸序列(SEQ ID NO:212)

[0382] DDDDKLQAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLHSGINVATYRIYWYQQKPGSPPQYL
LTYKSDLDKHQGSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSDDEGDYYCLIWHDYV
WYFGGGTKVTVLG**EGKSSGSGSESKAS**EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGF
TFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLY
LQMNSLRAEDTALYYCAKGGWGSSTHYYYGMDVWGQGTTVTVSSVDPFVSEY
QGQSSDLPQPPVNAGGGSXGGGXRWWLWFR

[0383] 克隆B15:(抗-ALK3(BMPRIA))

[0384] 核苷酸序列(SEQ ID NO:155)

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGAT
CACCTTCTCCTGCACTGGAACCAACACTGACATTGGTTATTATAATTATGTCT
CCTGGTACCAACAACTCCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCTTGATTTTTGAGGTC
GATAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTAGTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAA
CACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTAT
TACTGCAGCTCATATTCAACCTATAATATTTTGCTCTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCA**

[0385] **AAGCTAGC**GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGAGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG
GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTA
CTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
CGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCA
GGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAG
CAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACCCCACG
TATTACGATATTTTGACTGGTCCGGAGTACTGGGGCCAGGGAACCGTCACCG
TCTCCTCA

[0386] 氨基酸序列(SEQ ID NO:156)

LPVLTQPASVSGSPGQSITFSCTGTNTDIGYYNYVSWYQQLPGKAPKLLIFEVDN
RPSGVPSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSTYNILLFGGGTKLTVLG

[0387] **EGKSSGSGSESKAS**EVQLLESEAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQ
APGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTA
VYYCARDPTYYDILTGPEYWGQGTVTVSS

[0388] 克隆B16:(抗-ALK3(BMPRIA))

[0389] 核苷酸序列(SEQ ID NO:157)

GAAATAGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA

[0390] GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTG
GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC
AGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG

[0391] ACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAGGATTTTGCAGTGTATTAC
TGTCAGCAATATATTTACTCACCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAAGTGG
ATATCAAA**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGCTAGC**
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCTGGATACAACTTCGCCGGCTACTATGTTCAC
TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACC
CTAACAGTGGTGGCACAGACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCAT
GACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGACCTGAGTAGGCTGAGA
TCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGGAATCTACAGTTTTTTCGGCC
AGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0392] 氨基酸序列(SEQ ID NO:158)

[0393] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYIYSPYTFGQGTKVDIK**EGKS**
SGSGSESKASEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNFAGYYVHWVRQAPG
QGLEWMGWINPNSGGTDYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMDLSRLRSDDTAVYY
CARNLQFFRPGTLVTVSS

[0394] 克隆RI-2:(抗-ALK2(ACVR1))

[0395] 核苷酸序列(SEQ ID NO:159)

[0396] TCCTATGAGCTGACTCAGCCACTCTCAGTGTCAGTGGCCCTGGGACAGACGG
CCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAATGTGCACTGGTA
CCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCATCTATGATGATAGCGAC
CGGCCCTCAGGGACCTCCGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAG
CCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTG
TCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGCAGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTC
ACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGC**
TAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGA
GACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTT
ACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGG
GAGTATCTATTATAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
GCCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGATGACCT

[0397] CAGTGACCGCCGCAGACACGGCCATATATTACTGTGCGAGACAGGTGGGCCC
TGTGTTAAAGTCGGTATCTCAGGGCACCCTGGTCACCGTCACCTCA

[0398] 氨基酸序列(SEQ ID NO:160)

SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYDDSDRP

SGTSERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVVFGGGTKLTVLG

[0399] **EGKSSGSGSESKAS**QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQ

PPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRATISVDTSKNQFSLKMTSVTAADTAIYYC

ARQVGPVLKSVSQGTLVTVTS

[0400] 克隆RI-3:(抗-ALK2(ACVR1))*标注不同的接头序列

[0401] 核苷酸序列(SEQ ID NO:161)

GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGCAGCC

TGCGTCTGAGCTGTGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGC

TGGGTGCGTCAGGCACCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATTAGC

GGCAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCA

TTAGCCGTGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCG

TGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAAAGCGCCAGCTTCTTTGATT

[0402] ATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTTACCGTTAGCAGC**GGTGGAGGCGGTTCTG**

GTGGAGGCGGTTCGGGTGACGGAAGTTCAGAAATTGTGCTGACCCAGAGC

CCGGGCACGCTGTCTCTGAGCCCGGGTGAACGTGCGACCCTGAGCTGTCGTG

CGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCGG

GCCAGGCACCGCGTCTGCTGATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCGACCGGCAT

TCCGGATCGTTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTA

GCCGTCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGCATTTCCGT

TGGCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAATTAAA

[0403] 氨基酸序列(SEQ ID NO:162)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS

GGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSASFFDYWG

[0404] QGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGDGSS**EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSS

SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY

YCQQHFRWPWTFGQGTKVEIK

[0405] 克隆RI-4:(抗-ALK2(ACVR1))

[0406] 核苷酸序列(SEQ ID NO:163)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAAGG
TCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAAC
TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATA
ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTA
CTGTGCAGCGTGGGATGACAGCCTGAATGGTGTGGTTTTCGGCGGAGGGACC
[0407] AAGGTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC**
CAAAGCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCC
TTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCCATCAGCAGTG
GTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTG
GATTGGGTACAGCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAG
AGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGTACCT
GACCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTATATCATTGTGCGAGAGGGGGG
GTCAGGTTTGACCTCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0408] 氨基酸序列(SEQ ID NO:164)

SYELTQPPSASGTPGQKVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGVVFGGGTKVTVL

[0409] G**EGKSSGSGSESKAS**QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGASISSGGYYWSWIR
QHPGKGLEWIGYSYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLYLTSVTAADTAVY
HCARGGVRFDLWGQGTLVTVSS

[0410] 克隆RI-2-7(抗-ALK2(ACVR1))

[0411] 核苷酸序列(SEQ ID NO:165)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAAACGG
CCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCATTGCCAAAAAAATATGCTTATTGGTA
[0412] CCAGCAGAAGTCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCATCTATGAGGACAGCAAA
CGACCCTCCGGGATCCCTGAGAGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGGACAATGG
CCACCTTGACTGTCAGTGGGGCCCAGGTGGAGGATGAAGCTGACTACTACTG
TTACTCAACAGACAGCAGTGGTAATCCAGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTG

ACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAAGC**

TAGCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG

GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCA

TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTAT

[0413] TAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC

ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC

TGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATTCCTTGGGGTGA

TTACGATTTTTGGAGTGGTTATTATACCAGGCCCGGTCACTCCGGTATGGACG

TCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0414] 氨基酸序列(SEQ ID NO:166)

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPS

GIPERFSGSSSGTMATLTVSGAQVEDEADYYCYSTDSSGNPVFGGGTKLTVLG**E**

[0415] **GKSSGSGSESKAS**EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP

GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY

CAKIPWGDYDFWSGYYTRPGHSGMDVWGQGTLVTVSS

[0416] 克隆RI-9:(抗-ALK2(ACVR1))

[0417] 核苷酸序列(SEQ ID NO:167)

CAGGCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGG

TCACCATCTCCTGCGCTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGT

ACACTGGTACCAACAGCTTCCAGGAACAGCCCCCAAGCTCCTCATCTTTGAT

AGCTCCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCCGG

CACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGAT

TATTACTGCCAGTCCTATGACTTCAGGCTGAGTGGTTCTATGGTCTTCGGCGG

AGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTT**

[0418] **CCGAATCCAAAGCTAGC**GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGG

TCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTC

AGGGCCTATCCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT

GGGTCTCATCCATTACTTCTAGTGGCAGTTACTACGCAGACTCAGTGAAGGGT

CGATTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAGTTCACTGTATCTCCAAATGA

ACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGTGGGAGT

TACTGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0419] 氨基酸序列(SEQ ID NO:168)

QAVLTQPPSVSGAPGQRVTISCAGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIFDSSN
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDFRLSGSMVFGGGTKLT

[0420] VLG**EGKSSGSGSESKAS**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRAYPMSW
VRQAPGKGLEWVSSITSSGSYYADSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRADDTA
VYYCARVGVTDFDYWGQGTLVTVSS

[0421] 克隆RII-19(抗-ACTRIIA(ACVR2A))

[0422] 核苷酸序列(SEQ ID NO:169)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
TCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAACTAATTATGTATAC
TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATA
ATCAGCGGCCCTCAGGGGCCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAC
CTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATT
ACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGGAC
CAAGGTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAAT**

[0423] **CCAAAGCTAGC**GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC
CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGC
TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT
CAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTATCA
GAACTGGGAGCGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGT
CTCCTCA

[0424] 氨基酸序列(SEQ ID NO:170)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGTNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
SGAPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKVTVL

[0425] **GEGKSSGSGSESKAS**EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ
APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCAKSIRTGSGYFDYWGQGTLVTVSS

[0426] 克隆H1-2(抗-激活素RIIA(ACVR2A))

[0427] 核苷酸序列(SEQ ID NO:171)

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
TCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC
TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATA
ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTA
CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACC
AAGCTCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC**

[0428] **CAAAGCTAGC**CAGGTTCAGCTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG
GGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACT
ATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAT
AATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGA
GTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCA
GCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTCCTCCTC
TATGGTCGCGGGGGCGGTTTCCAGCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

[0429] 氨基酸序列(SEQ ID NO:172)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVL

[0430] G**EGKSSGSGSESKAS**QVQLQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVR
QAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA
VYYCARDLLLYGRGGGFQHWGQGTLVTVSS

[0431] 克隆H2-11(抗-激活素RIIB(ACVR2B))

[0432] 核苷酸序列(SEQ ID NO:173)
TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTAGGACAGACAGT

[0433] CAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAAAACAACC

GGCCCTCAGGGATCCCAGCCCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGC
TTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGT
AACTCCCGGGACAACAGTGGTAAGCATCTTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCA
AGCTCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCC**
AAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCT

[0434] GGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTA
TGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCT
GGTATTAATTGGAATGGTGGTAGCACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCANAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAA
CAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCGAGGAAATCTACA
GGTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

[0435] 氨基酸序列(SEQ ID NO:174)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP
SGIPARFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDNSGKHLWVFGGGTKLTVL

[0436] G**EGKSSGSGSESKAS**EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVR
QAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISTDNAKNSLYLQMNSLRAEDT
ALYYCARKSTGDYWGQGTLVTVSS

[0437] 克隆H2-15(抗-激活素RIIB(ACVR2B))

[0438] 核苷酸序列(SEQ ID NO:175)

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGG
TCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGT
ACACTGGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGT
AACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTG
GCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGA

[0439] TTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTCCGAGAATGGTATTC
GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCT**
GGTTCCGAATCCAAAGCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGG
CTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA
CCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTAGTAGTTACACAAACTACGCAGAC
TCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGT
ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC

[0440] GAGAGTTAACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTC
ACCGTCTCTTCA

[0441] 氨基酸序列(SEQ ID NO:176)

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSN
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPRMVFGGGTK

[0442] LTVLG**EGKSSGSGSESKAS**EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS
WIRQAPGKGLEWVSYISSSSSYTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARVNYYYGMDVWGQGTLVTVSS

[0443] 克隆H5-2(抗-ALK4(激活素RIB))

[0444] 核苷酸序列(SEQ ID NO:177)

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGT
CAGAATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAAATATTATGCAAGCTGGTAC
CAGCAGAAGGCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAAAACAAAC
GGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGC
TTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGT
AACTCCTGGGACAGCAGTGGTAACCACGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGC

[0445] TCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAA**
GCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA
CAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGG
TTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATT
GGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGGGTC
GAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG
CTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGAAGTG
GGAGACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0446] 氨基酸序列(SEQ ID NO:178)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRKYYASWYQQKAGQAPVLVIYGKNKR
PSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSWDSSGNHVVFGGGTKLTVL

[0447] G**EGKSSGSGSESKAS**QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIR
QHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY
YCAREEVGDWFDPWGQGTLVTVSS

[0448] 克隆H3-2(抗-ALK6(BMPR1B))

[0449] 核苷酸序列(SEQ ID NO:179)

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGT
CAGAATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAAATATTATGCAAGCTGGTAC
CAGCAGAAGGCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAAAGCAAAC
GGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGC
TTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGT
AACTCCTGGGACAGCAGTGGTAACCACGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGC

[0450] TCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATCCAAA**
GCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA
CAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGG
TTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATT
GGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGGGTC
GAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG
CTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGAAGTG
GGAGACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0451] 氨基酸序列(SEQ ID NO:180)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRKYYASWYQQKAGQAPVLVIYGKSKRP
SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSWDSSGNHVVFGGGTKLTVLG

[0452] **EGKSSGSGSESKAS**QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQ
HPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
CAREEVGDWFDPWGQGTLVTVSS

[0453] 克隆H4-1(抗-ALK7(ACVR1C))

[0454] 核苷酸序列(SEQ ID NO:181)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
TCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTACGTATAC
TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATA
ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC

TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTA
CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTGTGGTATTCGGCGGAGGGACC
[0455] AAGCTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCCTCCGGATCTGGTTCCGAATC**
CAAAGCTAGCCAGGTTCAGCTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG
GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACT
ACATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATG
GATCAACCCTAACGGTGGTGGCACAAAGTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGG
GTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCA
GTCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGACGCTTTCTGACTAT
AGCAGTGGCGGACCCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0456] 氨基酸序列(SEQ ID NO:182)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTKLTVL

[0457] G**EGKSSGSGSESKAS**QVQLQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
QAPGQGLEWMGWINPNGGGTKYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSDDT
AVYYCATLSDYSSGGPWGQGTLVTVSS

[0458] 克隆H4-4(抗-ALK7(ACVR1C))

[0459] 核苷酸序列(SEQ ID NO:183)

CAGGCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
TCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC
TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATA
ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTA
CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTGTGGTATTCGGCGGAGGGACC
AAGCTCACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC**

[0460] **CAAAGCTAGC**GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGACTGAGGTGAAGAGGCC
TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCT
ACCATGTGCACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG
GTGGATCAACCCTGACAGTGGTGGCACAAACTTTGCACAGAAGTTTCAGGGC
AGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAACTTA

CCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCATTTATTACTGTGCGAGACGTTCACTT
GACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0461] 氨基酸序列(SEQ ID NO:184)

QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQR
PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTKLTVL

[0462] G**EGKSSGSGSESKAS**EVQLVQSGTEVKRPGASVKVSCKASGYTFTGYHVHWVR
QAPGQGLEWMGWINPDSGGTNFAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELTSLRSDDT
AIYYCARRSLDYWGQGTLVTVSS

[0463] 克隆H4-7(抗-ALK7(ACVR1C))

[0464] 核苷酸序列(SEQ ID NO:185)

TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
TCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC
TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATA
ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACC
TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGCGGATGAGGCTGATTATTA
CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTGTGGTATTCGGCGGAGGGACC
AAGCTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC**

[0465] **CAAAGCTAGC**GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC
TGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACG
CCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGG
CCGTATTAAAAGCAAAACTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTG
AAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAAACACGCTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCTAGCCT
GGTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0466] 氨基酸序列(SEQ ID NO:186)

SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
SGVPDRFSASKSGTSASLAISGLQSADEADYYCAAWDDSLNGVVFGGGTKLTVL

[0467] G**EGKSSGSGSESKAS**EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR
QAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED
TAVYYCASLVDYWGQGTLVTVSS

[0468] 克隆H4-8(抗-ALK7(ACVR1C))

[0469] 核苷酸序列(SEQ ID NO:187)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGG
TCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATAC
TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATA
ATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACC
TCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTA
CTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTCCGGTGTTCGGCGGAGGGACC
AAGGTGACCGTCCTAGGT**GAGGGTAAATCTTCCGGATCTGGTTCCGAATC**

[0470] **CAAAGCTAGC**GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGTTGTGAAGAAGCC
TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCAAGT
ATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGAACAAGGGCTTGAGTGGATGGG
ATGGATCAGCGCTTACAATGTTGACACAAAGTATGCACAGAAGTTCCAGGGC
AGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAACTGA
GGAGCCTTAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGAGGGCT
TGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0471] 氨基酸序列(SEQ ID NO:188)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGTKVTVL

[0472] G**EGKSSGSGSESKAS**EVQLVQSGAVVKKPGASVKVSCKASGYTFTKYGISWVR
QAPEQGLEWMGWISAYNVDTKYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDT
AVYYCARRGLDYWGQGTLVTVSS

[0473] 实施例2.双特异性构建体

[0474] 由与ACVRL1(ACVRL1.8)和BMPR2(BMPR2.12)结合的scFv克隆制备双特异性构建体的几个实例。使这些中间复合体产生针对ALK1/ACVRL1和BMPR2的双特异性分子。这些复合体是通过将两个scFv表达为由接头分开、并具有C-末端His标签的单个分子来制备的,或者可选地通过将每个scFv分别表达为Fc-融合分子、然后组合成一个scFv-Fc异二聚体来制备的。

[0475] 在体外检测中,单分子双特异性体或异二聚体双特异性体本身均不具有显著的BMP转录活性;参见图8。这些分子不具有作为单分子双特异性体的生物活性,而是当它们作为四聚体连接时具有活性,使用Ni++、或Ca++、或抗-His以连接His标签从而形成异四聚体。这些结果显示异四聚体人工配体参与该途径中的信号传导;该发现是使这些BMP模拟信号传导分子工作的关键。

[0476] 克隆ACVRL1.8(抗-ACVRL1)

[0477] 氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVDIKEGKSS

[0478] GSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTPGKG LEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREG CNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:150)

[0479] 克隆BMPR2.12(抗-BMPR2)

[0480] 氨基酸序列

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSN RPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWVFGGGTKLTV

[0481] LGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAV YYCATDLWGVGADWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:154)

[0482] 双特异性构建体：

[0483] BMPR2.12-中-ACVRL1.8-His

[0484] 氨基酸序列：

GDEMGTGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWV

[0485] FGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF SSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELS SLRSEDTAVYYCATDLWGVGADWGQGTLVTVSS**SGGGGSGGGGSSGSGGGG DGGGGSGGT**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGT

[0486] KVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDDYYW SWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSSSGGGGSHHHHHHHH* (SEQ ID NO:189)

[0487] ACVRL1.8-长-BMPR2.12-His

[0488] 氨基酸序列：

GDEMGTGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL
IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTK
VDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDDYYWS
WIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
VYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSS**SGGSGGGGSSGGGGSGGGG**

[0489] **SSGGGGDGGGGSGGT**QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQ
QHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYT
SSSSLWVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC
KASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD
TAYMELSSLRSEDTAVYYCATDLWGVGADWGQGTLVTVSSSSGGGGSHHHHH
HHH* (SEQ ID NO:190)

[0490] BMPR2.12-长-ACVRL1.8-His

[0491] 氨基酸序列：

GDEMGTGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAP
KLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWV
FGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF

[0492] SSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELS
SLRSEDTAVYYCATDLWGVGADWGQGTLVTVSS**SGGGGSGGGGSSGGGGSG**
GGGSSGGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNW
YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS
YSTPRTFGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS

[0493] GGSISSDDYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS
LKLSSVTAADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSSSGGGGSHH
HHHHHH* (SEQ ID NO:191)

[0494] 实施例3.四价构建体

[0495] 由与ACVRL1(ACVRL1.8)和BMPR2(BMPR2.12)结合的scFv克隆制备四价构建体。这些被设计为表达为单分子的四价复合体,具有根据指定的不同长度的间隔区。可选地,它们被设计为通过表达为IgG Fc融合蛋白的两个双特异性scFv、然后结合为两个二硫键连接的同二聚体Fc复合体来产生的四价IgG-Fc蛋白。

[0496] 这些构建体能够在细胞中产生强力BMP信号传导(参见图8)。抗-ACVRL1和抗-BMPR2的四价复合体在内皮细胞中引发BMP转录活性。培养TIME细胞(人端粒酶永生化微血管内皮细胞),并用表达BMP应答元件(BRE-荧光素酶)报告子的质粒瞬时转染。BMP9(1ng/mL)在这些细胞中引发BMP转录活性,基于荧光素酶活性的检测,除以细胞的相对数,基于MTS比色活性测定(RLU/存活)。由通过间隔区连接的单个抗-ACVRL1 scFv和单个抗-BMPR2 scFv组成、并具有C-末端His标签结构域的双特异性构建体(“ACVRL1.8-L-BMPR2.12-His”)自身不引发信号传导,但在与单克隆抗-His抗体组合以将这些双特异性分子复合成四价复

合体时为活性的。为了证明在表达为二硫键连接的异四聚体时的四价复合体的信号传导，由表达为IgG Fc结构域融合蛋白并组装成二硫键连接的同二聚体的相同双特异性分子组成的四价复合体(“ACVRL1.8-L-BMPR2.12-短-Fc”)引发强力信号传导。

[0497] 与体外信号传导活性一致，在尾静脉注射盐水(50uL)、重组人BMP9(rhBMP9，50uL中150ug/kg)、或重组四聚Fc融合蛋白ACVRL1.8-L-BMPR2.12-短-Fc(50uL中150ug/kg)后24小时，基于在来自8周龄小鼠的全肺组织中检验的Id1基因转录活性表明了体内信号传导BMP信号传导活性(图9)。与全肺组织中的盐水相比，注射BMP9或ACVRL1.8-L-BMPR2.12-短-Fc引起BMP转录活性的增加。

[0498] 这样的体内信号传导的证明是通过静脉内、肌内、或皮下注射重组信号传导蛋白如ACVRL1.8-L-BMPR2.12-短-Fc或类似分子至例如小鼠或大鼠等合适的动物模型来完成的。在30分钟至24小时后，通过以下来检验这些处理相对于盐水对BMP信号传导活性的影响：通过对于SMAD1/5/9效应蛋白的磷酸化，对动物组织进行免疫组织化学，或通过对于磷酸化SMAD1/5/9进行组织提取物的免疫印迹，或通过经由定量RT-PCR来检验靶组织中ID1、ID2、和/或ID3的表达，或通过检验BMP转录应答元件的调控下的转基因报告子小鼠表达GFP中的GFP的表达(Monteiro等人，Genesis.2008Jul;46(7):335-46)。

[0499] 示例性四价构建体的序列

[0500] scFv克隆BMPR2.12(抗-BMPR2)：
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSN
RPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSSLWVFGGGTKLTV

[0501] LGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR
QAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAV
YYCATDLWGVGADWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:154)

[0502] A＝scFv克隆ACVRL1.8(抗-ACVRL1)：
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVDIKEGKSS

[0503] GSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTPGKG
LEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREG
CNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:150)

[0504] M＝二价复合体中scFv克隆之间的中间隔区：

[0505] SGGGGSGGGGSSGSGGGGDGGGGSG(SEQ ID NO:192)

[0506] L＝二价复合体中scFv克隆之间的长间隔区：

[0507] SGGSGGGGSSGGGGSGGGGSSGGGGDGGGGSG(SEQ ID NO:193)

[0508] 短＝同二聚体Fc分子的IgG Fc结构域之前的短间隔区：

[0509] GSGGGGDGGGGSG(SEQ ID NO:194)

[0510] 中＝同二聚体Fc分子的IgG Fc结构域之前的中间隔区：

[0511] GSGGGGDSGGGGSGGGGSSGGGGSG(SEQ ID NO:195)

[0512] 长＝同二聚体Fc分子的IgG Fc结构域之前的长间隔区：

[0513] GSGGGGDSGGGGSGGSGGSGGGSGGGGSG(SEQ ID NO:196)

[0514] Fc＝IgG Fc恒定结构域：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL

[0515] PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT

QKSLSLSPGS (SEQ ID NO:197)

[0516] 短(His)＝具有His标签的二价臂之间的短间隔区：

[0517] GGHHHHHHHHGG(SEQ ID NO:198)

[0518] 中(His)＝具有His标签的二价臂之间的中间隔区：

[0519] SGGGGSHHHHHHHHSGGGGS(SEQ ID NO:199)

[0520] 长(His)＝具有His标签的二价臂之间的长间隔区：

[0521] SGGGGSGGHHHHHHHHGGSGGGGS(SEQ ID NO:200)

[0522] 粗体＝scFv的CDR区

[0523] (1)BMA-短-Fc

[0524] GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**WYQQHPGK

APK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSL**

WVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG

GTFSSYAISWVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTEDTSTDTA

YMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSSGGGGSGGGGSSGS

GGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPG

KAPK**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**T

FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSD**

DYYWSWIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV

TAADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSGSGGGGDGGGGSG

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

[0525] WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL

PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT

QKSLSLSPGS* (SEQ ID NO:201)

[0526] (2)BMA-中-Fc

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**WYQQHPGK
APK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSL**
WVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
GTFSSYAISWVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTEDTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSSGGGGSGGGGSSGSG
GGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGK
APK**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**TF

[0527] GQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSD**
DYYWSWIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
TAADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSGSGGGGDSGGGGS
GGGGSSGGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS* (SEQ ID NO:202)

[0528] (3) BMA-长-Fc

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**WYQQHPGK
APK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSL**

[0529] **W**VFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
GTFSSYAISWVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTEDTSTDTAY
MELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSSGGGGSGGGGSSGSG
GGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGK
APK**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**TF
GQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSD**
DYYWSWIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
TAADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSGSGGGGDSGGGGS

[0530] GGSGGSGGSGGGSGGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS* (SEQ ID NO:203)

[0531] (4) ALB-短-Fc

GDEMGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAP
K**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**TFGQ
GTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSDDY**
YWSWIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
ADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSSGGSGGGGSSGGGGS
GGGGSSGGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**
WYQQHPGKAPK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
[0532] **SSYTSSSSLW**VFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSV
KVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTE
DTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSGSGGGGD
GGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGS* (SEQ ID NO:204)

[0533] (5) ALB-中-Fc

[0534] GDEMGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAP
K**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**TFGQ
GTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSDDY**
YWSWIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
ADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSSGGSGGGGSSGGGGS
GGGGSSGGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**
WYQQHPGKAPK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
SSYTSSSSLWVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSV
[0535] KVSCKASG**GTFSSYAIS**WVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMT
EDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSGSGGGG
DSGGGGSGGGGSSGGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS* (SEQ ID NO:205)

[0536] (6) ALB-长-Fc

GDEMGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAP
K**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**TFGQ
GTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSDDY**
YWSWIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA
ADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSSGGSGGGGSSGGGGS
GGGGSSGGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**
WYQQHPGKAPK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
[0537] **SSYTSSSSLW**VFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSV
KVSCKASG**GTFSSYAIS**WVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMT
EDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSGSGGGG
DSGGGGSGGSGGSGGSGGGSGGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS* (SEQ ID NO:206)

[0538] (7)BMA-‘短(His)’-ALB

[0539] GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**WYQQHPGK APK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSL** **W**VFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG **GTFSSYAIS**WVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTEDTSTDTA YMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSSGGGGSGGGGSSGS GGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPG KAPK**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**T FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSD** **DYYWS**WIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSGGHHHHHHHHGG GTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAPK**LLIYAASS** **LQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**TFGQGTKVDIKEG KSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSDDYYWS**WIRQTP GKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA **REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSSGGSGGGGSSGGGGSGGGGSSGGGG DGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**WYQQHPGKA PK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSLW** VFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG**GT** **FSSYAIS**WVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYM ELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSS* (SEQ ID NO:207)

[0540] (8)BMA-‘中(His)’-ALB

[0541] GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**WYQQHPGK APK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSL** **W**VFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG **GTFSSYAIS**WVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTEDTSTDTA YMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSSGGGGSGGGGSSGS GGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPG KAPK**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**T FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSD**

DYYWSWIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSSGGGGSHHHHHHH HSGGGGSGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAPK**L LIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**TFGQGT KVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSDDYYW S**WIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD

[0542] TAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSSGGSGGGGSSGGGGSGG GGSSGGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**W YQQHPGKAPK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**S SYTSSSSLW**VFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASG**GTFSSYAIS**WVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTE DTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSS* (SEQ ID NO:208)

[0543] (9)BMA-‘长(His)’-ALB

GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**WYQQHPGK APK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSL W**VFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG **GTFSSYAIS**WVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTEDTSTDTA YMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSSGGGGSGGGGSSGS GGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPG KAPK**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**T FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSD**

[0544] **DYYWS**WIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSSGGGGSGGHHHHH HHHGGSGGGGSGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPG KAPK**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**T FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSD DYYWS**WIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSSGGSGGGGSSGGG GSGGGGSSGGGGDGGGGSGGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKS VS**WYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YC**SSYTSSSSLW**VFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGS

[0545] SVKVSCKASG**GTFSSYAIS**WVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVT MTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSS* (SEQ ID NO:209)

[0546] (10)BMA-‘短(His)’-AMB

[0547] GDEMGTQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**WYQQHPGK
APK**LMIYDVSNRPS**GVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSL**
WVFGGGTKLTVLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
GTFSSYAISWVRQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTEDTSTDTA
YMELSSLRSEDTAVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSSSGGGGSGGGGSSGS
GGGGDGGGGSGGTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPG
KAPK**LLIYAASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**T
FGQGTKVDIKEGKSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSD**
DYYWSWIRQTPGKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
TAADTAVYYCA**REGCNDGVCYNGVFDY**WGQGTLVTVSSGGHHHHHHHHHGG
GTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS**QSISSYLN**WYQQKPGKAPK**LLIYAASS**
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPR**TFGQGTKVDIKEG
KSSGSGSESKASQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG**GSISSDDYYWS**WIRQTP
GKGLE**WIGYIYYSGITYY**NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA
REGCNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSSSGGSGGGGSSGSGGGGDGGGGSGG
TQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYKSVS**WYQQHPGKAPK**LMIYDVS**
NRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC**SSYTSSSSLW**VFGGGTKLT
VLGEGKSSGSGSESKASQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG**GTFSSYAIS**WV
RQAPGQGLE**WMGRIIPILGIANY**AQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDT
AVYYCA**TDLWGVGAD**WGQGTLVTVSS* (SEQ ID NO:210)

[0548] 引用的参考文献

[0549] 1.Agarwal,S.,et al.Strategic Targeting of Multiple BMP Receptors Prevents Trauma-Induced Heterotopic Ossification.Mol Ther 25,1974-1987(2017).

[0550] 2.Dey,D.,Goldhamer,D.J.&Yu,P.B.Contributions of Muscle-Resident Progenitor Cells to Homeostasis and Disease.Curr Mol Bio Rep,1-14(2015).

[0551] 3.Dey,D.,et al.Two tissue-resident progenitor lineages drive distinct phenotypes of heterotopic ossification.Sci Transl Med 8,366ra163(2016).

[0552] 4.Shen,H.,Gelberman,R.H.,Silva,M.J.,Sakiyama-Elbert,S.E.&Thomopoulos,S.BMP12 induces tenogenic differentiation of adipose-derived stromal cells.PLoS One 8,e77613(2013).

[0553] 5.Lin,S.,Svoboda,K.K.,Feng,J.Q.&Jiang,X.The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone.Bone Res 4,16005(2016).

[0554] 6.David,L.,Mallet,C.,Mazerbourg,S.,Feige,J.J.&Bailly,S.Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1(ALK1)in endothelial cells.Blood 109,1953-1961(2007).

[0555] 7.Long,L.,et al.Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension.Nature medicine 21,777-785 (2015).

[0556] 8.Dinter,T.,Bocobo,G.A.&Yu,P.B.Pharmacologic Strategies for Assaying BMP Signaling Function.Methods Mol Biol 1891,221-233(2019).

[0557] 9.Choi,E.J.,et al.Enhanced responses to angiogenic cues underlie the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia 2.PLoS One 8,e63138 (2013).

[0558] 10.Luu,H.H.,et al.Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.J Orthop Res 25,665-677 (2007).

[0559] 11.Leblanc,E.,et al.BMP9-Induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment.J Bone Miner Res (2010).

[0560] 12.Luo,J.,et al.TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells.J Biol Chem 285,29588-29598(2010).

[0561] 13.Salingcarnboriboon,R.,et al.Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property.Exp Cell Res 287,289-300(2003).

[0562] 14.Lejard,V.,et al.Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro-alpha1(I)collagen gene in tendon fibroblasts.J Biol Chem 282,17665-17675 (2007).

[0563] 15.Berasi,S.P.,et al.Divergent activities of osteogenic BMP2,and tenogenic BMP12 and BMP13 independent of receptor binding affinities.Growth Factors 29,128-139(2011).

[0564] 16.Andersson,O.,Korach-Andre,M.,Reissmann,E.,Ibanez,C.F.&Bertolino, P.Growth/differentiation factor 3signals through ALK7 and regulates accumulation of adipose tissue and diet-induced obesity.Proc Natl Acad Sci U S A 105,7252-7256(2008).

[0565] 其它实施方案

[0566] 应理解,尽管已结合本发明的详细说明描述了本发明,但前述描述旨在进行说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、优点、和修改在所附权利要求书的范围内。

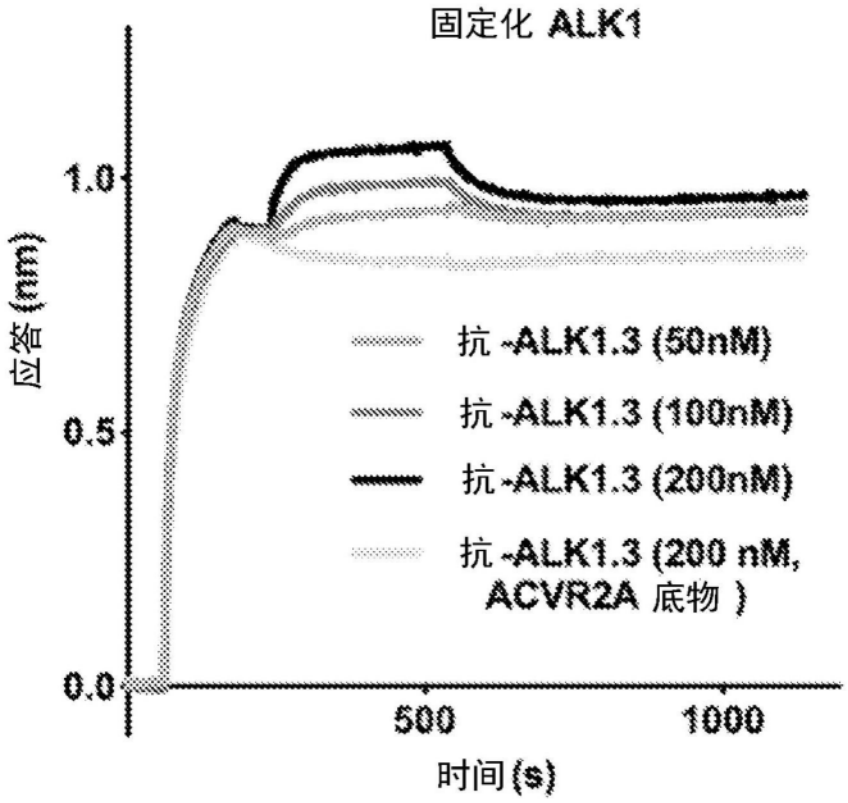

固定化 ALK1
1.0
0.5
0.0
应答 (nm)
抗 -ALK1.3 (50nM)
抗 -ALK1.3 (100nM)
抗 -ALK1.3 (200nM)
抗 -ALK1.3 (200 nM, ACVR2A 底物)
500
1000
时间 (s)

图1A

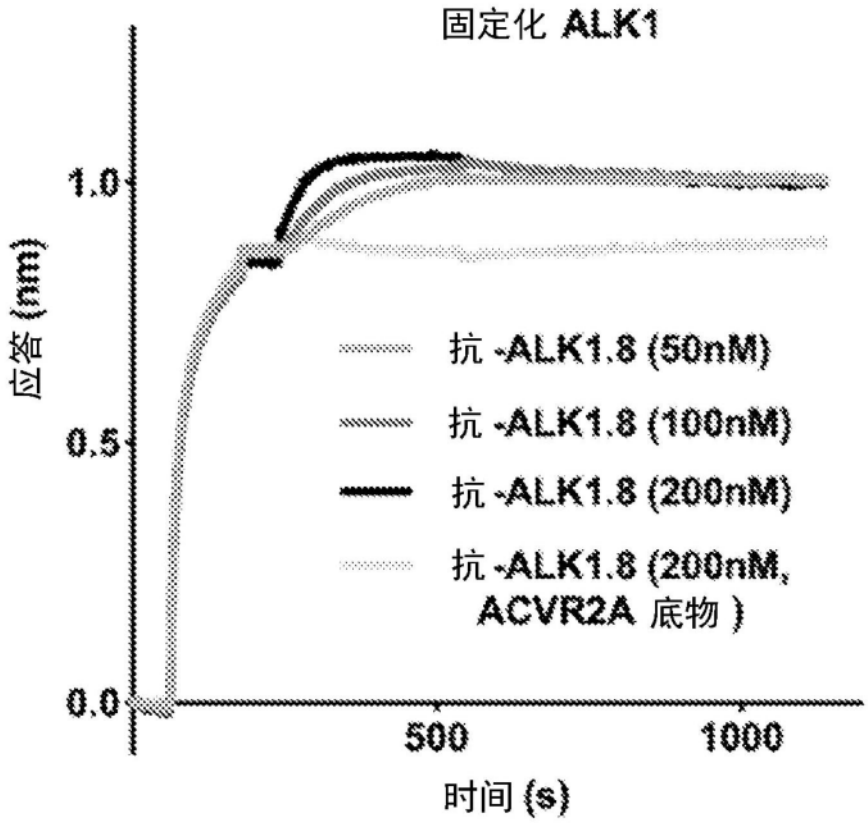

固定化 ALK1
1.0
0.5
0.0
应答 (nm)
抗 -ALK1.8 (50nM)
抗 -ALK1.8 (100nM)
抗 -ALK1.8 (200nM)
抗 -ALK1.8 (200nM, ACVR2A 底物)
500
1000
时间 (s)

图1B

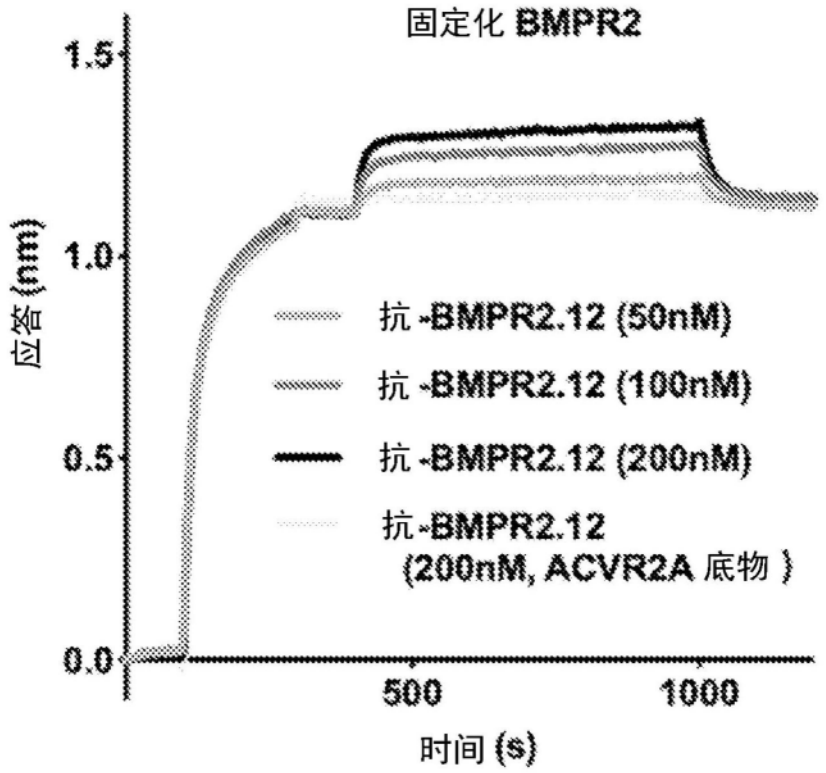

固定化 BMPR2
1.5
1.0
0.5
0.0
应答 (nm)
抗 -BMPR2.12 (50nM)
抗 -BMPR2.12 (100nM)
抗 -BMPR2.12 (200nM)
抗 -BMPR2.12
(200nM, ACVR2A 底物)
500
1000
时间 (s)

图1C

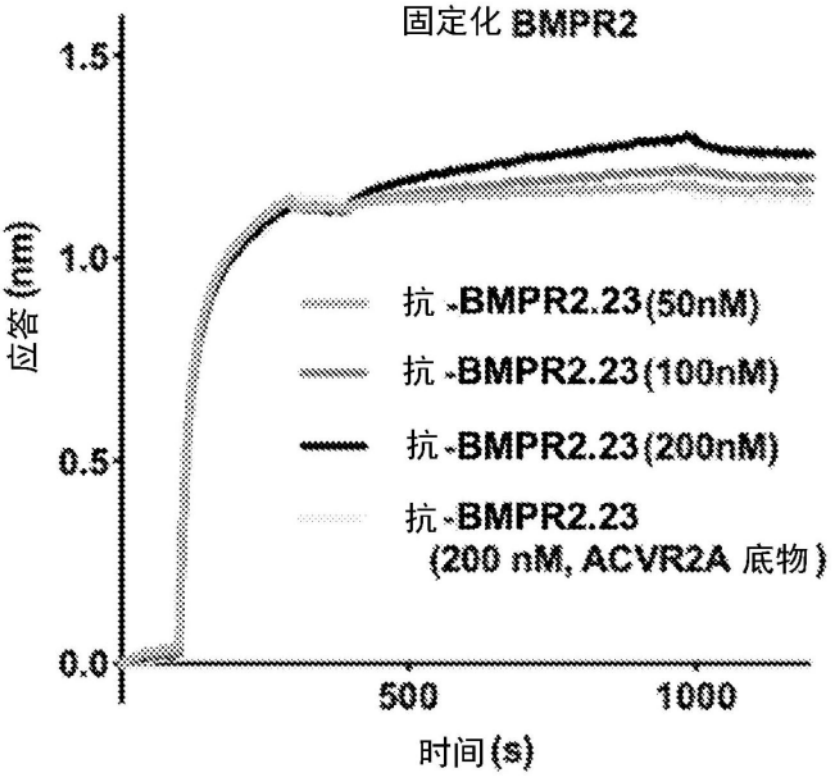

固定化 BMPR2
1.5
1.0
0.5
0.0
应答 (nm)
抗 -BMPR2.23(50nM)
抗 -BMPR2.23(100nM)
抗 -BMPR2.23(200nM)
抗 -BMPR2.23
(200 nM, ACVR2A 底物)
500
1000
时间 (s)

图1D

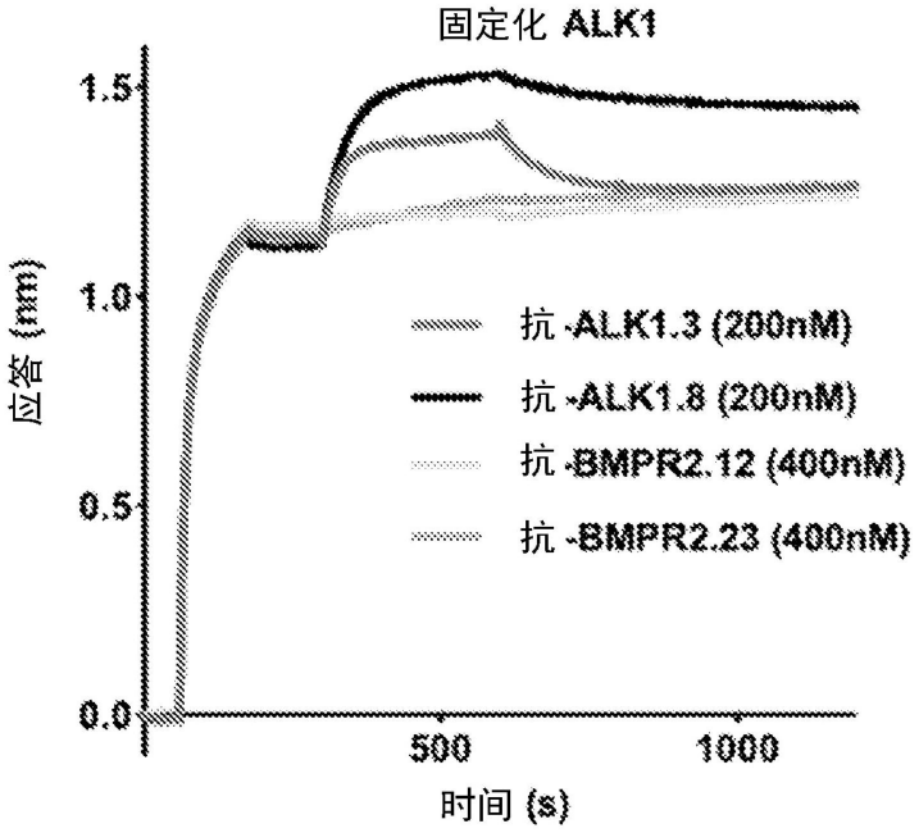

固定化 ALK1
1.5
1.0
0.5
0.0
应答 (nm)
500
1000
时间 (s)
抗 -ALK1.3 (200nM)
抗 -ALK1.8 (200nM)
抗 -BMPR2.12 (400nM)
抗 -BMPR2.23 (400nM)

图2A

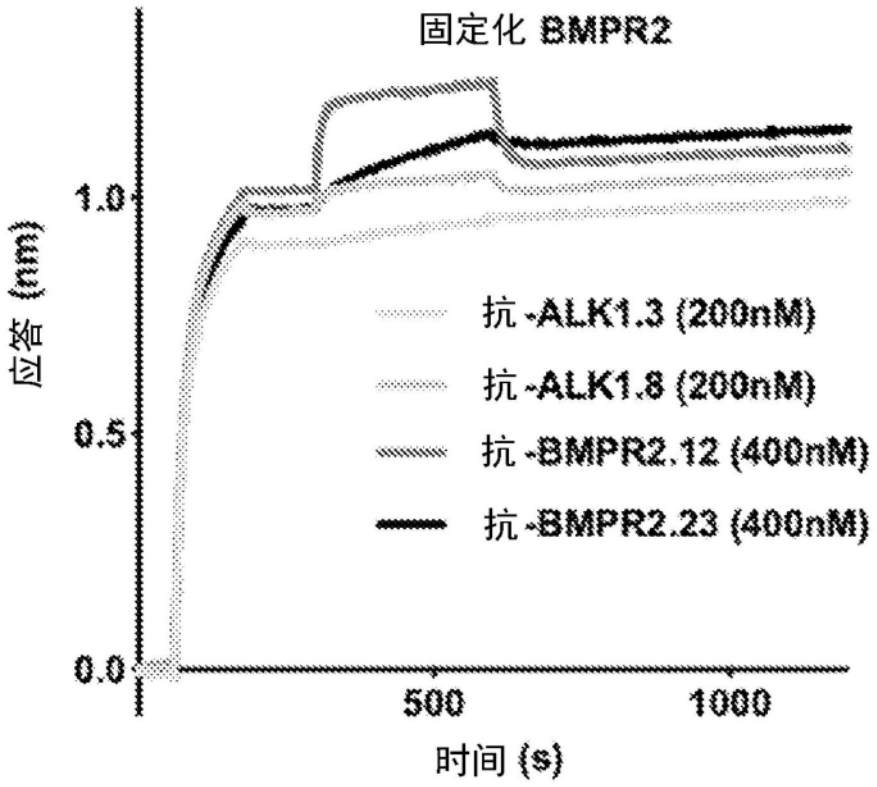

固定化 BMPR2
应答 (nm)
1.0
0.5
0.0
500
1000
时间 (s)
抗 -ALK1.3 (200nM)
抗 -ALK1.8 (200nM)
抗 -BMPR2.12 (400nM)
抗 -BMPR2.23 (400nM)

图2B

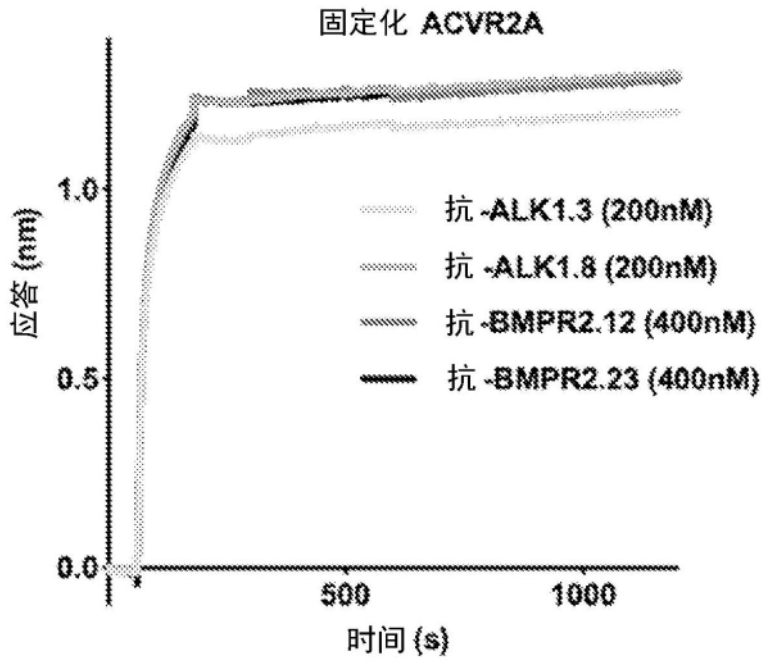

固定化 ACVR2A
应答 (nm)
1.0
0.5
0.0
500
1000
时间 (s)
抗 -ALK1.3 (200nM)
抗 -ALK1.8 (200nM)
抗 -BMPR2.12 (400nM)
抗 -BMPR2.23 (400nM)

图2C

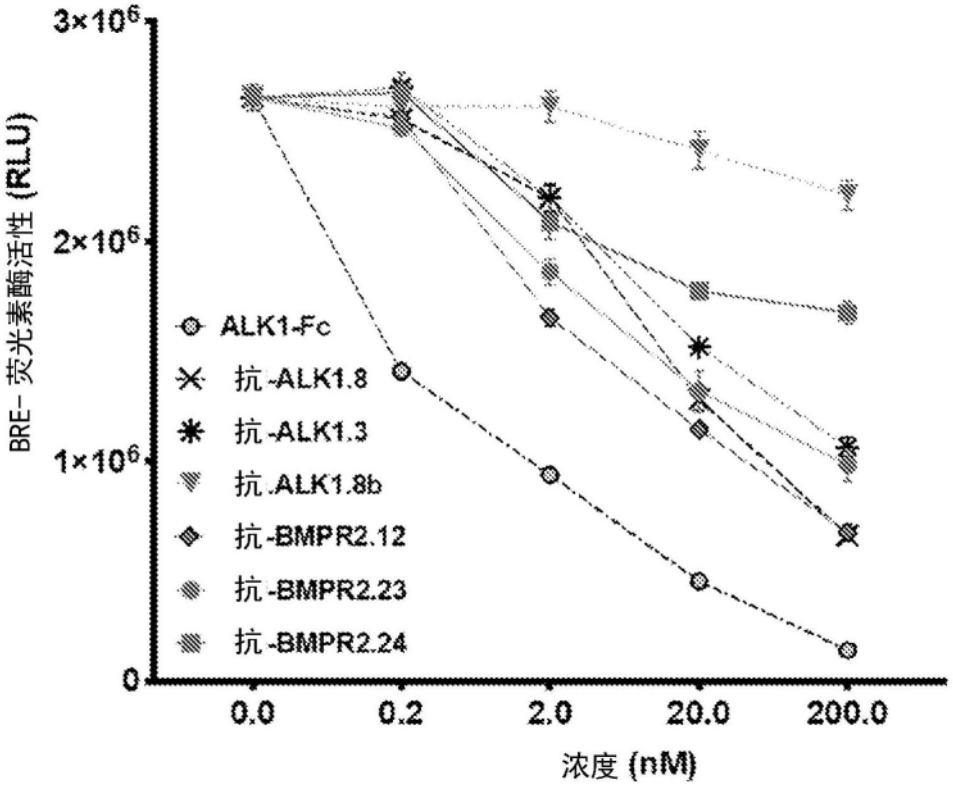

3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
BRE-荧光素酶活性 (RLU)
ALK1-Fc
抗-ALK1.8
抗-ALK1.3
抗.ALK1.8b
抗-BMPR2.12
抗-BMPR2.23
抗-BMPR2.24
0.0
0.2
2.0
20.0
200.0
浓度 (nM)

图3

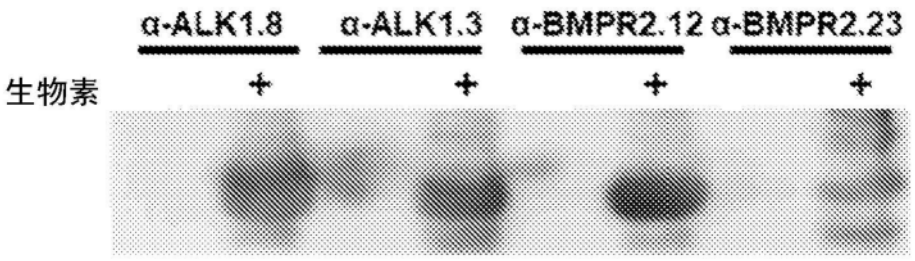

α-ALK1.8
α-ALK1.3
α-BMPR2.12
α-BMPR2.23
生物素
+
+
+
+

图4A

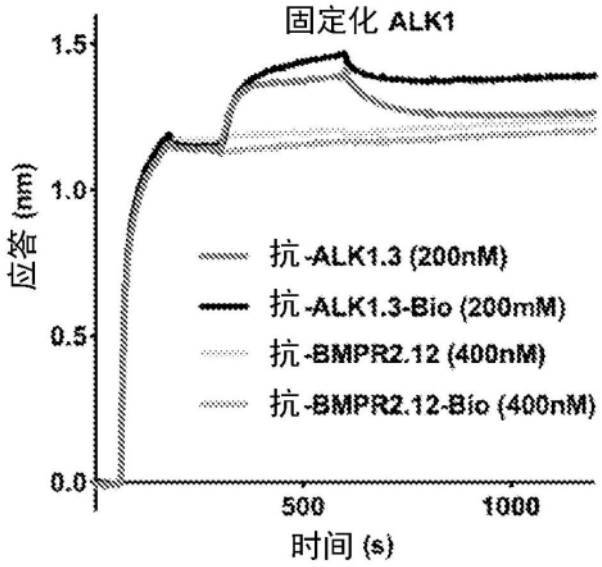

固定化 ALK1
1.5
1.0
0.5
0.0
应答 (nm)
500
1000
时间 (s)
抗-ALK1.3 (200nM)
抗-ALK1.3-Bio (200mM)
抗-BMPR2.12 (400nM)
抗-BMPR2.12-Bio (400nM)

图4B

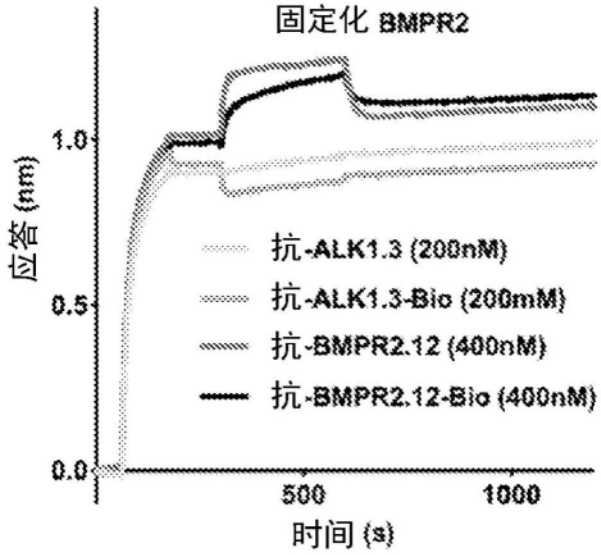

固定化 BMPR2
1.0
0.5
0.0
应答 (nm)
500
1000
时间 (s)
抗-ALK1.3 (200nM)
抗-ALK1.3-Bio (200mM)
抗-BMPR2.12 (400nM)
抗-BMPR2.12-Bio (400nM)

图4C

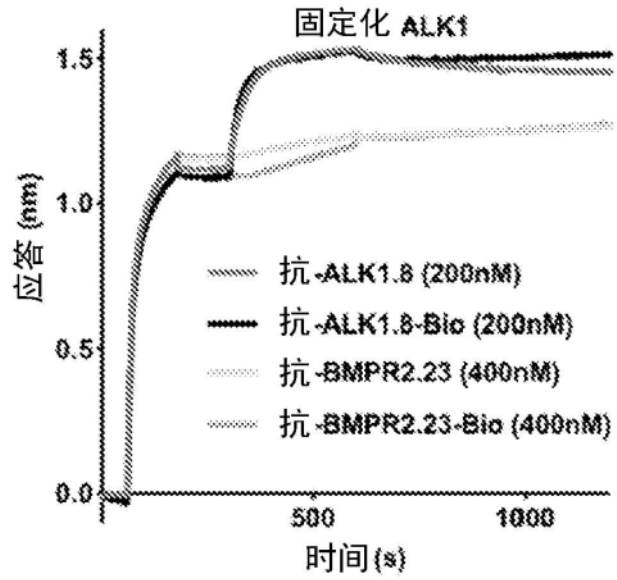

固定化 ALK1
1.5
1.0
0.5
0.0
应答 (nm)
抗-ALK1.8 (200nM)
抗-ALK1.8-Bio (200nM)
抗-BMPR2.23 (400nM)
抗-BMPR2.23-Bio (400nM)
500
1000
时间(s)

图4D

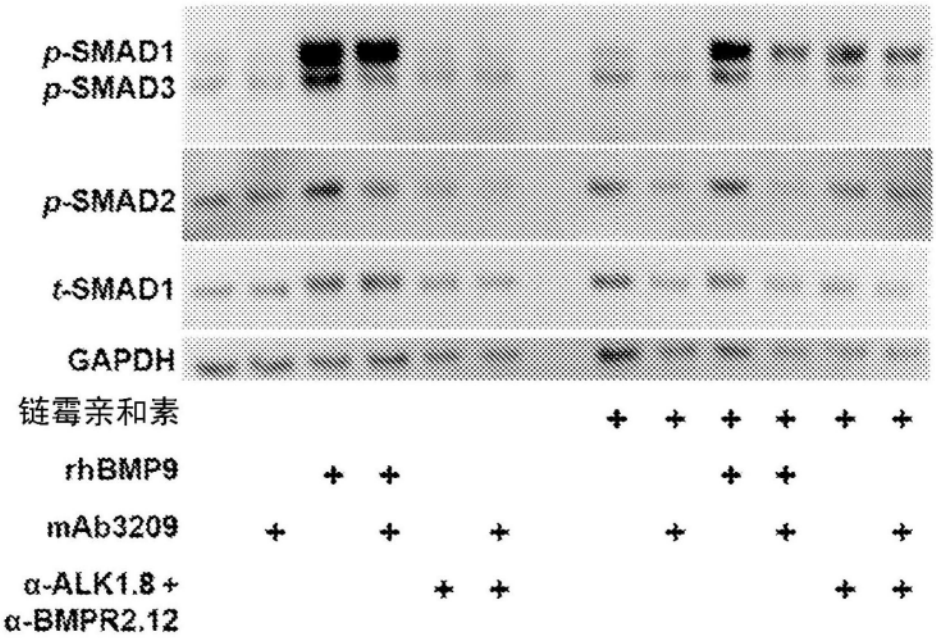

p-SMAD1
p-SMAD3
p-SMAD2
t-SMAD1
GAPDH
链霉亲和素
rhBMP9
mAb3209
α-ALK1.8 +
α-BMPR2.12

图5

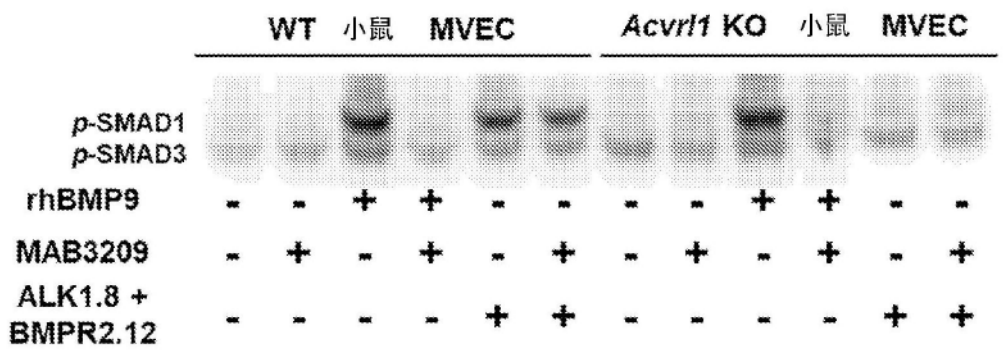

WT 小鼠 MVEC
Acvrl1 KO 小鼠 MVEC
p-SMAD1
p-SMAD3
rhBMP9
MAB3209
ALK1.8 +
BMPR2.12

图6A

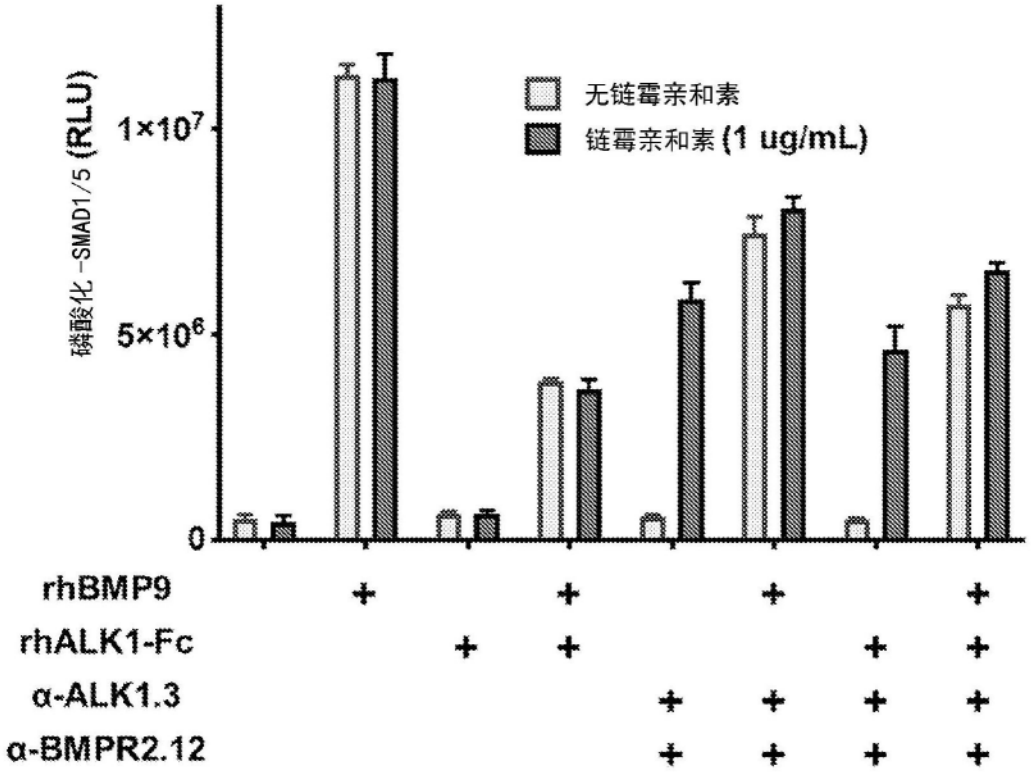

磷酸化-SMAD1/5 (RLU)
1×10^7
5×10^6
0
无链霉亲和素
链霉亲和素 (1 ug/mL)
rhBMP9
rhALK1-Fc
α-ALK1.3
α-BMPR2.12

图6B

克隆 B15 (抗 -BMPR1A/ALK3)					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 **CDR1**	GYTFTGY---	GYTFTGYYMH	-----GYYMH	----TGYYMH	GYTFTGYY--
重链 **CDR2**	-----NPNSGG---- -----	---RINPNSGGTN-- -----	--- RINPNSGGTNYAQ KFQG	WMGRINPN SGGTN------	----INPNSGGT-------
重链 **CDR3**	-- DPTYYDILTGPE Y	-- DPTYYDILTGPEY	--DPTYYDILTGPEY	ARDPTYYDIL TGPE-	ARDPTYYDILTGPEY
轻链 **CDR1**	TGTNTDIGYYN YVS--	TGTNTDIGYYNYV S--	TGTNTDIGYYNYV S--	------ IGYYNYVSWY	---NTDIGYYNY----
轻链 **CDR2**	----EVDNRPS	----EVDNRPS	----EVDNRPS	LLIFEVDNRP-	----EV-----
轻链 **CDR3**	SSYSTYNILL	SSYSTYNILL	SSYSTYNILL	SSYSTYNIL-	SSYSTYNILL
重链： EVQLLESEAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARDPTYYDILTGPEYWGQGTVTVSS					
轻链： LPVLTQPASVSGSPGQSITFSCTGTNTDIGYYNYVSWYQQLPGKAPKLLIFEVDNRPSGVPSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYSTYNILLFGGGTKLTVLG					

图7

克隆 B16 (抗-BMPR1A/ALK3)					
(VK- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GYNFAGY--- ------	GYNFAGYYVH	------GYYVH	----AGYYVH	GYNFAGYY--
重链 CDR2	NPNSGG---- ------	--- WINPNSGGTD- -------	--- WINPNSGGTDYAQK FQG	WMGWINPNSGGTD ---------	---- INPNSGGT--- -----
重链 CDR3	--NLQF	--NLQF	--NLQF	ARNLQ-	ARNLQF
轻链 CDR1	RASQSVSSNL A--	RASQSVSSNLA --	RASQSVSSNLA--	------SSNLAWY	---QSVSSN-- --
轻链 CDR2	----- GASSRAT	----GASSRAT	-----GASSRAT	LLIYGASSRA-	----GA-----
轻链 CDR3	QQYIYSPYT	QQYIYSPYT	QQYIYSPYT	QQYIYSPY-	QQYIYSPYT
重链： EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNFAGYYVHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTDYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMDLSRL RSDDTAVYYCARNLQFFRPGTLVTVSS					
轻链： EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYIY SPYTFGQGTKVDIK					

图7,续

克隆 RI-2 (抗-ACVR1/ALK2)

(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GGSISSSSY---Y	GGSISSSSYYWG	-----SSSYYWG	----SSSSYYWG	GGSISSSSYY---
重链 CDR2	------YYSGS----------	---SIYYSGSTY--------	---SIYYSGSTYYNPSLKS	WIGSIYYSGSTY--------	----IYYSGST----------
重链 CDR3	--QVGPVLKS	--QVGPVLKS	--QVGPVLKS	ARQVGPVLK-	ARQVGPVLKS
轻链 CDR1	GGNNIGSKNVH--	GGNNIGSKNVH--	GGNNIGSKNVH--	-------SKNVHWY	---NIGSKN----
轻链 CDR2	-----DDSDRPS	-----DDSDRPS	-----DDSDRPS	LVIYDDSDRP-	-----DD------
轻链 CDR3	QAWDSSTAVV	QAWDSSTAVV	QAWDSSTAVV	QAWDSSTAV-	QAWDSSTAVV
重链：QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRATISVDTSKNQFSLKMTSVTAADTAIYYCARQVGPVLKSVSQGTLVTVTS					
轻链：SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYDDSDRPSGTSERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVVFGGGTKLTVLG					

图7,续

克隆 RI-3: (抗-ALK2 (ACVR1))					
(VH- 接头 -VK)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 **CDR1**	GFTFSSY-- --	GFTFSSYAMS	-----SYAMS	----SSYAMS	GFTFSSYA-- -
重链 **CDR2**	------ SGSGGS-- -------	--- AISGSGGST Y-------	--- AISGSGGSTYYA DSVKG	WVSAISGSGGS TY-------	---- ISGSGGST- ------
重链 **CDR3**	-- SASFFDY	--SASFFDY	--SASFFDY	AKSASFFD-	AKSASFFDY
轻链 **CDR1**	RASQSVSS SYLA--	RASQSVSSS YLA--	RASQSVSSSYLA --	------- SSSYLAWY	--- QSVSSSY-- --
轻链 **CDR2**	----- GASSRAT	----- GASSRAT	-----GASSRAT	LLIYGASSRA-	----GA--- --
轻链 **CDR3**	QQHFRWPW T	QQHFRWPWT	QQHFRWPWT	QQHFRWPW-	QQHFRWPWT
重链： EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSASFFDYWGQGTLVTVSS					
轻链： EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQHFRWPWTFGQGTKVEIK					

图7,续

克隆 RI-4: (抗-ALK2 (ACVR1))					
(VH- 接头 -VK)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 **CDR1**	GASISSGGY ----	GASISSGGYY WS	-----SGGYYWS	----SSGGYYWS	GASISSGGYY --
重链 **CDR2**	----- YYSGS---- -----	--- YSYYSGSTY- -------	--- YSYYSGSTYYNP SLKS	--------- WIGYSYYSGSTY --------	---- SYYSGST--- -----
重链 **CDR3**	--GGVRFDL	--GGVRFDL	--GGVRFDL	ARGGVRFD-	ARGGVRFDL
轻链 **CDR1**	SGSSSNIGS NTVN--	SGSSSNIGSN TVN--	SGSSSNIGSNTV N--	------- IGSNTVNWY	--- SSNIGSNT-- --
轻链 **CDR2**	----- SNNQRPS	----- SNNQRPS	----SNNQRPS	LLIYSNNQRP-	----SN---- -
轻链 **CDR3**	AAWDDSLNG VV	AAWDDSLNGV V	AAWDDSLNGVV	AAWDDSLNGV-	AAWDDSLNGV V
重链： QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGASISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYSYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLYLT SVTAADTAVYHCARGGVRFDLWGQGTLVTVSS					
轻链： SYELTQPPSASGTPGQKVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEA DYYCAAWDDSLNGVVFGGGTKVTVLG					

图7,续

克隆RI-2-7 (抗-ALK2 (ACVR1))					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链CDR1	GFTFSSY---	GFTFSSYAMS	----SYAMS	---SSYAMS	GFTFSSYA--
重链CDR2	-----SGSGGS--------	---AISGSGGSTY--------	---AISGSGGSTYYADSVKG	WVSAISGSGGSTY----------	---ISGSGGST----------
重链CDR3	--IPWGDYDFWSGYYTRPGHSGMDV	--IPWGDYDFWSGYYTRPGHSGMDV	--IPWGDYDFWSGYYTRPGHSGMDV	AKIPWGDYDFWSGYYTRPGHSGMD-GYYTRPGHSGMDV	AKIPWGDYDFWSGYYTRPGHSGMDV
轻链CDR1	SGDALPKKYAY--	SGDALPKKYAY--	SGDALPKKYAY--	------KKYAYWY	---ALPKKY----
轻链CDR2	----EDSKRPS	----EDSKRPS	----EDSKRPS	LVIYEDSKRP-	----ED------
轻链CDR3	YSTDSSGNPV	YSTDSSGNPV	YSTDSSGNPV	YSTDSSGNP-	YSTDSSGNPV
重链： EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKIPWGDYDFWSGYYTRPGHSGMDVWGQGTLVTVSS					
轻链： SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTVSGAQVEDEAD YYCYSTDSSGNPVFGGGTKLTVLG					

图7,续

克隆 RI-9: (抗 -ALK2 (ACVR1))					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GFTFRAY--- --------	GFTFRAYPMS ----------	-----AYPMS ----------	----RAYPMS ----------	GFTFRAYP-- ----------
重链 CDR2	-----TSSG-- --------	SITSSGSY--- ----	--- SITSSGSYYADS VKG	WVSSITSSGSY-- ------	----ITSSGS- --------
重链 CDR3	--VGVTDFDY ----------	--VGVTDFDY ----------	--VGVTDFDY ----------	ARVGVTDFD- ----------	ARVGVTDFDY ----------
轻链 CDR1	AGSSSNIGAGY DVH--	AGSSSNIGAGY DVH--	AGSSSNIGAGYD VH--	------ IGAGYDVHWY	--- SSNIGAGYD-- --
轻链 CDR2	----DSSNRPS ----------	----DSSNRPS ----------	----DSSNRPS ----------	LLIFDSSNRP- ----------	----DS------ ----------
轻链 CDR3	QSYDFRLSGSM V	QSYDFRLSGSM V	QSYDFRLSGSMV ----------	QSYDFRLSGSM- ----------	QSYDFRLSGSM V
重链： EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRAYPMSWVRQAPGKGLEWVSSITSSGSYYADSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSL RADDTAVYYCARVGVTDFDYWGQGTLVTVSS					
轻链： QAVLTQPPSVSGAPGQRVTISCAGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIFDSSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDFRLSGSMVFGGGTKLTVLG					

图7,续

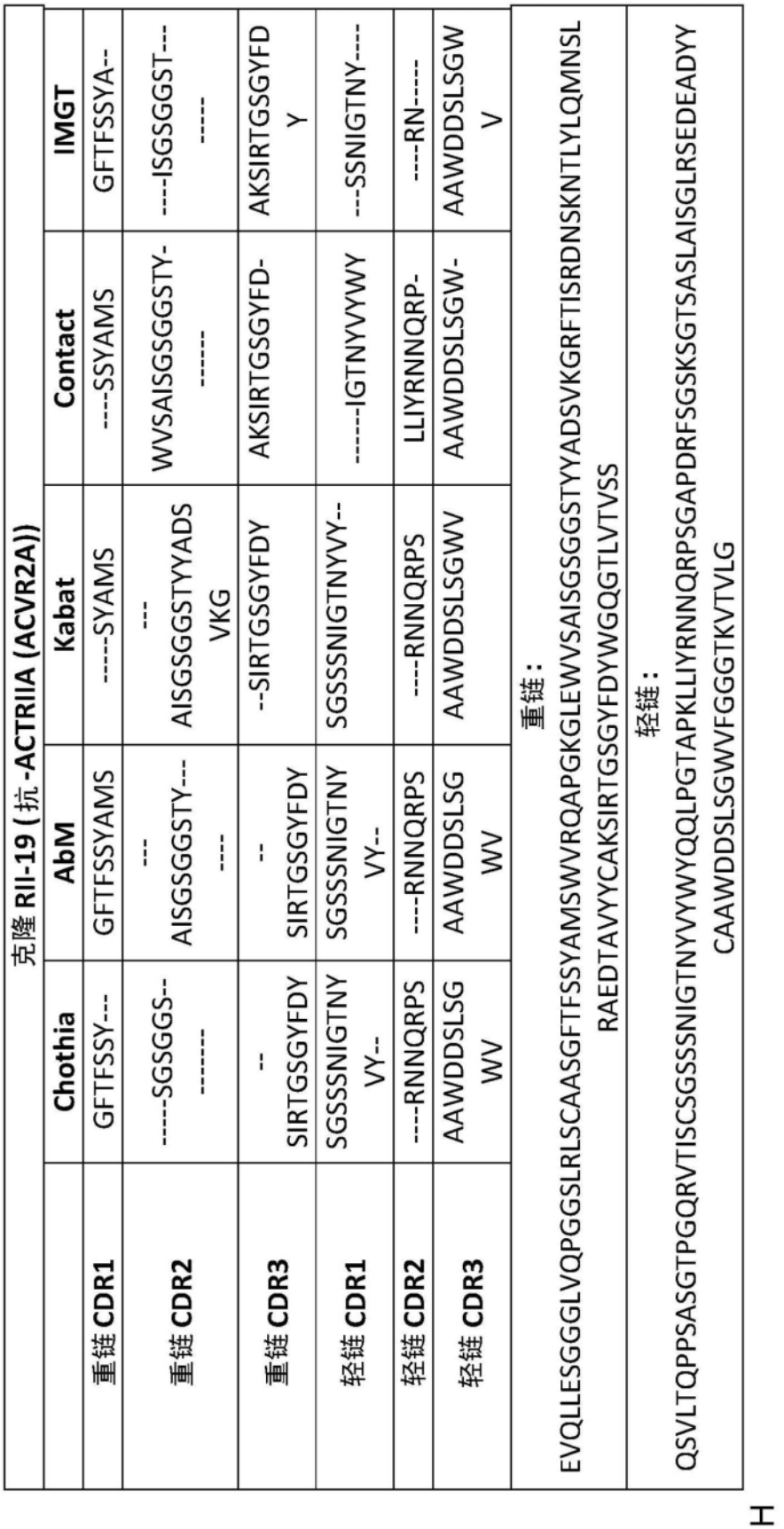

克隆 RII-19 (抗-ACTRIIA (ACVR2A))
Chothia
AbM
Kabat
Contact
IMGT
重链 CDR1
GFTFSSY---
GFTFSSYAMS
-----SYAMS
----SSYAMS
GFTFSSYA--
重链 CDR2
-----SGSGGS---
AISGSGGSTY-----
AISGSGGSTYYADSVKG
WVSAISGSGGSTY-----
----ISGSGGST-----
重链 CDR3
SIRTGSGYFDY
SIRTGSGYFDY
--SIRTGSGYFDY
AKSIRTGSGYFDY
轻链 CDR1
SGSSSNIGTNYVY--
SGSSSNIGTNYVY--
SGSSSNIGTNYVY--
------IGTNYVYWY
---SSNIGTNY----
轻链 CDR2
----RNNQRPS
----RNNQRPS
----RNNQRPS
LLIYRNNQRP-
----RN-----
轻链 CDR3
AAWDDSLSGWV
AAWDDSLSGWV
AAWDDSLSGWV
AAWDDSLSGW-
AAWDDSLSGWV
重链：
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSIRTGSGYFDYWGQGTLVTVSS
轻链：
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGTNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGAPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKVTVLG
H

图7,续

克隆 **H1-2**（抗－激活素 **RIIA (ACVR2A)**）

	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 **CDR1**	GYTFTSY---	GYTFTSYYMH	----SYYMH	----TSYYMH	GYTFTSYY--
重链 **CDR2**	-----NPSGGS--- -------	---IINPSGGSTS--- ----	WMGIINPSGGST S------	WMGIINPSGGSTS -------	----INPSGGST--- -----
重链 **CDR3**	-- DLLLYGRGGG FQH	-- DLLLYGRGGGFQ H	-- DLLLYGRGGGFQ H	ARDLLLYGRGGGF Q-	ARDLLLYGRGG GFQH
轻链 **CDR1**	SGSSSNIGSNY VY--	SGSSSNIGSNYVY --	SGSSSNIGSNYVY --	------IGSNYVYWY	---SSNIGSNY----
轻链 **CDR2**	----RNNQRPS	----RNNQRPS	----RNNQRPS	LLIYRNNQRP-	----RN-----
轻链 **CDR3**	AAWDDSLSG WV	AAWDDSLSGWV	AAWDDSLSGWV	AAWDDSLSGW-	AAWDDSLSGW V

重链：

QVQLQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME
LSSLRSEDTAVYYCARDLLLYGRGGGFQHWGQGTLVTVSS

轻链：

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD
YYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVLG

图7,续

克隆 H2-11 (抗 - 激活素 RIIB (ACVR2B))

	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GFTFDDY-- -	GFTFDDYGMS	-----DYGMS	----DDYGMS	GFTFDDYG- -
重链 CDR2	----- NWNGGS--- ------	--- GINWNGGSTG -------	--- GINWNGGSTGYAD SVKG	WVSGINWNGGS TG--------	---- INWNGGST- ------
重链 CDR3	--KSTGDY	--KSTGDY	--KSTGDY	ARKSTGD-	ARKSTGDY
轻链 CDR1	QGDSLRSYY AS--	QGDSLRSYYA S--	QGDSLRSYYAS--	------- SYYASWY	--SLRSYY- ---
轻链 CDR2	---- GKNNRPS	---- GKNNRPS	----GKNNRPS	LVIYGKNNRP-	----GK--- --
轻链 CDR3	NSRDNSGKH LWV	NSRDNSGKHL WV	NSRDNSGKHLWV	NSRDNSGKHLW -	NSRDNSGKH LWV

重链：

EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTIST
DNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARKSTGDYWGQGTLVTVSS

轻链：

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPARFSGSSSGNTASLTITG
AQAEDEADYYCNSRDNSGKHLWVFGGGTKLTVLG

图7,续

克隆 H2-15 (抗－激活素 RIIB (ACVR2B))					
	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GFTFSDY--- ------	GFTFSDYYMS	-----DYYMS	----SDYYMS	GFTFSDYY- -
重链 CDR2	SSSSSY----- ------	YISSSSSYTN ---------	--- YISSSSSYTNYA DSVKG	WVSYISSSSSY TN--------	---- ISSSSSYT- --------
重链 CDR3	-- VNYYYGMDV	-- VNYYYGMDV	--VNYYYGMDV	ARVNYYYGMD-	ARVNYYYGM DV
轻链 CDR1	TGSSSNIGAG YDVH--	TGSSSNIGAG YDVH--	TGSSSNIGAGYD VH--	------- IGAGYDVHWY	--- SSNIGAGYD ----
轻链 CDR2	---- GNSNRPS	---- GNSNRPS	----GNSNRPS	LLIYGNSNRP-	----GN--- --
轻链 CDR3	AAWDDSLNGP RMV	AAWDDSLNGP RMV	AAWDDSLNGPRM V	AAWDDSLNGPR M-	AAWDDSLNG PRMV
重链： EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSSSYTNYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVNYYYGMDVWGQGTLVTVSS					
轻链： QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPRMVFGGGTKLTVLG					

图7,续

克隆H5-2 (抗-ALK4 (激活素RIB))					
	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链CDR1	GGSISSGGY---	GGSISSGGYYWS	------SGGYYWS	----SSGGYYWS	GGSISSGGYY--
重链CDR2	------YYSGS------------	---YIYYSGSTY--------	---YIYYSGSTYYNPSLKG	----------WIGYIYYSGSTY----------	----IYYSGST--------
重链CDR3	--EEVGDWFDP	--EEVGDWFDP	--EEVGDWFDP	----------AREEVGDWFD-	AREEVGDWFDP
轻链CDR1	QGDSLRKYYAS--	QGDSLRKYYAS--	QGDSLRKYYAS-	----------KYYASWY	---SLRKYY------
轻链CDR2	-----GKNKRPS	-----GKNKRPS	----GKNKRPS	LVIYGKNKRP-	----GK------
轻链CDR3	NSWDSSGNHVV	NSWDSSGNHVV	NSWDSSGNHVV	NSWDSSGNHV-	NSWDSSGNHVV
重链： QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKGRVTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAREEVGDWFDPWGQGTLVTVSS					
轻链： SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRKYYASWYQQKAGQAPVLVIYGKNKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQ AEDEADYYCNSWDSSGNHVVFGGGTKLTVLG					

图7,续

克隆H4-1（抗-ALK7 (ACVR1C)）					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GYTFTGY--- ------	GYTFTGYYMH	-----GYYMH	----TGYYMH	GYTFTGYY--
重链 CDR2	NPNGGG---- ------	--- WINPNGGGTK --------	--- WINPNGGGTKY AQKFQG	WMGWINPNGG GTK------	----- INPNGGGT-- -------
重链 CDR3	-- LSDYSSGGP	-- LSDYSSGGP	--LSDYSSGGP	ATLSDYSSGG -	ATLSDYSSGG R
轻链 CDR1	SGSSSNIGSN YVY--	SGSSSNIGSN YVY--	SGSSSNIGSNY VY--	------- IGSNYVYWY	--- SSNIGSNY-- --
轻链 CDR2	----- RNNQRPS	----- RNNQRPS	----RNNQRPS	LLIYRNNQRP -	-----RN----- -
轻链 CDR3	AAWDDSLSGV V	AAWDDSLSGV V	AAWDDSLSGVV	AAWDDSLSGV -	AAWDDSLSGV V
重链： QVQLQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNGGGTKYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSSLRSDDTAVYYCATLSDYSSGGPWGQGTLVTVSS					
轻链： QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCAAWDDSLSGVVFGGGTKLTVLG					

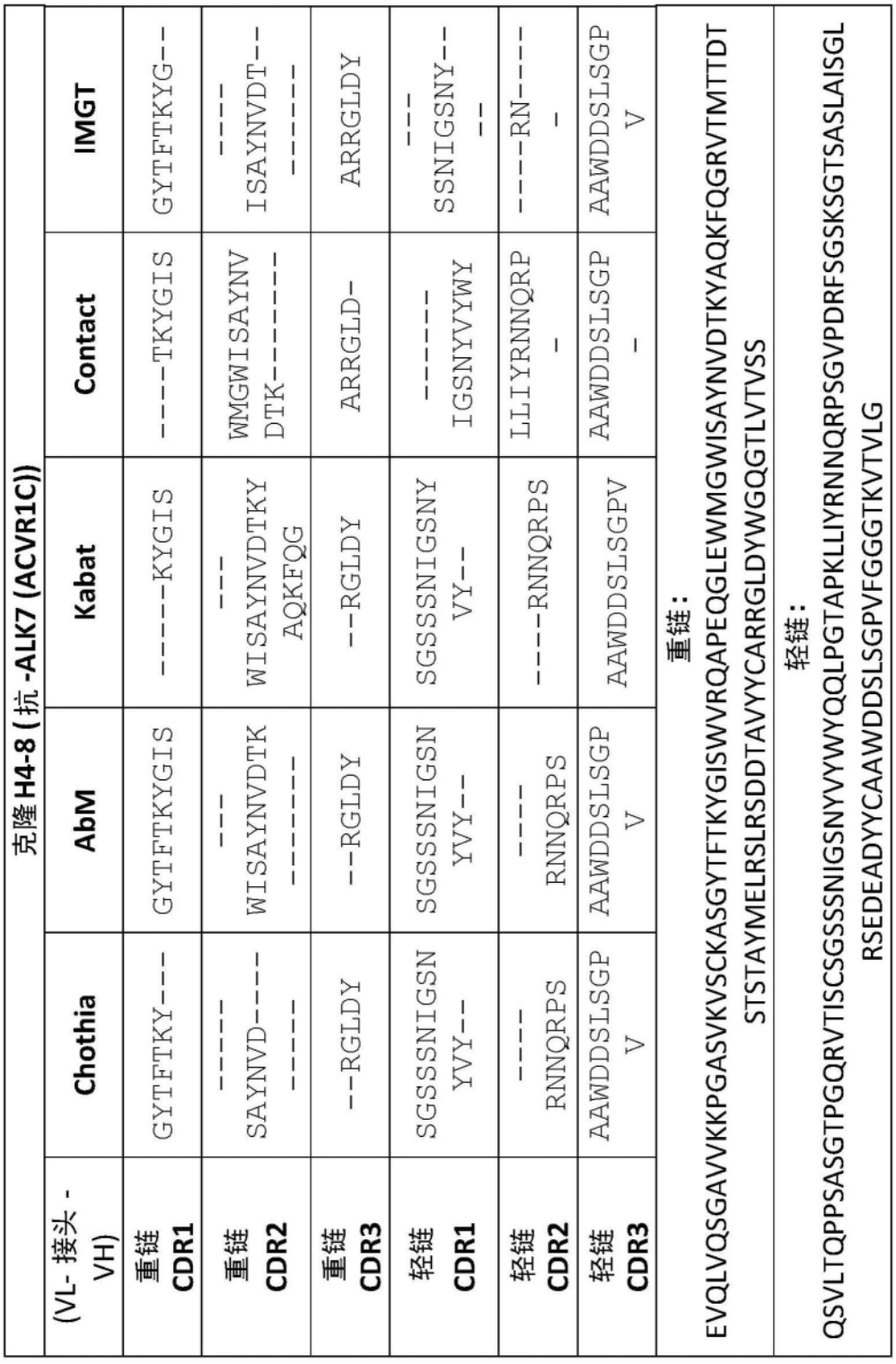
图7,续

克隆H4-4 (抗 -ALK7 (ACVR1C))					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GYTFTGY--- -----	GYTFTGYHVH ---	-----GYHVH ---	----TGYHVH WMGWINPDSG	GYTFTGYH-- ----
重链 CDR2	NPDSGG---- -----	WINPDSGGTN -------	WINPDSGGTNF AQKFQG	GTN--------	INPDSGGT-- ------
重链 CDR3	--RSLDY	--RSLDY	--RSLDY	ARRSLD-	ARRSLDY
轻链 CDR1	SGSSSNIGSN YVY--	SGSSSNIGSN YVY--	SGSSSNIGSNY VY--	------- IGSNYVYWY	--- SSNIGSNY-- --
轻链 CDR2	---- RNNQRPS	---- RNNQRPS	----RNNQRPS	LLIYRNNQRP -	----RN---- -
轻链 CDR3	AAWDDSLSGV V	AAWDDSLSGV V	AAWDDSLSGVV	AAWDDSLSGV -	AAWDDSLSGV V
重链： EVQLVQSGTEVKRPGASVKVSCKASGYTFTGYHVHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNFAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL TSLRSDDTAIYYCARRSLDYWGQGTLVTVSS					
轻链： QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC AAWDDSLSGVVFGGGTKLTVLG					

图7,续

克隆 H4-7 (抗 -ALK7 (ACVR1C))					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GFTFSNA--- -----	GFTFSNAWMS ---	------NAWMS ---	----SNAWMS WVGRIKSKTD	GFTFSNAW-- ----
重链 CDR2	KSKTDGGT-- --------	RIKSKTDGGT TD--------	RIKSKTDGGTT DYAAPVKG	GGTTD----- --	IKSKTDGGTT --------
重链 CDR3	--LVDY	--LVDY	--LVDY	ASLVD-	ASLVDY
轻链 CDR1	SGSSSNIGSN YVY--	SGSSSNIGSN YVY--	SGSSSNIGSNY VY--	------- IGSNYVYWY	--- SSNIGSNY-- --
轻链 CDR2	---- RNNQRPS	---- RNNQRPS	----RNNQRPS	LLIYRNNQRP -	----RN---- -
轻链 CDR3	AAWDDSLNGV V	AAWDDSLNGV V	AAWDDSLNGVV	AAWDDSLNGV -	AAWDDSLNGV V
重链： EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNT LYLQMNSLKTEDTAVYYCASLVDYWGQGTLVTVSS					
轻链： SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSASKSGTSASLAISGLQSADE ADYYCAAWDDSLNGVVFGGGTKLTVLG					

图7,续



克隆H4-8 (抗 -ALK7 (ACVR1C))					
(VL- 接头 - VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 **CDR1**	GYTFTKY--- ------	GYTFTKYGIS	-----KYGIS	----TKYGIS	GYTFTKYG--
重链 **CDR2**	SAYNVD---- -----	--- WISAYNVDTK --------	--- WISAYNVDTKY AQKFQG	WMGWISAYNV DTK--------	---- ISAYNVDT-- ------
重链 **CDR3**	--RGLDY	--RGLDY	--RGLDY	ARRGLD-	ARRGLDY
轻链 **CDR1**	SGSSSNIGSN YVY--	SGSSSNIGSN YVY--	SGSSSNIGSNY VY--	------ IGSNYVYWY	--- SSNIGSNY-- --
轻链 **CDR2**	---- RNNQRPS	---- RNNQRPS	----RNNQRPS	LLIYRNNQRP -	----RN---- -
轻链 **CDR3**	AAWDDSLSGP V	AAWDDSLSGP V	AAWDDSLSGPV	AAWDDSLSGP -	AAWDDSLSGP V
重链： EVQLVQSGAVVKKPGASVKVSCKASGYTFTKYGISWVRQAPEQGLEWMGWISAYNVDTKYAQKFQGRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRGLDYWGQGTLVTVSS					
轻链： QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGTKVTVLG					

图7,续

抗-ALK6.H3.2 (BMPR1B)					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GGSISSGGY ----	GGSISSGGY YWS	----- SGGYYWS	---- SSGGYYWS	GGSISSGGY Y--
重链 CDR2	----- YYSGS---- -----	--- YIYYSGSTY --------	--- YIYYSGSTYYN PSLKG	---- WIGYIYYSG STY------ -	---- IYYSGST-- -------
重链 CDR3	-- EEVGDWFDP	-- EEVGDWFDP	--EEVGDWFDP	AREEVGDWF D-	AREEVGDWF DP
轻链 CDR1	QGDSLRKYY AS--	QGDSLRKYY AS--	QGDSLRKYYAS --	------- KYYASWY	--- SLRKYY---- -
轻链 CDR2	----- GKSKRPS	----- GKSKRPS	----GKSKRPS	LVIYGKSKR P-	----GK--- --
轻链 CDR3	NSWDSSGNH VV	NSWDSSGNH VV	NSWDSSGNHVV	NSWDSSGNH V-	NSWDSSGNH VV
重链： QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCAREEVGDWFDPWGQGTLVTVSS					
轻链： QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGTKVTVLG					

图7,续

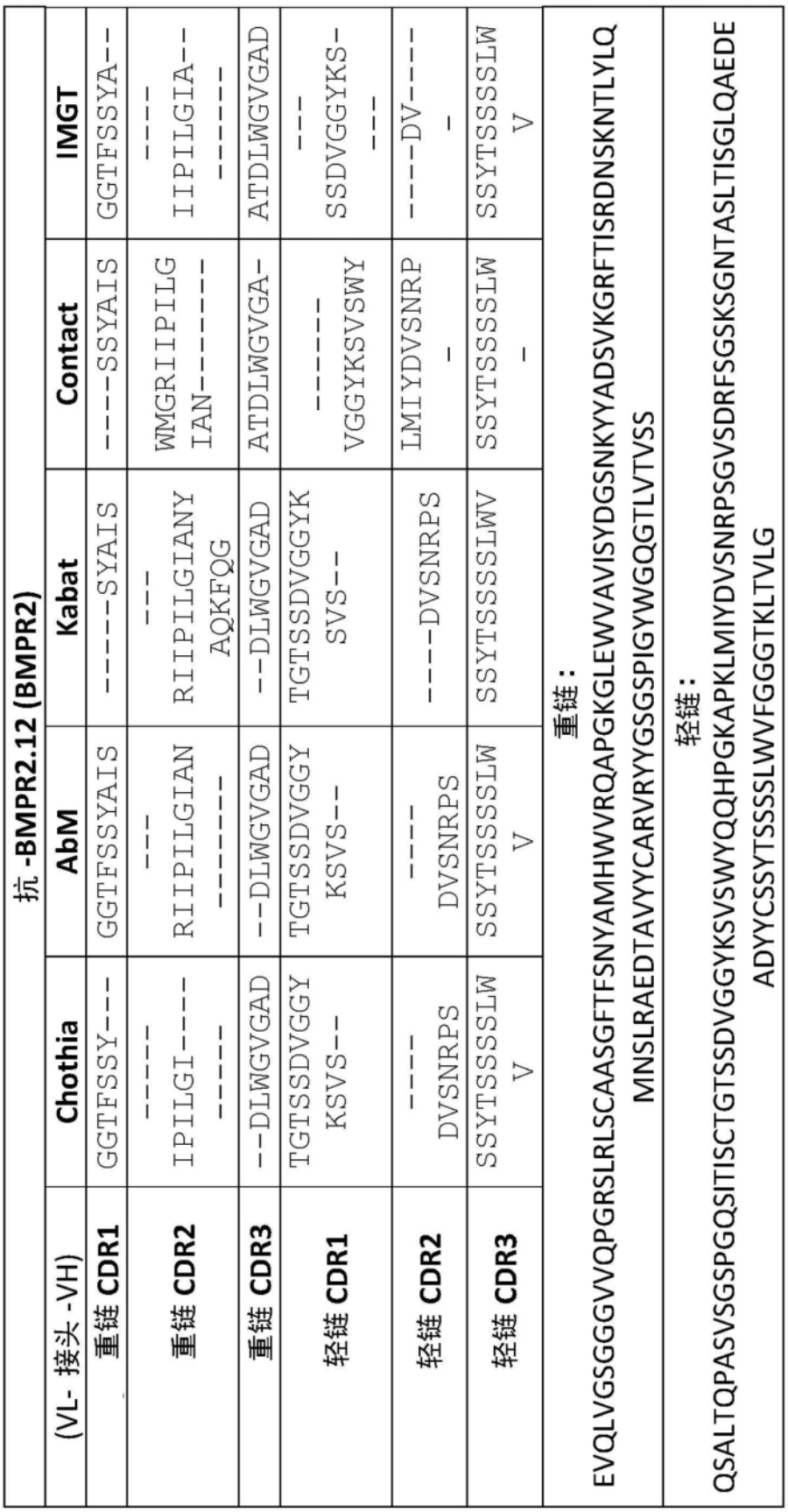

抗 -BMPR2.12 (BMPR2)
(VL- 接头 -VH)
Chothia
AbM
Kabat
Contact
IMGT
重链 CDR1
GGTFSSYAIS
GGTFSSYAIS
-----SYAIS
----SSYAIS
GGTFSSYA--
重链 CDR2
IPILGI----
RIIPILGIAN
RIIPILGIANY
AQKFQG
WMGRIIPILG
IAN------
IIPILGIA--
重链 CDR3
--DLWGVGAD
--DLWGVGAD
--DLWGVGAD
ATDLWGVGA-
ATDLWGVGAD
轻链 CDR1
TGTSSDVGGY
KSVS--
TGTSSDVGGY
KSVS--
TGTSSDVGGYK
SVS--
SSDVGGYKS-
轻链 CDR2
DVSNRPS
DVSNRPS
----DVSNRPS
LMIYDVSNRP
-
----DV----
-
轻链 CDR3
SSYTSSSSLW
V
SSYTSSSSLW
V
SSYTSSSSLWV
SSYTSSSSLW
-
SSYTSSSSLW
V
重链：
EVQLVGSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARVRYYGSGSPIGYWGQGTLVTVSS
轻链：
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKSVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDE
ADYYCSSYTSSSSLWVFGGGTKLTVLG

图7,续

抗-BMPR2.23 (BMPR2)					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GFTFDDY--- ------	GFTFDDYAMH ---	-----DYAMH ---	----DDYAMH ----	GFTFDDYA-- ----
重链 CDR2	SWNSGS---- ------	GISWNSGSIG ----------	GISWNSGSIGY ADSVKG	WVSGISWNSG SIG---------	ISWNSGSI-- -------
重链 CDR3	-- GGWGSSTHYY YGMDV	-- GGWGSSTHYY YGMDV	-- GGWGSSTHYYY GMDV	AKGGWGSSTH YYYGMD-	AKGGWGSSTH YYYGMDV
轻链 CDR1	TLHSGINVAT YRIY--	TLHSGINVAT YRIY--	TLHSGINVATY RIY--	-------- NVATYRIYWY	--- SGINVATYR- ---
轻链 CDR2	----- YKSDLDKHQG S	----- YKSDLDKHQG S	----- YKSDLDKHQGS	YLLTYKSDLD KHQG-	----- YKSDLD---- -
轻链 CDR3	LIWHDYVWY	LIWHDYVWY	LIWHDYVWY	LIWHDYVW-	LIWHDYVWY
重链： EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTALYYCAKGGWGSSTHYYYGMDVWGQGTTVTVSSVDPFVSEYQGQSSDLPQPPVNAGGGSXGGGXRW WLWFR					
轻链： DDDDKLQAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLHSGINVATYRIYWYQQKPGSPPQYLLTYKSDLDKHQGSGVPSRFSGSKDASAN AGILLISGLQSDDEGDYYCLIWHDYVWYFGGGTKVTVLG					

图7,续

克隆 ALK1.2 (抗 -ALK1 (ACVRL1))					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GGSISSDDY-- --	GGSISSDDYY WS	----- SDDYYWS	---- SSDDYYWS	GGSISSDDYY --
重链 CDR2	------ YYSGI------ ----	--- YIYYSGITY- -------	--- YIYYSGITYYN PSLKS	---- WIGYIYYSGI TY--------	---- IYYSGIT--- -----
重链 CDR3	-- EGCNDGVCYN GVFDY	-- EGCNDGVCYN GVFDY	-- EGCNDGVCYNG VFDY	------ AREGCNDGVC YNGVFD-	AREGCNDGVC YNGVFDY
轻链 CDR1	SGDKLGDKYA S--	SGDKLGDKYA S--	SGDKLGDKYAS --	------- DKYASWY	---KLGDKY- ---
轻链 CDR2	----- QDSKRPS	----- QDSKRPS	----QDSKRPS	LVIYQDSKRP -	----QD---- -
轻链 CDR3	QAWDSSTAV	QAWDSSTAV	QAWDSSTAV	QAWDSSTA-	QAWDSSTAV
重链： QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSS					
轻链： SYELTQPPSMSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYY CQAWDSSTAVFGGGTKLTVLG					

图7,续

克隆 ALK1.3 (抗 -ALK1 (ACVRL1))					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GDSIGSGDY-- --	GDSIGSGDYY WS	----- SGDYYWS	---- GSGDYYWS	GDSIGSGDYY --
重链 CDR2	----- YHTGS----- -----	--- YSYHTGSTD- ------	--- YSYHTGSTDYN PSLKS	------ WIGYSYHTGS TD--------	---- SYHTGST--- -----
重链 CDR3	--DYYGYLGY	--DYYGYLGY	--DYYGYLGY	ARDYYGYLG-	ARDYYGYLGY
轻链 CDR1	AGTSSDVGTY NYVS--	AGTSSDVGTY NYVS--	AGTSSDVGTYN YVS--	------ VGTYNYVSWY	--- SSDVGTYNY- ---
轻链 CDR2	---- DVSKRPS	---- DVSKRPS	----DVSKRPS	LMIYDVSKRP -	----DV---- -
轻链 CDR3	YSYTTSSTWV	YSYTTSSTWV	YSYTTSSTWV	YSYTTSSTW-	YSYTTSSTWV
重链： QVQLQESGPGLLKPSQTLSLTCTVSGDSIGSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYSYHTGSTDYNPSLKSRVSISVDRSKNQFSLKL RSVTAADTAVYYCARDYYGYLGYWGQGTLVTVSS					
轻链： QSALTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGTYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCYSYTTSSTWVFGGGTKVTVLG					

图7,续

克隆 ALK1.8 (抗-ALK1 (ACVRL1))					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 CDR1	GGSISSDDY-- --	GGSISSDDYY WS	----- SDDYYWS	---- SSDDYYWS	GGSISSDDYY --
重链 CDR2	----- YYSGI----- ----	--- YIYYSGITY- ------	--- YIYYSGITYYN PSLKS	---- WIGYIYYSGI TY--------	---- IYYSGIT--- -----
重链 CDR3	-- EGCNDGVCYN GVFDY	-- EGCNDGVCYN GVFDY	-- EGCNDGVCYNG VFDY	------ AREGCNDGVC YNGVFD-	AREGCNDGVC YNGVFDY
轻链 CDR1	RASQSISSYL N--	RASQSISSYL N--	RASQSISSYLN --	------- SSYLNWY	---QSISSY- ---
轻链 CDR2	----- AASSLQS	----- AASSLQS	----AASSLQS	LLIYAASSLQ -	----AA----- -
轻链 CDR3	QQSYSTPRT	QQSYSTPRT	QQSYSTPRT	QQSYSTPR-	QQSYSTPRT
重链： QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSDDYYWSWIRQTPGKGLEWIGYIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREGCNDGVCYNGVFDYWGQGTLVTVSS					
轻链： DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYSTPRTFGQGTKVDIK					

图7,续

抗-ALK1.8b (ACVRL1)					
(VL- 接头 -VH)	Chothia	AbM	Kabat	Contact	IMGT
重链 **CDR1**	GFTFSNY--- ------	GFTFSNYAMH	-----NYAMH	----SNYAMH	GFTFSNYA--
重链 **CDR2**	SYDGSN---- ------	--- VISYDGSNKY ---------	--- VISYDGSNKYY ADSVKG	WVAVISYDGS NKY------	----ISYDGSNK-- ------
重链 **CDR3**	-- VRYYGSGSPI GY	-- VRYYGSGSPI GY	-- VRYYGSGSPIG Y	ARVRYYGSGS PIG-	ARVRYYGSGSPIGY
轻链 **CDR1**	SGSSSNIGGN TVN--	SGSSSNIGGN TVN--	SGSSSNIGGNT VN--	------ IGGNTVNWY	---SSNIGGNT--- -
轻链 **CDR2**	---- GDDLRPS	---- GDDLRPS	----GDDLRPS	LLIYGDDLRP -	----GD------
轻链 **CDR3**	AAWDDSLNAY V	AAWDDSLNAY V	AAWDDSLNAYV	AAWDDSLNAY -	AAWDDSLNAYV
重链： QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYM ELSSLRSEDTAVYYCATDLWGVGADWGQGTLVTVSS					
轻链： LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGGNTVNWYHQLPGSAPKLLIYGDDLRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISRFQSGDE ADYYCAAWDDSLNAYVFGTGTKLTVLG					

图7,续

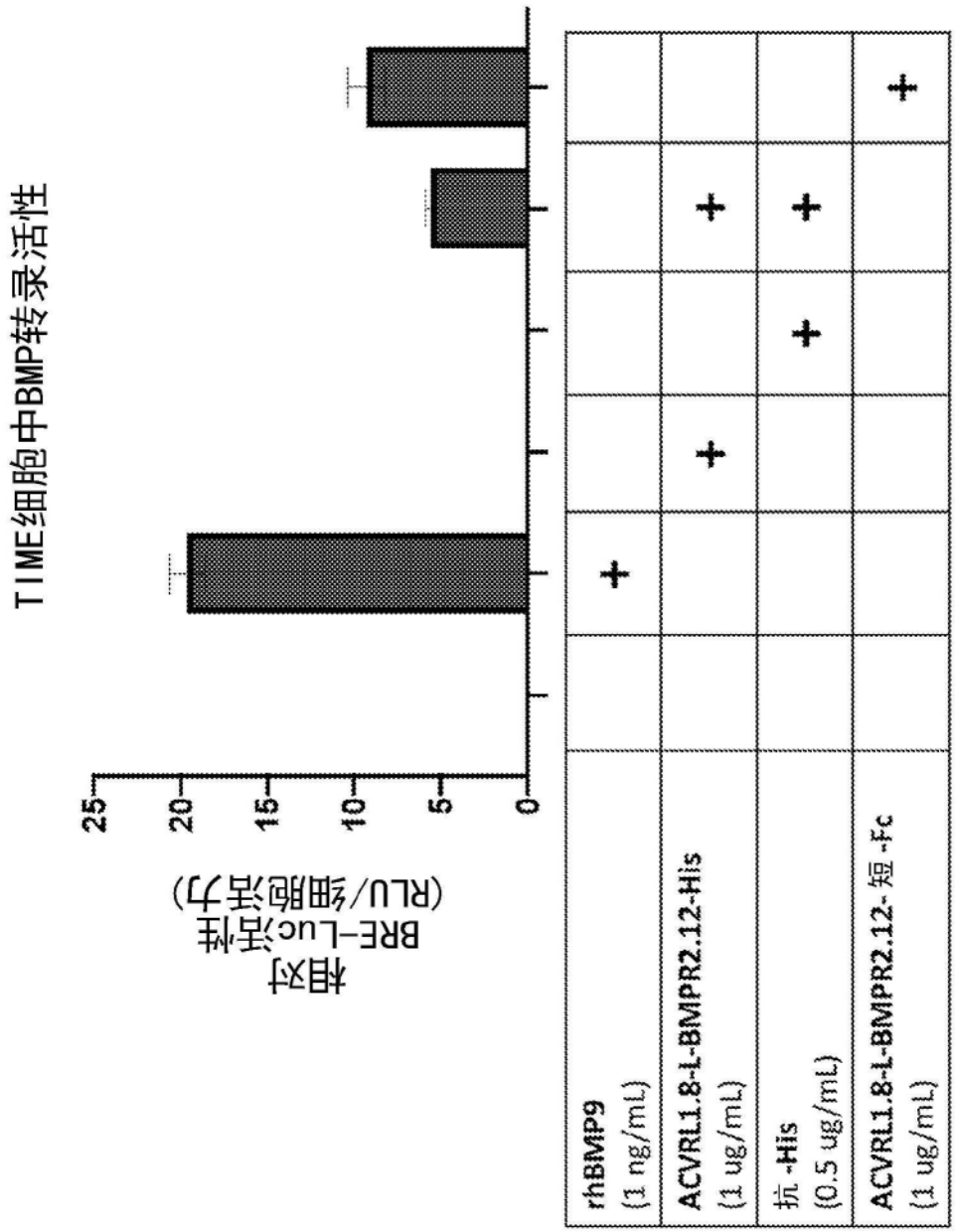

TIME细胞中BMP转录活性
相对
BRE-Luc活性
(RLU/细胞活力)
25
20
15
10
5
0
rhBMP9
(1 ng/mL)
ACVRL1.8-L-BMPR2.12-His
(1 ug/mL)
抗 -His
(0.5 ug/mL)
ACVRL1.8-L-BMPR2.12- 短 -Fc
(1 ug/mL)

图8

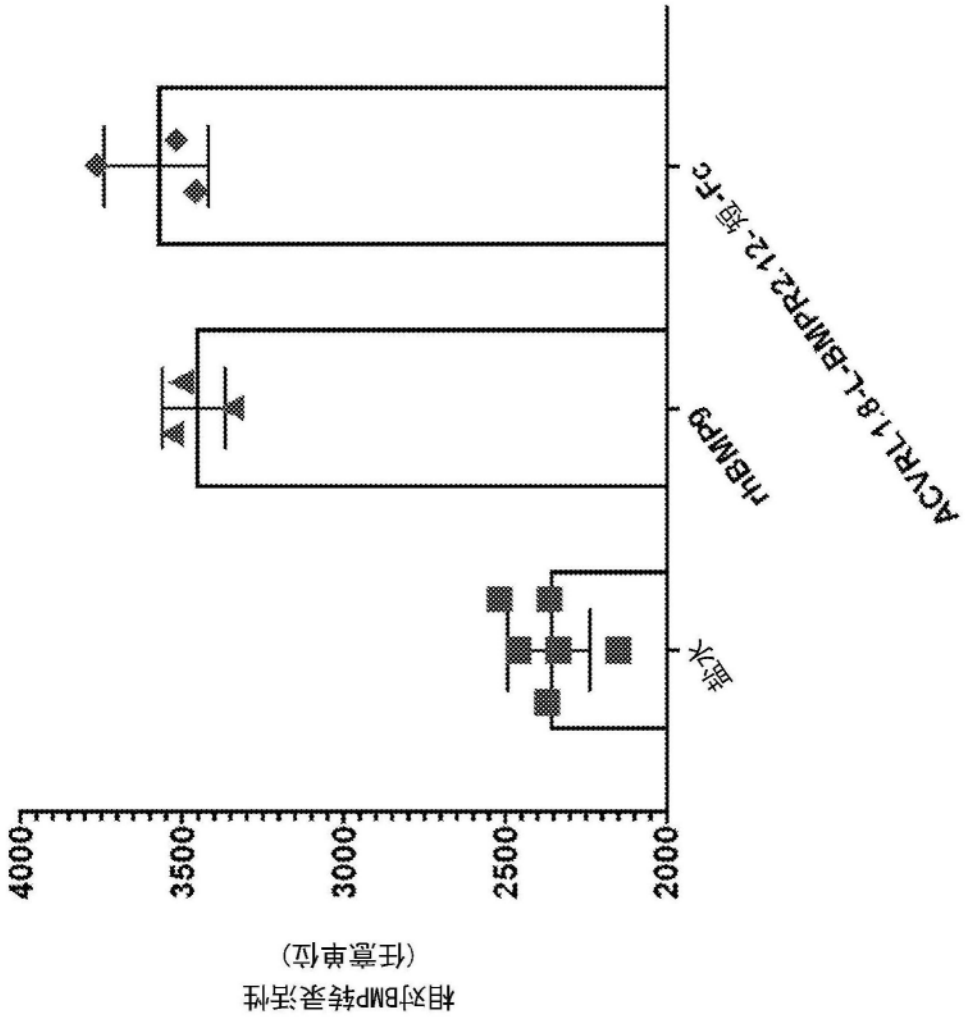

相对BMP转录活性
(任意单位)
4000
3500
3000
2500
2000
盐水
rhBMP9
ACVRL1.8-L-BMPR2.12-短-Fc

图9

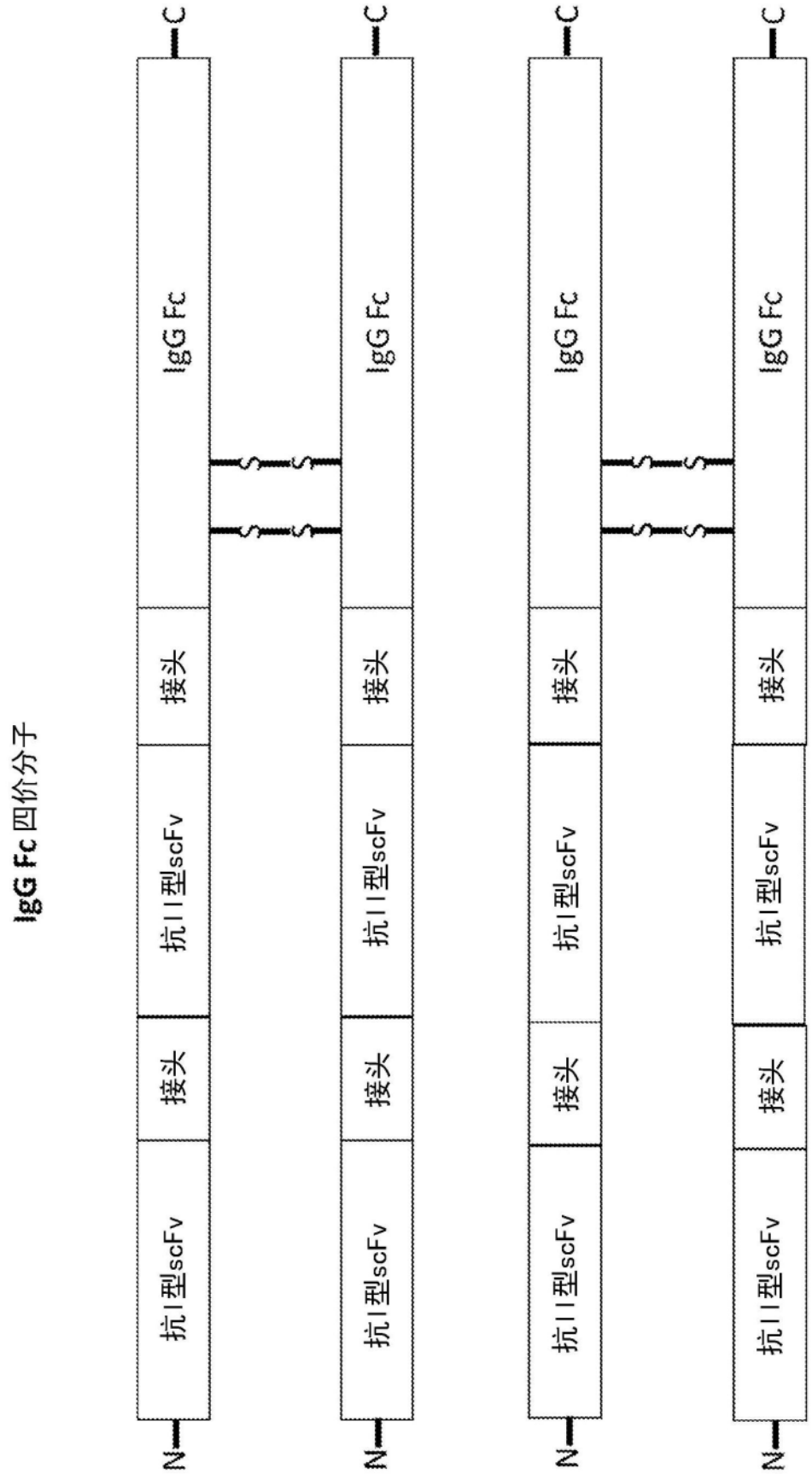

IgG Fc 四价分子
C
IgG Fc
接头
抗II型scFv
接头
抗I型scFv
N
C
IgG Fc
接头
抗II型scFv
接头
抗I型scFv
N
C
IgG Fc
接头
抗I型scFv
接头
抗II型scFv
N
C
IgG Fc
接头
抗I型scFv
接头
抗II型scFv
N

图10A

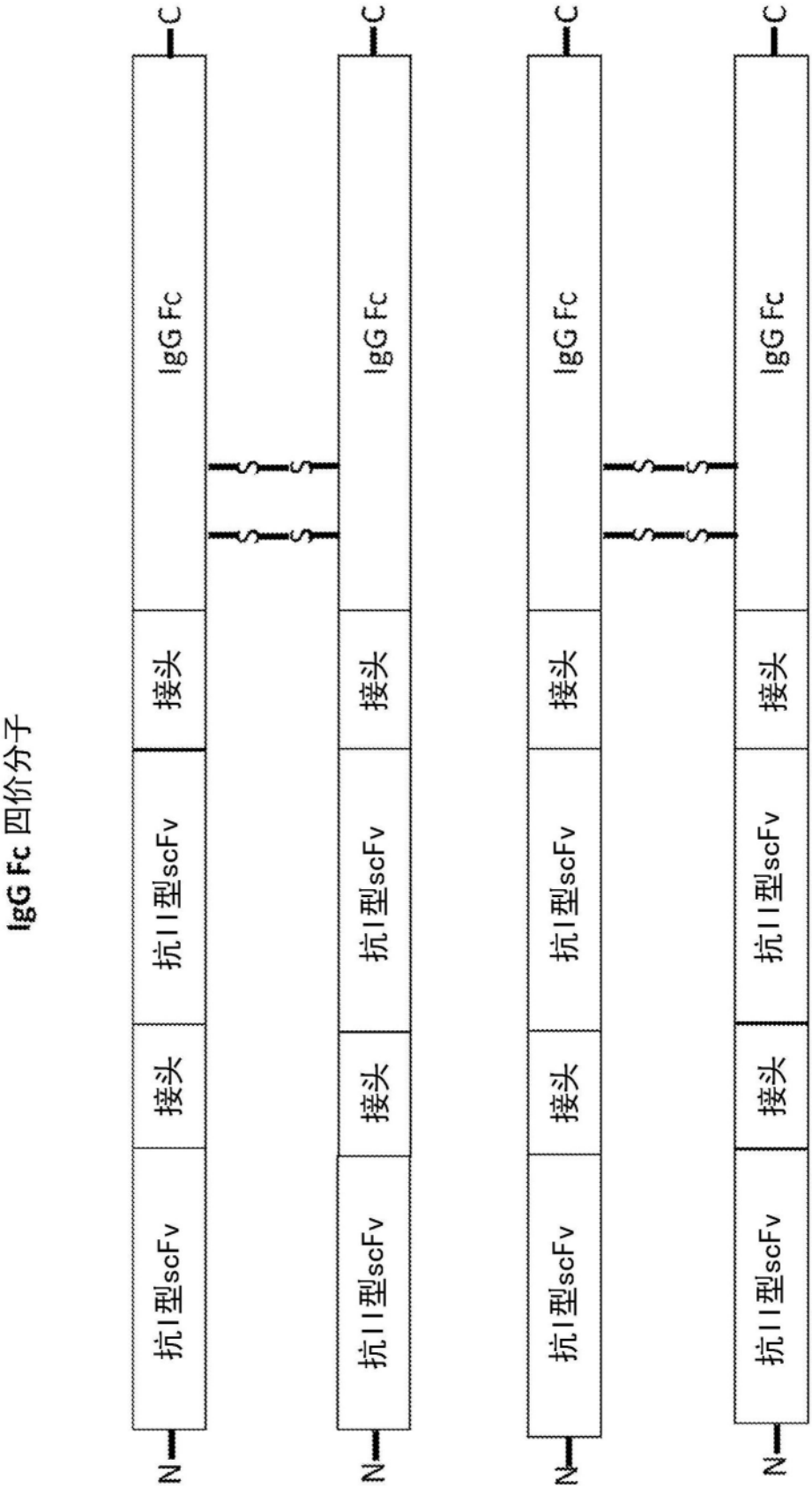

IgG Fc 四价分子
C
IgG Fc
接头
抗II型scFv
接头
抗I型scFv
N
C
IgG Fc
接头
抗I型scFv
接头
抗II型scFv
N
C
IgG Fc
接头
抗II型scFv
接头
抗I型scFv
N
C
IgG Fc
接头
抗I型scFv
接头
抗II型scFv
N

图10B

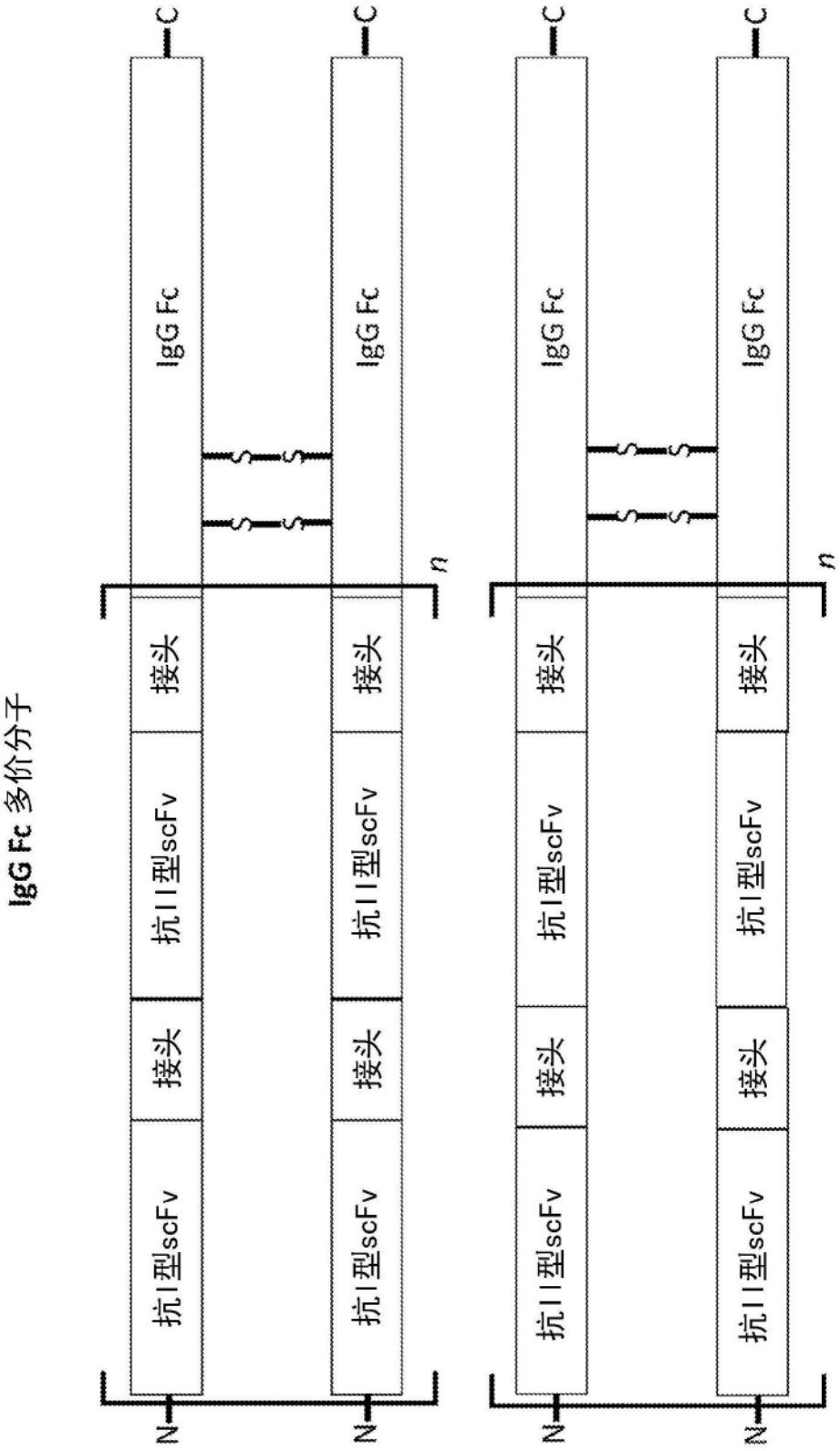


图10C

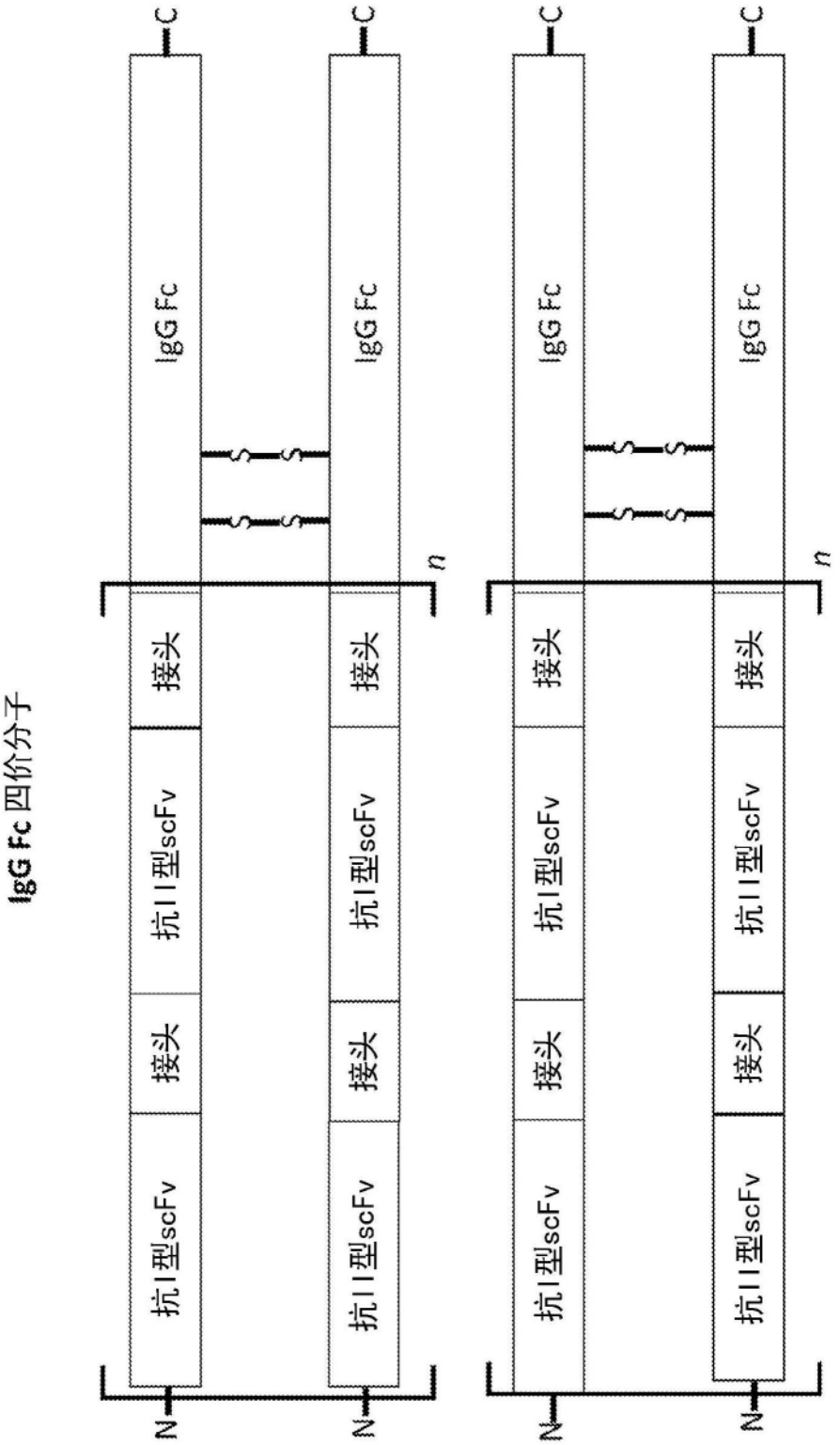


图10D

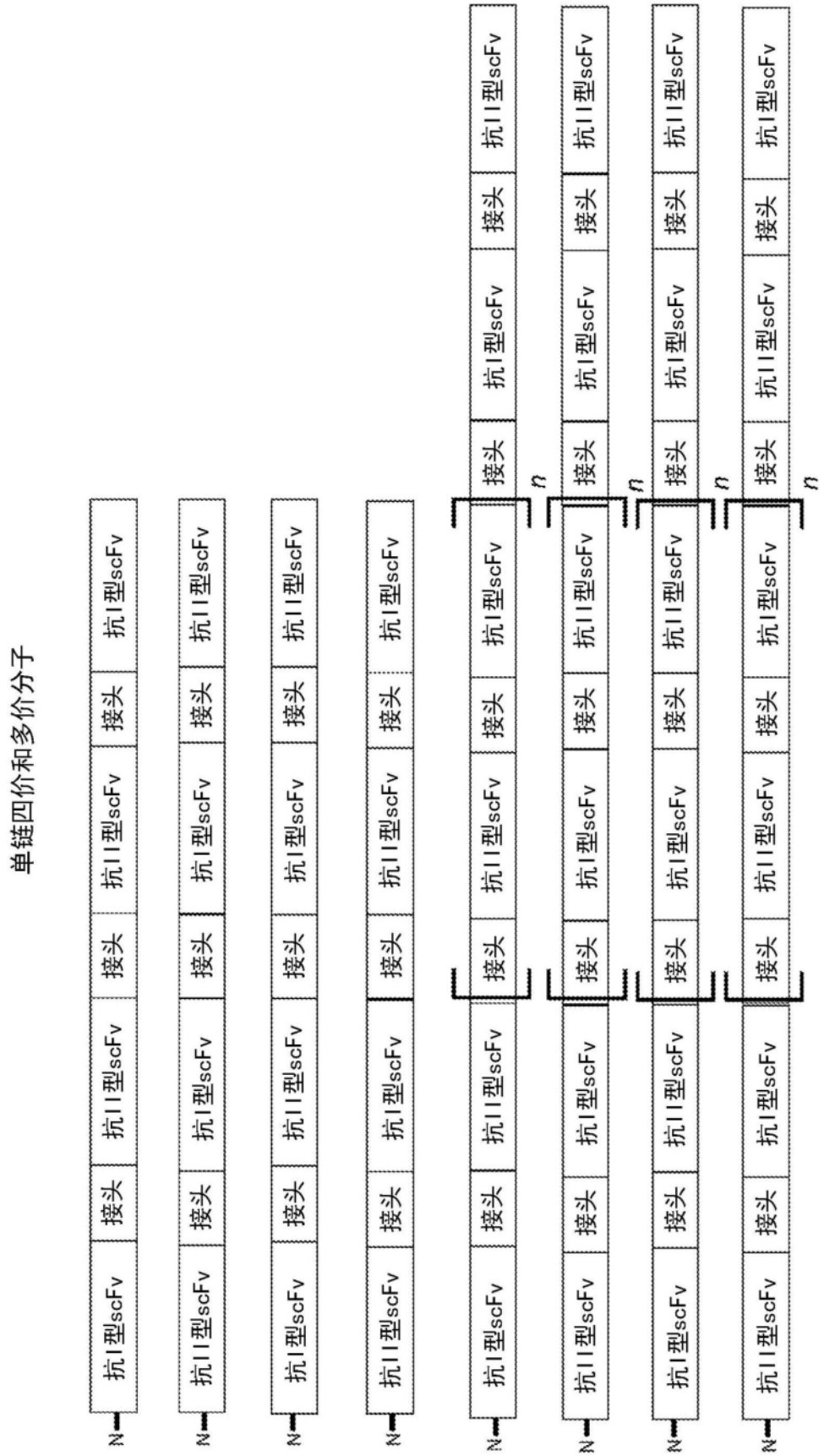


图10E

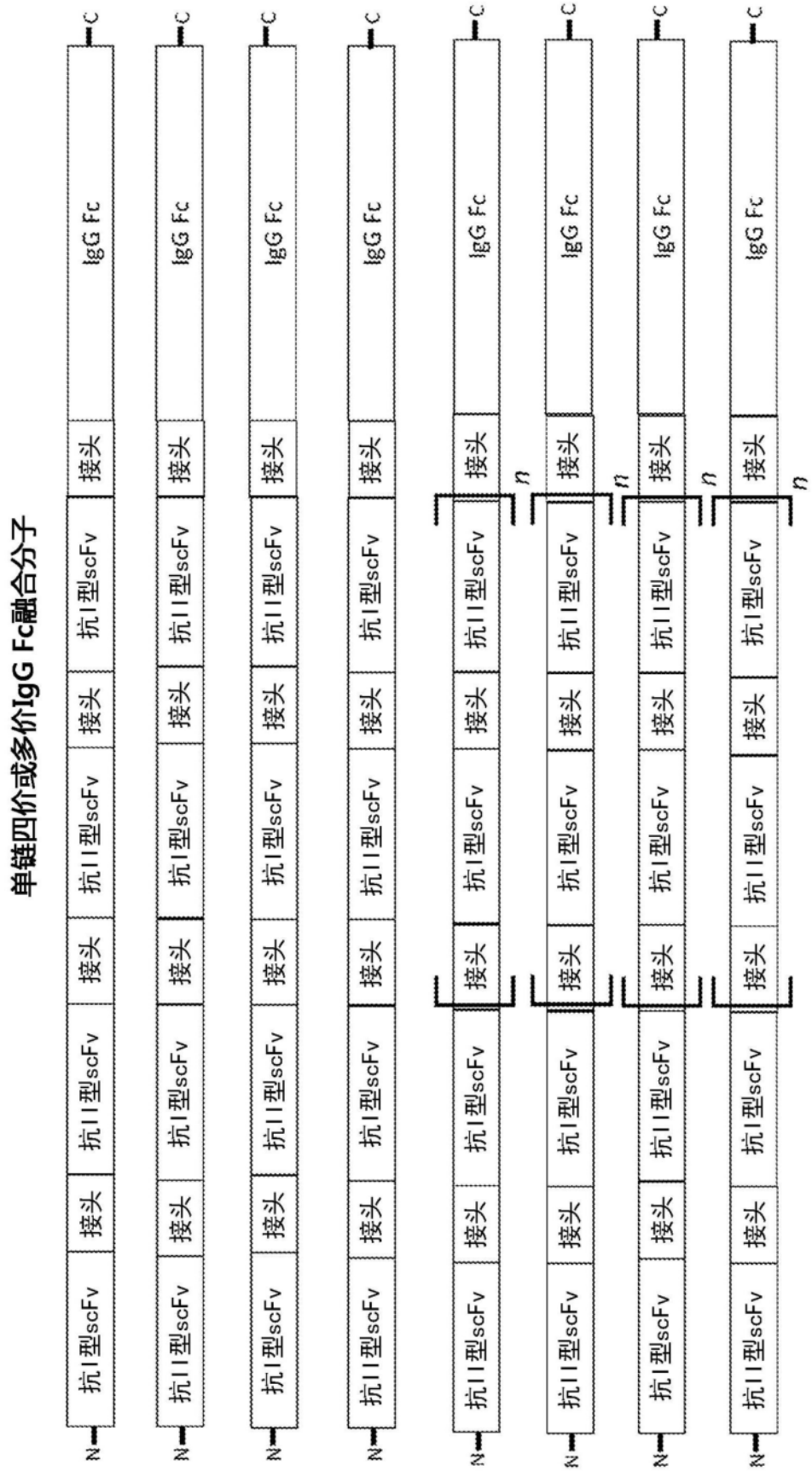


图10F