



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104023746 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201280045135. 9

蒂莫西·查尔斯·霍伊

(22) 申请日 2012. 07. 13

C·沙尔捷-库尔托

(30) 优先权数据

61/508, 403 2011. 07. 15 US

61/521, 547 2011. 08. 09 US

61/570, 629 2011. 12. 14 US

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 丁香兰 庞东成

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 14

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

G01N 33/574 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/046746 2012. 07. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/012747 EN 2013. 01. 24

(83) 生物保藏信息

PTA-12021 2011. 08. 10

PTA-11970 2011. 06. 30

(71) 申请人 昂考梅德药品有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 奥斯丁·L·格尼

富米考·塔卡达·阿克塞尔罗德

权利要求书9页 说明书83页 附图22页

(54) 发明名称

RSPO 结合剂和其应用

(57) 摘要

本发明涉及 RSPO 结合剂和使用该结合剂治疗诸如癌等疾病的方法。本发明还提供特异性结合人 RSPO 蛋白并调节 β 连环素活性的抗体。本发明还提供使用调节 RSPO 蛋白的活性的试剂的方法, 所述试剂例如为特异性结合 RSPO1、RSPO2 和 / 或 RSPO3 并抑制肿瘤生长的抗体。还描述了治疗癌的方法, 所述方法包括对具有肿瘤或癌的患者施用治疗有效量的本发明的试剂或抗体。

1. 一种特异性结合人 R- 反应蛋白 1 (RSP01) 的分离的抗体, 所述分离的抗体包含:
 - (a) 包含 TGYTMH (SEQ ID NO:12) 的重链 CDR1、包含 GINPNNGGTTYNQNFKG (SEQ ID NO:13) 的重链 CDR2 和包含 KEFSDGYFFAY (SEQ ID NO:14) 的重链 CDR3 ; 和 / 或
 - (b) 包含 KASQDVIFAFA (SEQ ID NO:15) 的轻链 CDR1, 包含 WASTRHT (SEQ ID NO:16) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTPW (SEQ ID NO:17) 的轻链 CDR3。
2. 一种特异性结合人 RSP01 的分离的抗体, 所述分离的抗体包含:
 - (a) 与 SEQ ID NO:10 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区 ; 和 / 或
 - (b) 与 SEQ ID NO:11 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。
3. 如权利要求 2 所述的抗体, 所述抗体包含:
 - (a) 与 SEQ ID NO:10 具有至少 95% 序列同一性的重链可变区 ; 和 / 或
 - (b) 与 SEQ ID NO:11 具有至少 95% 序列同一性的轻链可变区。
4. 如权利要求 2 所述的抗体, 所述抗体包含:
 - (a) 包含 SEQ ID NO:10 的重链可变区 ; 和 / 或
 - (b) 包含 SEQ ID NO:11 的轻链可变区。
5. 如权利要求 2 所述的抗体, 所述抗体包含:
 - (a) 基本上由 SEQ ID NO:10 组成的重链可变区 ; 和
 - (b) 基本上由 SEQ ID NO:11 组成的轻链可变区。
6. 一种特异性结合人 RSP01 的分离的抗体, 所述分离的抗体包含:
 - (a) 与 SEQ ID NO:55 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区 ; 和 / 或
 - (b) 与 SEQ ID NO:59 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。
7. 如权利要求 6 所述的抗体, 所述抗体包含:
 - (a) 与 SEQ ID NO:55 具有至少 95% 序列同一性的重链可变区 ; 和 / 或
 - (b) 与 SEQ ID NO:59 具有至少 95% 序列同一性的轻链可变区。
8. 如权利要求 6 所述的抗体, 所述抗体包含:
 - (a) 包含 SEQ ID NO:55 的重链可变区 ; 和 / 或
 - (b) 包含 SEQ ID NO:59 的轻链可变区。
9. 如权利要求 6 所述的抗体, 所述抗体包含:
 - (a) 基本上由 SEQ ID NO:55 组成的重链可变区 ; 和
 - (b) 基本上由 SEQ ID NO:59 组成的轻链可变区。
10. 一种分离的抗体, 所述分离的抗体与权利要求 1 ~ 9 中任一项所述的抗体竞争与 RSP01 的特异性结合。
11. 一种分离的抗体, 所述分离的抗体与权利要求 1 ~ 10 中任一项所述的抗体所结合的 RSP01 上的表位相同。
12. 一种分离的抗体, 所述分离的抗体所结合的 RSP01 上的表位与权利要求 1 ~ 10 中任一项所述的抗体所结合的 RSP01 上的表位重叠。
13. 如权利要求 1 ~ 12 中任一项所述的抗体, 所述抗体是重组抗体、单克隆抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。
14. 如权利要求 1 ~ 13 中任一项所述的抗体, 所述抗体是人源化抗体。
15. 如权利要求 1 ~ 13 中任一项所述的抗体, 所述抗体是人抗体。

16. 如权利要求 1 ~ 14 中任一项所述的抗体,所述抗体是 IgG1 抗体或 IgG2 抗体。
17. 如权利要求 1 ~ 14 中任一项所述的抗体,所述抗体是包含抗原结合位点的抗体片段。
18. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体由 ATCC 保藏号为 PTA-11970 的杂交瘤细胞系生产。
19. 权利要求 18 所述的抗体的人源化形式。
20. 如权利要求 1 ~ 19 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制 RSP01 与至少一种富含亮氨酸重复的 G 蛋白偶联受体 (LGR) 的结合。
21. 如权利要求 20 所述的抗体,其中,所述 LGR 选自自由 LGR4、LGR5 和 LGR6 组成的组。
22. 如权利要求 21 所述的抗体,其中,所述 LGR 是 LGR5。
23. 如权利要求 1 ~ 22 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制 RSP01 信号传导。
24. 如权利要求 1 ~ 23 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制 β -连环素的激活。
25. 如权利要求 1 ~ 24 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制 β -连环素信号传导。
26. 如权利要求 1 ~ 25 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制肿瘤生长。
27. 如权利要求 1 ~ 26 中任一项所述的抗体,所述抗体诱导肿瘤中分化标记物的表达。
28. 如权利要求 1 ~ 27 中任一项所述的抗体,所述抗体诱导肿瘤中的细胞进行分化。
29. 如权利要求 1 ~ 28 中任一项所述的抗体,所述抗体减小肿瘤中的癌干细胞的频率。
30. 一种多肽,所述多肽包含选自自由以下序列组成的组中的序列:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:68 和 SEQ ID NO:69。
31. 如权利要求 30 所述的多肽,所述多肽是抗体。
32. 一种细胞,所述细胞包含或产生权利要求 1 ~ 31 中任一项所述的抗体或多肽。
33. 一种杂交瘤细胞系,所述细胞系具有 ATCC 保藏号 PTA-11970。
34. 一种分离的多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含编码权利要求 1 ~ 31 中任一项所述的抗体或多肽的多核苷酸。
35. 一种分离的多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含选自自由以下序列组成的组中的多核苷酸序列:SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56 和 SEQ ID NO:58。
36. 一种载体,所述载体包含权利要求 34 或权利要求 35 所述的多核苷酸。
37. 一种细胞,所述细胞包含权利要求 34 或权利要求 35 所述的多核苷酸或者权利要求 36 所述的载体。
38. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1 ~ 31 中任一项所述的抗体或多肽和药学上可接受的载剂。
39. 一种抑制肿瘤生长的方法,其中,所述方法包括使所述肿瘤与有效量的权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的抗体接触。
40. 一种抑制受试对象中肿瘤生长的方法,其中,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的抗体。
41. 一种诱导受试对象中肿瘤细胞的分化的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的抗体。

42. 一种减小受试对象的肿瘤中的癌干细胞的频率的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的抗体。

43. 一种抑制细胞中 β 连环素信号传导的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的抗体接触。

44. 如权利要求 43 所述的方法,其中,所述细胞是肿瘤细胞。

45. 如权利要求 39 ~ 42 或 44 中任一项所述的方法,其中,所述肿瘤选自以下肿瘤组成的组:结直肠癌、卵巢瘤、胰腺瘤、肺癌、肝癌、乳腺癌、肾瘤、前列腺瘤、胃肠瘤、黑素瘤、子宫颈癌、膀胱瘤、成胶质细胞瘤以及头颈瘤。

46. 如权利要求 45 所述的方法,其中,所述肿瘤是胰腺瘤。

47. 如权利要求 45 所述的方法,其中,所述肿瘤是卵巢瘤。

48. 一种治疗受试对象中的癌的方法,其中,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的抗体。

49. 如权利要求 48 所述的方法,其中,所述癌选自以下癌组成的组:结直肠癌、卵巢癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃肠癌、黑素瘤、子宫颈癌、膀胱癌、成胶质细胞瘤以及头颈癌。

50. 如权利要求 49 所述的方法,其中,所述癌是结直肠癌或胰腺癌。

51. 如权利要求 50 所述的方法,其中,所述结直肠癌包含腺瘤性结肠息肉病 (APC) 基因中的失活突变。

52. 如权利要求 50 所述的方法,其中,所述结直肠癌不包含 APC 基因中的失活突变。

53. 如权利要求 50 所述的方法,其中,所述结直肠癌包含野生型 APC 基因。

54. 如权利要求 50 所述的方法,其中,所述结直肠癌不包含 β 连环素基因中的失活突变。

55. 如权利要求 49 所述的方法,其中,所述癌是卵巢癌。

56. 如权利要求 39 ~ 42 或 44 ~ 55 中任一项所述的方法,其中,所述肿瘤或所述癌表达的 RSP01 水平比正常组织中的 RSP01 水平高。

57. 如权利要求 40 ~ 42 或 45 ~ 56 中任一项所述的方法,其中,所述受试对象的肿瘤或癌已被去除。

58. 如权利要求 39 ~ 42 或 44 ~ 57 中任一项所述的方法,所述方法还包括确定所述肿瘤或癌中 RSP01 的表达水平的步骤。

59. 如权利要求 39 ~ 42 或 44 ~ 58 中任一项所述的方法,所述方法还包括确定所述肿瘤或癌是否具有所述 APC 基因中的失活突变的步骤。

60. 如权利要求 39 ~ 42 或 44 ~ 59 中任一项所述的方法,所述方法还包括确定所述肿瘤或癌是否具有 β 连环素基因的激活突变的步骤。

61. 如权利要求 58 所述的方法,其中,所述确定 RSP01 的表达水平的步骤在用所述抗体进行治疗或与所述抗体接触之前完成。

62. 如权利要求 61 所述的方法,其中,如果所述肿瘤或癌具有升高的 RSP01 表达水平,则将所述抗体:

- (a) 施用至所述受试对象;或
- (b) 与所述肿瘤或肿瘤细胞接触。

63. 一种治疗受试对象中的疾病的方法,其中,所述疾病与 β 连环素的激活相关,所述方法包括施用治疗有效量的权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的抗体。

64. 如权利要求 39 ~ 63 中任一项所述的方法,所述方法还包括施用至少一种另外的治疗剂。

65. 如权利要求 64 所述的方法,其中,所述另外的治疗剂是化学治疗剂。

66. 如权利要求 64 所述的方法,其中,所述另外的治疗剂是血管生成抑制剂。

67. 如权利要求 39 ~ 42 或 45 ~ 66 中任一项所述的方法,其中,所述受试对象是人。

68. 一种选择人受试对象以用结合 RSP01 的抗体进行治疗的方法,所述方法包括:确定所述受试对象是否具有 RSP01 表达水平升高的肿瘤,其中,如果所述肿瘤具有升高的 RSP01 表达水平,则选择所述受试对象以用特异性结合 RSP01 的抗体进行治疗。

69. 如权利要求 68 所述的方法,其中,所述肿瘤是卵巢瘤。

70. 如权利要求 58、68 或 69 中任一项所述的方法,其中,通过基于 PCR 的检验、微阵列分析或核苷酸测序来确定样品中 RSP01 的表达水平。

71. 一种选择人受试对象以用结合 RSP01 的抗体进行治疗的方法,所述方法包括:确定所述受试对象是否具有包含 APC 基因中的失活突变的肿瘤,其中,如果所述肿瘤具有所述 APC 基因中的失活突变,则选择所述受试对象以用特异性结合 RSP01 的抗体进行治疗。

72. 如权利要求 71 所述的方法,其中,所述肿瘤是结直肠癌。

73. 如权利要求 59、71 或 72 中任一项所述的方法,其中,通过基于 PCR 的检验、杂交检验、微阵列分析或核苷酸测序来确定样品中 APC 基因的失活突变。

74. 如权利要求 70 或 73 中任一项所述的方法,其中,所述样品是新鲜的肿瘤样品、冷冻的肿瘤样品或福尔马林固定的石蜡包埋样品。

75. 如权利要求 68 ~ 74 中任一项所述的方法,其中,所述抗体是权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的抗体。

76. 一种分离的抗体,所述分离的抗体特异性结合人 R- 反应蛋白 2 (RSP02), 并且包含:

(a) 包含 SSYAMS (SEQ ID NO:29) 的重链 CDR1、包含 SISSGGSTYYPDVSKG (SEQ ID NO:30) 的重链 CDR2 和包含 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (SEQ ID NO:31) 的重链 CDR3 ;和 / 或

(b) 包含 KASQDVSSAVA (SEQ ID NO:32) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:33) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTP (SEQ ID NO:34) 的轻链 CDR3。

77. 一种分离的抗体,所述分离的抗体特异性结合人 RSP02, 并且包含:

(a) 与 SEQ ID NO:27 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区 ;和 / 或

(b) 与 SEQ ID NO:28 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。

78. 如权利要求 77 所述的抗体,所述抗体包含:

(a) 与 SEQ ID NO:27 具有至少 95% 序列同一性的重链可变区 ;和 / 或

(b) 与 SEQ ID NO:28 具有至少 95% 序列同一性的轻链可变区。

79. 如权利要求 77 所述的抗体,所述抗体包含:

(a) 包含 SEQ ID NO:27 的重链可变区 ;和 / 或

(b) 包含 SEQ ID NO:28 的轻链可变区。

80. 如权利要求 77 所述的抗体,所述抗体包含:

- (a) 基本上由 SEQ ID NO:27 组成的重链可变区 ;和
(b) 基本上由 SEQ ID NO:28 组成的轻链可变区。
81. 一种分离的抗体,所述分离的抗体特异性结合人 RSP02,并且包含 :
(a) 与 SEQ ID NO:63 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区 ;和 / 或
(b) 与 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。
82. 如权利要求 81 所述的抗体,所述抗体包含 :
(a) 与 SEQ ID NO:63 具有至少 95% 序列同一性的重链可变区 ;和 / 或
(b) 与 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 具有至少 95% 序列同一性的轻链可变区。
83. 如权利要求 81 所述的抗体,所述抗体包含 :
(a) 包含 SEQ ID NO:63 的重链可变区 ;和 / 或
(b) 包含 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 的轻链可变区。
84. 如权利要求 81 所述的抗体,所述抗体包含 :
(a) 基本上由 SEQ ID NO:63 组成的重链可变区 ;和
(b) 基本上由 SEQ ID NO:67 组成的轻链可变区。
85. 如权利要求 81 所述的抗体,所述抗体包含 :
(a) 基本上由 SEQ ID NO:63 组成的重链可变区 ;和
(b) 基本上由 SEQ ID NO:76 组成的轻链可变区。
86. 一种分离的抗体,所述分离的抗体与权利要求 76 ~ 85 中任一项所述的抗体竞争与 RSP02 的特异性结合。
87. 一种分离的抗体,所述分离的抗体与权利要求 76 ~ 86 中任一项所述的抗体所结合的 RSP02 上的表位相同。
88. 一种分离的抗体,所述分离的抗体所结合的 RSP02 上的表位与权利要求 76 ~ 86 中任一项所述的抗体所结合的 RSP02 上的表位重叠。
89. 如权利要求 76 ~ 88 中任一项所述的抗体,所述抗体是重组抗体、单克隆抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。
90. 如权利要求 76 ~ 89 中任一项所述的抗体,所述抗体是人源化抗体。
91. 如权利要求 76 ~ 89 中任一项所述的抗体,所述抗体是人抗体。
92. 如权利要求 76 ~ 91 中任一项所述的抗体,所述抗体是 IgG1 抗体或 IgG2 抗体。
93. 如权利要求 76 ~ 92 中任一项所述的抗体,所述抗体是包含抗原结合位点的抗体片段。
94. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体由 ATCC 保藏号为 PTA-12021 的杂交瘤细胞系生产。
95. 权利要求 94 所述的抗体的人源化形式。
96. 如权利要求 76-95 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制 RSP02 与至少一种富含亮氨酸重复的 G 蛋白偶联受体 (LGR) 的结合。
97. 如权利要求 96 所述的抗体,其中,所述 LGR 选自由 LGR4、LGR5 和 LGR6 组成的组。
98. 如权利要求 97 所述的抗体,其中,所述 LGR 是 LGR5。
99. 如权利要求 76 ~ 98 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制 RSP02 信号传导。
100. 如权利要求 76 ~ 99 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制 β - 连环素的激活。

101. 如权利要求 76 ~ 100 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制 β -连环素信号传导。
102. 如权利要求 76 ~ 101 中任一项所述的抗体,所述抗体抑制肿瘤生长。
103. 如权利要求 76 ~ 102 中任一项所述的抗体,所述抗体诱导肿瘤中分化标记物的表达。
104. 如权利要求 76 ~ 103 中任一项所述的抗体,所述抗体诱导肿瘤中的细胞进行分化。
105. 如权利要求 76 ~ 104 中任一项所述的抗体,所述抗体减小肿瘤中的癌干细胞的频率。
106. 一种多肽,所述多肽包含选自以下序列组成的组中的序列:SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:76。
107. 如权利要求 106 所述的多肽,所述多肽是抗体。
108. 一种细胞,所述细胞包含或产生权利要求 76 ~ 107 中任一项所述的抗体或多肽。
109. 一种杂交瘤细胞系,所述细胞系具有 ATCC 保藏号 PTA-12021。
110. 一种分离的多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含编码权利要求 76 ~ 107 中任一项所述的抗体或多肽的多核苷酸。
111. 一种分离的多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含选自以下序列组成的组中的多核苷酸序列:SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:72 和 SEQ ID NO:75。
112. 一种载体,所述载体包含权利要求 110 或权利要求 111 所述的多核苷酸。
113. 一种细胞,所述细胞包含权利要求 110 或权利要求 111 所述的多核苷酸或者权利要求 112 所述的载体。
114. 一种药物组合物,所述药物组合物包含:权利要求 76 ~ 107 中任一项所述的抗体或多肽;和药学上可接受的载剂。
115. 一种抑制肿瘤生长的方法,其中,所述方法包括使所述肿瘤与有效量的权利要求 76 ~ 105 中任一项所述的抗体接触。
116. 一种抑制受试对象中肿瘤生长的方法,其中,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 76 ~ 105 中任一项所述的抗体。
117. 一种诱导受试对象中肿瘤细胞的分化的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 76 ~ 105 中任一项所述的抗体。
118. 一种减小受试对象的肿瘤中的癌干细胞的频率的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 76 ~ 105 中任一项所述的抗体。
119. 一种抑制细胞中 β 连环素信号传导的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的权利要求 76 ~ 105 中任一项所述的抗体接触。
120. 如权利要求 119 所述的方法,其中,所述细胞是肿瘤细胞。
121. 如权利要求 115 ~ 118 或 120 中任一项所述的方法,其中,所述肿瘤选自以下肿瘤组成的组:结直肠癌、卵巢瘤、胰腺瘤、肺癌、肝癌、乳腺癌、肾瘤、前列腺瘤、胃肠瘤、黑色素瘤、子宫颈癌、膀胱瘤、成胶质细胞瘤以及头颈瘤。

122. 如权利要求 121 所述的方法,其中,所述肿瘤是胰腺癌。
123. 如权利要求 121 所述的方法,其中,所述肿瘤是卵巢癌。
124. 一种治疗受试对象中的癌的方法,其中,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的权利要求 76 ~ 105 中任一项所述的抗体。
125. 如权利要求 124 所述的方法,其中,所述癌选自以下癌组成的组:结直肠癌、卵巢癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃肠癌、黑素瘤、子宫颈癌、膀胱癌、成胶质细胞瘤以及头颈癌。
126. 如权利要求 125 所述的方法,其中,所述癌是结直肠癌。
127. 如权利要求 126 所述的方法,其中,所述结直肠癌包含腺瘤性结肠息肉病 (APC) 基因的失活突变。
128. 如权利要求 126 所述的方法,其中,所述结直肠癌不包含 APC 基因中的失活突变。
129. 如权利要求 126 所述的方法,其中,所述结直肠癌包含野生型 APC 基因。
130. 如权利要求 126 所述的方法,其中,所述结直肠癌不包含 β 连环素基因中的激活突变。
131. 如权利要求 125 所述的方法,其中,所述癌是胰腺癌。
132. 如权利要求 115 ~ 118 或 120 ~ 131 中任一项所述的方法,其中,所述肿瘤或所述癌表达的 RSP02 水平比正常组织中的 RSP02 水平高。
133. 如权利要求 116 ~ 118 或 121 ~ 132 中任一项所述的方法,其中,所述受试对象的肿瘤或癌已经被去除。
134. 如权利要求 115 ~ 118 或 120 ~ 133 中任一项所述的方法,所述方法还包括确定所述肿瘤或癌中 RSP02 的表达水平的步骤。
135. 如权利要求 115 ~ 118 或 120 ~ 134 中任一项所述的方法,所述方法还包括确定所述肿瘤或癌是否具有所述 APC 基因中的失活突变的步骤。
136. 如权利要求 115 ~ 118 或 120 ~ 135 中任一项所述的方法,所述方法还包括确定所述肿瘤或癌是否具有 β 连环素基因的激活突变的步骤。
137. 如权利要求 134 所述的方法,其中,所述确定 RSP02 的表达水平的步骤在用所述抗体进行治疗或与所述抗体接触之前完成。
138. 如权利要求 137 所述的方法,其中,如果所述肿瘤或癌具有升高的 RSP02 表达水平,则将所述抗体:
- (a) 施用至所述受试对象;或
 - (b) 与所述肿瘤或肿瘤细胞接触。
139. 一种治疗受试对象中的疾病的方法,其中,所述疾病与 β 连环素的激活相关,所述方法包括施用治疗有效量的权利要求 76 ~ 105 中任一项所述的抗体。
140. 如权利要求 115 ~ 139 中任一项所述的方法,所述方法还包括施用至少一种另外的治疗剂。
141. 如权利要求 140 所述的方法,其中,所述另外的治疗剂是化学治疗剂。
142. 如权利要求 140 所述的方法,其中,所述另外的治疗剂是 Wnt 途径抑制剂。
143. 如权利要求 116 ~ 118 或 121 ~ 142 中任一项所述的方法,其中,所述受试对象是人。

144. 一种选择人受试对象以用结合 RSP02 的抗体进行治疗的方法,所述方法包括:确定所述受试对象是否具有 RSP02 表达水平升高的肿瘤,其中,如果所述肿瘤具有升高的 RSP02 表达水平,则选择所述受试对象以用特异性结合 RSP02 的抗体进行治疗。

145. 如权利要求 144 所述的方法,其中,所述肿瘤是胰腺瘤。

146. 如权利要求 144 所述的方法,其中,所述肿瘤是乳腺癌。

147. 如权利要求 144 所述的方法,其中,所述肿瘤是肺癌。

148. 如权利要求 144 所述的方法,其中,所述肿瘤是黑素瘤。

149. 如权利要求 144 所述的方法,其中,所述肿瘤是结直肠癌。

150. 如权利要求 134 或 144 ~ 149 中任一项所述的方法,其中,通过基于 PCR 的检验、微阵列分析或核苷酸测序来确定样品中 RSP02 的表达水平。

151. 一种选择人受试对象以用结合 RSP02 的抗体进行治疗的方法,所述方法包括:确定所述受试对象是否具有包含 APC 基因中的失活突变的肿瘤,其中,如果所述肿瘤具有所述 APC 基因中的失活突变,则选择所述受试对象以用特异性结合 RSP02 的抗体进行治疗。

152. 如权利要求 151 所述的方法,其中,所述肿瘤是结直肠癌。

153. 如权利要求 135、151 或 152 中任一项所述的方法,其中,通过基于 PCR 的检验、杂交检验、微阵列分析或核苷酸测序来确定样品中 APC 基因的失活突变。

154. 如权利要求 150 或权利要求 153 所述的方法,其中,所述样品是新鲜的肿瘤样品、冷冻的肿瘤样品或福尔马林固定的石蜡包埋样品。

155. 如权利要求 144 ~ 154 中任一项所述的方法,其中,所述抗体是权利要求 76 ~ 105 中任一项所述的抗体。

156. 一种抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO:25 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:26 的轻链氨基酸序列。

157. 一种抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO:41 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:42 的轻链氨基酸序列。

158. 一种抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO:68 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:69 的轻链氨基酸序列。

159. 一种抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO:70 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:71 的轻链氨基酸序列。

160. 一种抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO:70 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:74 的轻链氨基酸序列。

161. 一种选择人受试对象以用结合 RSP03 的抗体进行治疗的方法,所述方法包括:确定所述受试对象是否具有 RSP03 表达水平升高的肿瘤,其中,如果所述肿瘤具有升高的 RSP03 表达水平,则选择所述受试对象以用特异性结合 RSP03 的抗体进行治疗。

162. 如权利要求 161 所述的方法,其中,所述肿瘤是肺癌。

163. 如权利要求 161 所述的方法,其中,所述肿瘤是乳腺癌。

164. 如权利要求 161 所述的方法,其中,所述肿瘤是卵巢瘤。

165. 如权利要求 161 所述的方法,其中,所述肿瘤是结直肠癌。

166. 如权利要求 161 ~ 165 中任一项所述的方法,其中,通过基于 PCR 的检验、微阵列分析或核苷酸测序来确定样品中 RSP03 的表达水平。

167. 如权利要求 166 所述的方法,其中,所述样品是新鲜的肿瘤样品、冷冻的肿瘤样品或福尔马林固定的石蜡包埋样品。

168. 一种选择人受试对象以用结合 RSP04 的抗体进行治疗的方法,所述方法包括:确定所述受试对象是否具有 RSP04 表达水平升高的肿瘤,其中,如果所述肿瘤具有升高的 RSP04 表达水平,则选择所述受试对象以用特异性结合 RSP04 的抗体进行治疗。

169. 如权利要求 168 所述的方法,其中,所述肿瘤是肺癌。

170. 如权利要求 168 所述的方法,其中,所述肿瘤是乳腺癌。

171. 如权利要求 168 所述的方法,其中,所述肿瘤是卵巢瘤。

172. 如权利要求 168 ~ 171 中任一项所述的方法,其中,通过基于 PCR 的检验、微阵列分析或核苷酸测序来确定样品中 RSP03 的表达水平。

173. 如权利要求 172 所述的方法,其中,所述样品是新鲜的肿瘤样品、冷冻的肿瘤样品或福尔马林固定的石蜡包埋样品。

RSP0 结合剂和其应用

背景技术

技术领域

[0001] 本发明的领域大体上涉及结合包括 RSP01、RSP02 和 RSP03 在内的 R- 反应蛋白 (RSP0) (特别是人 R- 反应蛋白) 的抗体和其他试剂, 以及使用所述抗体或其他试剂来治疗诸如癌等疾病的方法。

[0002] 背景技术

[0003] 蛋白质的 R- 反应蛋白 (RSP0) 家族在脊椎动物中是保守的, 并且包括四个成员, RSP01、RSP02、RSP03 和 RSP04。这些蛋白被以各种名称相称, 包括顶板特异性反应蛋白、hPWTSR (hRSP03)、THS2D (RSP03)、Cristin1-4 和 Futrin1-4。RSP0 是小的分泌蛋白, 其共享约 40% 至 60% 的序列同源性和结构域组织。所有的 RSP0 蛋白在 N- 末端含有两个弗林蛋白酶 (furin) 样富半胱氨酸结构域, 其连着血小板反应蛋白结构域以及碱性带电 C 末端尾部 (Kim 等, 2006, *Cell Cycle*, 5:23-26)。

[0004] 研究已经显示, RSP0 蛋白在脊椎动物发育 (Kamata 等, 2004, *Biochim. BiophysActa*, 1676:51-62) 期间和在非洲爪蟾肌发生 (Kazanskaya 等, 2004, *Dev. Cell*, 7:525-534) 中起作用。RSP01 还据显示充当胃肠上皮细胞用的强效丝裂原 (Kim 等, 2005, *Science*, 309:1256-1259)。已知 RSP0 蛋白激活与 Wnt 信号传导相似的 β 连环素信号传导, 但是仍正在研究 RSP0 蛋白和 Wnt 信号传导之间的关系。已经报道 RSP0 蛋白对 Wnt 配体拥有正向调节活性 (Nam 等, 2006, *JBC*281:13247-57)。该研究报道了 RSP0 蛋白能够充当 Frizzled8 和 LRP6 受体配体, 并诱导 β 连环素信号传导 (Nam 等, 2006, *JBC*281:13247-57)。近期研究已经鉴定了 RSP0 蛋白和诸如 LGR5 等 LGR (富含亮氨酸重复的 G 蛋白偶联受体) 蛋白之间的相互作用 (美国专利公开第 2009/0074782 和 2009/0191205 号), 这些数据提出了 β -连环素信号传导的激活的替代途径。

[0005] Wnt 信号传导途径已被鉴定为癌治疗的潜在靶标。Wnt 信号传导途径是胚胎模式形成、胚胎后组织维持和干细胞生物学的数种关键调节因素之一。更具体而言, Wnt 信号传导在细胞极性的产生和细胞命运特化 (包括干细胞群的自我更新) 中起重要作用。不受调节的 Wnt 途径的激活与许多人类癌症有关, 据信在所述癌症中这样的激活能够改变细胞的发育命运。Wnt 途径的激活可以将肿瘤细胞保持在未分化状态和 / 或导致不受控的增殖。因此癌变可以通过压制控制正常发育和组织修复的体内平衡机制进行 (在 Reya&Clevers, 2005, *Nature*, 434:843-50; Beachy 等, 2004, *Nature*, 432:324-31 中综述)。

[0006] Wnt 信号传导途径首次在果蝇发育突变无翼体 (wg) 中阐明, 并且来自鼠类原癌基因 *int-1* (现在的 Wnt1) (Nusse&Varmus, 1982, *Cell*, 31:99-109; Van Ooyen&Nusse, 1984, *Cell*, 39:233-40; Cabrera 等, 1987, *Cell*, 50:659-63; Rijsewijk 等, 1987, *Cell*, 50:649-57)。Wnt 基因编码分泌的脂修饰的糖蛋白, 所述糖蛋白在哺乳动物中已被鉴定出其中的 19 个。这些分泌的配体激活由 Frizzled (FZD) 受体家族成员和低密度脂蛋白 (LDL) 受体相关蛋白 5 或 6 (LRP5/6) 组成的受体复合物。FZD 受体是 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 超家族

的 7 个跨膜结构域蛋白,并且含有具有 10 个保守性半胱氨酸的大的细胞外 N 末端配体结合结构域,该结构域被称为富半胱氨酸结构域 (CRD) 或 Fri 结构域。存在 10 种人 FZD 受体, FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9 和 FZD10。不同的 FZD CRD 对特定的 Wnt 蛋白具有不同的结合亲和性 (Wu&Nusse, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277:41762-9), 因此将 FZD 受体分类为激活典型 β 连环素途径的受体和激活非典型途径的受体 (Miller 等, 1999, *Oncogene*, 18:7860-72)。

[0007] 在经附近注射鼠类病毒而转化的乳腺癌中将 Wnt1 (最初称为 int1) 鉴定为致癌基因后,首次揭示了 Wnt 信号传导在癌中的作用 (Nusse&Varmus, 1982, *Cell*, 31:99-109)。近期还已经积累了 Wnt 信号传导在乳腺癌中的作用的额外证据。例如,乳腺中 β -连环素的转基因过表达导致增生和腺癌 (Imbert 等, 2001, *J. Cell Biol.*, 153:555-68; Michaelson&Leder, 2001, *Oncogene*, 20:5093-9), 而 Wnt 信号传导的丧失干扰正常的乳腺发育 (Tepera 等, 2003, *J. Cell Sci.*, 116:1137-49; Hatsell 等, 2003, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 8:145-58)。在人乳腺癌中, β -连环素累积在超过 50% 的癌中涉及激活的 Wnt 信号传导,虽然尚未鉴定出具体的突变,但是观察到 Frizzled 受体表达的上调 (Brennan&Brown, 2004, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 9:119-31; Malovanovic 等, 2004, *Int. J. Oncol.*, 25:1337-42)。

[0008] Wnt 途径的激活还与结直肠癌相关。所有结直肠癌中的约 5% 至 10% 遗传有作为家族性腺瘤性息肉病 (FAP) 的主要形式之一,该疾病是一种常染色体显性疾病,其中约 80% 的受影响个体含有腺瘤性结肠息肉病 (APC) 基因中的种系突变。还在包括 Axin 和 β -连环素在内的其他 Wnt 途径组分中鉴定出突变。个体的腺瘤是含有第二失活等位基因的上皮细胞的克隆外生长物,大量的 FAP 腺瘤必然通过致癌基因和 / 或肿瘤抑制基因的另外突变导致腺瘤的发展。此外,Wnt 信号传导途径的激活,包括 APC 中的功能丧失突变和 β -连环素中的稳定化突变,能够诱导小鼠模型中的增生性发育和肿瘤生长 (Oshima 等, 1997, *Cancer Res.*, 57:1644-9; Harada 等, 1999, *EMBO J.*, 18:5931-42)。

[0009] 与乳腺癌和结肠癌相似,黑素瘤经常具有 Wnt 途径的组成性激活,这可以通过 β -连环素的细胞核累积表明。将 Wnt/ β -连环素途径在一些黑素瘤和细胞系中的激活归因于诸如 APC、ICAT、LEF1 和 β -连环素等途径组分的修饰 (例如参见 Larue 等, 2006, *Frontiers Biosci.*, 11:733-742)。但是,关于 Wnt/ β -连环素信号传导在黑素瘤中的确切作用在文献中存在矛盾的报道。例如,一个研究从黑素瘤发现细胞核 β -连环素的水平升高与存活率提高相关,并且发现激活的 Wnt/ β -连环素信号传导与细胞增殖减少相关 (Chien 等, 2009, *PNAS*, 106:1193-1198)。

[0010] 癌药物研究的焦点正在转向以参与人癌基因、蛋白质和途径为目标的靶向治疗。对于靶向信号传导途径的新型试剂和靶向能够为癌患者提供治疗益处的多种途径的新型试剂组合存在需要。因此,干扰 β -连环素信号传导的生物分子 (例如抗-RSP0 抗体) 是癌以及其他 β -连环素相关疾病的新治疗剂的潜在来源。

发明内容

[0011] 本发明提供诸如抗体等结合 RSP0 蛋白的结合剂,以及包含所述结合剂的组合物,例如药物组合物。在一些实施方式中,RSP0-结合剂是诸如抗体、抗体片段等新型多肽以及

涉及此类抗体的其他多肽。在一些实施方式中,所述结合剂是特异性结合人 RSP01、RSP02 和 / 或 RSP03 的抗体。本发明还提供通过对具有肿瘤的受试对象施用所述 RSP0- 结合剂而抑制肿瘤生长的方法。本发明还提供通过对有需要的受试对象施用所述 RSP0- 结合剂而治疗癌的方法。在一些实施方式中,治疗癌或抑制肿瘤生长的方法包括用所述 RSP0- 结合剂靶向癌干细胞。在一些实施方式中,所述方法包括减少肿瘤中癌干细胞的频率、减少肿瘤中癌干细胞的数量、减少肿瘤的致瘤性 (tumorigenicity) 和 / 或通过减少肿瘤中癌干细胞的数量或频率来减少肿瘤的致瘤性。

[0012] 在一个方面,本发明提供诸如抗体等特异性结合人 RSP01 的结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂在人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸内结合。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂在人 RSP01 的 34 ~ 135 位氨基酸内结合。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂在人 RSP01 的 91 ~ 135 位氨基酸内结合。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂 (例如抗体) 特异性结合选自 RSP02、RSP03 和 RSP04 组成的组中的至少一种其他人 RSP0。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂或抗体调节 β - 连环素活性,是 β - 连环素信号传导的拮抗剂,抑制 β - 连环素信号传导和 / 或抑制 β - 连环素的激活。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂抑制 RSP01 信号传导。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂抑制或干扰 RSP01 与一种或多种 LGR 蛋白 (例如 LGR4、LGR5 和 / 或 LGR6) 的结合。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂抑制 RSP01 与 LGR5 的结合。

[0013] 在另一个方面,本发明提供诸如抗体等特异性结合人 RSP02 的结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂在人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基酸内结合。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂在人 RSP02 的 22 ~ 205 位氨基酸内结合。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂在人 RSP02 的 34 ~ 134 位氨基酸内结合。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂在人 RSP02 的 90 ~ 134 位氨基酸内结合。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂 (例如抗体) 特异性结合选自 RSP01、RSP03 和 RSP04 组成的组中的至少一种其他人 RSP0。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂或抗体调节 β - 连环素活性,是 β - 连环素信号传导的拮抗剂,抑制 β - 连环素信号传导和 / 或抑制 β - 连环素的激活。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂抑制 RSP02 信号传导。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂抑制或干扰 RSP02 与一种或多种 LGR 蛋白 (例如 LGR4、LGR5 和 / 或 LGR6) 的结合。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂抑制 RSP02 与 LGR5 的结合。

[0014] 在各个上述方面和实施方式中的一些实施方式以及本文所述的其他方面和实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述抗体是单克隆抗体。在一些实施方式中,所述抗体是人源化抗体。在一些实施方式中,所述抗体结合人 RSP01。在一些实施方式中,所述抗体结合人 RSP01 和小鼠 RSP01。在一些实施方式中,所述抗体以小于 1nM 的 K_D 结合人 RSP01 和以小于 1nM 的 K_D 结合小鼠 RSP01。

[0015] 在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体,所述抗体含有包含 TGYTMH (SEQ ID NO:12) 的重链 CDR1、包含 GINPNNGGTTYNQNFKG (SEQ ID NO:13) 的重链 CDR2 和包含 KEFSDGYFFAY (SEQ ID NO:14) 的重链 CDR3。在一些实施方式中,所述抗体还含有包含 KASQDVIFAFA (SEQ ID NO:15) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:16) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTPW (SEQ ID NO:17) 的轻链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体,所述抗体含有包含 KASQDVIFAFA (SEQ ID NO:15) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:16) 的轻

链 CDR2 和包含 QQHYSTPW (SEQ ID NO:17) 的轻链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体,所述抗体含有:(a) 包含 TGYTMH (SEQ ID NO:12) 的重链 CDR1,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 包含 GINPNNGGTTYNQNFKG (SEQ ID NO:13) 的重链 CDR2,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体;(c) 包含 KEFSDGYFFAY (SEQ ID NO:14) 的重链 CDR3,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体;(d) 包含 KASQDVIFAFA (SEQ ID NO:15) 的轻链 CDR1,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体;(e) 包含 WASTRHT (SEQ ID NO:16) 的轻链 CDR2,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体;和 (f) 包含 QQHYSTPW (SEQ ID NO:17) 的轻链 CDR3,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体。在一些实施方式中,氨基酸取代是保守性氨基酸取代。

[0016] 在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:10 具有至少 80% 序列同一性的重链可变区和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO:11 具有至少 80% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:10 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO:11 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。

[0017] 在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:55 具有至少 80% 序列同一性的重链可变区;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO:59 具有至少 80% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:55 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO:59 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。

[0018] 在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是单克隆抗体 89M5,由在 2011 年 6 月 30 日保藏的 ATCC 保藏号为 PTA-11970 的杂交瘤细胞系 89M5 产生。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 89M5 的人源化形式。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是人源化单克隆抗体 h89M5-H2L2。

[0019] 在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是结合人 RSP02 的抗体。在一些实施方式中,所述抗体结合人 RSP02 和小鼠 RSP02。在一些实施方式中,所述抗体含有包含 SSYAMS (SEQ ID NO:29) 的重链 CDR1、包含 SISSGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30) 的重链 CDR2 和包含 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (SEQ ID NO:31) 的重链 CDR3。在一些实施方式中,所述抗体还含有包含 KASQDVSSAVA (SEQ ID NO:32) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:33) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTP (SEQ ID NO:34) 的轻链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体,所述抗体含有包含 KASQDVSSAVA (SEQ ID NO:32) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:33) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTP (SEQ ID NO:34) 的轻链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体,所述抗体含有:(a) 包含 SSYAMS (SEQ ID NO:29) 的重链 CDR1,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体;(b) 包含 SISSGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30) 的重链 CDR2,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体;(c) 包含 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (SEQ ID NO:31) 的重链 CDR3,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体;(d) 包含 KASQDVSSAVA (SEQ ID NO:32) 的轻链 CDR1,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(e) 包含 WASTRHT (SEQ ID NO:33) 的轻链 CDR2,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体;和 (f) 包含 QQHYSTP (SEQ ID NO:34) 的轻链 CDR3,或者其包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的变体。在一些实施方式中,氨基酸取代是保守性氨基酸取代。

[0020] 在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:27 具有至少 80% 序列同一性的重链可变区;和/或 (b) 与 SEQ ID NO:28 具有至少 80% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:27 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区;和/或 (b) 与 SEQ ID NO:28 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。

[0021] 在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:63 具有至少 80% 序列同一性的重链可变区;和/或 (b) 与 SEQ ID NO:67 具有至少 80% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:63 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区;和/或 (b) 与 SEQ ID NO:67 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。

[0022] 在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:63 具有至少 80% 序列同一性的重链可变区;和/或 (b) 与 SEQ ID NO:76 具有至少 80% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体,所述抗体包含:(a) 与 SEQ ID NO:63 具有至少 90% 序列同一性的重链可变区;和/或 (b) 与 SEQ ID NO:76 具有至少 90% 序列同一性的轻链可变区。

[0023] 在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是单克隆抗体 130M23,由在 2011 年 8 月 10 日保藏的 ATCC 保藏号为 PTA-12021 的杂交瘤细胞系 130M23 产生。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 130M23 的人源化形式。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是人源化单克隆抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是人源化单克隆抗体 h130M23-H1L6。

[0024] 在另一方面,本发明提供与本发明的抗体竞争与人 RSP0 蛋白的特异性结合的结合剂(例如抗体)。在一些实施方式中,所述结合剂(例如抗体)与含有包含 SEQ ID NO:10 的重链可变区和包含 SEQ ID NO:11 的轻链可变区的抗体竞争与人 RSP01 的特异性结合。在一些实施方式中,所述结合剂(例如抗体)与含有包含 SEQ ID NO:55 的重链可变区和包含 SEQ ID NO:59 的轻链可变区的抗体竞争与人 RSP01 的特异性结合。在一些实施方式中,与所述 RSP01- 结合剂竞争的抗体是 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述结合剂在体外竞争性结合检验中与本发明的抗体竞争与 RSP01 的特异性结合。

[0025] 在一些实施方式中,所述抗体与本发明的抗体(例如 89M5)所结合的 RSP01 上的表位相同或基本上相同。

[0026] 在又一方面,所述结合剂是抗体,所述抗体结合的 RSP01 上的表位与本发明的抗体(例如 89M5)结合的 RSP01 上的表位重叠。

[0027] 在另一方面,本发明提供与本发明的抗体竞争与人 RSP02 的特异性结合的结合剂(例如抗体)。在一些实施方式中,所述结合剂(例如抗体)与含有包含 SEQ ID NO:27 的重链可变区和包含 SEQ ID NO:28 的轻链可变区的抗体竞争与人 RSP02 的特异性结合。在一些实施方式中,所述结合剂(例如抗体)与含有包含 SEQ ID NO:63 的重链可变区和包含 SEQ ID NO:67 的轻链可变区的抗体竞争与人 RSP02 的特异性结合。在一些实施方式中,所述结合剂(例如抗体)与含有包含 SEQ ID NO:63 的重链可变区和包含 SEQ ID NO:76 的轻链可变区的抗体竞争与人 RSP02 的特异性结合。在一些实施方式中,与所述 RSP02- 结合剂竞争的抗体是 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述结合剂在体外竞

竞争性结合检验中与本发明的抗体竞争与 RSP02 的特异性结合。

[0028] 在一些实施方式中,所述抗体与本发明的抗体(例如 89M5)所结合的 RSP02 上的表位相同或基本上相同。

[0029] 在又一方面,所述结合剂是抗体,所述抗体结合的 RSP02 上的表位与本发明的抗体(例如 130M23)结合的 RSP02 上的表位重叠。

[0030] 在各个上述方面以及本文别处描述的其他方面和/或实施方式中的一些实施方式中,RSP0-结合剂或抗体是分离的。

[0031] 在另一方面,本发明提供包含 SEQ ID NO:10 和/或 SEQ ID NO:11 的多肽。在另一方面,本发明提供包含 SEQ ID NO:55 和/或 SEQ ID NO:59 的多肽。在另一方面,本发明提供包含 SEQ ID NO:27 和/或 SEQ ID NO:28 的多肽。在另一方面,本发明提供包含 SEQ ID NO:63 和/或 SEQ ID NO:67 的多肽。在另一方面,本发明提供包含 SEQ ID NO:63 和/或 SEQ ID NO:76 的多肽。在一些实施方式中,结合 RSP01 的多肽含有包含 SEQ ID NO:25 和/或 SEQ ID NO:26 的多肽。在一些实施方式中,结合 RSP01 的多肽含有包含 SEQ ID NO:68 和/或 SEQ ID NO:69 的多肽。在一些实施方式中,结合 RSP02 的多肽含有包含 SEQ ID NO:41 和/或 SEQ ID NO:42 的多肽。在一些实施方式中,结合 RSP02 的多肽含有包含 SEQ ID NO:70 和/或 SEQ ID NO:71 的多肽。在一些实施方式中,结合 RSP02 的多肽含有包含 SEQ ID NO:70 和/或 SEQ ID NO:74 的多肽。在一些实施方式中,所述多肽是分离的。在一些实施方式中,所述多肽基本上是纯的。在一些实施方式中,所述多肽是抗体。

[0032] 在另一方面,本发明提供分离的多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含编码各个上述方面以及本文描述的其他方面和/或实施方式的抗体和/或多肽。在一些实施方式中,所述多核苷酸包含选自由 SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56 和 SEQ ID NO:58 组成的组中的序列。在一些实施方式中,所述多核苷酸包含选自由 SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:72 和 SEQ ID NO:75 组成的组中的序列。本发明还提供包含所述多核苷酸的表达载体以及包含所述表达载体和/或多核苷酸的细胞。在一些实施方式中,所述细胞是杂交瘤细胞系。在一些实施方式中,所述细胞是 ATCC 保藏号为 PTA-11970 的杂交瘤细胞系。在一些实施方式中,所述细胞是 ATCC 保藏号为 PTA-12021 的杂交瘤细胞系。

[0033] 在其他方面,本发明提供抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括使所述肿瘤与有效量的 RSP0-结合剂或抗体(包括本文描述的每种 RSP0-结合剂或抗体)接触。

[0034] 在另一方面,本发明提供抑制受试对象中肿瘤生长的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的 RSP0-结合剂或抗体(包括本文描述的每种 RSP0-结合剂或抗体)。

[0035] 在另一方面,本发明提供抑制细胞中 β -连环素信号传导的方法,所述方法包括使所述肿瘤与有效量的 RSP0-结合剂或抗体(包括本文描述的每种 RSP0-结合剂或抗体)接触。在一些实施方式中,所述细胞是肿瘤细胞。在一些实施方式中,所述肿瘤是结直肠癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是卵巢瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是胰腺瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是肺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤表达的 RSP0 蛋白中的至少一种的水平升高。在一些实施方式中,所述肿瘤表达的 RSP01 水平升高。在一些实施方式中,所

述肿瘤表达的 RSP02 水平升高。在一些实施方式中,所述肿瘤表达的 RSP03 水平升高。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂例如通过减少肿瘤中癌干细胞的数量和 / 或频率而抑制肿瘤生长。

[0036] 在另一方面,本发明提供治疗受试对象中的癌的方法。在一些实施方式中,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的上述 RSP0- 结合剂或抗体以及本文别处描述的 RSP0- 结合剂或抗体中的任一种。在一些实施方式中,所述癌是胰腺癌。在一些实施方式中,所述癌是结直肠癌。在一些实施方式中,所述结直肠癌包含在腺瘤性结肠息肉病 (APC) 基因中的失活突变。在一些实施方式中,所述结直肠癌不包含所述 APC 基因中的失活突变。在一些实施方式中,所述结直肠癌包含野生型 APC 基因。在一些实施方式中,所述癌是卵巢癌。在一些实施方式中,所述癌是乳腺癌。在一些实施方式中,所述癌是肺癌。在一些实施方式中,所述癌表达的至少一种 RSP0 蛋白的水平升高。在一些实施方式中,所述癌是表达升高水平的 RSP01 的卵巢癌。在一些实施方式中,所述癌是表达升高水平的 RSP02 的结肠癌。在一些实施方式中,所述癌是表达升高水平的 RSP02 的胰腺癌。在一些实施方式中,所述癌是表达升高水平的 RSP02 的乳腺癌。在一些实施方式中,所述癌是表达升高水平的 RSP02 的肺癌。

[0037] 在另一方面,本发明提供治疗受试对象中疾病的方法,其中所述疾病与 β - 连环素的激活和 / 或异常的 β - 连环素信号传导相关,所述方法包括施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂或抗体 (包括本文所述的每种 RSP0- 结合剂或抗体)。

[0038] 在各个上述方面以及本文别处描述的其他方面和 / 或实施方式中的一些实施方式中,所述治疗方法包括将 RSP0- 结合剂与至少一种另外的治疗剂组合施用。在一些实施方式中,所述治疗方法包括将 RSP01- 结合剂与诸如 RSP02- 结合剂、RSP03- 结合剂和 / 或 RSP04- 结合剂等第二 RSP0- 结合剂组合施用。在一些实施方式中,所述治疗方法包括将 RSP02- 结合剂与诸如 RSP01- 结合剂、RSP03- 结合剂和 / 或 RSP04- 结合剂等第二 RSP0- 结合剂组合施用。在一些实施方式中,所述治疗方法包括将 RSP01- 结合剂与 RSP02- 结合剂组合施用。在一些实施方式中,所述治疗方法包括施用 RSP01- 结合剂、RSP02- 结合剂和化学治疗剂的组合。

[0039] 在各个上述方面以及本文别处描述的其他方面和 / 或实施方式中的一些实施方式中,所述治疗方法还包括确定所述肿瘤或癌中至少一种 RSP0 蛋白的水平步骤。

[0040] 在另一方面,本发明提供鉴定人受试对象或选择人受试对象以用 RSP0- 结合剂或抗体 (包括但不限于本文描述的每种 RSP0- 结合剂或抗体) 进行治疗的方法。在一些实施方式中,所述方法包括确定所述受试对象是否具有肿瘤,所述肿瘤具有的特定 RSP0 (例如 RSP01 或 RSP02) 的表达水平与正常组织中相同的 RSP0 蛋白的表达相比升高。在一些实施方式中,如果所述肿瘤具有升高的 RSP0 表达水平,则所述方法包括鉴定治疗用受试对象或选择治疗用受试对象。在一些实施方式中,所述方法包括确定所述受试对象是否具有包含 APC 基因中的失活突变的肿瘤。在一些实施方式中,如果所述肿瘤具有 APC 基因中的失活突变,则所述方法包括鉴定治疗的受试对象或选择治疗的受试对象。

[0041] 还提供了包含本文所述的 RSP0- 结合剂或抗体以及药学上可接受的载剂的药物组合物,以及产生所述 RSP0- 结合剂的细胞系。还提供了治疗受试对象 (例如人) 中的癌和 / 或抑制受试对象 (例如人) 中的肿瘤生长的方法,所述方法包括对所述受试对象施用

有效量的包含所述 RSP0- 结合剂的组合物。

[0042] 如果本发明的方面或实施方式根据马库什分组或其他替代分组进行描述,则本发明不仅涵盖了作为整体列出的整个组,还单独涵盖了所述组的每个成员以及主要组的所有可能的亚组,还涵盖了缺少一个或多个组成员的主要组。本发明还设想明确排除了在所要求保护的发明中的任意一个或多个组成员。

附图说明

[0043] 图 1. 肿瘤和正常组织中的 RSP0 表达。显示了来自正常组织人样品、良性组织人样品和恶性组织人样品的微阵列数据的总结。各个刻度标记 (tick mark) 表示 RSP0mRNA 的表达水平。A) RSP01B) RSP02C) RSP03

[0044] 图 2. RSP0 蛋白和 LGR5 的结合研究。表达 LGR5 的 HEK-293 细胞的 FACS 分析。将 HEK-293 细胞用编码 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 的 cDNA 表达载体瞬时转染,然后与可溶性 RSP01-Fc、RSP02-Fc、RSP03-Fc 或 RSP04-Fc 融合蛋白混合。使用抗 FLAG 抗体作为阳性对照,使用可溶性 FZD8-Fc 作为阴性对照。通过在各个 FACS 图上的黑线框重叠区 (dark lined box overlay) 内信号的存在表示特异性结合。

[0045] 图 3. 肺癌细胞条件培养基中抑制活性的鉴定。使用 6xTCF- 荧光素酶报告基因检验来测定 HEK-293 细胞中的 β - 连环素信号传导。在可溶性 LGR5-Fc 的存在下使 HEK-293 细胞暴露至含有 Wnt3a L 细胞条件培养基的对照培养基 (DMEM 培养基) 或含有肺癌细胞条件培养基和 Wnt3a L 细胞条件培养基的培养基。使用可溶性 Jag-Fc 和抗体 LZ1 作为阴性对照。使用可溶性 FZD8-Fc 和阻断 Wnt3a 的抗 -FZD 抗体作为阳性对照。以 10 μ g/ml 使用可溶性 LGR5-Fc、Jag-Fc 和 FZD8-Fc 融合蛋白。以 40 μ g/ml 使用抗 -FZD 抗体和 LZ1 抗体。

[0046] 图 4. β - 连环素信号传导的诱导的抑制。使用 6xTCF- 荧光素酶报告基因检验来测定 HEK-293 细胞中的 β - 连环素信号传导。在可溶性 LGR5-Fc 在 20 μ g/ml \sim 0.02 μ g/ml 的四倍稀释液存在下,使 HEK-293 细胞暴露至含有 10ng/ml RSP02 和 25%Wnt3a L 细胞条件培养基的培养基 (“RSP02”) 或含有 25% 肺癌细胞条件培养基和 25%Wnt3a L 细胞条件培养基的培养基 (“LT”);具有 LGR5-Fc 的 RSP02(- \square -) 和具有 LGR5-Fc(- \blacksquare -) 的 LT。具有 RSP02(- \triangle -) 或 LT(- \blacktriangle -) 的 20 μ g/ml 的可溶性 Jag-Fc 用作阴性对照。具有 RSP02(- \circ -) 或 LT(- \bullet -) 的 20 μ g/ml 的阻断 Wnt3a 的可溶性 FZD8-Fc 用作阳性对照。

[0047] 图 5. 结合 RSP01 的抗体的鉴定。A) 融合蛋白 FLAG-RSP01 弗林蛋白酶-CD4TM-GFP 的图示。B) 所产生的针对人 RSP01 的抗体的 FACS 分析。y 轴显示相对抗体结合,x 轴表示 FLAG-RSP01 弗林蛋白酶-CD4TM-GFP 融合蛋白的表达。通过在各个 FACS 图上的黑线框重叠区内信号的存在表示阳性结合。使用抗 -FLAG 抗体作为阳性对照。使用抗 -PE 抗体作为阴性对照。

[0048] 图 6. 抑制由 RSP01 诱导的 β - 连环素信号传导的抗 -RSP01 抗体的鉴定。在浓度渐增的抗 -RSP01 抗体 (89M2、89M4、89M5、89M7、89M19 或 89M25) 或无关对照抗体 (254M14 或 254M26) 的存在下,在将 HEK-293 细胞暴露至 Wnt3a (5ng/ml) 和 RSP01 (10ng/ml) 的组合后,使用 TOPflash 荧光素酶报告基因检验来测定所述 HEK-293 细胞中的 β - 连环素信号传导。抗体以 10 μ g/ml \sim 0.625 μ g/ml 范围内的 2 倍稀释液使用。对照包括在不存在抗体时暴露至对照培养基 (无 Wnt3a 和无 RSP0)、单独 Wnt3a 或者 Wnt3a 和 RSP0 的组合。

[0049] 图 7. 阻断 RSP01/LGR5 结合的抗 -RSP01 抗体的鉴定。表达 LGR5 的 HEK-293 细胞的 FACS 分析。将 HEK-293 细胞用编码 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 的 cDNA 表达载体瞬时转染, 然后与组合有各种抗 -RSP01 抗体的可溶性 RSP01-Fc 融合蛋白混合。用缀合有 PE 的抗人 Fc 二抗检测结合。y 轴显示相对 RSP01-Fc 结合, x 轴表示 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 融合蛋白的表达。通过在各个 FACS 图上的黑线框重叠区内信号的存在表示阳性结合。使用抗 -PE 抗体作为阴性对照。

[0050] 图 8. 用抗 -RSP01 抗体抑制肿瘤生长。将 OV19 卵巢瘤细胞皮下注入 NOD/SCID 小鼠中。用 89M5 (-●-), 89M25 (-▼-), 紫杉醇 (-◆-), 抗体 89M5 和紫杉醇的组合 (-○-), 抗体 89M25 和紫杉醇的组合 (-□-) 或者对照抗体 1B7.11 (-■-) 治疗小鼠。数据显示为治疗后天数与肿瘤体积 (mm³)。

[0051] 图 9. 抗 -RSP01 抗体的表位作图。A) 含有 RSP01 结构域的缺失系列的所构建的融合蛋白的图。这些构建体都包含允许所述蛋白的细胞表面表达的 CD4TM 结构域。B) 抗 -RSP01 抗体与用所述融合蛋白转染的细胞的结合的 FACS 分析。y 轴显示相对抗体结合, x 轴表示所述融合蛋白的表达。使用抗 -FLAG 抗体作为阳性对照。使用抗 -PE 抗体作为阴性对照。

[0052] 图 10. 结合 RSP02 的抗体的鉴定。所产生的针对人 RSP02 的抗体的 FACS 分析。y 轴显示相对抗体结合, x 轴表示 FLAG-RSP02 弗林蛋白酶 -CD4TM-GFP 融合蛋白的表达。使用抗 -FLAG 抗体作为阳性对照。使用抗 -PE 抗体作为阴性对照。

[0053] 图 11. 抑制 RSP02 诱导 β -连环素信号传导的抗 -RSP02 抗体的鉴定。在针对 RSP02 的抗体 (mAbs130M23、130M24、130M25、130M26、130M27 和 130M28) 的存在下, 在将 HEK-293 细胞暴露至 Wnt3a (5ng/ml) 和人 RSP02 (10ng/ml) 的组合或 Wnt3a (5ng/ml) 和人 RSP03 (10ng/ml) 的组合后, 使用 TOPflash 荧光素酶报告基因检验来测定所述 HEK-293 细胞中的 β -连环素信号传导。对照包括在不存在抗体时暴露至对照培养基 (不添加 Wnt3a 和没有 RSP0 标记的“细胞”)、单独 Wnt3a (经标记的“W3A”) 或者 Wnt3a 和 RSP0 的组合。

[0054] 图 12. 阻断 RSP02/LGR5 结合的抗 -RSP02 抗体的鉴定。表达 LGR5 的 HEK-293 细胞的 FACS 分析。将 HEK-293 细胞用编码 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 的 cDNA 表达载体瞬时转染, 然后与组合有各种抗 -RSP02 抗体的可溶性 RSP02-Fc 融合蛋白混合。用缀合有 PE 的抗人 Fc 二抗检测结合。y 轴显示相对 RSP02-Fc 结合, x 轴表示 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 融合蛋白的表达。通过在各个 FACS 图上的黑线框重叠区内信号的存在表示阳性结合。使用抗 FLAG 抗体作为阳性对照, 使用抗 -PE 抗体作为阴性对照。

[0055] 图 13. 肿瘤细胞条件培养基中抑制活性的鉴定。在可溶性 LGR5-Fc、FZD8-Fc 或对照融合 Fc 蛋白的存在下, 将 STF-293 细胞暴露至对照培养基 (DMEM 培养基)、含有 Wnt3a L 细胞条件培养基的培养基、含有肿瘤细胞条件培养基的培养基或含有肿瘤细胞条件培养基和 Wnt3a L 细胞条件培养基的培养基。以 10 μ g/ml 使用可溶性 LGR5-Fc、FZD8-Fc 和对照 -Fc 融合蛋白。从肺癌 LU2 (图 13A)、肺癌 LU25 (图 13B) 和卵巢瘤 OV38 (图 13C) 制备肿瘤细胞条件培养基。

[0056] 图 14. β -连环素信号传导的诱导的抑制。使 STF-293 与 LU2 细胞和 25% 的肿瘤细胞条件培养基以及 25%Wnt3a-L 细胞条件培养基一起温育。将抗体 130M23 (-■-) 和可溶性 LGR5-Fc (-●-) 以 50 μ g/ml ~ 0.0006 μ g/ml 范围内的 5 倍连续稀释液添加至所述

细胞。使用经过类似稀释的无关单克隆抗体 (- □ -) 和对照 Fc 融合蛋白 (- △ -, 50 μ g/ml) 作为阴性对照。

[0057] 图 15. 用抗-RSP0 抗体抑制肿瘤生长。将 PN31 胰腺瘤细胞皮下注入 NOD/SCID 小鼠中。用抗-RSP01 抗体 89M5 (- □ -)、抗-RSP02 抗体 130M23 (- ▲ -)、吉西他滨 (- ■ -)、抗体 89M5 和吉西他滨的组合 (- ▼ -)、抗体 130M23 和吉西他滨的组合 (- ◇ -) 或对照抗体 1B7. 11 (- ○ -) 治疗小鼠。数据显示为植入后天数与肿瘤体积 (mm³)。

[0058] 图 16. 用抗-RSP0 抗体抑制肿瘤生长。将 PN7 胰腺瘤细胞皮下注入 NOD/SCID 小鼠中。用抗-RSP02 抗体 130M23 (- ▼ -)、抗-FZD 抗体 18R5 (- ▲ -)、吉西他滨 (- ● -)、130M23 和 18R5 的组合 (- ○ -)、130M23 和吉西他滨的组合 (- □ -)、18R5 和吉西他滨的组合 (- △ -)、130M23、18R5 和吉西他滨的组合 (- ◇ -) 或对照抗体 1B7. 11 (- ■ -) 治疗小鼠。数据显示为治疗后天数与肿瘤体积 (mm³) (图 16A)。用 Wnt 途径抑制剂 FZD8-Fc 和吉西他滨的组合 (- △ -)、130M23 和吉西他滨的组合 (- ▼ -)、130M23、FZD8-Fc 和吉西他滨的组合 (- ◇ -)、吉西他滨 (- ● -) 或对照抗体 1B7. 11 (- ■ -) 治疗小鼠。数据显示为治疗后天数的肿瘤体积 (mm³) (图 16B)。将所得到的肿瘤处理成单细胞悬浮液, 并连续移植到小鼠中。将获自每个治疗组的 90 个肿瘤细胞皮下注入 NOD/SCID 小鼠中。在不进行治疗时使肿瘤生长。数据显示为第 40 天的肿瘤体积 (mm³) (图 16C)。

[0059] 图 17. 人源化 RSP0 抗体的 FACS 分析。A) 人源化 89M5 抗体 (h89M5-H2L2) 和亲本 89M5 抗体的 FACS 分析。测试每种抗体的 5 倍连续稀释液。y 轴显示相对抗体结合, x 轴表示 FLAG-RSP01 弗林蛋白酶-CD4TM-GFP 融合蛋白的表达。B) 人源化 130M23 抗体 (h130M23-H1L2) 和亲本 130M23 抗体的 FACS 分析。测试每种抗体的 5 倍连续稀释液。y 轴显示相对抗体结合, x 轴表示 FLAG-RSP02 弗林蛋白酶-CD4TM-GFP 融合蛋白的表达。

[0060] 图 18. 用抗-RSP01 和抗-RSP02 抗体抑制肿瘤生长。将 B39 三重阴性 (triplogenegative) 乳腺癌肿瘤细胞皮下注入 NOD/SCID 小鼠中。用抗-RSP01 抗体 89M5 和抗-RSP02 抗体 130M23 的组合 (- ○ -)、顺铂 (- ▼ -)、89M5、130M23 和顺铂的组合 (- ● -) 或对照抗体 1B7. 11 (- ■ -) 治疗小鼠。数据显示为治疗后天数的肿瘤体积 (mm³)。

具体实施方式

[0061] 本发明提供结合 RSP0 蛋白 (例如人 RSP01、RSP02 和 / 或 RSP03) 的新型试剂, 包括但不限于多肽, 例如抗体。所述 RSP0- 结合剂包括 β- 连环素信号传导的拮抗剂。还提供了相关多肽和多核苷酸、包含所述 RSP0- 结合剂的组合物以及制造所述 RSP0- 结合剂的方法。进一步提供了使用上述新型 RSP0- 结合剂的方法, 例如抑制肿瘤生长的方法、治疗癌的方法、减少癌干细胞在肿瘤中的频率的方法、抑制 β- 连环素信号传导的方法和 / 或鉴定和 / 或选择治疗用受试对象的方法。

[0062] 已经鉴定出特异性结合人 RSP01 的单克隆抗体: 单克隆抗体 89M2、89M4、89M5、89M7、89M19 和 89M25 (实施例 5、图 5)。抗-RSP01 抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 抑制 β- 连环素信号传导 (实施例 6、图 6)。抗-RSP01 抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 阻断可溶性 RSP01 与 LGR5 的结合 (实施例 7、图 7)。随后, 序列数据证明抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 含有相同的重链和轻链可变区, 并且据推断这些抗体会包含相同的抗原结合位点。抗-RSP01 抗体

89M4、89M5、89M7 和 89M25 对人和小鼠 RSP01 的结合亲和性都小于 0.1nM(实施例 8)。产生了 89M5 的人源化版本 h89M5-H2L2(实施例 19)，其对 RSP01 的结合亲和性小于 0.1nM(实施例 20)。已经发现抗 -RSP01 抗体 89M5 和 89M25 在卵巢瘤异种移植物模型中作为单独的试剂和与化学治疗剂组合在体内抑制肿瘤细胞生长(实施例 9、图 8)。抗 -RSP01 抗体 89M5 显示在胰腺瘤异种移植物模型中与化学治疗剂组合在体内抑制肿瘤细胞生长(实施例 17、图 15)。初步的表位作图研究表明, 抗 -RSP01 抗体 89M5 的结合位点涉及 RSP01 的弗林蛋白酶 2 结构域内的氨基酸(实施例 10、图 9)。

[0063] 此外, 已经鉴定出特异性结合人 RSP02 的单克隆抗体: 单克隆抗体 130M23、130M24、130M25、130M26、130M27 和 130M28(实施例 11、图 10)。抗 -RSP02 抗体 130M23、130M24、130M25、130M26、130M27 和 130M28 据显示会减少或完全阻断 β -连环素信号传导(实施例 12、图 11)。抗 -RSP02 抗体 130M23 和 130M24 阻断可溶性 RSP02 与 LGR5 的结合(实施例 13、图 12)。抗 -RSP02 抗体 130M23 对人 RSP02 的结合亲和性为 0.14nM, 对小鼠 RSP02 的结合亲和性为 0.35nM(实施例 15)。产生了 130M23 的人源化版本 h130M23-H1L2 和 h130M23-H1L6(实施例 19)。抗 -RSP02 抗体 h130M23-H1L2 对人 RSP02 的结合亲和性为 0.13nM, h130M23-H1L6 对人 RSP02 的结合亲和性为 0.15nM(实施例 20)。抗 -RSP02 抗体 130M23 显示在胰腺瘤异种移植物模型中作为单独试剂和与另外的化学治疗剂组合在体内抑制肿瘤细胞生长(实施例 17 和 18、图 15 和 16)。

[0064] I. 定义

[0065] 为了便于理解本发明, 将许多术语和短语如下定义。

[0066] 本文所用的术语“拮抗剂”和“拮抗的”是指任何部分或完全阻断、抑制、减少或中和靶标和 / 或信号传导途径(例如, β -连环素信号传导) 的分子。本文使用术语“拮抗剂”来包括任何部分或完全阻断、抑制、减少或中和蛋白质的活性(例如, RSP0 蛋白) 的分子。合适的拮抗剂分子具体包括但不限于拮抗性抗体或抗体片段。

[0067] 本文使用的术语“调节”和“调整”是指生物活性的改变或变化。调节包括但不限于刺激或抑制活性。调节可以是活性的增加或降低(例如 RSP0 信号传导的降低、 β -连环素信号传导的降低)、结合特性的改变、或者与蛋白活性、途径或其他所关注生物点有关的生物、功能或免疫性质上的任何其他改变。

[0068] 本文使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子, 其通过免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别和特异性结合靶标, 例如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或者前述的组合。如本文所述, 该术语涵盖了完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、抗体片段(例如 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段)、单链 Fv(scFv) 抗体、多特异性抗体(例如由至少两个完整抗体产生的双特异性抗体)、单特异性抗体、单价抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其他经修饰免疫球蛋白分子, 只要该抗体展现所需的生物活性即可。基于分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的抗体的重链恒定结构域, 抗体可以是免疫球蛋白的五个主要类别中的任一个: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 或者其亚类(同种型)(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)。不同类别的免疫球蛋白具有不同且公知的亚基结构以及三维构型。抗体可以是裸露的, 或缀合至其他分子, 包括但不限于毒素和放射性同位素。

[0069] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分, 并且是指完整抗体的抗原决定可变区。

抗体片段的实例包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段、线性抗体、单链抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体。本文使用的“抗体片段”包括抗原结合位点或表位结合位点。

[0070] 术语抗体的“可变区”是指抗体轻链的可变区和 / 或抗体重链的可变区。重链和轻链的可变区各自自由通过三个互补决定区 (CDR) (也称为“超变区”) 连接的四个框架区 (FR) 组成。各链中的 CDR 通过框架区而保持得相互靠近, 并与来自其他链的 CDR 一起促成抗体的抗原结合位点的形成。确定 CDR 的技术至少有两种技术: (1) 基于交叉物种序列可变性的方法 (即, Kabat 等, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, National Institutes of Health, Bethesda MD) 和 (2) 基于抗原-抗体复合物的晶体研究的方法 (Al-Lazikani 等, 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948)。此外, 本领域有时使用这两种方法的组合来确定 CDR。

[0071] 本文使用的术语“单克隆抗体”是指参与高特异性识别和结合单一抗原决定簇或表位的均匀抗体群体。这与多克隆抗体相反, 多克隆抗体通常包括针对不同抗原决定簇的不同抗体的混合物。术语“单克隆抗体”涵盖了完整和全长单克隆抗体以及抗体片段 (例如, Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链 (scFv) 抗体、包含抗体部分的融合蛋白和包含抗原识别位点 (抗原结合位点) 的任何其他经修饰免疫球蛋白分子。此外, “单克隆抗体”是指通过任意数量的技术制造的此类抗体, 所述技术包括但不限于杂交瘤技术、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0072] 本文使用的术语“人源化抗体”是指非人 (例如鼠类) 抗体的形式, 其是特异性的免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其含有最小非人序列的片段。通常, 人源化抗体是其中 CDR 残基被具有所需特异性、亲和性和 / 或结合能力的非人物种 (例如小鼠、大鼠、兔或仓鼠) 的 CDR 残基替换的人免疫球蛋白 (Jones 等, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann 等, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen 等, 1988, *Science*, 239:1534-1536)。在某些情况下, 人免疫球蛋白的 Fv 框架区残基被来自具有所需特异性、亲和性和 / 或结合能力的非人物种的抗体中的相应残基替换。人源化抗体可以通过 Fv 框架区中和 / 或所替换的非人残基中的另外残基的取代而被进一步修饰, 从而改善和优化抗体特异性、亲和性和 / 或结合能力。通常, 人源化抗体会包含至少一个、通常 2 个或 3 个含有所有或基本上所有对应于非人免疫球蛋白的 CDR 的可变结构域, 但所有或基本上所有的框架区是人免疫球蛋白共有序列的框架区。人源化抗体还可以包括免疫球蛋白恒定区或结构域 (Fc) 的至少一部分, 通常是人免疫球蛋白恒定区或结构域 (Fc) 的至少一部分。用于生成人源化抗体的方法的实例描述于例如美国专利 5, 225, 539。

[0073] 本文使用的术语“人抗体”是指由人产生的抗体, 或者具有对应于使用任何本领域已知的技术制造的由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的该定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0074] 本文使用的术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列源自两种以上物种的抗体。通常, 轻链和重链的可变区对应于源自一个具有所需特异性、亲和性和 / 或结合能力的哺乳动物物种 (例如小鼠、大鼠、兔等), 而恒定区与源自另一物种 (通常为人) 的抗体中的序列是同源的, 以避免引起该物种中的免疫响应。

[0075] 文使用的短语“亲和性成熟抗体”是指在其一个或多个 CDR 中具有一个或多个改变的抗体, 所述改变导致与不拥有这些改变的亲本抗体相比, 该抗体与抗原

的亲性和得到改善。优选的亲性和成熟抗体会对靶抗原具有纳摩尔甚至皮摩尔的亲性和。亲性和成熟抗体通过本领域已知的步骤产生。例如, Marks 等, 1992, *Bio/Technology* 10:779-783 中描述了通过 VH 和 VL 结构域重排产生的亲性和成熟。Barbas 等, 1994, *PNAS*, 91:3809-3813; Schier 等, 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton 等, 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson 等, 1995, *J. Immunol.*, 154:3310-9; 和 Hawkins 等, 1992, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 中描述了 CDR 和 / 或框架残基的随机诱变。

[0076] 术语“表位”和“抗原决定簇”在本文可以相互替换地使用, 并且是指抗原的能够通过特定抗体识别和特异性结合的部分。当抗原是多肽时, 表位可以由相邻的氨基酸以及通过蛋白质的三维折叠而并排的非相邻氨基酸形成。由相邻氨基酸形成的表位(也称为线性表位)通常在蛋白质变性时保留, 而由三维折叠形成的表位(也称为构象表位)通常在蛋白质变性时丢失。表位通常在独特的空间构象中包括至少 3 个、更经常至少 5 个或 8 ~ 10 个氨基酸。

[0077] 术语“选择性结合”或“特异性结合”是指与替代物质(包括不相关蛋白)相比, 抗体与表位、蛋白质或靶分子反应或结合得更频繁、更迅速、更持久、更具亲性和或以上情况的一些组合。在一些实施方式中, “特异性结合”例如是指抗体与蛋白结合的 K_D 为约 0.1 nM 以下, 更通常小于约 1 μ M。在一些实施方式中, “特异性结合”有时是指抗体与靶标结合的 K_D 为至少约 0.1 μ M 以下, 其他情况下是指为至少约 0.01 μ M 以下, 另外的情况下为至少约 1 nM 以下。由于不同物种的同源蛋白之间的序列同一性, 特异性结合可以包括在超过一个物种(例如人 RSP01 和小鼠 RSP01) 中识别蛋白质的抗体。类似地, 由于不同蛋白质的多肽序列的特定区域内的同源性, 特异性结合可以包括识别超过一种蛋白质(例如人 RSP01 和人 RSP02) 的抗体(或其他多肽或结合剂)。应该理解的是, 在一些实施方式中, 抗体或特异性结合第一靶标的结合部分可以或不可以特异性结合第二靶标。因此, “特异性结合”不必然要求(但其包括)专一性结合(即与单一靶标结合)。所以, 在一些实施方式中, 抗体可以特异性结合超过一种靶标。在一些实施方式中, 多种靶标可以被抗体上的同一抗原结合位点结合。例如, 在一些情况下, 抗体可以包括两个相同的抗原结合位点, 每个抗原结合位点特异性结合两种以上蛋白质(例如 RSP01 和 RSP02) 上的相同表位。在一些替代实施方式中, 抗体可以是双特异性的或多特异性的, 并且包含至少两个具有不同特异性的抗原结合位点。非限制性举例而言, 双特异性抗体可以包括识别一种蛋白质(例如人 RSP01) 上的表位的一个抗原结合位点, 还包含第二个不同的识别第二蛋白质上的不同表位的抗原结合位点。通常提到结合是指特异性结合, 但并非必然如此。

[0078] 术语“多肽”和“肽”和“蛋白质”在本文中相互替换地使用, 并且是指任何长度的氨基酸的聚合物。该聚合物可以是直链或支链的, 其可以包含经修饰氨基酸, 并且其可以间插非氨基酸。该术语还涵盖了通过天然或干预而进行修饰的聚合物, 例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰, 例如与标记成分缀合。该定义中还涵盖了例如含有氨基酸的一种或多种类似物(包括例如非天然氨基酸) 以及其他本领域已知的修饰的多肽。应该理解的是, 由于本发明的多肽可以基于抗体, 在一些实施方式中, 所述多肽可以作为单链或结合链出现。

[0079] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文可以相互替换地使用, 是指任何长度的核苷酸的聚合物, 并且包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核酸、核糖核酸、经修饰核苷酸或碱

基和 / 或他们的类似物, 或者可以通过 DNA 或 RNA 聚合酶引入聚合物中的任何物质。

[0080] “高严谨条件”可以通过以下鉴定:(1) 使用低离子强度和高温以用于洗涤, 例如 50°C 的 15mM 氯化钠 /1.5mM 柠檬酸钠 /0.1% 十二烷基硫酸钠;(2) 杂交期间使用诸如甲酰胺等变性剂, 例如 42°C 的具有 0.1% 胎牛血清白蛋白 /0.1%Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 /pH6.5 的 50mM 磷酸钠缓冲液(带 750mM 氯化钠、75mM 柠檬酸钠)的 50%(v/v) 甲酰胺;或(3) 使用 42°C 的 50% 甲酰胺、5×SSC(0.75M NaCl, 75mM 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠(pH6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5× 邓哈特溶液(Denhardt's solution)、超声处理的鲑鱼精子 DNA(50 μg/ml)、0.1%SDS 和 10% 右旋糖酐硫酸酯, 在 42°C 的 0.2×SSC 中洗涤, 在 55°C 的 50% 甲酰胺中洗涤, 然后在 55°C 的由含有 EDTA 的 0.1×SSC 组成的高严谨洗涤液中洗涤。

[0081] 在两个以上核酸或多肽的背景下的术语“同一性”或百分比“同一性”, 是指不考虑作为序列同一性的一部分的任何保守性氨基酸取代, 当就最大相应性进行比较和比对(必要时引入空位)时, 两个或更多个相同或的序列或亚序列、或所述序列或亚序列的特定百分比的核苷酸或氨基酸残基是相同的。可以使用序列比较软件或算法或通过目视检查测定百分比同一性。可用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对的各种算法和软件是本领域已知的。这些包括但不限于 LAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package 及其各种变体。如使用序列比较算法或通过目视检查所测定的, 当就最大相应性进行比较和比对时, 本发明的两种核酸或多肽基本上具有同一性, 这意味着他们具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、且在一些实施方式中至少 95%、96%、97%、98%、99% 核苷酸或氨基酸残基同一性。在一些实施方式中, 在长度为至少约 10 个、至少约 20 个、至少约 40-60 个、至少约 60-80 个残基或其间的任意整数值的序列区域上存在同一性。在一些实施方式中, 在大于 60-80 个残基的更长区域(例如至少约 80-100 个残基)上存在同一性, 并且在一些实施方式中, 序列在所比较的序列(例如核苷酸序列的编码序列)的全长上基本上是相同的。

[0082] “保守性氨基酸取代”是其中一个氨基酸被具有相似侧链的另一氨基酸替换的取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族已经在本领域中定义, 包括碱性侧链(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)。例如, 苯丙氨酸取代酪氨酸是保守性取代。优选的是, 本发明的多肽序列和抗体中的保守性取代不会消除含有上述氨基酸序列的多肽或抗体与抗原的结合, 所述抗原即所述多肽或抗体所结合的一种或多种 RSP0 蛋白。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守性取代的方法是本领域公知的。

[0083] 本文使用的术语“载体”是指构建体, 其能够递送并且通常在宿主细胞中表达一种或多种目的基因或序列。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂连接的 DNA 或 RNA 表达载体和包封在脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体。

[0084] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是处于未见于自然界中的形式的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或

组合物包括已经被纯化至他们不再处于其见于自然界中的形式的程度的那些。在一些实施方式中,分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是基本上纯的。

[0085] 本文使用的术语“基本上纯”是指至少为 50% 纯(纯即无污染物)、至少为 90% 纯、至少为 95% 纯、至少为 98% 纯或至少为 99% 纯的材料。

[0086] 本文使用的术语“癌”和“癌性的”是指或描述其中细胞群的特征在于不受控的细胞生长的哺乳动物中的生理条件。癌的实例包括但不限于上皮癌、母细胞瘤、肉瘤和血液癌(例如淋巴瘤和白血病)。

[0087] 本文使用的术语“肿瘤”和“赘生物”是指由过度细胞生长或增殖(良性(非癌性)或恶性(癌性),包括前癌损伤)引起的任何组织团块。

[0088] 本文使用的术语“转移”是指癌从起始位点扩散或转移至身体的其他区域并在新位置发育有类似的癌损伤的过程。“转移”或“转移性”细胞是丧失与邻近细胞的粘附接触、通过血流或淋巴从疾病的原发位点移动从而入侵邻近的身体结构的细胞。

[0089] 术语“癌干细胞”和“CSC”和“肿瘤干细胞”和“肿瘤起始细胞”在本文可以相互替换地使用,并且是指来自癌或肿瘤的如下细胞:(1) 具有全面的增殖能力;(2) 能够进行不对称细胞分裂以产生一种或多种分化细胞后裔,其中分化细胞具有减少的增殖或发育潜能;和(3) 能够进行对称细胞分裂以自我更新或自我维持。与不能形成肿瘤的大多数肿瘤细胞相比,这些性质赋予癌干细胞在连续移植到免疫妥协的宿主(例如小鼠)时形成或建立肿瘤或癌的能力。癌干细胞以无序方式进行自我更新和分化,从而形成具有异常细胞类型的肿瘤,由于发生突变,所述异常细胞类型能够随时间发生改变。

[0090] 术语“癌细胞”和“肿瘤细胞”是指源自癌或肿瘤或前癌损伤的总细胞群体,其包括非致瘤性细胞(其包含大量癌细胞群)和致瘤性干细胞(癌干细胞)。如本文所用,术语“癌细胞”或“肿瘤细胞”当仅指缺乏更新分化能力的那些细胞时会被术语“非致瘤性的”修饰,从而将这些肿瘤细胞与癌干细胞区分开。

[0091] 本文使用的术语“致瘤性的”是指癌干细胞的功能特征,包括自我更新性质(产生另外的致瘤性癌干细胞)和增殖以产生所有其他肿瘤细胞的性质(产生分化的非致瘤性肿瘤细胞)。

[0092] 本文使用的术语“致瘤性”是指来自肿瘤的随机细胞样品在连续移植至免疫妥协的宿主(例如,小鼠)时形成可察觉的肿瘤的能力。

[0093] 术语“受试对象”是指任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类、犬科动物、猫科动物和啮齿动物等,其是特定治疗的接受者。通常而言,本文术语“受试对象”或“患者”在指人类受试对象时可相互替换地使用。

[0094] 术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构批准或能够批准或在美国药典或用于包括人类在内的动物的其它公认的药典中列出。

[0095] 术语“药学上可接受的赋形剂、载剂或佐剂”或“可接受的药物载剂”是指可以与至少一种本发明的结合剂(例如抗体)施用至受试对象的赋形剂、载剂或佐剂,当以足以递送治疗效果的剂量施用其时不破坏至少一种本发明的结合剂的药物活性,并且是非毒性的。

[0096] 术语“有效量”或“治疗有效量”或“治疗效果”是指对于“治疗”受试对象或哺乳动物中的疾病或病症有效的结合剂、抗体、多肽、多核苷酸、有机小分子或其他药物的量。在癌的情况下,药物的治疗有效量具有治疗效果,因此能够减少癌细胞的数量;降低致瘤性、

致瘤频率或致瘤能力；减小癌干细胞的数量和频率；减小肿瘤尺寸；减少癌细胞群；抑制或停止癌细胞浸润到周围器官，包括例如癌扩散至软组织和骨中；抑制和停止肿瘤或癌细胞转移；抑制和停止肿瘤或癌细胞生长；某种程度上减缓与癌有关的一种或多种症状；减少发病率和致死率；改善生活品质；或所述效果的组合。如果试剂，例如抗体防止现有癌细胞生长和 / 或杀死现有癌细胞，则可以将其称为细胞抑制剂和 / 或细胞毒素。

[0097] 术语“治疗中”或“治疗”或“待治疗”或“缓解”或“待缓解”等术语是指 1) 治愈、减慢、减轻所诊断病理疾病或病症的症状和 / 或暂停其发展的治疗性措施，以及 2) 预防和 / 或减慢目的病理疾病或病症的发展的预防性或防止性措施。因此需要治疗的对象包括已经罹患疾病的对象、倾向于罹患疾病的对象和其中待要预防疾病的对象。在一些实施方式中，如果患者显示以下情况中的一种或多种，则根据本发明的方法成功地“治疗”了受试对象：癌细胞的数量减少或完全不存在；肿瘤尺寸的减小；浸润到周围器官的癌细胞（包括例如癌至软组织和骨的扩散）受抑制或不存在；肿瘤或癌细胞转移受抑制或不存在；癌生长受抑制或不存在；与特定癌相关的一种或多种症状的缓解；发病率和致死率减少；生活品质提高；或上述效果的某些组合。

[0098] 如本说明书和权利要求所用，单数形式的“一种”、“一个”和“所述”包括复数形式，除非上下文明确地指出例外。

[0099] 应该理解的是，在本文无论何处以语言“包含”描述了实施方式，也就提供了以术语“由……组成”和 / 或“基本上由……组成”描述的另外的类似实施方式。

[0100] 本文诸如“A 和 / 或 B”等短语中使用的术语“和 / 或”旨在包括 A 和 B、A 或 B、（单独的）A 和（单独的）B。类似地，诸如“A、B 和 / 或 C”等短语中使用的术语“和 / 或”旨在涵盖了以下实施方式中的每一种：A、B 和 C；A、B 或 C；A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 和 C；A 和 B；B 和 C；（单独的）A（单独）；（单独的）B（单独）；和（单独的）C。

[0101] II. RSP0- 结合剂

[0102] 本发明提供结合人 RSP0 蛋白的试剂。本文将这些试剂称为“RSP0- 结合剂”。在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂是抗体。在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂是多肽。在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂结合 RSP01。在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂结合 RSP02。在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂结合 RSP03。在一些实施方式中，所述 RSP0 试剂特异性结合至少一种其他人 RSP0。在一些实施方式中，由 RSP01- 结合剂结合的所述至少一种其他人 RSP0 选自由 RSP02、RSP03 和 RSP04 组成的组。在一些实施方式中，由 RSP02- 结合剂结合的所述至少一种其他人 RSP0 选自由 RSP01、RSP03 和 RSP04 组成的组。在一些实施方式中，由 RSP03- 结合剂结合的所述至少一种其他人 RSP0 选自由 RSP01、RSP02 和 RSP04 组成的组。人 RSP01、RSP02、RSP03 和 RSP04 的全长氨基酸 (aa) 序列是本领域已知的，并且在本文作为 SEQ ID NO: 1 (RSP01)、SEQ ID NO: 2 (RSP02)、SEQ ID NO: 3 (RSP03) 和 SEQ ID NO: 4 (RSP04) 提供。

[0103] 在一些实施方式中，本文描述的 RSP0- 结合剂（例如抗体）的抗原结合位点能够结合（或结合）一种、两种、三种或四种 RSP0。在一些实施方式中，本文描述的 RSP01- 结合剂（例如抗体）的抗原结合位点能够结合（或结合）RSP01 以及一种、两种或三种其他 RSP0。例如，在一些实施方式中，RSP01- 结合剂的抗原结合位点能够特异性结合 RSP01 以及至少一种选自由 RSP02、RSP03 和 RSP04 组成的组中的其他 RSP0。在一些实施方式中，所述

RSP01- 结合剂特异性结合 RSP01 和 RSP02。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂特异性结合 RSP01 和 RSP03。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂特异性结合 RSP01 和 RSP04。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂特异性结合 RSP01、RSP02 和 RSP03。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂特异性结合 RSP01、RSP02 和 RSP04。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂特异性结合 RSP01、RSP03 和 RSP04。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂特异性结合人 RSP01。在一些实施方式中,本文描述的 RSP01- 结合剂(例如抗体)特异性结合人 RSP01 和小鼠 RSP01。

[0104] 在一些实施方式中,所述试剂(结合剂)是在人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述试剂(结合剂)是在人 RSP01 的 31 ~ 263 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述抗原结合剂是在人 RSP01 的 34 ~ 135 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述抗原结合剂是在人 RSP01 的 91 ~ 135 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂在 SEQ ID NO:5 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂在 SEQ ID NO:9 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂或抗体结合 RSP01 的弗林蛋白酶样富半胱氨酸结构域。在一些实施方式中,所述试剂或抗体结合在 RSP01 的弗林蛋白酶样富半胱氨酸结构域内的至少一个氨基酸。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂或抗体在序列 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂或抗体在序列 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂结合 RSP01 的血小板反应蛋白结构域。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂或抗体结合 RSP01 的血小板反应蛋白结构域内的至少一个氨基酸。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂或抗体在 SEQ ID NO:8 内结合。

[0105] 在一些实施方式中,本文描述的 RSP02- 结合剂(例如抗体)的抗原结合位点能够结合(或结合)RSP02 以及一种、两种或三种其他 RSP0。例如,在一些实施方式中,RSP02- 结合剂的抗原结合位点能够特异性结合 RSP02 以及至少一种选自 RSP01、RSP03 和 RSP04 组成的组中的其他 RSP0。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂特异性结合 RSP02 和 RSP01。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂特异性结合 RSP02 和 RSP03。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂特异性结合 RSP02 和 RSP04。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂特异性结合 RSP02、RSP03 和 RSP04。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂特异性结合 RSP02、RSP01 和 RSP03。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂特异性结合 RSP02、RSP01 和 RSP04。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂特异性结合人 RSP02。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂(例如抗体)特异性结合人 RSP02 和小鼠 RSP02。

[0106] 在一些实施方式中,所述试剂(结合剂)是在人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述试剂(结合剂)是在人 RSP02 的 22 ~ 205 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述抗原-结合剂是在人 RSP02 的 31 ~ 146 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述抗原结合剂是在人 RSP02 的 31 ~ 89 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述抗原结合剂是在人 RSP02 的 90 ~ 134 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述抗原结合剂是在人 RSP02 的 90 ~ 146 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂在 SEQ ID NO:43 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂在 SEQ ID NO:44 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂或抗体结合 RSP02 的弗林蛋白酶样富半胱氨酸结构域。在

一些实施方式中,所述试剂或抗体结合在 RSP02 的弗林蛋白酶样富半胱氨酸结构域内的至少一个氨基酸。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂或抗体在序列 SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:46 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂或抗体在序列 SEQ ID NO:45 和 SEQ ID NO:46 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂结合 RSP02 的血小板反应蛋白结构域。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂或抗体结合 RSP02 的血小板反应蛋白结构域内的至少一个氨基酸。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂或抗体在 SEQ ID NO:47 内结合。

[0107] 在一些实施方式中,本文描述的 RSP03- 结合剂(例如抗体)的抗原结合位点能够结合(或结合)RSP03 以及一种、两种或三种其他 RSP0。例如,在一些实施方式中,RSP03- 结合剂的抗原结合位点能够特异性结合 RSP03 以及至少一种选自 RSP01、RSP02 和 RSP04 组成的组中的其他 RSP0。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂特异性结合 RSP03 和 RSP01。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂特异性结合 RSP03 和 RSP02。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂特异性结合 RSP03 和 RSP04。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂特异性结合 RSP03、RSP01 和 RSP02。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂特异性结合 RSP03、RSP01 和 RSP04。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂特异性结合 RSP03、RSP02 和 RSP04。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂特异性结合人 RSP03。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂(例如抗体)特异性结合人 RSP03 和小鼠 RSP03。

[0108] 在一些实施方式中,所述试剂(结合剂)是在人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述试剂(结合剂)是在人 RSP03 的 22 ~ 207 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述抗原结合剂是在人 RSP03 的 35 ~ 135 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述抗原结合剂是在人 RSP03 的 35 ~ 86 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述抗原-结合剂是在人 RSP03 的 92 ~ 135 位氨基酸内特异性结合的抗体。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂在 SEQ ID NO:48 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂或抗体结合 RSP03 的弗林蛋白酶样富半胱氨酸结构域。在一些实施方式中,所述试剂或抗体结合在 RSP03 的弗林蛋白酶样富半胱氨酸结构域内的至少一个氨基酸。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂或抗体在序列 SEQ ID NO:49 或 SEQ ID NO:50 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂或抗体在序列 SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:50 内结合。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂结合 RSP03 的血小板反应蛋白结构域。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂或抗体结合 RSP03 的血小板反应蛋白结构域内的至少一个氨基酸。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂或抗体在 SEQ ID NO:51 内结合。

[0109] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂或抗体以约 1 μ M 以下、约 100nM 以下、约 40nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下的解离常数 (K_D) 结合至少一种 RSP0 蛋白。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂或抗体以约 1 μ M 以下、约 100nM 以下、约 40nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下的解离常数 (K_D) 结合 RSP01。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂或抗体以约 1nM 以下的解离常数 (K_D) 结合 RSP01。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂或抗体以约 0.1nM 以下的解离常数 (K_D) 结合 RSP01。在一些实施方式中,本文描述的 RSP01- 结合剂或抗体结合至少一种其他 RSP0。在一些实施方式中,本文描述的结合至少一种其他 RSP0 的 RSP01- 结合剂或抗体与至少一种

其他 RSP0 结合的 K_D 为约 100nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下。例如, 在一些实施方式中, RSP01- 结合剂或抗体还以约 10nM 以下的 K_D 结合 RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂 (例如抗体) 以约 0.1nM 以下的 K_D 结合人 RSP01。在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂以约 10nM 以下的 K_D 结合人 RSP0 和小鼠 RSP0。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂以约 1nM 以下的 K_D 结合人 RSP01 和小鼠 RSP01。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂以约 0.1nM 以下的 K_D 结合人 RSP01 和小鼠 RSP01。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂或抗体以约 1 μ M 以下、约 100nM 以下、约 40nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下的解离常数 (K_D) 结合 RSP02。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂或抗体以约 10nM 以下的解离常数 (K_D) 结合 RSP02。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂或抗体以约 1nM 以下的解离常数 (K_D) 结合 RSP02。在一些实施方式中, 本文描述的 RSP02- 结合剂或抗体结合至少一种其他 RSP0。在一些实施方式中, 本文描述的结合至少一种其他 RSP0 的 RSP02- 结合剂或抗体与至少一种其他 RSP0 结合的 K_D 为约 100nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下。例如, 在一些实施方式中, RSP02- 结合剂或抗体还以约 10nM 以下的 K_D 结合 RSP01、RSP03 和 / 或 RSP04。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂 (例如抗体) 以约 1nM 以下的 K_D 结合人 RSP02。在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂以约 10nM 以下的 K_D 结合人 RSP0 和小鼠 RSP0。在一些实施方式中, 所述 RSP02- 结合剂以约 1nM 以下的 K_D 结合人 RSP01 和小鼠 RSP01。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂以约 0.1nM 以下的 K_D 结合人 RSP02 和小鼠 RSP02。在一些实施方式中, 所述结合剂 (例如抗体) 与 RSP0 蛋白的解离常数是使用固定在 Biacore 芯片上的包含至少一部分所述 RSP0 蛋白的 RSP0 融合蛋白确定的解离常数。

[0110] 在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂 (例如抗体) 以约 1 μ M 以下、约 100nM 以下、约 40nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下的半最大效应浓度 (EC_{50}) 结合至少一种人 RSP0 蛋白。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂 (例如抗体) 以约 1 μ M 以下、约 100nM 以下、约 40nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下的半最大效应浓度 (EC_{50}) 结合人 RSP01。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂 (例如抗体) 还以约 40nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下的 EC_{50} 结合人 RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂 (例如抗体) 以约 1 μ M 以下、约 100nM 以下、约 40nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下的半最大效应浓度 (EC_{50}) 结合人 RSP02。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂 (例如抗体) 还以约 40nM 以下、约 20nM 以下、约 10nM 以下、约 1nM 以下或约 0.1nM 以下的 EC_{50} 结合人 RSP01、RSP03 和 / 或 RSP04。

[0111] 在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂是抗体。在一些实施方式中, 所述抗体是重组抗体。在一些实施方式中, 所述抗体是单克隆抗体。在一些实施方式中, 所述抗体是嵌合抗体。在一些实施方式中, 所述抗体是人源化抗体。在一些实施方式中, 所述抗体是人抗体。在一些实施方式中, 所述抗体是 IgG1 抗体。在一些实施方式中, 所述抗体是 IgG2 抗体。在一些实施方式中, 所述抗体是包含抗原结合位点的抗体片段。在一些实施方式中, 所述抗体是单价抗体、单特异性抗体、双价抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。在一些实施方式中, 所述抗体缀合至细胞毒素部分。在一些实施方式中, 所述抗体是分离的。在一些实施方式中, 所述抗体是基本上纯的。

[0112] 本发明的 RSP0- 结合剂（例如抗体）可以通过本领域已知的任何方法进行特异性结合检验。可以使用的免疫检验包括但不限于使用诸如以下技术的竞争性和非竞争性检验系统：Biacore 分析、FACS 分析、免疫荧光、免疫细胞化学、蛋白质印迹、放射性免疫检验、ELISA、“夹心”免疫检验、免疫沉淀检验、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散检验、凝集检验、补体固定检验、免疫放射检验、荧光免疫检验和蛋白 A 免疫检验。此类检验是常规的，并且是本领域公知的（例如参见，Ausubel 等编，1994-present, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., New York, NY）。

[0113] 例如，抗体与人 RSP01 的特异性结合可以使用 ELISA 确定。ELISA 检验包括：制备抗原，用抗原包被 96 孔微量滴定板的孔，向所述孔添加缀合至诸如酶促底物（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）等可检测化合物的所述 RSP01- 结合抗体或其他 RSP01- 结合剂，温育一段时间，和检测与所述抗原结合的抗体的存在。在一些实施方式中，所述 RSP01- 结合抗体或试剂不缀合至可检测化合物，而是向所述孔添加识别所述 RSP01- 结合抗体或试剂的第二缀合抗体。在一些实施方式中，作为用所述抗原包被所述孔的替代方案，将所述 RSP0- 结合抗体或试剂包被孔，将所述抗原添加至经包被孔，之后可以添加缀合至可检测化合物的第二抗体。本领域技术人员能够知晓对于参数可以对其进行修改以增加所检测信号以及本领域已知的 ELISA 的其他变化。

[0114] 在一个实例中，抗体与人 RSP01 的特异性结合可以使用 FACS 确定。FACS 筛选检验可以包括：产生表达作为融合蛋白（例如，RSP01-Fc 或 RSP01-CD4TM）的抗原的 cDNA 构建体，将所述构建体转染至细胞中，在所述细胞的表面上表达所述抗原，将所述 RSP01- 结合抗体或其他 RSP01- 结合剂与所转染的细胞混合，和温育一段时间。被 RSP01- 结合抗体或其他 RSP01- 结合剂结合的细胞可以通过使用缀合有可检测化合物的第二抗体（例如，缀合有 PE- 的抗 -Fc 抗体）和流式细胞仪来鉴定。本领域技术人员能够知晓对于参数可以对其进行修改以增加所检测信号以及可以增强筛选的 FACS 的其他变化（例如，就阻断抗体进行筛选）。

[0115] 抗体或其他结合剂与抗原（例如 RSP0 蛋白）的结合亲和性和抗体-抗原相互作用的解离速率 (off-rate) 可以通过竞争性结合检验来确定。竞争性结合检验的一个实例是放射性免疫检验，其包括使经标记抗原（例如 ³H 或 ¹²⁵I）或其片段或变体与目的抗体在递增量的未标记抗原的存在下进行温育，然后检测与所述经标记抗原结合的抗体。抗体对抗原（例如 RSP0 蛋白）的亲合性和结合解离速率可以通过 Scatchard 作图分析确定。在一些实施方式中，使用 Biacore 动力学分析来确定结合抗原（例如 RSP0 蛋白）的抗体或试剂的结合和解离速率。Biacore 动力学分析包括从表面上具有经固定抗原（例如 RSP0 蛋白）的芯片上分析抗体的结合和解离。

[0116] 在一些实施方式中，本发明提供特异性结合人 RSP01 的 RSP01- 结合剂（例如，抗体），其中所述 RSP01- 结合剂（例如，抗体）包含抗体 89M5 的 CDR 中的一个、两个、三个、四个、五个和 / 或六个（见表 1）。在一些实施方式中，所述 RSP01- 结合剂包含 89M5 的 CDR 中的一个以上、89M5 的 CDR 中的两个以上、89M5 的 CDR 中的三个以上、89M5 的 CDR 中的四个以上、89M5 的 CDR 中的五个以上或 89M5 的 CDR 中的所有六个。

[0117] 表 1

[0118]

	89M5	130M23
HC CDR1	TGYTMH (SEQ ID NO:12)	SSYAMS (SEQ ID NO:29)
HC CDR2	GINPNNGGTTYNQNFKG (SEQ ID NO:13)	SISSGGSTYYPPDSVKG (SEQ ID NO:30)
HC CDR3	KEFSDGYFFAY (SEQ ID NO:14)	RGGDPGVYNGDYEDAMDY (SEQ ID NO:31)
LC CDR1	KASQDVIFAVA (SEQ ID NO:15)	KASQDVSSAVA (SEQ ID NO:32)
LC CDR2	WASTRHT (SEQ ID NO:16)	WASTRHT (SEQ ID NO:33)
LC CDR3	QQHYSTPW (SEQ ID NO:17)	QQHYSTP (SEQ ID NO:34)

[0119] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP01 的 RSP01- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP01- 结合剂含有包含 TGYTMH(SEQ ID NO:12) 的重链 CDR1、包含 GINPNNGGTTYNQNFKG(SEQ ID NO:13) 的重链 CDR2 和包含 KEFSDGYFFAY(SEQ ID NO:14) 的重链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂还含有包含 KASQDVIFAVA(SEQ ID NO:15) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT(SEQ ID NO:16) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTPW(SEQ ID NO:17) 的轻链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有包含 KASQDVIFAVA(SEQ ID NO:15) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT(SEQ ID NO:16) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTPW(SEQ ID NO:17) 的轻链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有:(a) 包含 TGYTMH(SEQ ID NO:12) 的重链 CDR1、包含 GINPNNGGTTYNQNFKG(SEQ ID NO:13) 的重链 CDR2 和包含 KEFSDGYFFAY(SEQ ID NO:14) 的重链 CDR3; 和 (b) 包含 KASQDVIFAVA(SEQ ID NO:15) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT(SEQ ID NO:16) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTPW(SEQ ID NO:17) 的轻链 CDR3。

[0120] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP01 的 RSP01- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP01- 结合剂含有:(a) 包含 TGYTMH(SEQ ID NO:12) 的重链 CDR1,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 包含 GINPNNGGTTYNQNFKG(SEQ ID NO:13) 的重链 CDR2,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(c) 包含 KEFSDGYFFAY(SEQ ID NO:14) 的重链 CDR3,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(d) 包含 KASQDVIFAVA(SEQ ID NO:15) 的轻链 CDR1,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(e) 包含 WASTRHT(SEQ ID NO:16) 的轻链 CDR2,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;和 (f) 包含 QQHYSTPW(SEQ ID NO:17) 的轻链 CDR3,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体。在一些实施方式中,所述氨基酸取代是保守性氨基酸取代。

[0121] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合 RSP01 的 RSP01- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP01- 结合剂包含与 SEQ ID NO:10 具有至少约 80% 序列同一性的重链可变区和/或与 SEQ ID NO:11 具有至少 80% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂包含与 SEQ ID NO:10 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的重链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂包含与 SEQ ID NO:11 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂包含与 SEQ ID NO:10 具有至少约 95% 序列同一性的重链可变区和/或与 SEQ ID NO:11 具有至少约 95% 序列同一性的轻链可变

区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:10 的重链可变区和 / 或包含 SEQ ID NO:11 的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:10 组成的重链可变区和基本上由 SEQ ID NO:11 组成的轻链可变区。

[0122] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合 RSP01 的 RSP01- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP01- 结合剂包含与 SEQ ID NO:55 具有至少约 80% 序列同一性的重链可变区和 / 或与 SEQ ID NO:59 具有至少 80% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂包含与 SEQ ID NO:55 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的重链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂包含与 SEQ ID NO:59 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂包含与 SEQ ID NO:55 具有至少约 95% 序列同一性的重链可变区和 / 或与 SEQ ID NO:59 具有至少约 95% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:55 的重链可变区和 / 或包含 SEQ ID NO:59 的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:55 组成的重链可变区和基本上由 SEQ ID NO:59 组成的轻链可变区。

[0123] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合 RSP01 的 RSP01- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP01- 结合剂包含:(a) 与 SEQ ID NO:25 具有至少 90% 序列同一性的重链,和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO:26 具有至少 90% 序列同一性的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂包含:(a) 与 SEQ ID NO:25 具有至少 95% 序列同一性的重链;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO:26 具有至少 95% 序列同一性的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:25 的重链和 / 或包含 SEQ ID NO:26 的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:25 组成的重链和基本上由 SEQ ID NO:26 组成的轻链。

[0124] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合 RSP01 的 RSP01- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP01- 结合剂包含:(a) 与 SEQ ID NO:68 具有至少 90% 序列同一性的重链,和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO:69 具有至少 90% 序列同一性的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂包含:(a) 与 SEQ ID NO:68 具有至少 95% 序列同一性的重链;和 / 或 (b) 与 SEQ ID NO:69 具有至少 95% 序列同一性的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:68 的重链和 / 或包含 SEQ ID NO:69 的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:68 组成的重链和基本上由 SEQ ID NO:69 组成的轻链。

[0125] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP02 的 RSP02- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP02- 结合剂(例如,抗体)包括抗体 130M23 的 CDR 中的一个、两个、三个、四个、五个和 / 或六个(见表 1)。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂包含 130M23 的 CDR 中的一个以上、130M23 的 CDR 中的两个以上、130M23 的 CDR 中的三个以上、130M23 的 CDR 中的四个以上、130M23 的 CDR 中的五个以上或 130M23 的 CDR 中的所有六个。

[0126] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP02 的 RSP02- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP02- 结合剂含有包含 SSSYAMS(SEQ ID NO:29) 的重链 CDR1、包含 SSSGGSTYYPDVSKG(SEQ ID NO:30) 的重链 CDR2 和包含 RGGDPGVYNGDYEDAMDY(SEQ ID NO:31) 的重链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂还含有包含 KASQDVSSAVA(SEQ ID

NO:32) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:33) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTP (SEQ ID NO:34) 的轻链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有包含 KASQDVSSAVA (SEQ ID NO:32) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:33) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTP (SEQ ID NO:34) 的轻链 CDR3。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有:(a) 包含 SSYAMS (SEQ ID NO:29) 的重链 CDR1、包含 SISSGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30) 的重链 CDR2 和包含 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (SEQ ID NO:31) 的重链 CDR3 ;和 (b) 包含 KASQDVSSAVA (SEQ ID NO:32) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:33) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTP (SEQ ID NO:34) 的轻链 CDR3。

[0127] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP02 的 RSP02- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP02- 结合剂含有:(a) 包含 SSYAMS (SEQ ID NO:29) 的重链 CDR1,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(b) 包含 SISSGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30) 的重链 CDR2,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(c) 包含 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (SEQ ID NO:31) 的重链 CDR3,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(d) 包含 KASQDVSSAVA (SEQ ID NO:32) 的轻链 CDR1,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;(e) 包含 WASTRHT (SEQ ID NO:33) 的轻链 CDR2,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体;和 (f) 包含 QQHYSTP (SEQ ID NO:34) 的轻链 CDR3,或者包含 1、2、3 或 4 个氨基酸取代的其变体。在一些实施方式中,所述氨基酸取代是保守性氨基酸取代。

[0128] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合 RSP02 的 RSP02- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP02- 结合剂包含与 SEQ ID NO:27 具有至少约 80% 序列同一性的重链可变区和 / 或与 SEQ ID NO:28 具有至少 80% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂包含与 SEQ ID NO:27 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的重链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂包含与 SEQ ID NO:28 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂包含与 SEQ ID NO:27 具有至少约 95% 序列同一性的重链可变区和 / 或与 SEQ ID NO:28 具有至少约 95% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:27 的重链可变区和 / 或包含 SEQ ID NO:28 的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:27 组成的重链可变区和基本上由 SEQ ID NO:28 组成的轻链可变区。

[0129] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合 RSP02 的 RSP02- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP02- 结合剂包含与 SEQ ID NO:63 具有至少约 80% 序列同一性的重链可变区和 / 或与 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 具有至少 80% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂包含与 SEQ ID NO:63 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的重链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂包含与 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂包含与 SEQ ID NO:63 具有至少约 95% 序列同一性的重链可变区和 / 或与 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 具有至少约 95% 序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:63 的重链可变区和 / 或包含 SEQ ID NO:67 的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:63 的重链可变区和 /

或包含 SEQ ID NO:76 的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:63 组成的重链可变区和基本上由 SEQ ID NO:67 组成的轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:63 组成的重链可变区和基本上由 SEQ ID NO:76 组成的轻链可变区。

[0130] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合 RSP02 的 RSP02- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP02- 结合剂包含:(a) 与 SEQ ID NO:41 具有至少 90% 序列同一性的重链,和/或 (b) 与 SEQ ID NO:42 具有至少 90% 序列同一性的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂包含:(a) 与 SEQ ID NO:41 具有至少 95% 序列同一性的重链;和/或 (b) 与 SEQ ID NO:42 具有至少 95% 序列同一性的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:41 的重链和/或包含 SEQ ID NO:42 的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:41 组成的重链和基本上由 SEQ ID NO:42 组成的轻链。

[0131] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合 RSP02 的 RSP02- 结合剂(例如,抗体),其中所述 RSP02- 结合剂包含:(a) 与 SEQ ID NO:70 具有至少 90% 序列同一性的重链,和/或 (b) 与 SEQ ID NO:71 或 SEQ ID NO:74 具有至少 90% 序列同一性的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂包含:(a) 与 SEQ ID NO:70 具有至少 95% 序列同一性的重链;和/或 (b) 与 SEQ ID NO:71 或 SEQ ID NO:74 具有至少 95% 序列同一性的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:70 的重链和/或包含 SEQ ID NO:71 的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有包含 SEQ ID NO:70 的重链和/或包含 SEQ ID NO:74 的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:70 组成的重链和基本上由 SEQ ID NO:71 组成的轻链。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂含有基本上由 SEQ ID NO:70 组成的重链和基本上由 SEQ ID NO:74 组成的轻链。

[0132] 本发明提供多肽,包括但不限于特异性结合人 RSP0 蛋白的抗体。在一些实施方式中,所述多肽结合人 RSP01。在一些实施方式中,所述多肽结合人 RSP02。在一些实施方式中,所述多肽结合人 RSP03。

[0133] 在一些实施方式中,所述多肽包含抗体 89M5 的 CDR 中的一个、两个、三个、四个、五个和/或六个(参见本文表 1)。在一些实施方式中,所述多肽包含抗体 130M23 的 CDR 中的一个、两个、三个、四个、五个和/或六个(参见本文表 1)。在一些实施方式中,所述多肽包含的 CDR 在每个 CDR 中具有至多四个(即,0、1、2、3 或 4)个氨基酸取代。在一些实施方式中,所述重链 CDR 包含在重链可变区内。在一些实施方式中,所述轻链 CDR 包含在轻链可变区内。

[0134] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP01 的多肽,其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:55 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列和/或与 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:59 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:55 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:59 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:55 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列和/或与 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:59 具有至少

约 95% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列。

[0135] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP02 的多肽,其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:63 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:63 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:63 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:63 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:67 的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:63 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:76 的氨基酸序列。

[0136] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP01 的多肽,其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:25 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:26 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:25 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:26 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:25 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:26 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽基本上由 SEQ ID NO:25 和 / 或 SEQ ID NO:26 组成。

[0137] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP01 的多肽,其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:68 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:69 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:68 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:69 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:68 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:69 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:68 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:69 的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽基本上由 SEQ ID NO:68 和 / 或 SEQ ID NO:69 组成。

[0138] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP02 的多肽,其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:41 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:42 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:41 具有

至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:42 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:41 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:42 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽基本上由 SEQ ID NO:41 和 / 或 SEQ ID NO:42 组成。

[0139] 在一些实施方式中,本发明提供特异性结合人 RSP02 的多肽,其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:70 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:71 或 SEQ ID NO:74 具有至少约 80% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:70 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:71 或 SEQ ID NO:74 具有至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97% 或至少约 99% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽包含与 SEQ ID NO:70 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列和 / 或与 SEQ ID NO:71 或 SEQ ID NO:74 具有至少约 95% 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:70 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:71 的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽含有包含 SEQ ID NO:70 的氨基酸序列和 / 或包含 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述多肽基本上由 SEQ ID NO:70 和 / 或 SEQ ID NO:71 组成。在一些实施方式中,所述多肽基本上由 SEQ ID NO:70 和 / 或 SEQ ID NO:74 组成。

[0140] 在一些实施方式中,RSP01- 结合剂含有包含选自以下序列组成的组中的序列的多肽:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:68 和 SEQ ID NO:69。在一些实施方式中,RSP02- 结合剂含有包含选自以下序列组成的组中的序列的多肽:SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:76。

[0141] 在一些实施方式中,RSP01- 结合剂包含 89M5 抗体的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂包含 89M5 抗体(带有或不带有前导序列)的重链和轻链。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂是 89M5 抗体。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂包含处于 89M5 抗体的人源化形式的 89M5 抗体的重链可变区和 / 或轻链可变区。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂包含 h89M5-H2L2 抗体的重链可变区和 / 或轻链可变区。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂包含处于 89M5 抗体的人源化形式的 89M5 抗体(带有或不带有前导序列)的重链和轻链。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂包含 h89M5-H2L2 抗体(带有或不带有前导序列)的重链和轻链。在一些实施方式中,89M5 的人源化版本是 IgG1 抗体。在一些实施方式中,89M5 的人源化版本是 IgG2 抗体。将产生 89M5 抗体的杂交瘤细胞系于 2011 年 6 月 30 日在布达佩斯条约的条件下保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)(10801 University Boulevard, Manassas, VA, 美国)并给予 ATCC 指定保藏号 PTA-11970。

[0142] 在一些实施方式中,RSP01- 结合剂包含抗体 89M5、基本上由抗体 89M5 组成或由

抗体 89M5 组成。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂包含抗体 h89M5-H2L2、基本上由抗体 h89M5-H2L2 组成或由抗体 h89M5-H2L2 组成。

[0143] 在一些实施方式中, RSP02- 结合剂包含 130M23 抗体的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂包含 130M23 抗体(带有或不带有前导序列)的重链和轻链。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂是 130M23 抗体。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂包含处于 130M23 抗体的人源化形式的 130M23 抗体的重链可变区和 / 或轻链可变区。在一些实施方式中, 所述 RSP02- 结合剂包含 h130M23-H1L2 抗体的重链可变区和 / 或轻链可变区。在一些实施方式中, 所述 RSP02- 结合剂包含 h130M23-H1L6 抗体的重链可变区和 / 或轻链可变区。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂包含处于 130M23 抗体的人源化形式的 130M23 抗体(带有或不带有前导序列)的重链和轻链。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂包含 h130M23-H1L2 抗体(带有或不带有前导序列)的重链和轻链。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂包含 h130M23-H1L6 抗体(带有或不带有前导序列)的重链和轻链。在一些实施方式中, 130M23 的人源化版本是 IgG1 抗体。在一些实施方式中, 130M23 的人源化版本是 IgG2 抗体。将产生 130M23 抗体的杂交瘤细胞系于 2011 年 8 月 10 日在布达佩斯条约的条件下保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)(10801 University Boulevard, Manassas, VA, 美国)并给予 ATCC 指定保藏号 PTA-12021。

[0144] 在一些实施方式中, RSP02- 结合剂包含抗体 130M23、基本上由抗体 130M23 组成或由抗体 130M23 组成。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂包含抗体 h130M23-H1L2、基本上由抗体 h130M23-H1L2 组成或由抗体 h130M23-H1L2 组成。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂包含抗体 h130M23-H1L6、基本上由抗体 h130M23-H1L6 组成或由抗体 h130M23-H1L6 组成。

[0145] 包括抗体在内的许多蛋白质含有指导蛋白质运输至各种位置的信号序列。信号序列(也称为信号肽或前导序列)位于初生多肽的 N 末端。他们将多肽靶向内质网, 并且通过分泌将蛋白质分发至其目的地, 例如到细胞器的内部空间、到内部膜、到细胞外膜或到细胞内部。在蛋白质运输到内质网后, 信号肽酶将大多数信号序列从所述蛋白质切割下。从所述多肽切割下信号序列通常在氨基酸序列中的特定位置发生, 并且依赖于信号序列内的氨基酸残基。虽然通常存在一个特异性切割位点, 信号肽酶可以识别和 / 或可以使用超过一个切割位点, 产生所述多肽的非同源 N 末端。例如, 信号序列内的不同切割位点的使用可以产生表达有不同 N 末端氨基酸的多肽。因此, 在一些实施方式中, 本文描述的多肽可以包含具有不同 N 末端的多肽的混合物。在一些实施方式中, N 末端的差异在于 1、2、3、4 或 5 个长度的氨基酸。在一些实施方式中, 所述多肽基本上是同源的, 即多肽具有相同的 N 末端。在一些实施方式中, 与“天然”或“亲本”信号序列相比, 所述多肽的信号序列包含一个以上(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个等)氨基酸取代和 / 或缺失。在一些实施方式中, 所述多肽的信号序列包含使一个切割位点占优势的氨基酸取代和 / 或缺失, 由此产生具有一种 N 末端的基本上同源的多肽。在一些实施方式中, 所述多肽的信号序列被不同的信号序列替换。在一些实施方式中, 所述多肽的信号序列影响所述多肽的表达水平。在一些实施方式中, 所述多肽的信号序列增加所述多肽的表达水平。在一些实施方式中, 所述多肽的信号序列降低所述多肽的表达水平。

[0146] 在一些实施方式中, RSP01- 结合剂(例如, 抗体)与含有包含 SEQ ID NO:10 的重链可变区和包含 SEQ ID NO:11 的轻链可变区的抗体竞争与 RSP01 的特异性结合。在一些实

施方式中, RSP01- 结合剂(例如, 抗体)与含有包含 SEQ ID NO:55 的重链可变区和包含 SEQ ID NO:59 的轻链可变区的抗体竞争与 RSP01 的特异性结合。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂(例如, 抗体)与含有包含 SEQ ID NO:25 的重链和包含 SEQ ID NO:26 的轻链的抗体竞争与 RSP01 的特异性结合。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂(例如, 抗体)与含有包含 SEQ ID NO:68 的重链和包含 SEQ ID NO:69 的轻链的抗体竞争与 RSP01 的特异性结合。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂与抗体 89M5 或 h89M5-H2L2 竞争与人 RSP01 的特异性结合。在一些实施方式中, 在体外竞争性结合检验中, RSP01- 结合剂或抗体竞争与 RSP01 的特异性结合。在一些实施方式中, 所述 RSP01 是人 RSP01。在一些实施方式中, 所述 RSP01 是小鼠 RSP01。

[0147] 在一些实施方式中, RSP01- 结合剂(例如, 抗体)与本发明的抗体结合的 RSP01 上的表位相同, 或结合的 RSP01 上的表位基本上相同。在另一实施方式中, RSP01- 结合剂是这样的抗体: 其结合的 RSP01 上的表位与本发明的抗体结合的 RSP01 上的表位重叠。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂(例如, 抗体)与抗体 89M5 或 h89M5-H2L2 结合 RSP01 上的表位相同, 或结合 RSP01 上的表位基本上相同。在另一实施方式中, RSP01- 结合剂是这样的抗体: 其所结合的 RSP01 上的表位与本发明的 89M5 或 h89M5-H2L2 结合的 RSP01 上的表位重叠。

[0148] 在一些实施方式中, 所述 RSP01- 结合剂是与 ATCC 指定保藏号为 PTA-11970 的杂交瘤产生的抗体(例如, 在竞争性结合检验中)竞争与 RSP01 的特异性结合的试剂。

[0149] 在一些实施方式中, RSP02- 结合剂(例如, 抗体)与含有包含 SEQ ID NO:27 的重链可变区和包含 SEQ ID NO:28 的轻链可变区的抗体竞争与 RSP02 的特异性结合。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂(例如, 抗体)与含有包含 SEQ ID NO:63 的重链可变区和包含 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:76 的轻链可变区的抗体竞争与 RSP02 的特异性结合。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂(例如, 抗体)与含有包含 SEQ ID NO:41 的重链和包含 SEQ ID NO:42 的轻链的抗体竞争与 RSP02 的特异性结合。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂(例如, 抗体)与含有包含 SEQ ID NO:70 的重链和包含 SEQ ID NO:71 或 SEQ ID NO:74 的轻链的抗体竞争与 RSP02 的特异性结合。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂与抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6 竞争与人 RSP02 的特异性结合。在一些实施方式中, 在体外竞争性结合检验中, RSP02- 结合剂或抗体竞争与 RSP02 的特异性结合。在一些实施方式中, 所述 RSP02 是人 RSP02。在一些实施方式中, 所述 RSP02 是小鼠 RSP02。

[0150] 在一些实施方式中, RSP02- 结合剂(例如, 抗体)与本发明的抗体结合的 RSP02 上的表位相同, 或结合的 RSP02 上的表位基本上相同。在另一实施方式中, RSP02- 结合剂是这样的抗体: 其所结合的 RSP02 上的表位与本发明的抗体结合的 RSP02 上的表位重叠。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂(例如, 抗体)与抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6 结合的 RSP02 上的表位相同, 或结合 RSP02 上的表位基本上相同。在另一实施方式中, RSP01- 结合剂是这样的抗体: 其所结合的 RSP02 上的表位与本发明的 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6 结合的 RSP02 上的表位重叠。

[0151] 在一些实施方式中, 所述 RSP02- 结合剂是与 ATCC 指定保藏号为 PTA-12021 的杂交瘤产生的抗体(例如, 在竞争性结合检验中)竞争与 RSP02 的特异性结合的试剂。

[0152] 在一些实施方式中, 本文描述的 RSP0- 结合剂(例如, 抗体)结合至少一种人 RSP0

蛋白和调节 RSP0 活性。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP0 拮抗剂,并降低 RSP0 活性。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP0 拮抗剂,并降低 β - 连环素活性。

[0153] 在一些实施方式中,本文描述的 RSP01- 结合剂(例如,抗体)结合人 RSP01,并调节 RSP01 活性。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂是 RSP01 拮抗剂,并降低 RSP01 活性。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂是 RSP01 拮抗剂,并降低 β - 连环素活性。

[0154] 在一些实施方式中,本文描述的 RSP02- 结合剂(例如,抗体)结合人 RSP02,并调节 RSP02 活性。在一些实施方式中,RSP02- 结合剂是 RSP02 拮抗剂,并降低 RSP02 活性。在一些实施方式中,RSP02- 结合剂是 RSP02 拮抗剂,并降低 β - 连环素活性。

[0155] 在一些实施方式中,本文描述的 RSP03- 结合剂(例如,抗体)结合人 RSP03,并调节 RSP03 活性。在一些实施方式中,RSP03- 结合剂是 RSP03 拮抗剂,并降低 RSP03 活性。在一些实施方式中,RSP03- 结合剂是 RSP03 拮抗剂,并降低 β - 连环素活性。

[0156] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂(例如,抗体)是至少一种人 RSP0 蛋白的拮抗剂。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是至少一种 RSP0 的拮抗剂,并且抑制 RSP0 活性。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制 RSP0 活性的至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或约 100%。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制一种、两种、三种或四种 RSP0 蛋白的活性。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制人 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 的活性。在一些实施方式中,抑制人 RSP01 活性的 RSP01- 结合剂是抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,抑制人 RSP02 活性的 RSP02- 结合剂是抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0157] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂(例如,抗体)是至少一种人 RSP0 蛋白的拮抗剂。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制 RSP0 信号传导的至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或约 100%。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制一种、两种、三种或四种 RSP0 蛋白的信号传导。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制人 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 的信号传导。在一些实施方式中,抑制 RSP01 信号传导的 RSP01- 结合剂是抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,抑制 RSP02 信号传导的 RSP02- 结合剂是抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0158] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂(例如,抗体)是 β - 连环素信号传导的拮抗剂。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制 β - 连环素信号传导的至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或约 100%。在一些实施方式中,抑制 β - 连环素信号传导的 RSP01- 结合剂是抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,抑制 β - 连环素信号传导的 RSP02- 结合剂是抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0159] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂(例如,抗体)抑制至少一种 RSP0 蛋白与受体的结合。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制人 RSP0 蛋白与一种或多种其受体的结合。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制 RSP0 蛋白与至少一种 LGR 蛋白的结合。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制 RSP0 蛋白与 LGR4、LGR5 和 / 或 LGR6 的结合。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂抑制 RSP01 与 LGR4 的结合。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂抑制 RSP01 与 LGR5 的结合。在一些实施方式中,RSP01- 结合剂抑制 RSP01 与 LGR6 的结合。在一些实施方式中,RSP02- 结合剂抑制 RSP02 与 LGR4 的结合。在一些实施方式中,RSP02- 结合剂抑制 RSP02 与 LGR5 的结合。在一些实施方式中,RSP02- 结合剂抑

制 RSP02 与 LGR6 的结合。在一些实施方式中, RSP0- 结合剂与至少一种 LGR 蛋白的结合被抑制至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或至少约 95%。在一些实施方式中, 抑制至少一种 RSP0 与至少一种 LGR 蛋白的结合的 RSP0- 结合剂还抑制 β - 连环素信号传导。在一些实施方式中, 抑制人 RSP01 与至少一种 LGR 蛋白的结合的 RSP01- 结合剂是抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中, 抑制人 RSP02 与至少一种 LGR 蛋白的结合的 RSP02- 结合剂是抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0160] 在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂 (例如, 抗体) 阻断至少一种 RSP0 与受体的结合。在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂阻断人 RSP0 蛋白与一种或多种其受体的结合。在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂阻断 RSP0 与至少一种 LGR 蛋白的结合。在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂阻断至少一种 RSP0 蛋白与 LGR4、LGR5 和 / 或 LGR6 的结合。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂阻断 RSP01 与 LGR4 的结合。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂阻断 RSP01 与 LGR5 的结合。在一些实施方式中, RSP01- 结合剂阻断 RSP01 与 LGR6 的结合。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂阻断 RSP02 与 LGR4 的结合。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂阻断 RSP02 与 LGR5 的结合。在一些实施方式中, RSP02- 结合剂阻断 RSP02 与 LGR6 的结合。在一些实施方式中, RSP0- 结合剂与至少一种 LGR 蛋白的结合被阻断至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或至少约 95%。在一些实施方式中, 阻断至少一种 RSP0 蛋白与至少一种 LGR 蛋白的结合的 RSP0- 结合剂还抑制 β - 连环素信号传导。在一些实施方式中, 阻断人 RSP01 与至少一种 LGR 蛋白的结合的 RSP01- 结合剂是抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中, 阻断人 RSP02 与至少一种 LGR 蛋白的结合的 RSP02- 结合剂是抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0161] 在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂 (例如, 抗体) 抑制 β - 连环素信号传导。应该理解的是, 抑制 β - 连环素信号传导的 RSP0- 结合剂可以在一些实施方式中抑制 β - 连环素信号传导途径中的一种或多种受体导致的信号传导, 但并非必须抑制所有受体导致的信号传导。在一些替代实施方式中, 可以抑制所有人受体导致的 β - 连环素信号传导。在一些实施方式中, 抑制了选自由 LGR4、LGR5 和 LGR6 组成的组中的一种或多种受体导致的 β - 连环素信号传导。在一些实施方式中, RSP0- 结合剂对 β - 连环素信号传导的抑制使 β - 连环素信号传导的水平减少至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或至少约 95%。在一些实施方式中, 抑制 β - 连环素信号传导的 RSP01- 结合剂是抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中, 抑制 β - 连环素信号传导的 RSP02- 结合剂是抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0162] 在一些实施方式中, 所述 RSP0- 结合剂 (例如, 抗体) 抑制 β - 连环素的激活。应该理解的是, 抑制 β - 连环素的激活的 RSP0- 结合剂可以在一些实施方式中抑制一种或多种受体导致的 β - 连环素的激活, 但并非必须抑制所有受体导致的 β - 连环素的激活。在一些替代实施方式中, 可以抑制所有人受体导致的 β - 连环素的激活。在一些实施方式中, 抑制了选自由 LGR4、LGR5 和 LGR6 组成的组中的一种或多种受体导致的 β - 连环素的激活。在一些实施方式中, RSP0- 结合剂对 β - 连环素的激活的抑制使 β - 连环素的激活的水平减少至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75%、至少约 90% 或至少约 95%。在一些实施方式中, 抑制 β - 连环素的激活的 RSP01- 结合剂是抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中, 抑制 β - 连环素的激活的 RSP02- 结合剂是抗体 130M23、h130M23-H1L2 或

h130M23-H1L6。

[0163] 用于确定 RSP0- 结合剂（或候选 RSP0- 结合剂）是否抑制 β -连环素信号传导的体内和体外检验是本领域已知的。例如，可以使用基于细胞的荧光素酶报告基因检验来在体外测定 β -连环素信号传导水平，所述荧光素酶报告基因检验利用含有多个拷贝的位于果蝇荧光素酶报告基因的 TCF 结合结构域（Gazit 等，1999, *Oncogene*, 18:5959-66; TOPflash, Millipore, Billerica MA）。在具有或不具有 RSP0 蛋白或 RSP0 条件培养基的一种或多种 Wnt（例如，由转染细胞表达的 Wnt 或由 Wnt 条件培养基提供的 Wnt）的存在下，将在 RSP0- 结合剂的存在下的 β -连环素信号传导的水平与不存在 RSP0- 结合剂下的信号传导水平进行比较。除了 TCF/Lu 报告基因检验之外，RSP0- 结合剂（或候选剂）对 β -连环素信号传导的作用可以通过测定所述试剂对 β -连环素-调节基因（例如 c-myc（He 等，1998, *Science*, 281:1509-12）、周期蛋白 D1（Tetsu 等，1999, *Nature*, 398:422-6）和 / 或 纤连蛋白（Gradl 等，1999, *Mol. Cell Biol.*, 19:5576-87））的作用而在体外或在体内测定。在一些实施方式中，RSP0- 结合剂对 β -连环素信号传导的作用还可以通过测定所述试剂对 Dishevelled-1、Dishevelled-2、Dishevelled-3、LRP5、LRP6 和 / 或 β -连环素的磷酸化状态的影响而测定。

[0164] 在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂具有以下效应中的一种或多种：抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤生长、减少肿瘤的致瘤性、通过减少癌干细胞在肿瘤中的频率而减少肿瘤的致瘤性、抑制肿瘤生长、触发肿瘤细胞的细胞死亡、诱导肿瘤中的细胞进行分化、使致瘤性细胞分化成非致瘤性状态、诱导肿瘤细胞中的分化标记物的表达、防止肿瘤细胞的转移或降低肿瘤细胞的存活。

[0165] 在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂能够抑制肿瘤生长。在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂能够抑制体内肿瘤生长（例如，在异种移植物小鼠模型中和 / 或在具有癌的人中）。

[0166] 在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂能够减少肿瘤的致瘤性。在一些实施方式中，所述 RSP0- 结合剂或抗体能够在诸如小鼠异种移植物模型等动物模型中减少包含癌干细胞的肿瘤的致瘤性。在一些实施方式中，肿瘤中癌干细胞的数量或频率降低了至少约两倍、约三倍、约五倍、约十倍、约 50 倍、约 100 倍或约 1000 倍。在一些实施方式中，癌干细胞的数量或频率的减少通过使用动物模型的有限稀释检验来确定。关于使用有限稀释检验来确定肿瘤中的癌干细胞数量或频率的减少的另外实验和指南可见例如在国际公开号 W02008/042236、美国专利公开号 2008/0064049 和美国专利公开号 2008/0178305。

[0167] 在一些实施方式中，本文描述的 RSP0- 结合剂在小鼠、食蟹猴或人中所具有的循环半衰期为至少约 5 小时、至少约 10 小时、至少约 24 小时、至少约 3 天、至少约 1 周或至少约 2 周。在一些实施方式中，RSP0- 结合剂是 IgG（例如，IgG1 或 IgG2）抗体，其在小鼠、食蟹猴或人中所具有的循环半衰期为至少约 5 小时、至少约 10 小时、至少约 24 小时、至少约 3 天、至少约 1 周或至少约 2 周。增加（或减少）诸如多肽和抗体等试剂的半衰期的方法是本领域已知的。例如，增加 IgG 抗体的循环半衰期的已知方法包括在 Fc 区引入突变，所述突变增加在 pH6.0 的所述抗体与初生 Fc 受体（FcRn）的 pH 依赖性结合（参见例如，美国专利公开号 2005/0276799、2007/0148164 和 2007/0122403）。增加缺乏所述 Fc 区的抗体片段的循环半衰期的已知方法包括诸如 PEG 化等技术。

[0168] 在一些实施方式中,所述 RSPO- 结合剂是多克隆抗体。可以通过任何已知方法制备多克隆抗体。在一些实施方式中,通过对动物(例如,兔、大鼠、小鼠、山羊、驴)多次皮下或腹膜内注射相关抗原(例如纯化的肽片段、全长重组蛋白或融合蛋白)而使其免疫来产生多克隆抗体。所述抗原可以可选地缀合至载体,例如钥孔虫戚血兰素(KLH)或血清白蛋白。将所述抗原(使用或不使用载体蛋白)稀释在无菌盐水中并通常与佐剂(例如,完全或不完全弗氏佐剂)组合以形成稳定的乳液。一段足够时间后,从经免疫动物的血液和腹水回收多克隆抗体。多克隆抗体可以根据本领域的标准方法(包括但不限于亲和色谱、离子交换色谱、凝胶电泳和透析)从血清或腹水纯化。

[0169] 在一些实施方式中,所述 RSPO- 结合剂是单克隆抗体。可以使用本领域技术人员已知的杂交瘤方法制备单克隆抗体(参见例如, Kohler 和 Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497)。在一些实施方式中,使用杂交瘤方法,如上所述对小鼠、仓鼠或其他合适的宿主动物进行免疫,以引发淋巴细胞产生会特异性结合免疫抗原的抗体。在一些实施方式中,可以在体外对淋巴细胞进行免疫。在一些实施方式中,免疫抗原可以是人蛋白或其一部分。在一些实施方式中,免疫抗原可以是小鼠蛋白或其一部分。

[0170] 免疫后,将淋巴细胞分离并使用例如聚乙二醇与合适的骨髓瘤细胞系融合,从而形成杂交瘤细胞,所述杂交瘤细胞然后可以从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞中选出。产生特异性针对所选择抗原的单克隆抗体的杂交瘤可以通过各种方法鉴定,所述方法包括但不限于免疫沉淀、免疫印迹和体外结合检验(例如,流式细胞仪、FACS、ELISA 和放射性免疫检验)。杂交瘤可以使用标准方法在体外培养物中繁殖(J. W. Goding, 1996, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第3版, Academic Press, San Diego, CA) 或作为作为动物中的腹水肿瘤在体内繁殖。单克隆抗体可以根据本领域的标准方法从培养基或腹水纯化,所述标准方法包括但不限于亲和色谱、离子交换色谱、凝胶电泳和透析。

[0171] 在一些实施方式中,单克隆抗体可以使用对本领域技术人员而言已知的重组 DNA 技术制备(参见例如,美国专利号 4,816,567)。例如通过使用特异性扩增编码所述抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸引物,从成熟的 B 细胞或杂交瘤细胞分离编码单克隆抗体的多核苷酸。然后将编码重链和轻链的分离多核苷酸克隆至合适的表达载体中,所述表达载体在转染至诸如不另外产生免疫球蛋白的大肠杆菌、类人猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞等宿主细胞时产生单克隆抗体。在其他实施方式中,重组单克隆抗体或其片段可以从表达所需要物种的 CDR 的噬菌体展示文库中分离(参见例如, McCafferty 等, 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson 等, 1991, *Nature*, 352:624-628; 和 Marks 等, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597)。

[0172] 编码单克隆抗体的多核苷酸可以进而使用重组 DNA 技术以许多不同方式进行修饰,从而产生替代性抗体。在一些实施方式中,例如小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域可以被例如人抗体的相应区域取代从而产生嵌合抗体,或被非免疫球蛋白多肽取代从而产生融合抗体。在一些实施方式中,将恒定区截短或除去从而产生单克隆抗体的所需抗体片段。可以使用可变区的定点或高密度诱变来优化单克隆抗体的特异性、亲和性等。

[0173] 在一些实施方式中,针对人 RSPO 蛋白的单克隆抗体是人源化抗体。通常而言,人源化抗体是其中使用对本领域技术人员而言已知的方法使来自 CDR 的残基被具有所需特异性、亲和性和/或结合能力的非人物种(例如小鼠、兔、大鼠、仓鼠等)的 CDR 的残基替换

的人免疫球蛋白。在一些实施方式中,人免疫球蛋白的 Fv 框架区残基被来自具有所需特异性、亲和性和 / 或结合能力的非人物种的抗体中的相应残基替换。在一些实施方式中,人源化抗体可以通过 Fv 框架区中和 / 或所替换的非人残基中的另外残基的取代而被进一步修饰,从而改善和优化抗体特异性、亲和性和 / 或能力。通常,人源化抗体会包含至少一个、通常 2 个或 3 个含有所有或基本上所有对应于非人免疫球蛋白的 CDR 的可变结构域区域,而所有或基本上所有的框架区是人免疫球蛋白共有序列的框架区。在一些实施方式中,人源化抗体还可以包括免疫球蛋白恒定区或结构域 (Fc) 的至少一部分,通常是人免疫球蛋白恒定区或结构域 (Fc) 的至少一部分。在一些实施方式中,治疗上使用此类人源化抗体,因为他们在施用至人受试对象时可以减少抗原性和 HAMA (人抗小鼠抗体) 响应。本领域技术人员能够按照已知技术获得具有减少的免疫原性的功能性人源化抗体 (参见例如,美国专利号 5, 225, 539、5, 585, 089、5, 693, 761 和 5, 693, 762)

[0174] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是人抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术直接制备。在一些实施方式中,可以产生体外固定或分离自产生针对靶抗原的抗体的免疫个体的永生生化人 B 淋巴细胞 (参见例如, Cole 等, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第 77 页; Boemer 等, 1991, *J. Immunol.*, 147:86-95; 和美国专利第 5, 750, 373、5, 567, 610 和 5, 229, 275 号)。在一些实施方式中,所述人抗体可以从噬菌体文库中选择,其中该噬菌体文库表达人抗体 (Vaughan 等, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets 等, 1998, *PNAS*, 95:6157-6162; Hoogenboom 和 Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks 等, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581)。作为选择,可以使用噬菌体展示技术来从来自未经免疫的供体的免疫球蛋白可变结构域库中在体外生产人抗体和抗体片段。用于产生和利用抗体噬菌体文库的技术还描述于美国专利第 5, 969, 108、6, 172, 197、5, 885, 793、6, 521, 404、6, 544, 731、6, 555, 313、6, 582, 915、6, 593, 081、6, 300, 064、6, 653, 068、6, 706, 484 和 7, 264, 963 号以及 Rothe 等, 2008, *J. Mol. Bio.*, 376:1182-1200 中。包括但不限于链重排 (Marks 等, 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783) 和定点诱变在内的亲和性成熟策略是本领域已知的,并且可以用于产生高亲和性人抗体。

[0175] 在一些实施方式中,可以在含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备人抗体。这些小鼠在免疫后能够在缺乏内源性免疫球蛋白产生的情况下生产全部库 (repertoire) 的人抗体。该方法还见述于美国专利第 5, 545, 807、5, 545, 806、5, 569, 825、5, 625, 126、5, 633, 425 和 5, 661, 016 号。

[0176] 本发明还涉及特异性识别至少一种人 RSP0 蛋白的双特异性抗体。双特异性抗体能够特异性识别和结合至少两种不同的表位。不同的表位可以位于同一分子内 (例如人 RSP01 上的两个表位) 或在不同分子上 (例如 RSP01 上的一个表位和 RSP02 上的一个表位)。在一些实施方式中,所述双特异性抗体是单克隆人抗体或人源化抗体。在一些实施方式中,所述抗体能够特异性识别和结合第一抗原靶标 (例如 RSP01) 以及第二抗原靶标 (例如白细胞上的效应分子 (例如, CD2、CD3、CD28 或 B7) 或 Fc 受体 (例如, CD64、CD32 或 CD16)), 从而将细胞防御机制聚焦于表达所述第一抗原靶标的细胞。在一些实施方式中,所述抗体可用于将细胞毒性剂导向表达特定靶抗原的细胞。这些抗体拥有抗原结合臂和结合细胞毒性剂或放射性同位素螯合剂 (例如 EOTUBE、DPTA、DOTA 或 TETA) 的臂。在一些实施

方式中,所述双特异性抗体特异性结合 RSP01 以及选自由 RSP02、RSP03 和 RSP04 组成的组中的另外 RSP0 蛋白。在一些实施方式中,所述双特异性抗体特异性结合 RSP02 以及选自由 RSP01、RSP03 和 RSP04 组成的组中的另外 RSP0 蛋白。

[0177] 用于制造双特异性抗体的技术是本领域技术人员已知的,参见例如 Millstein 等, 1983, *Nature*, 305:537-539; Brennan 等, 1985, *Science*, 229:81; Suresh 等, 1986, *Methods in Enzymol.*, 121:120; Traunecker 等, 1991, *EMBO J.*, 10:3655-3659; Shalaby 等, 1992, *J. Exp. Med.*, 175:217-225; Kostelny 等, 1992, *J. Immunol.*, 148:1547-1553; Gruber 等, 1994, *J. Immunol.*, 152:5368; 美国专利第 5,731,168 号; 和美国专利公开第 2011/0123532 号。双特异性抗体可以是完整抗体或抗体片段。还设计了具有超过两价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体 (Tutt 等, 1991, *J. Immunol.*, 147:60)。因此,在一些实施方式中针对 RSP01 的抗体是多特异性的。

[0178] 在一些实施方式中,本文描述的抗体(或其他多肽)可以是单特异性的。例如,在一些实施方式中,抗体含有的一个或多个抗原结合位点中的每个都能够结合(或结合) RSP0 蛋白上的同源性表位。在一些实施方式中,本文描述的单特异性抗体的抗原结合位点能够结合(或结合)例如 RSP01 和 RSP02(即,在 RSP01 和 RSP02 蛋白上都发现相同的表位)。

[0179] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗体片段。抗体片段与完整抗体相比可以具有不同的功能或能力,例如抗体片段可以具有增加的肿瘤渗透。已知各种技术可用于生产抗体片段,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化。在一些实施方式中,抗体片段包括通过对抗体分子进行胃蛋白酶消化而产生的 F(ab')₂ 片段。在一些实施方式中,抗体片段包括通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键而生成的 Fab 片段。在其他实施方式中,抗体片段包括通过用木瓜蛋白酶和还原剂对抗体分子处理而生成的 Fab 片段。在一些实施方式中,抗体片段以重组方式产生。在一些实施方式中,抗体片段包括 Fv 或单链 Fv(scFv) 片段。Fab、Fv 和 scFv 抗体片段可以在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达并从其分泌,从而允许大量地产生这些片段。在一些实施方式中,抗体片段分离自本文讨论的抗体噬菌体文库。例如,可以使用构建 Fab 表达文库的方法(Huse 等, 1989, *Science*, 246:1275-1281)来允许快速有效地鉴定具有针对 RSP0 蛋白或其衍生物、片段、类似物或同源物的所需特异性的单克隆 Fab 片段。在一些实施方式中,抗体片段是线性抗体片段。在一些实施方式中,抗体片段为单特异性或双特异性的。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 scFv。可以使用各种技术来产生对一种或多种人 RSP0 具有特异性的单链抗体(参见例如,美国专利号 4,946,778)。

[0180] 此外,特别是在抗体片段的情况下,理想的是抗体进行修饰从而增加其血清半衰期。这可以例如通过利用在抗体片段的合适区域进行突变将挽救受体结合表位引入至抗体片段中或者通过将所述表位引入肽标记内(所述肽标记然后融合至抗体片段的末端或中部)(例如通过 DNA 或肽合成)而实现。

[0181] 异源缀合抗体也在本发明的范围内。异源缀合抗体由两个共价连接的抗体组成。提出此类抗体以例如将免疫细胞靶向不想要的细胞(美国专利号 4,676,980)。还设想可以使用在合成蛋白化学中已知的方法(包括涉及交联剂的那些方法)在体外制备异源缀合抗体。例如,可以使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键而构建免疫毒素。用于该目的的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇盐和 4- 巯基丁亚氨酸甲酯。

[0182] 为了本发明的目的,应该意识到的是,经修饰抗体可以包含提供所述抗体与靶标(即,人 RSP01 或人 RSP02) 的连接的任何类型的可变区。在这点上,所述可变区可以包含或衍生自可以诱导增强体液响应和产生针对所需肿瘤相关抗原的免疫球蛋白的任何种类的哺乳动物。因此,经修饰抗体的可变区可以例如来自人、鼠类、非人灵长类(例如食蟹猴、猕猴等)或大鼠来源。在一些实施方式中,经修饰抗体的可变区和恒定区都是人的。在其他实施方式中,可以对相容性抗体(通常源自非人来源)的可变区进行工程化设计或特意定制,从而改善所述分子的结合性质或减少所述分子的免疫原性。就此而言,用于本发明的可变区可以是人源化的,或者通过包含进引入的氨基酸序列而得到改变。

[0183] 在一些实施方式中,通过至少部分地替换一个或多个 CDR 以及必要时部分地替换框架区和序列修饰和/或改变而对重链和轻链的可变结构域进行改变。虽然所述 CDR 可以源自与框架区所源自的抗体相同类别或亚类别的抗体,设想的是 CDR 源自不同类别的抗体,优选源自不同物种的抗体。为了将一个可变结构域的抗原结合能力转移至另一个,不必将所有 CDR 用来自供体可变区的所有 CDR 替换。相反,可以仅需要转移对于维持抗原结合位点的活性而言必须的那些残基。考虑到美国专利号 5,585,089、5,693,761 和 5,693,762 中提出的解释,通过实施常规实验或通过试错法测试而获得具有减少的免疫原性的功能抗体完全在本领域技术人员能力之内。

[0184] 尽管可以对可变区进行改变,本领域技术人员会意识到本发明的经修饰抗体会包括其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已经缺失或改变,以便提供诸如增加的肿瘤定位或增加的血清半衰期(当与包含天然或未改变的恒定区的大致相同的免疫原性的抗体相比时)等所需生化特性的抗体。在一些实施方式中,经修饰抗体的恒定区会包含人恒定区。与本发明相容的对恒定区进行的修饰包括添加、缺失或取代一个或多个结构域中的一个或多个氨基酸。本文公开的经修饰抗体可以包含对三个重链恒定区(CH1、CH2 或 CH3) 中的一个或多个和/或对轻链恒定区(CL) 进行改变或修饰。在一些实施方式中,使一个或多个结构域从经修饰抗体的恒定区部分或完全缺失。在一些实施方式中,经修饰抗体会包含其中整个 CH2 结构域已经被除去的结构域缺失的构建体或变体(Δ CH2 构建体)。在一些实施方式中,省去的恒定区结构域被短氨基酸间隔子(例如 10 个氨基酸残基)替换,该氨基酸间隔子提供部分的通常由缺失恒定区所赋予的分子柔性。

[0185] 在一些实施方式中,对经修饰抗体进行工程化设计以将 CH3 结构域直接融合至抗体的铰链区。在其他实施方式中,在铰链区和经修饰 CH2 和/或 CH3 结构域之间插入肽间隔子。例如,可以表达这样的构建体:其中 CH2 结构域已经缺失,并且残留的 CH3 结构域(经修饰或未经修饰)利用 5~20 个氨基酸的间隔子连接至铰链区。可以添加此类间隔子以确保构建体结构域的调节元件保持游离和可及,或确保铰链区保持柔性。但是,应该注意的是在某些情况下,氨基酸间隔子可能会被证实具有免疫原性,并且引发不想要的针对构建体的免疫响应。因此,在一些实施方式中,添加至构建体的任何间隔子相对地是不具有免疫原性的,以维持经修饰抗体的所需生物品质。

[0186] 在一些实施方式中,经修饰抗体可以仅具有恒定结构域的部分缺失,或仅取代少量或一个氨基酸。例如,CH2 结构域的选定区域中单个氨基酸的取代可能足以实质上减少 Fc 结合,并由此增加癌细胞定位和/或肿瘤渗透。类似地,可能理想的是仅使一个或多个恒定区结构域的一部分缺失,所述部分控制特定效应子功能(例如补体 C1q 结合)受到调

节。恒定区的这种部分缺失可以改善抗体的选定特性（血清半衰期）同时使与受试对象恒定区相关的其他所需功能保持完整。另外，如上所述，通过使一个或多个氨基酸进行可增强所产生构建体的特征的突变或取代，可以对本发明公开的抗体的恒定区进行修饰。就此而言，有可能的是，干扰保守性结合位点（例如，Fc 结合）的活性而同时基本上保持经修饰抗体的构象和免疫原性特征。在一些实施方式中，经修饰抗体包含添加至恒定区的一个或多个氨基酸，以便增强所需特性，例如减少或增加效应子功能或提供更多的细胞毒素或碳水化合物连接位点。

[0187] 本领域已知恒定区介导数种效应子功能。例如，补体的 C1 组分与 IgG 或 IgM 抗体的 Fc 区的结合（结合至抗原）激活补体系统。补体激活在细胞病原体的调理素化和裂解中是重要的。补体激活还刺激炎性响应，并且还可与自体免疫超敏性有关。此外，抗体的 Fc 区可以结合表达 Fc 受体 (FcR) 的细胞。存在许多对不同类别的抗体具有特异性的 Fc 受体，包括 IgG (γ 受体)、IgE (ϵ 受体)、IgA (α 受体) 和 IgM (μ 受体)。抗体与细胞表面上的 Fc 受体的结合触发许多重要的各种各样的生物响应，包括包被有抗体的颗粒的吞噬和破坏、免疫复合物的清除、包被有抗体的靶细胞被杀死细胞（称为抗体依赖性细胞的细胞毒性或 ADCC）裂解、释放炎性介体、胎盘转移和控制免疫球蛋白产生。

[0188] 在一些实施方式中，RSP0- 结合抗体提供改变的效应子功能，后者转而影响所施用抗体的生物特性。例如，在一些实施方式中，恒定区结构域的缺失或失活（通过点突变或其他手段）可以减少循环的经修饰抗体（例如抗 -RSP01 抗体）的 Fc 受体结合，由此增加癌细胞定位和 / 或肿瘤渗透。在其他实施方式中，恒定区修饰增加或减少所述抗体的血清半衰期。在一些实施方式中，对恒定区进行修饰以消除二硫键或寡糖部分。根据本发明的对恒定区进行的修饰可以容易地使用本领域技术人员知识内公知的生物化学或分子工程化设计技术来进行。

[0189] 在一些实施方式中，作为抗体的 RSP0- 结合剂不具有一种或多种效应子功能。例如，在一些实施方式中，所述抗体不具有 ADCC 活性，和 / 或不具有补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性。在一些实施方式中，所述抗体不结合 Fc 受体和 / 或补体因子。在一些实施方式中，所述抗体不具有效应子功能。

[0190] 本发明还包括与本文提出的嵌合、人源化和人抗体或其抗体片段基本上同源的变体和等效物。这些可以含有例如保守性取代突变，即一个或多个氨基酸被类似的氨基酸取代。例如，保守性取代是指氨基酸被相同通用类别内的另一氨基酸取代，例如一个酸性氨基酸被另一酸性氨基酸取代，一个碱性氨基酸被另一碱性氨基酸取代，或一个中性氨基酸被另一中性氨基酸取代。保守性氨基酸取代的含义是本领域公知的，并且如本文中所述。

[0191] 因此，本发明提供用于生产结合至少一种 RSP0 蛋白的抗体的方法。在一些实施方式中，用于生产结合至少一种 RSP0 蛋白的抗体的方法包括使用杂交瘤技术。在一些实施方式中，提供用于生产结合人 RSP01 的抗体的方法。在一些实施方式中，所述方法包括使用人 RSP01 的 31 ~ 263 位氨基酸。在一些实施方式中，所述方法包括使用 SEQ ID NO:1 的 31 ~ 263 位氨基酸。在一些实施方式中，提供用于生产结合人 RSP02 的抗体的方法。在一些实施方式中，所述方法包括使用人 RSP02 的 22 ~ 205 位氨基酸。在一些实施方式中，所述方法包括使用 SEQ ID NO:2 的 22 ~ 205 位氨基酸。在一些实施方式中，提供用于生产结合人 RSP03 的抗体的方法。在一些实施方式中，所述方法包括使用人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基

酸。在一些实施方式中,所述方法包括使用 SEQ ID NO:3 的 22 ~ 272 位氨基酸。在一些实施方式中,生产结合至少一种人 RSP0 蛋白的抗体的方法包括筛选人噬菌体文库。本发明还提供鉴定结合至少一种 RSP0 蛋白的抗体的方法。在一些实施方式中,通过对与 RSP0 蛋白或其部分的结合进行 FACS 筛选而鉴定所述抗体。在一些实施方式中,通过对与 RSP0 蛋白的结合进行使用 ELISA 的筛选而鉴定所述抗体。在一些实施方式中,通过就对 RSP0 蛋白与人 LGR 蛋白的结合的阻断来进行 FACS 筛选而鉴定所述抗体。在一些实施方式中,对 β -连环素信号传导的抑制或阻断进行筛选而鉴定所述抗体。

[0192] 在一些实施方式中,生产针对人 RSP01 蛋白的抗体的方法包括用包含人 RSP01 的 31 ~ 263 位氨基酸的多肽对哺乳动物进行免疫。在一些实施方式中,生产针对人 RSP01 蛋白的抗体的方法包括用包含人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸中的至少一部分的多肽对哺乳动物进行免疫。在一些实施方式中,所述方法还包括从所述哺乳动物分离抗体或产生抗体的细胞。在一些实施方式中,生产结合 RSP01 蛋白的单克隆抗体的方法包括:(a) 用包含人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸的至少一部分的多肽对哺乳动物进行免疫;(b) 从经免疫哺乳动物分离产生抗体的细胞;(c) 将所述产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞系的细胞融合以产生杂交瘤细胞。在一些实施方式中,所述方法还包括(d) 选择表达结合 RSP01 蛋白的抗体的杂交瘤细胞。在一些实施方式中,人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸的所述至少一部分选自自由 SEQ ID NO:5 ~ SEQ ID NO:9 组成的组。在一些实施方式中,人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸的所述至少一部分是 SEQ ID NO:9。在一些实施方式中,人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸的所述至少一部分是 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7。在一些实施方式中,人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸的所述至少一部分是 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7。在一些实施方式中,所述哺乳动物是小鼠。在一些实施方式中,使用包含人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸的至少一部分的多肽选择所述抗体。在一些实施方式中,包含人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸的至少一部分的用于选择的多肽选自自由 SEQ ID NO:5 ~ SEQ ID NO:9 组成的组。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP01 和至少一种其他 RSP0 蛋白。在一些实施方式中,所述至少一种其他 RSP0 蛋白选自自由 RSP02、RSP03 和 RSP04 组成的组。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP01 和 RSP02。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP01 和 RSP03。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP01 和 RSP04。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP01、RSP02 和 RSP03。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP01、RSP02 和 RSP04。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP01、RSP03 和 RSP04。在一些实施方式中,所述抗体结合人 RSP01 和小鼠 RSP01。

[0193] 在一些实施方式中,生产针对人 RSP02 蛋白的抗体的方法包括用包含人 RSP02 的 22 ~ 205 位氨基酸的多肽对哺乳动物进行免疫。在一些实施方式中,生产针对人 RSP02 蛋白的抗体的方法包括用包含人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基酸中的至少一部分的多肽对哺乳动物进行免疫。在一些实施方式中,所述方法还包括从所述哺乳动物分离抗体或产生抗体的细胞。在一些实施方式中,生产结合 RSP02 蛋白的单克隆抗体的方法包括:(a) 用包含人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基酸的至少一部分的多肽对哺乳动物进行免疫;(b) 从经免疫哺乳动物分离产生抗体的细胞;(c) 将所述产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞系的细胞融合以产生杂交瘤细胞。在一些实施方式中,所述方法还包括(d) 选择表达结合 RSP02 蛋白的抗体的杂交瘤细胞。在一些实施方式中,人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基酸的所述至少一部分选自自由 SEQ ID NO:44 ~ SEQ ID NO:47 组成的组。在一些实施方式中,人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基

酸的所述至少一部分是 SEQ ID NO:44。在一些实施方式中,人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基酸的所述至少一部分是 SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:46。在一些实施方式中,人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基酸的所述至少一部分是 SEQ ID NO:45 和 SEQ ID NO:46。在一些实施方式中,所述哺乳动物是小鼠。在一些实施方式中,使用包含人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基酸的至少一部分的多肽选择所述抗体。在一些实施方式中,包含人 RSP02 的 22 ~ 243 位氨基酸的至少一部分的用于选择的多肽选自 SEQ ID NO:44 ~ SEQ ID NO:47 组成的组。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP02 和至少一种其他 RSP0 蛋白。在一些实施方式中,所述至少一种其他 RSP0 蛋白选自 RSP01、RSP03 和 RSP04 组成的组。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP02 和 RSP01。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP02 和 RSP03。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP02 和 RSP04。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP02、RSP01 和 RSP03。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP02、RSP03 和 RSP04。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP02、RSP01 和 RSP04。在一些实施方式中,所述抗体结合人 RSP02 和小鼠 RSP02。

[0194] 在一些实施方式中,生产针对人 RSP03 蛋白的抗体的方法包括用包含人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基酸的多肽对哺乳动物进行免疫。在一些实施方式中,生产针对人 RSP03 蛋白的抗体的方法包括用包含人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基酸中的至少一部分的多肽对哺乳动物进行免疫。在一些实施方式中,所述方法还包括从所述哺乳动物分离抗体或产生抗体的细胞。在一些实施方式中,生产结合 RSP03 蛋白的单克隆抗体的方法包括:(a) 用包含人 RSP03 的 22-272 位氨基酸的至少一部分的多肽对哺乳动物进行免疫;(b) 从经免疫哺乳动物分离产生抗体的细胞;(c) 将所述产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞系的细胞融合以产生杂交瘤细胞。在一些实施方式中,所述方法还包括(d) 选择表达结合 RSP03 蛋白的抗体的杂交瘤细胞。在一些实施方式中,人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基酸的所述至少一部分选自 SEQ ID NO:48 ~ SEQ ID NO:51 组成的组。在一些实施方式中,人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基酸的所述至少一部分是 SEQ ID NO:48。在一些实施方式中,人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基酸的所述至少一部分是 SEQ ID NO:49 或 SEQ ID NO:50。在一些实施方式中,人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基酸的所述至少一部分是 SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:50。在一些实施方式中,所述哺乳动物是小鼠。在一些实施方式中,使用包含人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基酸的至少一部分的多肽选择所述抗体。在一些实施方式中,包含人 RSP03 的 22 ~ 272 位氨基酸的至少一部分的用于选择的多肽选自 SEQ ID NO:48 ~ SEQ ID NO:51 组成的组。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP03 和至少一种其他 RSP0 蛋白。在一些实施方式中,所述至少一种其他 RSP0 蛋白选自 RSP02、RSP04 和 RSP01 组成的组。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP03 和 RSP01。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP03 和 RSP02。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP03 和 RSP04。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP03、RSP01 和 RSP02。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP03、RSP01 和 RSP04。在一些实施方式中,所述抗体结合 RSP03、RSP02 和 RSP04。在一些实施方式中,所述抗体结合人 RSP03 和小鼠 RSP03。

[0195] 在一些实施方式中,由本文描述方法产生的抗体是 RSP0 拮抗剂。在一些实施方式中,由本文描述方法产生的抗体抑制 β -连环素信号传导。

[0196] 在一些实施方式中,生产针对至少一种人 RSP0 蛋白的抗体的方法包括使用包含单抗原结合位点的膜结合异二聚体分子鉴定抗体。在一些非限制性实施方式中,使用国际申请 W02011/100566 中公开的方法和多肽鉴定所述抗体,本文通过参考并入其全部内容。

[0197] 在一些实施方式中,生产针对至少一种人 RSP0 蛋白的抗体的方法包括就结合人 RSP0 蛋白的抗体筛选抗体表达文库。在一些实施方式中,所述抗体表达文库是噬菌体文库。在一些实施方式中,所述筛选包括淘选。在一些实施方式中,所述抗体表达文库(例如噬菌体文库)使用人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸的至少一部分进行筛选。在一些实施方式中,使用不同的 RSP0 蛋白再次对在第一筛选中鉴定出的抗体进行筛选,由此鉴定结合 RSP01 和第二 RSP0 蛋白的抗体。在一些实施方式中,用于筛选的多肽包含人 RSP01 的 21 ~ 263 位氨基酸的至少一部分,所述至少一部分选自由 SEQ ID NO:5 ~ SEQ ID NO:9 组成的组。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合 RSP01 和至少一种其他 RSP0 蛋白。在一些实施方式中,所述至少一种其他 RSP0 蛋白选自由 RSP02、RSP03 和 RSP04 组成的组。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合 RSP01 和 RSP02。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合 RSP01 和 RSP03。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合 RSP01 和 RSP04。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合人 RSP01 和小鼠 RSP01。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体是 RSP01 拮抗剂。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体抑制由 RSP01 诱导的 β -连环素信号传导。在一些实施方式中,所述抗体表达文库(例如噬菌体文库)使用人 RSP02 的 22 ~ 205 位氨基酸的至少一部分进行筛选。在一些实施方式中,使用不同的 RSP0 蛋白再次对在第一筛选中鉴定出的抗体进行筛选,由此鉴定结合 RSP02 和第二 RSP0 蛋白的抗体。在一些实施方式中,用于筛选的多肽包含人 RSP02 的 22 ~ 205 位氨基酸的至少一部分,所述至少一部分选自由 SEQ ID NO:44 ~ SEQ ID NO:47 组成的组。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合 RSP02 和至少一种其他 RSP0 蛋白。在一些实施方式中,所述至少一种其他 RSP0 蛋白选自由 RSP01、RSP03 和 RSP04 组成的组。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合 RSP02 和 RSP03。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合 RSP02 和 RSP04。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合 RSP02 和 RSP01。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体结合人 RSP02 和小鼠 RSP02。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体是 RSP02 拮抗剂。在一些实施方式中,在所述筛选中鉴定出的抗体抑制由 RSP02 诱导的 β -连环素信号传导。

[0198] 在一些实施方式中,本文描述的抗体是分离的。在一些实施方式中,本文描述的抗体是基本纯的。

[0199] 在本发明的一些实施方式中,所述 RSP0-结合剂是多肽。所述多肽可以是包含结合至少一种人 RSP0 蛋白的抗体或其片段的重组多肽、天然多肽或合成多肽。在本领域中会意识到的是,可以对本发明的一些氨基酸序列进行改变而不会显著影响所述蛋白的结构或功能。因此,本发明还包括所述多肽的各种变化,其显示了针对人 RSP0 蛋白的抗体或其片段的实质活性,或者其包括针对人 RSP0 蛋白的抗体或其片段的区域。在一些实施方式中,RSP0-结合多肽的氨基酸序列改变包括缺失、插入、倒置、重复和/或其他类型的取代。

[0200] 可以对所述多肽、其类似物和变体进行进一步修饰以含有另外的化学部分,该部分通常不是所述多肽的一部分。衍生部分可以改善所述多肽的溶解度、生物半衰期和/或吸收。所述部分还可以减少或消除所述多肽和变体的任何不期望的副作用。对化学部分的综述可见于 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 21 版, 2005, University of the Sciences, Philadelphia, PA。

[0201] 本文描述的多肽可以通过本领域已知的任何合适的方法产生。此类方法包括从直接蛋白合成至构建编码多肽序列的 DNA 序列和在合适的宿主中表达这些序列。在一些实施方式中,使用重组技术通过分离或合成编码野生型目的蛋白的 DNA 序列来构建 DNA 序列。可选的是,可以通过位点特异性诱变对所述序列进行诱变,以提供其功能类似物。参见例如 Zoeller 等,1984,PNAS, 81:5662-5066 和美国专利号 4,588,585。

[0202] 在一些实施方式中,编码目的多肽的 DNA 序列可以使用寡核苷酸合成仪通过化学合成来构建。寡核苷酸可以基于所需多肽的氨基酸序列,选择在其中产生目的重组多肽的宿主细胞中有利的那些密码子来设计。可以应用标准方法来合成对分离的目的多肽进行编码的多核苷酸序列。例如,可以使用完整氨基酸序列来构建回译基因。此外,可以合成含有编码特定分离多肽的核苷酸序列的 DNA 寡聚物。例如,可以合成编码所需多肽的一部分的数个小寡核苷酸,然后将其连接。各寡核苷酸通常含有用于互补组装的 5' 或 3' 突出(overhang)。

[0203] 一旦组装后(通过合成、定点诱变或另一方法),可以将编码特定目的多肽的多核苷酸序列插入至表达载体中,并可操作地连接至适于在所述宿主中表达所述蛋白的表达控制序列。通过核苷酸测序、限制酶定位和/或在合适的宿主中表达生物活性多肽而确认正确的组装。如本领域所公知的,为了在宿主中获得高表达水平的转染基因,所述基因必须可操作地连接至转录和翻译表达控制序列,所述序列在所选的表达宿主中具有功能。

[0204] 在一些实施方式中,使用重组表达载体来扩增和表达编码针对人 RSP0 蛋白的抗体或其片段的 DNA。例如,重组表达载体可以是可复制 DNA 构建体,所述构建体具有编码 RSP0-结合剂、抗-RSP0 抗体或其片段的多肽链的合成或源自 cDNA 的 DNA 片段,所述 DNA 片段可操作地连接至源自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录和/或翻译调控元件。转录单元通常包括以下组件:(1) 在基因表达中具有调控作用的一种或多种遗传元件,例如转录启动子或增强子,(2) 转录至 mRNA 中并翻译成蛋白质的结构或编码序列,和(3) 合适的转录和翻译起始和终止序列。调控元件可以包括操作子序列以控制转录。可以另外引入通常由复制原点赋予的在宿主中复制的能力和便于识别转化体的选择基因。当 DNA 区彼此功能相关时 DNA 区是“可操作地连接”。例如,如果信号肽的 DNA(分泌前导)表达为参与多肽的分泌的前体,该信号肽的 DNA(分泌前导)与多肽的 DNA 可操作地连接,如果启动子控制编码序列的转录则启动子与编码序列可操作地连接,或者如果核糖体结合位点的定位使得允许翻译则核糖体结合位点与编码序列可操作地连接。在一些实施方式中,旨在用于酵母表达系统中的结构元件包括能够使宿主细胞细胞外分泌经翻译蛋白的前导序列。其他实施方式中,当不用前导或转运序列表达重组蛋白时,该重组蛋白可以包括 N 末端甲硫氨酸残基。该残基可选地能够被从所表达的重组蛋白切割下,从而提供最终产物。

[0205] 表达控制序列和表达载体的选择依赖于宿主的选择。可以使用各种表达宿主/载体的组合。用于真核宿主的有用的表达载体包括例如包含来自 SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用的表达载体包括已知的细菌质粒,例如来自大肠杆菌的质粒,包括 pCR1、pBR322、pMB9 及其衍生物,以及更宽宿主范围的质粒,例如 M13 以及其他丝状单链 DNA 噬菌体。

[0206] 用于表达 RSP0-结合多肽或抗体(或 RSP0 蛋白以用作抗原)的合适宿主细胞包括在合适启动子控制下的原核生物、酵母细胞、昆虫细胞或高级真核细胞。原核生物包括

革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或杆菌。高级真核细胞包括如下文所述的哺乳动物来源的已建立细胞系。还可以使用无细胞移植系统。Pouwels 等 (1985, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, NY) 描述了与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的合适的克隆表达载体。关于蛋白生产 (包括抗体生产) 的方法的另外信息可以例如见于美国专利公开号 2008/0187954、美国专利第 6,413,746 和 6,660,501 号和国际专利公开号 W004009823。

[0207] 使用各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统来表达重组多肽。在哺乳动物细胞中表达重组多肽是优选的,因为此类蛋白通常正确折叠、经过合适的修饰和具有完全功能。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括 COS-7 (来自猴肾)、L-929 (来自鼠类成纤维细胞)、C127 (来自鼠类哺乳动物肿瘤)、3T3 (来自鼠类成纤维细胞)、CHO (来自中国仓鼠卵巢)、HeLa (来自人子宫颈癌)、BHK (来自仓鼠肾成纤维细胞) 和 HEK-293 (来自人胚胎肾) 细胞系和其变体。哺乳动物表达载体可以包含非转录元件 (例如复制原点、与待表达基因连接的合适的启动子和增强子、以及其他 5' 或 3' 侧接非转录序列) 和 5' 或 3' 非翻译序列,例如必要的核糖体结合位点、多腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。用于在昆虫细胞中生产异源蛋白的杆状病毒系统是本领域公知的 (参见例如, Luckow 和 Summers, 1988, Bio/Technology, 6:47)。

[0208] 因此,本发明提供包含本文描述的 RSP0- 结合剂的细胞。在一些实施方式中,所述细胞产生本文描述的 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述细胞产生抗体。在一些实施方式中,所述细胞产生抗体 89M5。在一些实施方式中,所述细胞产生抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述细胞产生抗体 130M23。在一些实施方式中,所述细胞产生抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述细胞产生抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述细胞是 ATCC 保藏号为 PTA-11970 的杂交瘤细胞系。在一些实施方式中,所述细胞是 ATCC 保藏号为 PTA-12021 的杂交瘤细胞系。

[0209] 由转化的宿主产生的蛋白可以根据任何合适的方法进行纯化。标准方法包括色谱 (例如离子交换、亲和和尺寸柱色谱)、离心、差别溶解或用于蛋白纯化的任何其他标准技术。可以将诸如六聚组氨酸、麦芽糖结合结构域、流感病毒包衣序列和谷胱甘肽-S-转移酶等亲和标记连接至所述蛋白,以允许通过合适的亲和柱而容易地纯化。还可以利用诸如蛋白水解、质谱 (MS)、核磁共振 (NMR)、高性能液相色谱 (HPLC) 和 X 射线晶体学等技术来物理表征分离的蛋白质。

[0210] 在一些实施方式中,可以使用可商购获得的蛋白浓缩过滤器 (例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元) 对来自将重组蛋白分泌至培养基中的表达系统的上清液进行第一浓缩。浓缩步骤后,将浓缩物施涂至合适的纯化基质。在一些实施方式中,可以使用阴离子交换树脂,例如具有悬垂的二乙基氨基乙基 (DEAE) 基团的基质或底物。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、右旋糖苷、纤维素或在蛋白纯化中其他类型的常用基质。在一些实施方式中,可以使用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换剂包括各种包含磺丙基或羧甲基的不溶性基质。在一些实施方式中,可以使用羟基磷灰石培养基,包括但不限于陶瓷羟基磷灰石 (CHT)。在一些实施方式中,可以使用利用疏水性 RP-HPLC 培养基 (例如具有悬垂甲基或其他脂肪族基团的二氧化硅凝胶) 的一步或多步反相 HPLC 步骤来进一步纯化 RSP0- 结合剂。还可以采用前述纯化步骤的一些或所有的各种组合来提供均匀的重组蛋白。

[0211] 在一些实施方式中,在细菌培养基中产生的重组蛋白可以通过例如以下步骤进行分离:首先从细胞球团中提取,然后进行一步或多步浓缩、盐析、水性离子交换或尺寸排阻色谱步骤。可以使用 HPLC 来进行最终纯化步骤。用于表达重组蛋白的微生物细胞可以被任何常规方法破坏,包括冷冻-解冻循环、超声波、机械破坏或使用细胞裂解剂。

[0212] 用于纯化抗体和其他蛋白的本领域已知的方法还包括例如美国专利公开号 2008/0312425、2008/0177048 和 2009/0187005 中描述的那些。

[0213] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂为不作为抗体的多肽。用于鉴定和生产以高亲和性与蛋白靶标的非抗体多肽的各种方法是本领域已知的。参见例如,Skerra, 2007, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304; Hosse 等, 2006, Protein Science, 15:14-27; Gill 等, 2006, Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658; Nygren, 2008, FEBS J., 275:2668-76; 和 Skerra, 2008, FEBS J., 275:2677-83。在一些实施方式中,可以使用噬菌体展示技术来生产和/或鉴定 RSP0- 结合多肽。在一些实施方式中,所述多肽包含选自自由蛋白 A、蛋白 G、脂钙蛋白、纤连蛋白结构域、锚蛋白共有重复结构域和硫氧还蛋白组成的组中的类别的蛋白支架。

[0214] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂或抗体可以以许多缀合(即免疫缀合物或放射性缀合物)或非缀合形式中的任一种使用。在一些实施方式中,所述抗体能够以非缀合形式用于利用受试对象的天然防御机制(包括补体依赖性细胞毒性和抗体依赖性细胞毒性),从而消除恶性或瘤细胞。

[0215] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂(例如抗体或多肽)缀合至细胞毒性剂。在一些实施方式中,所述细胞毒性剂是化学治疗剂,包括但不限于甲氨蝶呤、阿霉素、多柔比星、美法仑、丝裂霉素 C、苯丁酸氮芥、道诺霉素或其他嵌入剂(intercalating agent)。在一些实施方式中,所述细胞毒性剂是细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段,包括但不限于白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲素 A 链、 α -八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒素、巴豆毒素、肥皂草(Sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素、丝林霉素、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素(tricothecene)。在一些实施方式中,所述细胞毒性剂是放射性同位素,以产生放射性缀合物或放射性缀合抗体。可利用各种放射性同位素来产生放射性缀合抗体,包括但不限于⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹²³I、¹¹¹In、¹³¹In、¹⁰⁵Rh、¹⁵³Sm、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re 和 ²¹²Bi。还可以利用抗体与一种或多种小分子毒素的缀合物,所述小分子毒素例如奇霉素、美登醇、单端孢菌毒素(tricothene)和 CC1065,以及这些毒素的衍生物。抗体和细胞毒性剂的缀合物可以使用各种双官能蛋白偶联剂来制备,例如 N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(例如盐酸二甲基己二亚酰胺)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺)、醛(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮盐衍生物(例如双(对重氮基苯酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(例如 2,6-二异氰酸甲苯酯)和双活性氟化合物(例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0216] III. 多核苷酸

[0217] 在一些实施方式中,本发明涵盖了包含编码特异性结合至少一种人 RSP0 的多肽或此类多肽的片段的多核苷酸的多核苷酸。术语“编码多肽的多核苷酸”涵盖了仅包括所

述多肽的编码序列的多核苷酸以及包括另外的编码序列和 / 或非编码序列的多核苷酸。例如, 本发明提供包含编码针对人 RSP0 蛋白的抗体或编码此类抗体的片段的多核苷酸的多核苷酸。本发明的多核苷酸可以为 RNA 形式或为 DNA 形式。DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 和合成 DNA, 并且能够是双链或单链的, 并且单链可以是编码链或非编码 (反义) 链。

[0218] 在一些实施方式中, 所述多核苷酸包含编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含选自以下序列组成的组中的序列: SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:68 和 SEQ ID NO:69。在一些实施方式中, 所述多核苷酸包含编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含选自以下序列组成的组中的序列: SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO:76。在一些实施方式中, 所述多核苷酸包含选自以下序列组成的组中的多核苷酸序列: SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56 和 SEQ ID NO:58。在一些实施方式中, 所述多核苷酸包含选自以下序列组成的组中的多核苷酸序列: SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:72 和 SEQ ID NO:75。

[0219] 在一些实施方式中, 质粒包含含有 SEQ ID NO:52 的多核苷酸。在一些实施方式中, 质粒包含含有 SEQ ID NO:56 的多核苷酸。在一些实施方式中, 质粒包含含有 SEQ ID NO:60 的多核苷酸。在一些实施方式中, 质粒包含含有 SEQ ID NO:64 的多核苷酸。在一些实施方式中, 质粒包含含有 SEQ ID NO:72 的多核苷酸。在一些实施方式中, 质粒包含编码含有 SEQ ID NO:68 和 / 或 SEQ ID NO:69 的氨基酸序列的多核苷酸。在一些实施方式中, 质粒包含编码含有 SEQ ID NO:70 和 / 或 SEQ ID NO:71 的氨基酸序列的多核苷酸。在一些实施方式中, 质粒包含编码含有 SEQ ID NO:70 和 / 或 SEQ ID NO:74 的氨基酸序列的多核苷酸。

[0220] 在一些实施方式中, 所述多核苷酸包含具有核苷酸序列的多核苷酸, 所述核苷酸序列与包含选自 SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56 和 SEQ ID NO:58 组成的组中序列的多核苷酸具有至少 80% 同一性、至少 85% 同一性、至少 90% 同一性、至少 95% 同一性, 并且在一些实施方式中, 两者具有至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性。在一些实施方式中, 所述多核苷酸包含具有下述核苷酸序列的多核苷酸: 所述核苷酸序列与包含选自 SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:72 和 SEQ ID NO:75 组成的组中序列的多核苷酸具有至少 80% 同一性、至少 85% 同一性、至少 90% 同一性、至少 95% 同一性, 并且在一些实施方式中, 两者具有至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性。还提供了包含与 SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:72 或 SEQ ID NO:75 杂交的多核苷酸的多核苷酸。在一些实施方式中, 所述杂交在高严谨条件下进行。

[0221] 在一些实施方式中, 抗体由包含 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24 的多核苷酸编码。在一些实施方式中, 抗体由包含 SEQ ID NO:52 和 SEQ ID NO:56 的多核苷酸编码。在一些实

施方式中,抗体由包含 SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:40 的多核苷酸编码。在一些实施方式中,抗体由包含 SEQ ID NO:60 和 SEQ ID NO:64 的多核苷酸编码。在一些实施方式中,抗体由包含 SEQ ID NO:60 和 SEQ ID NO:72 的多核苷酸编码。

[0222] 在一些实施方式中,所述多核苷酸包含成熟多肽的编码序列,所述编码序列与例如有助于多肽从宿主细胞表达和分泌的多核苷酸(例如前导序列或信号序列,其用作控制多肽从细胞进行转运的分泌序列)融合在同一阅读框中。具有前导序列的多肽是前蛋白,并且能够被宿主细胞将前导序列其阁下,从而形成所述多肽的成熟形式。所述多核苷酸还可以编码作为附加有另外的 5' 氨基酸残基的成熟蛋白的原蛋白。具有原序列(prosequence)的成熟蛋白是原蛋白,并且是所述蛋白的失活形式。一旦原序列被切割,则留下活性成熟蛋白。

[0223] 在一些实施方式中,所述多核苷酸包含与例如允许对所编码多肽进行纯化的标记序列融合在同一阅读框中的成熟多肽的编码序列。例如,所述标记序列可以是由 pQE-9 载体提供的六聚组氨酸标记,以用于在细菌宿主的情况下对与所述标记融合的成熟多肽进行纯化,或者在使用哺乳动物宿主(例如, COS-7 细胞)时,所述标记序列可以是源自流感血凝素蛋白的血凝素(HA)标记。在一些实施方式中,所述标记序列是 FLAG 标记,其是序列为 DYKDDDDK(SEQ ID NO:18)的肽,可以与其他亲和标记组合使用。

[0224] 本发明还涉及例如编码片段、类似物和/或衍生物的上文所述多核苷酸的变体。

[0225] 在一些实施方式中,所述多核苷酸包含具有核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列与编码包含本文描述的 RSP0- 结合剂(例如,抗体)或其片段的多核苷酸具有至少 80% 同一性、至少 85% 同一性、至少 90% 同一性、至少 95% 同一性,并且在一些实施方式中,两者具有至少约 96%、97%、98% 或 99% 同一性。

[0226] 如本文所用,短语具有与参照核苷酸序列具有至少例如 95% “同一性”的核苷酸序列的多核苷酸是指:所述多核苷酸的核苷酸序列与参照序列相同,不同之处在于,相对于参照核苷酸序列中的每 100 个核苷酸,所述多核苷酸序列包括至多 5 个点突变。换言之,为了获得与参照核苷酸序列具有至少例如 95% 同一性的核苷酸序列的多核苷酸,可以将参照序列中的至多 5% 的核苷酸缺失、或用另一核苷酸取代、或可以将数量为参照序列中全部核苷酸的至多 5% 的核苷酸插入至参照序列中。参照序列的这些突变可以出现在参照核苷酸序列的 5' 或 3' 末端位置或这些末端位置之间的任何地方,其在参照序列的核苷酸中分别地穿插或在参照序列内以一个或多个相邻基团穿插。

[0227] 多核苷酸变体可以含有编码区和/或非编码区中的改变。在一些实施方式中,所述多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失但不改变所编码多肽的性质或活性的改变。在一些实施方式中,核苷酸变体通过因遗传编码的简并性导致的沉默取代而产生。在一些实施方式中,核苷酸变体包含导致表达差异(例如表达增加或降低)的核苷酸序列,但氨基酸序列未改变。多核苷酸变体可以出于各种理由而产生,例如,对特定宿主优化密码子表达(即,将人 mRNA 中的密码子改变为诸如大肠杆菌等细菌宿主优选的密码子)。

[0228] 在一些实施方式中,所述多核苷酸是分离的。在一些实施方式中,所述多核苷酸是基本上纯的。

[0229] 还提供包含本文描述的多核苷酸的载体和细胞。在一些实施方式中,表达载体包含多核苷酸分子。在一些实施方式中,宿主细胞包含含有所述多核苷酸分子的表达载体。在

一些实施方式中,宿主细胞包含多核苷酸分子。

[0230] IV. 使用方法和药物组合物

[0231] 本发明的 RSP0- 结合剂(包括多肽和抗体)用于各种应用,包括但不限于治疗性治疗方法,例如治疗癌。在一些实施方式中,所述试剂用于抑制 β - 连环素信号传导、抑制肿瘤生长、诱导分化、减少肿瘤体积、减少肿瘤中癌干细胞的频率和 / 或减少肿瘤的致癌性。所述使用方法可以是体外、离体或体内方法。在一些实施方式中,RSP0- 结合剂或多肽或抗体是人 RSP01 的拮抗剂。在一些实施方式中,RSP0- 结合剂或多肽或抗体是人 RSP02 的拮抗剂。在一些实施方式中,RSP0- 结合剂或多肽或抗体是人 RSP03 的拮抗剂。

[0232] 在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂用于治疗与 β - 连环素的激活、 β - 连环素信号传导增加和 / 或 β - 连环素信号传导异常有关的疾病。在一些实施方式中,所述疾病是依赖于 β - 连环素信号传导的疾病。在一些实施方式中,所述疾病是依赖于 β - 连环素激活的疾病。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂用于治疗特征在于干细胞和 / 或祖细胞的水平增加的疾病。在一些实施方式中,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的 RSP01- 结合剂(例如,抗体)。在一些实施方式中,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的 RSP02- 结合剂(例如,抗体)。在一些实施方式中,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的 RSP03- 结合剂(例如,抗体)。在一些实施方式中,所述受试对象是人。

[0233] 本发明提供使用本文描述的 RSP0- 结合剂或抗体抑制肿瘤生长的方法。在一些实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括使细胞与 RSP0- 结合剂(例如,抗体)在体外交触。例如,在添加有抗 -RSP0 抗体或其他试剂的培养基中培养永生化细胞系或癌细胞系以抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,肿瘤细胞分离自患者样品(例如组织活检、胸腔积液或血液样品),并且在添加有 RSP0- 结合剂的培养基中培养以抑制肿瘤生长。

[0234] 在一些实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括使肿瘤或肿瘤细胞与 RSP0- 结合剂(例如,抗体)在体内接触。在一些实施方式中,使肿瘤或肿瘤细胞与 RSP0- 结合剂接触在动物模型中进行。例如,可以对具有异种移植物的免疫妥协的小鼠(例如 NOD/SCID 小鼠)施用 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,从患者样品(例如组织活检、胸腔积液或血液样品)分离出癌细胞或癌干细胞,并且将其注入免疫妥协的小鼠中,然后对所述免疫妥协的小鼠施用 RSP0- 结合剂以抑制肿瘤细胞生长。在一些实施方式中,对所述动物施用 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,对所述动物施用 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,对所述动物施用 RSP03- 结合剂。在一些实施方式中,在将致癌性细胞引入动物的同时或稍后施用所述 RSP0- 结合剂,以预防肿瘤生长(“预防性模型”)。在一些实施方式中,在肿瘤已经生长至特定尺寸后施用所述 RSP0- 结合剂作为治疗剂(“治疗性模型”)。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗 -RSP01 抗体。在一些实施方式中,所述抗 -RSP01 抗体是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述抗 -RSP01 抗体是抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗 -RSP02 抗体。在一些实施方式中,所述抗 -RSP02 抗体是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述抗 -RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述抗 -RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗 -RSP03 抗体。

[0235] 在一些实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括对受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂,所述 RSP0- 结合剂含有:包含 TGYTMH(SEQ ID NO:12) 的重链 CDR1、包含

GINPNNGGTTYNQNFKG (SEQ ID NO:13) 的重链 CDR2 和包含 KEFSDGYFFAY (SEQ ID NO:14) 的重链 CDR3 ;和 / 或包含 KASQDVIFAVA (SEQ ID NO:15) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:16) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTPW (SEQ ID NO:17) 的轻链 CDR3。在一些实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括对受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂,所述 RSP0- 结合剂含有:包含 SSYAMS (SEQ ID NO:29) 的重链 CDR1、包含 SISSGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:30) 的重链 CDR2 和包含 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (SEQ ID NO:31) 的重链 CDR3 ;和 / 或包含 KASQDVSSAVA (SEQ ID NO:32) 的轻链 CDR1、包含 WASTRHT (SEQ ID NO:33) 的轻链 CDR2 和包含 QQHYSTP (SEQ ID NO:34) 的轻链 CDR3。

[0236] 在一些实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括对受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述受试对象是人。在一些实施方式中,所述受试对象具有肿瘤或具有的肿瘤已经被除去。在一些实施方式中,所述受试对象具有至少一种 RSP0 蛋白 (例如, RSP01、RSP02 或 RSP03) 的表达水平升高的肿瘤。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述抗-RSP01 抗体是抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述抗-RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP03- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂是抗体。

[0237] 在一些实施方式中,所述肿瘤是其中激活 β -连环素信号传导的肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是其中 β -连环素信号传导异常的肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤包含 APC 肿瘤抑制基因中的失活突变 (例如,截短突变)。在一些实施方式中,所述肿瘤不包含所述 APC 肿瘤抑制基因中的失活突变。在一些实施方式中,所述肿瘤包含野生型 APC 基因。在一些实施方式中,所述肿瘤不包含 β -连环素基因中的激活突变。在一些实施方式中,正在被治疗的受试对象的癌与此类肿瘤有关。

[0238] 在一些实施方式中,所述肿瘤表达与 RSP01- 结合剂或抗体结合的 RSP01。在一些实施方式中,所述肿瘤具有升高表达水平的 RSP01 或过表达的 RSP01。在一些实施方式中,所述肿瘤具有高表达水平的 RSP01。通常,短语“肿瘤具有升高表达水平的”蛋白 (或类似短语) 是指肿瘤中的蛋白的表达水平与同一组织类型的正常组织中同一蛋白质的表达水平进行比较。但是,在一些实施方式中,肿瘤中蛋白质的表达水平与组织类型的组内所述蛋白质的平均表达水平相比“升高”或“高”。在一些实施方式中,肿瘤中蛋白质的表达水平与同一组织类型或不同组织类型的其他肿瘤中所述蛋白质的表达水平相比“升高”或“高”。在一些实施方式中,所述肿瘤表达与 RSP02- 结合剂或抗体结合的 RSP02。在一些实施方式中,所述肿瘤具有升高表达水平的 RSP02 或过表达的 RSP02。在一些实施方式中,所述肿瘤具有高表达水平的 RSP02。在一些实施方式中,所述肿瘤表达与 RSP03- 结合剂或抗体结合的 RSP03。在一些实施方式中,所述肿瘤具有升高表达水平的 RSP03 或过表达的 RSP03。在一些实施方式中,所述肿瘤具有高表达水平的 RSP03。在一些实施方式中,所述肿瘤表达与 RSP04- 结合剂或抗体结合的 RSP04。在一些实施方式中,所述肿瘤具有升高表达水平的 RSP04 或过表达的 RSP04。在一些实施方式中,所述肿瘤具有高表达水平的 RSP04。在一些实施方式中,与正常组织中表达的 RSP0 水平相比,所述肿瘤表达升高水平的 RSP01、RSP02、

RSP03 和 / 或 RSP04。在一些实施方式中,所述正常组织是与所述肿瘤相同的组织类型的组织。

[0239] 此外,本发明提供抑制受试对象中肿瘤生长的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述肿瘤包含癌干细胞。在一些实施方式中,所述肿瘤中癌干细胞的频率通过施用所述 RSP0- 结合剂而减少。本发明还提供减少肿瘤中癌干细胞的频率的方法,所述方法包括使所述肿瘤与有效量的 RSP0- 结合剂(例如,抗-RSP0 抗体)接触。在一些实施方式中,提供一种减少受试对象的肿瘤中癌干细胞的频率的方法,所述方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂(例如,抗-RSP0 抗体)。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗-RSP01 抗体。在一些实施方式中,所述抗-RSP01 抗体是 89M5。在一些实施方式中,所述抗-RSP01 抗体是抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗-RSP02 抗体。在一些实施方式中,所述抗-RSP02 抗体是 130M23。在一些实施方式中,所述抗-RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述抗-RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗-RSP03 抗体。

[0240] 在一些实施方式中,所述肿瘤是实体肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是选自以下肿瘤组成的组中的肿瘤:结直肠癌、胰腺瘤、肺癌、卵巢瘤、肝癌、乳腺癌、肾瘤、前列腺瘤、胃肠瘤、黑素瘤、子宫颈瘤、膀胱瘤、成胶质细胞瘤以及头颈瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是结直肠癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是卵巢瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是肺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是胰腺瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是包含 APC 基因中的失活突变的结直肠癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是不包含 APC 基因中的失活突变的结直肠癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP01 的表达水平升高的卵巢瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平升高的胰腺瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平升高的结肠瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平升高的肺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平升高的黑素瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平升高的乳腺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP03 的表达水平升高的肺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP03 的表达水平升高的卵巢瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP03 的表达水平升高的乳腺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP03 的表达水平升高的结肠瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP04 的表达水平升高的乳腺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP04 的表达水平升高的肺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP04 的表达水平升高的卵巢瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP01 的表达水平高的卵巢瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平高的胰腺瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平高的结肠瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平高的肺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平高的黑素瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP02 的表达水平高的乳腺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP03 的表达水平高的肺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP03 的表达水平高的卵巢瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP03 的表达水平高的乳腺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP03 的表达水平高的结肠瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP04 的表达水平高的乳腺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP04 的表达水平高的肺癌。在一些实施方式中,所述肿瘤是 RSP04 的表达水平高的卵巢瘤。

[0241] 本发明还提供用于治疗癌的方法,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述癌的特征在于表达的至少一种 RSP0 蛋白的水平与正常组织中的同一 RSP0 蛋白的表达水平相比升高的细胞。在一些实施方式中,所述癌的特征在于过表达 RSP01 的细胞。在一些实施方式中,所述癌的特征在于过表达 RSP02 的细胞。在一些实施方式中,所述癌的特征在于过表达 RSP03 的细胞。在一些实施方式中,所述癌过表达选自 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 组成的组中的至少一种 RSP0 蛋白。在一些实施方式中,所述癌的特征在于表达 β -连环素的细胞,其中所述 RSP0- 结合剂(例如,抗体)干扰 RSP0- 诱导的 β -连环素信号传导和 / 或激活。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP01,并且抑制或减少所述癌的生长。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP02,并且抑制或减少所述癌的生长。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP03,并且抑制或减少所述癌的生长。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP01,干扰 RSP01/LGR 相互作用,并且抑制或减少所述癌的生长。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP02,干扰 RSP02/LGR 相互作用,并且抑制或减少所述癌的生长。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP03,干扰 RSP03/LGR 相互作用,并且抑制或减少所述癌的生长。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP01,抑制 β -连环素激活,并且抑制或减少所述癌的生长。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP02,抑制 β -连环素激活,并且抑制或减少所述癌的生长。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP03,抑制 β -连环素激活,并且抑制或减少所述癌的生长。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP01,并且减少所述癌中癌干细胞的频率。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP02,并且减少所述癌中癌干细胞的频率。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂结合 RSP03,并且减少所述癌中癌干细胞的频率。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗-RSP01 抗体。在一些实施方式中,所述抗-RSP01 抗体是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述抗-RSP01 抗体是抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗-RSP02 抗体。在一些实施方式中,所述抗-RSP02 抗体是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述抗-RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述抗-RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是抗-RSP03 抗体。

[0242] 本发明提供治疗癌的方法,所述方法包括对受试对象(例如需要治疗的受试对象)施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述受试对象是人。在一些实施方式中,所述受试对象具有癌性肿瘤。在一些实施方式中,所述受试对象具有的肿瘤已经除去。在一些实施方式中,治疗癌的方法包括对受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂,其中所述受试对象具有至少一种 RSP0 蛋白的表达升高的肿瘤。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP01 的表达升高的卵巢瘤,并且对其施用 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP01 的表达升高的卵巢瘤,并且对其施用抗-RSP01 抗体。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP01 的表达升高的卵巢瘤,并且对其施用抗体 89M5。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP01 的表达升高的卵巢瘤,并且对其施用抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的卵巢瘤,并且对其施用 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的卵巢瘤,并且对其施用抗-RSP02 抗体。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的卵巢瘤,并且

对其施用抗体 130M23。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的卵巢瘤,并且对其施用抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的胰腺瘤,并且对其施用抗体 130M23。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的胰腺瘤,并且对其施用抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的胰腺瘤,并且对其施用抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的结肠瘤,并且对其施用抗体 130M23。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的结肠瘤,并且对其施用抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP02 的表达升高的结肠瘤,并且对其施用抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述受试对象具有 RSP03 的表达升高的肺癌,并且对其施用抗-RSP03 抗体。

[0243] 在一些实施方式中,所述癌是选自由以下癌组成的组中的癌:结直肠癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃肠癌、黑素瘤、子宫颈癌、膀胱癌、成胶质细胞瘤以及头颈癌。在一些实施方式中,所述癌是胰腺癌。在一些实施方式中,所述癌是卵巢癌。在一些实施方式中,所述癌是结直肠癌。在一些实施方式中,所述癌是乳腺癌。在一些实施方式中,所述癌是前列腺癌。在一些实施方式中,所述癌是肺癌。

[0244] 此外,本发明提供减少受试对象中肿瘤的致癌性的方法,所述方法包括对受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述肿瘤包含癌干细胞。在一些实施方式中,通过减少所述肿瘤中癌干细胞的频率而减少肿瘤的致癌性。在一些实施方式中,所述方法包括使用本文描述的 RSP01- 结合剂、RSP02- 结合剂或 RSP03- 结合剂。在一些实施方式中,通过施用 RSP0- 结合剂而减少所述肿瘤中癌干细胞的频率。

[0245] 在一些实施方式中,所述方法还包括确定所述肿瘤或癌中至少一种 RSP0 蛋白的表达水平的步骤。在一些实施方式中,确定所述肿瘤或癌中 RSP0 的表达水平的步骤包括确定 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 的表达水平。在一些实施方式中,将肿瘤或癌中 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 的表达水平与正常组织中 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 的表达水平进行比较。在一些实施方式中,将肿瘤或癌中 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 的表达水平与正常组织中 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 的预定表达水平进行比较。在一些实施方式中,所述方法还包括确定所述肿瘤或癌是否具有 APC 基因中的失活突变的步骤。在一些实施方式中,所述方法还包括确定所述肿瘤或癌是否具有 β - 连环素基因中的激活突变的步骤。在一些实施方式中,确定 RSP0 的表达水平的步骤在治疗之前完成。在一些实施方式中,如果所述肿瘤或癌具有的 RSP0 表达水平与正常组织中相同 RSP0 蛋白的表达相比升高,则对所述受试对象施用本文描述的 RSP0- 结合剂或抗体。例如,在一些实施方式中,如果所述肿瘤或癌具有的 RSP01 表达水平与正常组织中 RSP01 蛋白的表达水平相比升高,则对所述受试对象施用 RSP01- 结合剂(例如,抗-RSP01 抗体)。在一些实施方式中,如果所述肿瘤或癌具有的 RSP02 表达水平与正常组织中 RSP02 蛋白的表达水平相比升高,则对所述受试对象施用 RSP02- 结合剂(例如,抗-RSP02 抗体)。在一些实施方式中,如果所述肿瘤或癌具有的 RSP03 表达水平与正常组织中 RSP03 蛋白的表达水平相比升高,则对所述受试对象施用 RSP03- 结合剂(例如,抗-RSP03 抗体)。如果所述肿瘤的表达超过一种 RSP0 蛋白的表达水平升高,则对所述受试对象首先施用针对与正常组织相比过表达最多的 RSP0 蛋白的 RSP0- 结合剂或抗体。在一些实施方式中,如果所述肿瘤或癌具有 APC 基因中的突

变,则对所述受试对象本文描述的施用 RSP0- 结合剂或抗体。

[0246] 此外,本发明提供鉴定用 RSP0- 结合剂治疗的人受试对象的方法,所述方法包括确定所述受试对象是否具有 RSP0 表达水平与正常组织中相同 RSP0 蛋白的表达相比升高的肿瘤。在一些实施方式中,如果所述肿瘤具有的 RSP0 表达水平升高,则选择所述受试对象以用特异性结合 RSP0 蛋白的抗体治疗。在一些实施方式中,如果选定用于治疗,则对所述受试对象施用本文描述的 RSP0- 结合剂或抗体。在一些实施方式中,如果所述肿瘤具有的超过一种 RSP0 的表达水平升高,则对所述受试对象施用结合表达水平最高的 RSP0 蛋白的 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述受试对象具有的肿瘤已经除去。例如,在一些实施方式中,确定肿瘤中 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 的表达水平,如果所述肿瘤具有的 RSP01 表达水平与正常组织中 RSP01 的水平相比升高,则选择所述受试对象以用特异性结合 RSP01 的抗体进行治疗。如果选定用于治疗,则对所述受试对象施用本文描述的抗 -RSP01 抗体。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述受试对象具有的肿瘤已经除去。例如,在一些实施方式中,确定肿瘤中 RSP01、RSP02、RSP03 和 / 或 RSP04 的表达水平,如果所述肿瘤具有的 RSP02 表达水平与正常组织中 RSP02 的水平相比升高,则选择所述受试对象以用特异性结合 RSP02 的抗体进行治疗。如果选定用于治疗,则对所述受试对象施用本文描述的抗 -RSP02 抗体。在一些实施方式中,所述抗 -RSP02 抗体是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述抗 -RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述抗 -RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述受试对象具有的肿瘤已经除去。

[0247] 本发明提供选择用 RSP0- 结合剂治疗的人受试对象的方法,所述方法包括确定所述受试对象是否具有至少一种 RSP0 蛋白的表达水平升高的肿瘤,其中如果所述肿瘤具有的至少一种 RSP0 蛋白的表达水平升高,则选择所述受试对象以用特异性结合表达水平升高的 RSP0 蛋白的抗体进行治疗。本发明提供选择用 RSP0- 结合剂治疗的人受试对象的方法,所述方法包括确定所述受试对象是否具有至少一种 RSP0 蛋白的表达水平高的肿瘤,其中如果所述肿瘤具有的至少一种 RSP0 蛋白的表达水平高,则选择所述受试对象以用特异性结合表达水平高的 RSP0 蛋白的抗体进行治疗。在一些实施方式中,表达水平“升高”或“高”是与相同组织类型的正常组织中的相同 RSP0 蛋白的表达水平相比。在一些实施方式中,表达水平“升高”或“高”是与相同肿瘤类型的其他肿瘤中的相同 RSP0 蛋白的表达水平相比。在一些实施方式中,如果选定用于治疗,则对所述受试对象施用本文描述的 RSP0- 结合剂或抗体。在一些实施方式中,所述受试对象具有的肿瘤已经除去。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述抗 -RSP01 抗体是抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述抗 -RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述抗 -RSP02 抗体是抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP03- 结合剂。

[0248] 本发明还提供治疗人受试对象中的癌的方法,所述方法包括:(a) 基于或至少部分基于具有 RSP01 的表达水平升高或高的癌的受试对象选择受试对象,和 (b) 对所述受试

对象施用治疗有效量的本文描述的 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 h89M5-H2L2。

[0249] 本发明还提供治疗人受试对象中的癌的方法,所述方法包括:(a) 基于或至少部分基于具有 RSP02 的表达水平升高或高的癌的受试对象选择受试对象,和 (b) 对所述受试对象施用治疗有效量的本文描述的 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 h130M23-H1L6。

[0250] 本发明还提供治疗人受试对象中的癌的方法,所述方法包括:(a) 基于或至少部分基于具有 RSP03 的表达水平升高或高的癌的受试对象选择受试对象,和 (b) 对所述受试对象施用治疗有效量的本文描述的 RSP03- 结合剂。

[0251] 用于确定细胞、肿瘤或癌中 RSP0 的表达水平的方法是本领域技术人员已知的。这些方法包括但不限于,用于核酸表达的基于 PCR 的检验、微阵列分析和核苷酸测序(例如 NextGen 测序)。其他方法包括但不限于,用于蛋白质表达的蛋白质印迹分析、蛋白质阵列、ELISA 和 FACS。

[0252] 用于确定肿瘤或癌是否具有升高水平或高水平的 RSP0 表达的方法可以使用各种样品。在一些实施方式中,所述样品取自具有肿瘤或癌的受试对象。在一些实施方式中,所述样品是新鲜肿瘤/癌样品。在一些实施方式中,所述样品是冷冻肿瘤/癌样品。在一些实施方式中,所述样品是福尔马林-固定的石蜡包埋样品。在一些实施方式中,将所述样品处理成细胞裂解物。在一些实施方式中,将所述样品处理成 DNA 或 RNA。

[0253] 还提供治疗受试对象中疾病或病症的方法,其中所述疾病或病症与异常(例如,水平增加)的 β -连环素信号传导相关。还提供治疗受试对象中疾病或病症的方法,其中所述疾病或病症的特征在于干细胞和/或祖细胞的水平增加。在一些实施方式中,所述治疗方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂、多肽或抗体。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP03- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂是抗体。

[0254] 本发明还提供抑制细胞中 β -连环素信号传导的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的 RSP0- 结合剂接触。在一些实施方式中,所述细胞是肿瘤细胞。在一些实施方式中,所述方法是体内方法,其中使细胞与 RSP0- 结合剂接触的步骤包括对受试对象施用治疗有效量的所述 RSP0- 结合剂的步骤。在一些实施方式中,所述方法是体外或离体方法。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制 β -连环素信号传导。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂抑制 β -连环素的激活。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂干扰 RSP0/LGR 相互作用。在一些实施方式中,所述 LGR 是 LGR4、LGR5 和/或 LGR6。在一些实施方式中,所述 LGR 是 LGR4。在一些实施方式中,所述 LGR 是 LGR5。在一些实施方式中,所述 LGR 是 LGR6。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,所

述 RSP01- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP03- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂是抗体。

[0255] 还提供本文描述的 RSP0- 结合剂、多肽或抗体在诱导细胞(包括但不限于肿瘤细胞)分化中的应用。在一些实施方式中,诱导细胞分化的方法包括使所述细胞与有效量的本文描述的 RSP0- 结合剂(例如,抗-RSP0 抗体)接触。在一些实施方式中,诱导受试对象的肿瘤中细胞分化的方法包括对所述受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂、多肽或抗体。在一些实施方式中,诱导肿瘤细胞上的分化标记的方法包括施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂、多肽或抗体。在一些实施方式中,所述肿瘤是实体肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤选自以下肿瘤组成的组:结直肠癌、胰腺瘤、肺癌、卵巢瘤、肝癌、乳腺癌、肾瘤、前列腺瘤、胃肠瘤、黑素瘤、子宫颈瘤、膀胱瘤、成胶质细胞瘤以及头颈瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是卵巢瘤。在一些其他实施方式中,所述肿瘤是结肠瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是肺癌。在一些实施方式中,所述方法是体内方法。在一些实施方式中,所述方法是体外方法。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP03- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂是抗体。

[0256] 本发明还提供将致瘤性细胞分化成非致瘤性细胞的方法,所述方法包括使所述致瘤性细胞与 RSP0- 结合剂接触的方法。在一些实施方式中,所述方法包括对具有包含致瘤性细胞或已经除去此类肿瘤的受试对象施用所述 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述致瘤性细胞是卵巢瘤细胞。在一些实施方式中,所述致瘤性细胞是结肠瘤细胞。在一些实施方式中,所述致瘤性细胞是肺癌细胞。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP01- 结合剂是抗体 89M5。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体。在一些实施方式中,所述 RSP02- 结合剂是抗体 130M23。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂是 RSP03- 结合剂。在一些实施方式中,所述 RSP03- 结合剂是抗体。

[0257] 在一些实施方式中,用本文描述的 RSP0- 结合剂治疗的疾病不是癌。例如,所述疾病可以是代谢性疾病,例如肥胖症或糖尿病(例如,II 型糖尿病)(Jin T., 2008, Diabetologia, 51:1771-80)。作为选择,所述疾病可以是骨病,例如骨质疏松、骨关节炎或类风湿性关节炎(Corr M., 2008, Nat. Clin. Pract. Rheumatol., 4:550-6; Day 等, 2008, Bone Joint Surg. Am., 90Suppl1:19-24)。所述疾病还可以是肾病,例如多囊性肾病(Harris 等, 2009, Ann. Rev. Med., 60:321-337; Schmidt-Ott 等, 2008, Kidney Int., 74:1004-8; Benzing 等, 2007, J. Am. Soc. Nephrol., 18:1389-98)。作为选择,可以

治疗眼病,包括但不限于黄斑退化和家族性渗出性玻璃体视网膜病变(Lad等,2009,Stem Cells Dev.,18:7-16)。还可以治疗心血管疾病,包括心肌梗死、动脉粥样硬化和瓣膜障碍(Al-Aly Z.,2008,Transl. Res.,151:233-9;Kobayashi等,2009,Nat. Cell Biol.,11:46-55;van Gijn等,2002,Cardiovasc. Res.,55:16-24;Christman等,2008,Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.,294:H2864-70)。在一些实施方式中,所述疾病是肺病,例如特发性肺动脉高压或肺纤维症(Laumanns等,2008,Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.,2009,40:683-691;Königshoff等,2008,PLoS ONE,3:e2142)。在一些实施方式中,用所述RSP0-结合剂治疗的疾病是肝病,例如肝硬化或肝纤维症(Cheng等,2008,Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.,294:G39-49)。

[0258] 本发明还提供包含本文描述的RSP0-结合剂的药物组合物。在一些实施方式中,所述药物组合物还包含药学上可接受的载剂。这些药物组合物可应用在抑制受试对象(例如,人患者)中的肿瘤生长和治疗受试对象(例如,人患者)中的癌方面。

[0259] 在一些实施方式中,通过将本发明的经纯化抗体或试剂与药学上可接受的载剂(例如载体或赋性剂)组合而制备制剂以用于贮存和使用。合适的药学上可接受的载剂包括但不限于:非毒性缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;盐,例如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂,例如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六羟季铵(hexamethonium)、苯扎氯铵、苄索氯铵、酚、丁基醇或苄基醇、烷基对羟基苯甲酸酯(例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚;低分子量多肽(例如,小于约10个氨基酸残基);蛋白质,例如血清白蛋白、凝胶蛋白或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;碳水化合物,例如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,例如钠;金属络合物,例如Zn-蛋白络合物;和非离子表面活性剂,例如TWEEN或聚乙二醇(PEG)(Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,2005,University of the Sciences in Philadelphia,PA)。

[0260] 本发明的药物组合物可以以任何方式施用,以用于局部或全身治疗。施用可以通过下述方式进行:通过表皮或透皮贴剂、油膏剂、乳液剂、膏剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末的局部施用;通过吸入或吹入粉末或气溶胶而肺部给药,包括通过喷雾器、气管内和鼻内;口服施用;或胃肠外施用,包括静脉内、动脉内、肿瘤内、皮下、腹膜内、肌肉内(例如注射或输注)或颅内(例如鞘内或心室内)。

[0261] 治疗制剂可以是单位剂量形式。此类制剂包括片剂、丸剂、胶囊剂、粉末剂、颗粒剂、水或非水性介质中的溶液剂或悬浮剂、或者栓剂。在诸如片剂等固体组合物中,将主要活性成分与药物载剂混合。常规制片成分包括玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或胶以及稀释剂(例如水)。可以使用他们来形成固体预制剂组合物,所述组合物含有本发明的化合物或其非毒性药学上可接受盐的均匀混合物。然后将固体预制剂组合物细分成上述类型的单位剂型。可以将所述制剂或组合物的片剂、丸剂等包被或配合,来提供赋予延长作用的优点。例如,片剂或丸剂可以包含被外部组分覆盖的内部组合物。此外,所述两种组分可以通过肠衣分开,所述肠衣用于抵抗崩解和允许内部组分完整地通过胃或允许延迟释放。可以将各种材料用于此类肠衣或包衣,此类材料包括许多聚

合性酸,以及聚合性酸与诸如虫胶、十六烷醇和乙酸纤维素的混合物。

[0262] 本文描述的 RSP0- 结合剂或抗体还可以包封入微胶囊中。此类微胶囊可以分别例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备,例如,羟甲基纤维素或凝胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或在巨乳液(macroemulsion),如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 21 版, 2005, University of the Sciences in Philadelphia, PA 中所述。

[0263] 在一些实施方式中,药物组合物包括与脂质体复合的本发明的 RSP0- 结合剂(例如,抗体)。生产脂质体的方法是本领域技术人员已知的。例如,一些脂质体可以通过具有包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物进行反相蒸发而生产。脂质体通过规定孔径的过滤器进行挤出,以产生具有所需直径的脂质体。

[0264] 在一些实施方式中,可以生产缓释制品。缓释制品的合适实例包括含有 RSP0- 结合剂(例如抗体)的固体疏水性聚合物的半渗透基质,其中所述基质是成型品的形式(例如膜或微胶囊)。缓释基质的实例包括聚酯、诸如聚(甲基丙烯酸 2-羟基乙酯)或聚(乙炔醇)等水凝胶、聚乳酸、L-谷氨酸和 7-乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物(例如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和亮氨酸脯氨酸醋酸盐组成的可注射微球))、蔗糖乙酸异丁酸酯和聚-D(-)-3-羟基丁酸。

[0265] 在一些实施方式中,除了施用 RSP0- 结合剂(例如,抗体)之外,所述方法或治疗还包括施用至少一种另外的治疗剂。可以在施用所述 RSP0- 结合剂之前、与其同时和/或之后施用另外的治疗剂。还提供包含 RSP0- 结合剂和所述另外的治疗剂的药物组合物。在一些实施方式中,至少一种另外的治疗剂包括 1 种、2 种、3 种或更多种另外的治疗剂。

[0266] 施用两种以上治疗剂的组合治疗通常使用通过不同作用机制起作用的试剂,但不是必须如此。施用具有不同作用机制的试剂的组合治疗可以产生加合或协同效应。组合治疗可以允许每种试剂的剂量比单药治疗使用的剂量更低,由此减少毒性副作用和/或增加所述试剂的治疗指数。组合治疗可以减少发展抗性癌细胞的可能性。在一些实施方式中,组合治疗包含影响(例如抑制或杀死)非致瘤性细胞的治疗剂和影响(例如抑制或杀死)致瘤性 CSC 的治疗剂。

[0267] 在一些实施方式中, RSP0- 结合剂与至少一种另外的治疗剂的组合产生加合或协同结果。在一些实施方式中,所述组合治疗导致所述 RSP0- 结合剂的治疗指数的增加。在一些实施方式中,所述组合治疗导致所述另外试剂的治疗指数的增加。在一些实施方式中,所述组合治疗导致所述 RSP0- 结合剂的毒性和/或副作用的降低。在一些实施方式中,所述组合治疗导致所述另外试剂的毒性和/或副作用的降低。

[0268] 治疗剂的有用类别包括例如:抗微管蛋白剂、奥利斯达汀(auristatin)、DNA 小槽结合剂、DNA 复制抑制剂、烷基化剂(例如铂络合物,例如顺铂、单(铂)、双(铂)和三核铂络合物以及卡铂)、蒽环类化合物、抗生素、抗叶酸药、抗代谢药、化学治疗敏化剂、倍癌霉素(duocarmycin)、依托泊苷、氟嘧啶、离子载体(ionophore)、雷昔托普辛(lexitropsin)、亚硝基脲、顺氯氨铂(platinol)、嘌呤抗代谢药、嘌呤霉素、放射敏化剂、类固醇、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂或长春花生物碱等。在一些实施方式中,第二治疗剂是烷基化剂、抗代谢药、抗有丝分裂剂、拓扑异构酶抑制剂或血管生成抑制剂。在一些实施方式中,所述第二治疗剂是铂络合物,例如卡铂或顺铂。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是与紫杉烷组合的铂

络合物。

[0269] 可以与所述 RSP0- 结合剂组合施用的治疗剂包括化学治疗剂。因此, 在一些实施方式中, 所述方法或治疗包括与化学治疗剂或多种不同化学治疗剂的鸡尾酒剂组合施用本发明的 RSP01- 结合剂或抗体。在一些实施方式中, 所述方法或治疗包括与化学治疗剂或多种不同化学治疗剂的鸡尾酒剂组合施用本发明的 RSP02- 结合剂或抗体。在一些实施方式中, 所述方法或治疗包括与化学治疗剂或多种不同化学治疗剂的鸡尾酒剂组合施用本发明的 RSP03- 结合剂或抗体。用 RSP0- 结合剂 (例如抗体) 进行治疗可以在施用化疗剂之前、与其同时或之后发生。组合施用可以包括在单独的制剂中或使用单独的制剂共施用, 或者以任意顺序连续施用 (但通常在一定时间段内), 从而使所有活性剂能够同时发挥其生物活性。此类化学治疗剂的制备和给药可以根据制造商说明使用, 或者由熟练的从业者根据经验确定。此类化疗剂的制备和给药方案还描述于 The Chemotherapy Source Book, 第 4 版, 2008, M. C. Perry 编, Lippincott, Williams&Wilkins, Philadelphia, PA. 中。

[0270] 用于本发明的化学治疗剂包括但不限于: 烷基化剂, 例如噻替派和环磷酰胺 (CYTOXAN); 烷基磺酸盐, 例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡; 氮丙啶, 例如苯佐替派、卡波醌、美妥替哌 (meturedopa) 和乌瑞替哌 (uredopa); 乙撑亚胺和甲基蜜胺 (methylamelamine), 包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺; 氮芥, 例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磺丙脲 (cholophosphamide)、磷雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、苯丙氨酸氮芥、新氮芥、苯芥胆甾醇、松龙苯芥、氯乙环磷酰胺、尿嘧啶氮芥; 硝基脲, 例如双氯乙基亚硝脲、氯脲菌素、福莫司汀、环己亚硝脲、嘧啶亚硝脲、雷莫司汀; 抗生素, 例如阿克拉霉素、放射菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C、刺孢霉素、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素 D、柔红霉素、地托比星、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星、去甲氧基柔红霉素、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、派来霉素、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链唑霉素、杀结核菌素、乌苯美司、新制癌菌素、佐柔比星; 抗代谢药, 例如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 例如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶酰三谷氨酸、三甲曲沙; 嘌呤类似物, 例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 例如环胞苷、氮杂胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他宾、氟尿嘧啶脱氧核苷、5-FU; 雄激素, 例如卡鲁睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯; 抗肾上腺药 (anti-adrenal), 例如氨苯吡酮、米托坦、曲洛司坦; 叶酸补充剂, 例如亚叶酸 (frolinic acid); 醋葡醛内酯; 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸; 安吡啶; 比达布昔 (bestrabucil); 比山群; 依达曲沙; 磷胺氮芥 (defofamine); 秋水仙胺; 地吡醌; 依氟鸟氨酸 (elfornithine); 依利醋铵; 依托格鲁; 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明; 米托胍脲; 米托蒽醌; 莫哌达醇; 二胺硝吡啶; 喷司他丁; 蛋氨酸氮芥; 吡柔比星; 鬼臼酸; 2-乙基胍; 甲基胍; PSK; 丙亚胺; 西佐喃; 锗螺胺; 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2, 2', 2''-三氯三乙胺; 乌拉坦; 长春酰胺; 氮烯咪胺; 甘露醇氮芥; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; 加西托星 (gacytosine); 阿糖胞嘧啶 (Ara-C); 紫杉烷类, 例如紫杉醇 (TAXOL) 和多西他赛 (TAXOTERE); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨; 6-巯基嘌呤; 巯基嘌呤; 铂类似物, 例如顺铂和卡铂; 长春碱; 铂; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂霉素 C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞滨; 诺维本; 诺消灵; 替尼泊苷; 道诺霉

素；氨喋呤；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂 RFS2000；二氟甲基鸟氨酸 (DMFO)；视黄酸；埃斯培拉霉素 (esperamicin)；卡培他滨 (XELODA)；以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。化学治疗剂还包括用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂，例如抗雌激素剂包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制芳香酶的 4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、那洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬 (FARESTON)；以及抗雄激素剂例如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、醋酸亮丙瑞林和戈舍瑞林；以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在一些实施方式中，所述另外的治疗剂是顺铂。在一些实施方式中，所述另外的治疗剂是卡铂。在一些实施方式中，所述另外的治疗剂是紫杉醇（紫杉酚）。在一些实施方式中，方法包括与顺铂组合施用抗-RSP01 抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中，方法包括与顺铂组合施用抗-RSP02 抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0271] 在一些实施方式中，所述化学治疗剂是拓扑异构酶抑制剂。拓扑异构酶抑制剂是干扰拓扑异构酶（例如拓扑异构酶 I 或 II）的作用的化学治疗剂。拓扑异构酶抑制剂包括但不限于盐酸多柔比星、柠檬酸道诺霉素、盐酸米托蒽醌、放射菌素 D、依托泊苷、盐酸托泊替康、替尼泊苷 (VM-26) 和依立替康，以及他们中任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在一些实施方式中，所述另外的治疗剂是依立替康。因此，在一些实施方式中，所述治疗方法包括与拓扑异构酶抑制剂组合施用 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中，方法包括与依立替康组合施用抗-RSP01 抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中，方法包括与拓扑异构酶抑制剂组合施用 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中，方法包括与依立替康组合施用抗-RSP02 抗体 130M23 或 h130M23-H1L2。

[0272] 在一些实施方式中，所述化学治疗剂是抗代谢药。抗代谢药是这样的化学品：其与正常生化反应所需的代谢物具有类似结构，但是不同之处足以干扰细胞的一种或多种正常功能，例如细胞分裂。抗代谢药包括但不限于，吉西他滨、氟尿嘧啶、卡培他滨、甲氨喋呤钠、雷替曲塞 (ralitrexed)、培美曲塞、替加氟、胞嘧啶阿拉伯糖苷、硫鸟嘌呤、5-阿扎胞苷、6-巯基嘌呤、咪唑硫嘌呤、6-硫鸟嘌呤、喷司他丁、磷酸氟达拉滨和克拉屈滨，以及他们中任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在一些实施方式中，所述另外的治疗剂是吉西他滨。因此，在一些实施方式中，方法包括与抗代谢药组合施用 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中，方法包括与吉西他滨组合施用抗-RSP01 抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中，方法包括与抗代谢药组合施用 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中，方法包括与吉西他滨组合施用抗-RSP02 抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0273] 在一些实施方式中，所述化学治疗剂是抗有丝分裂剂，其包括但不限于结合微管蛋白的试剂。在一些实施方式中，所述试剂是紫杉烷。在一些实施方式中，所述试剂是紫杉醇或多西他赛，或紫杉醇或多西他赛的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在一些实施方式中，所述试剂是紫杉醇 (TAXOL)、多西他赛 (TAXOTERE)、结合有白蛋白的紫杉醇 (ABRAXANE)、DHA-紫杉醇或 PG-紫杉醇。在一些替代实施方式中，所述抗有丝分裂剂包括长春花生物碱，例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨或长春地辛，或其药学上可接受的盐、酸或衍生物。在一些实施方式中，所述抗有丝分裂剂是驱动蛋白 Eg5 的抑制剂或诸如 Aurora A 或 Plk1 等有丝分裂激酶的抑制剂。在一些实施方式中，当与 RSP0- 结合剂组合施用的化学治疗剂是抗有丝分裂剂时，正在治疗的癌或肿瘤是乳腺癌或乳腺瘤。

[0274] 在一些实施方式中,另外的治疗剂包括诸如小分子等试剂。例如,治疗可以包括组合施用本发明的 RSP0- 结合剂(例如抗体)与小分子,所述小分子充当针对另外的肿瘤相关抗原的抑制剂,所述抗原包括但不限于 EGFR、ErbB2、HER2 和 / 或 VEGF。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是抑制癌干细胞途径的小分子。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是 Notch 途径的抑制剂。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是 Wnt 途径的抑制剂。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是 BMP 途径的抑制剂。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是抑制 β -连环素信号传导的分子。

[0275] 在一些实施方式中,另外的治疗剂包含生物分子,例如抗体。例如,治疗可以包括组合施用本发明的 RSP0- 结合剂(例如抗体)与其他抗体,所述其他抗体针对另外的肿瘤相关抗原,其包括包括但不限于结合 EGFR、ErbB2、HER2 和 / 或 VEGF 的抗体。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是第二抗-RSP0 抗体。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是与抗-RSP01 抗体组合使用的抗-RSP02 抗体、抗-RSP03 抗体和 / 或抗-RSP04 抗体。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是与抗-RSP02 抗体组合使用的抗-RSP01 抗体、抗-RSP03 抗体和 / 或抗-RSP04 抗体。在一些实施方式中,抗-RSP01 抗体与抗-RSP02 抗体组合使用。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是对抗癌干细胞标记物具有特异性的抗体。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是结合 Notch 途径的组分的抗体。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是结合 Wnt 途径的组分的抗体。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是抑制癌干细胞途径的抗体。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是 Notch 途径的抑制剂。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是 Wnt 途径的抑制剂。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是 BMP 途径的抑制剂。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是抑制 β -连环素信号传导的抗体。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是作为血管生成抑制剂的抗体(例如,抗-VEGF 或 VEGF 受体抗体)。在一些实施方式中,所述另外的治疗剂是贝伐单抗(AVASTIN)、曲妥单抗(HERCEPTIN)、帕尼单抗(VECTIBIX)或西妥昔单抗(ERBITUX)。

[0276] 在一些实施方式中,本文描述的方法包括与 Wnt 途径抑制剂组合施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述 Wnt 途径抑制剂是卷曲蛋白(FZD)结合剂(“FZD- 结合剂”)。FZD- 结合剂的非限制性实例可见于美国专利号 7,982,013,本文通过参考并入其全部内容。FZD- 结合剂可以包括但不限于抗-FZD 抗体。在一些实施方式中,方法包括与抗-FZD 抗体组合施用 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,方法包括与抗-FZD 抗体 18R5 组合施用 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,所述 Wnt 途径抑制剂是 Wnt 蛋白结合剂(“Wnt- 结合剂”)。Wnt- 结合剂的非限制性实例可见于美国专利号 7,723,477 和 7,947,277 以及国际公开号 W02011/088127 和 W02011/088123 中,本文通过参考并入其全部内容。Wnt- 结合剂可以包括但不限于抗-Wnt 抗体和 FZD-Fc 可溶性受体。在一些实施方式中,方法包括与 FZD-Fc 可溶性受体组合施用 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,方法包括与 FZD8-Fc 可溶性受体组合施用 RSP0- 结合剂。在一些实施方式中,方法包括与抗-FZD 抗体组合施用 RSP01- 结合剂。在一些实施方式中,方法包括与抗-FZD 抗体组合施用抗-RSP01 抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,方法包括与抗-FZD 抗体 18R5 组合施用抗-RSP01 抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,方法包括与 FZD-Fc 可溶性受体组合施用抗-RSP01 抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,方法包括与 FZD8-Fc 可溶性受体组合施用抗-RSP01 抗体 89M5 或 h89M5-H2L2。在一些实施方式中,方法

包括与抗-FZD 抗体组合施用 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,方法包括与抗-FZD 抗体组合施用抗-RSP02 抗体 130M23 或 h130M23-H1L2。在一些实施方式中,方法包括与抗-FZD 抗体 18R5 组合施用抗-RSP02 抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,方法包括与 FZD-Fc 可溶性受体组合施用抗-RSP02 抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,方法包括与 FZD8-Fc 可溶性受体组合施用抗-RSP02 抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0277] 在一些实施方式中,本文描述的方法包括与超过一种另外的治疗剂组合施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂。因此,在一些实施方式中,所述治疗方法包括与化学治疗剂和 Wnt 途径抑制剂组合施用 RSP0- 结合剂。因此,在一些实施方式中,所述治疗方法包括与化学治疗剂和 Wnt 途径抑制剂组合施用 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,方法包括与化学治疗剂和抗-FZD 抗体 18R5 组合施用 RSP02- 结合剂。因此,在一些实施方式中,所述治疗方法包括与化学治疗剂和 FZD8-Fc 可溶性受体组合施用 RSP02- 结合剂。因此,在一些实施方式中,所述治疗方法包括与吉西他滨和 Wnt 途径抑制剂组合施用 RSP02- 结合剂。在一些实施方式中,方法包括与吉西他滨和抗-FZD 抗体 18R5 组合施用抗-RSP02 抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。在一些实施方式中,方法包括与吉西他滨和 FZD8-Fc 可溶性受体组合施用抗-RSP02 抗体 130M23、h130M23-H1L2 或 h130M23-H1L6。

[0278] 此外,用本文描述的 RSP0- 结合剂进行治疗可以包括与诸如一种或多种细胞因子(例如,淋巴因子、白介素、肿瘤坏死因子和/或生长因子)等另外的生物分子组合治疗,或可以伴随通过手术除去肿瘤、癌细胞或任何其他治疗医师认为必须的疗法。

[0279] 在一些实施方式中,所述治疗包括与放射性治疗组合施用本发明的 RSP0- 结合剂(例如抗体)。用 RSP0- 结合剂进行治疗可以在施加放射性疗法之前、与其同时或之后发生。此类放射性疗法的给药方案可由熟练的医学从业者确定。

[0280] 组合施用可以包括在单独的药物制剂中或使用单独的制剂共施用,或者以任意顺序连续施用(但通常在一定时间段内),从而使所有活性剂能够同时发挥其生物活性。

[0281] 应该意识到,RSP0- 结合剂与至少一种另外的治疗剂的组合可以以任意顺序或同时施用。在一些实施方式中,所述 RSP0- 结合剂可以对之前已经施用第二治疗剂进行治疗的患者施用。在一些其他实施方式中,所述 RSP0- 结合剂和第二治疗剂可以基本上同时或同时施用。例如,可以对受试对象给药 RSP0- 结合剂(例如,抗体),并同时用第二治疗剂(例如化疗剂)进行治疗过程。在一些实施方式中,RSP0- 结合剂在用第二治疗剂治疗 1 年内施用。在一些替代实施方式中,RSP0- 结合剂在用第二治疗剂进行任何治疗 10、8、6、4 或 2 个月内施用。在一些其他实施方式中,RSP0- 结合剂在用第二治疗剂进行任何治疗 4、3、2 或 1 周内施用。在一些其他实施方式中,RSP0- 结合剂在用第二治疗剂进行任何治疗 5、4、3、2 或 1 天内施用。应该进一步意识到,两种(或更多种)试剂或治疗可以在大约数小时或数分钟内(即基本上同时)施用。

[0282] 为了治疗疾病,本发明的 RSP0- 结合剂(例如,抗体)的合适剂量取决于待治疗的疾病类型、疾病的严重性和病程、疾病的响应性,所述 RSP0- 结合剂抗体是用于治疗性目的施用还是预防性目的施用、之前的治疗和患者的临床史等等,所有这些都由治疗医师裁量。所述 RSP0- 结合剂或抗体可以一次施用或在持续从数天至数月的一系列治疗中施用,或直到达到治愈或实现疾病状态的缩减(例如肿瘤尺寸的减小)。最佳给药方案可以从患者体

内的药物累积的测量结果计算,并且会根据个体抗体或试剂的相对效力而不同。给药医师可以容易地确定最佳剂量、给药方法和重复速率。在一些实施方式中,剂量为 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重 $\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重 $\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重 $\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重 $\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重 $\sim 80\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重 $\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重 $\sim 75\text{mg}/\text{kg}$ 体重或 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重 $\sim 50\text{mg}/\text{kg}$ 体重。在一些实施方式中,抗体或其他 RSP0- 结合剂的剂量为约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 体重 \sim 约 $20\text{mg}/\text{kg}$ 体重。在一些实施方式中,可以每天、每周、每月或每年一次或多次给予剂量。在一些实施方式中,每周一次、每两周一次或每三周一次给予所述抗体或其他 RSP0- 结合剂。

[0283] 在一些实施方式中, RSP0- 结合剂(例如,抗体)可以以起始较高的“加载”剂量施用,然后施用一次或多次较低的剂量。在一些实施方式中,也可以改变施用频率。在一些实施方式中,给药方案可以包括施用起始剂量,然后每周一次、每两周一次、每三周一次或每月一次施用另外的剂量(或“维持”剂量)。例如,给药方案可以包括施用起始加载剂量,然后每周施用为起始剂量一半的维持剂量。或者给药方案可以包括施用起始加载剂量,然后每隔一周施用为起始剂量一半的维持剂量。或者给药方案可以包括 3 周施用 3 次起始剂量,然后每隔一周施用例如为相同量的维持剂量。

[0284] 本领域技术人员还已知,施用任何治疗剂都可以产生副作用和/或毒性。在一些情况下,副作用和/或毒性如此严重以致于妨碍以治疗有效量施用特定的试剂。在一些情况下,药物治疗必须中断,并且可以尝试其他试剂。但是,相同治疗类别中的许多试剂通常展示相似的副作用和/或毒性,这意味着患者要么必须停止疗法,要么如果可能的话,就要遭受与所述治疗剂相关的令人不愉快的副作用。

[0285] 因此,本发明提供治疗受试对象中的癌的方法,所述方法使用间歇性给药策略来施用一种或多种试剂,这可以减少与施用 RSP0- 结合剂、化学治疗剂等相关的副作用和/或毒性。在一些实施方式中,治疗人受试对象中的癌的方法包括与治疗有效量的化学治疗剂组合对所述受试对象施用治疗有效量的 RSP0- 结合剂,其中所述试剂中的一种或两种根据间歇性给药策略施用。在一些实施方式中,所述间歇性给药策略包括对受试对象施用起始剂量的 RSP0- 结合剂,并约每 2 周 1 次施用 RSP0- 结合剂的后续剂量。在一些实施方式中,所述间歇性给药策略包括对受试对象施用起始剂量的 RSP0- 结合剂,并约每 3 周 1 次施用 RSP0- 结合剂的后续剂量。在一些实施方式中,所述间歇性给药策略包括对受试对象施用起始剂量的 RSP0- 结合剂,并约每 4 周 1 次施用 RSP0- 结合剂的后续剂量。在一些实施方式中,使用间歇性给药策略施用所述 RSP0- 结合剂,并且每周施用所述化学治疗剂。

[0286] V. 包含 RSP0- 结合剂的试剂盒

[0287] 本发明提供包含本文描述的包含 RSP0- 结合剂(例如,抗体)的试剂盒,所述试剂盒可用于执行本文描述的方法。在一些实施方式中,试剂盒包含在一个或多个容器中的针对至少一种人 RSP0 蛋白的至少一种经纯化抗体。在一些实施方式中,所述试剂盒含有对于执行检查检验所必需和/或充分的所有组件,包括实施检验用的所有控制部件、导引部件,以及用于分析和显示结果的任何必需软件。本领域技术人员会容易地意识到,能够容易地将本发明所公开的 RSP0- 结合剂引入本领域公知的已建立试剂盒格式之一。

[0288] 还提供的是包含 RSP0- 结合剂(例如,抗-RSP0 抗体)以及至少一种另外的治疗剂的试剂盒。在一些实施方式中,所述第二(或更多的)治疗剂是化学治疗剂。一些实施方

式中,所述第二(或更多的)治疗剂是 Wnt 途径抑制剂。在一些实施方式中,所述第二(或更多的)治疗剂是血管生成抑制剂。

[0289] 本发明的实施方式能够通过参考以下非限制性实例进一步定义,所述非限制性实例详细地描述了本发明的一些抗体的制备以及使用本发明的抗体的方法。对本领域技术人员显而易见的是,无需背离本发明的范围即可对材料和方法进行许多改进。

[0290] 实施例

[0291] 实施例 1

[0292] 人肿瘤中 RSP0 和 LGR 的表达

[0293] 通过微阵列分析 (GeneLogicBioExpressDataSuite) 分析来自肿瘤组织、大量人患者的良性肿瘤和恶性肿瘤样品。该数据公开了在数种肿瘤类型(包括肾、子宫内膜和卵巢)中相对于正常组织在恶性组织中 RSP01 的表达水平升高。注意到 RSP01 在卵巢癌中频繁过表达(图 1A)。此外,该数据表明,在数种肿瘤类型(包括卵巢、胰腺和肺)中相对于正常组织在恶性组织中 RSP03 的表达水平升高。此外,据发现相对于正常组织在恶性胸腺瘤、结肠瘤、肺癌和卵巢瘤织中 LGR5 和 LGR6 过表达,而 LGR4 在肺癌中过表达。相对于其他乳腺癌亚型,LGR5 和 LGR6 过表达似乎局限于三重阴性 (ER^{neg}PR^{neg}HER2^{neg}) 乳腺癌。

[0294] 从小鼠异种移植物中生长的一系列人肿瘤中分离 RNA。使用已建立的 Affymetrix 策略制备 RNA 样品并对其进行处理,以产生经标记 cRNA。按照制造商的技术手册将经处理的 RNA 杂交至 Affymetrix HG-U133plus2.0 微阵列 (Affymetrix, Santa Clara, CA)。杂交后,对微阵列进行洗涤、扫描和分析。使用 GCRMA 算法 (Bioconductor, www.bioconductor.org) 进行经扫描阵列的背景调整和信号强度标准化。

[0295] 对特定的人 RSP0 和人 LGRs 进行评价:RSP01 (241450_at)、RSP02 (1554012_at)、RSP03 (228186_s_at)、RSP04 (237423_at)、LGR4 (218326_s_at)、LGR5 (210393_at) 和 LGR6 (227819_at)。微阵列分析显示,LGR4 和 LGR6 在几乎所有肿瘤中广泛表达,发现许多肿瘤仅极大地过表达特定的 RSP0 家族成员和 LGR5 (表 2),但没有将这些表达水平与正常组织中的表达水平比较。通常而言,只有一个 RSP0 家族成员在给定肿瘤中高度表达,表明在 RSP0 家族内可能存在功能冗余。

[0296] 表 2

[0297]

肿瘤	RSPO1	RSPO2	RSPO3	RSPO4	LGR4	LGR5	LGR6
乳腺癌							
B34	4.79	4.93	303.31	4.41			
B39	20.59	588.88	22.60	4.40			
B60	4.60	4.92	10.89	64.79			
B02	4.60	4.92	692.34	4.41	2678.95	4.28	50.88
B03	5.56	4.89	1870.42	4.41	686.47	30.78	73.49
B06	4.60	4.91	4.51	120.72	274.54	4.26	20.77
B59	4.60	4.91	4.53	1158.11	200.48	4.26	6467.15
结肠瘤							
C11	4.63	4.98	4.56	4.43	3852.26	6.22	11.31
C17	4.64	5.00	4.57	4.44	2822.46	62.34	43.94
C18	4.63	4.95	13.83	4.42	2454.15	4.29	723.15
C27	6.66	980.49	4.75	4.40	5083.84	4.30	20.82
肺癌							
LU02	4.62	15190.40	4.55	4.43	13.95	4.29	14.56
LU11	4.60	4.92	4.53	4.41	999.55	4.27	146.67
LU25	4.64	5.56	11123.06	4.44	1208.92	4.29	41089
LU33	4.64	5.01	12.02	62.98	329.62	4.30	20.96
LU45	4.64	4.99	4.62	4.44	3877.47	4.29	4.86
黑素瘤							
M06	4.73	21.80	4.65	4.50	1077.93	4.34	3.90
卵巢瘤							
OV12	4.72	5.12	4.64	460.40	5383.63	1152.73	115.04
OV19	960.19	4.74	69.77	20.90	494.67	5.72	4302.78
OV22	4.66	5.10	132.85	37.43	3743.91	482.33	812.05
OV27	4.55	4.86	125.78	4.92			
OV38	9.19	4.83	3439.88	16.35	1528.12	4.24	19.49
胰腺瘤							
PN07	4.58	689.52	4.51	4.40	6777.41	4.28	746.38
PN18	4.72	2508.47	4.65	4.50	6750.73	51.15	564.94

[0298]

[0299] 实施例 2

[0300] RSPO 蛋白与 LGR5 的结合

[0301] 使用标准重组 DNA 技术通过将人 LGR5 的 22 ~ 564 位氨基酸连接至 N 末端 FLAG 标记和连接至 CD4 的跨膜结构域和 C 末端 GFP 蛋白生成细胞表面 LGR5 蛋白 (FLAG-LGR5-CD4TM-GFP)。使用标准重组 DNA 技术生成 RSPO-Fc 构建体。具体而言, 将全长人 RSPO1、RSPO2、RSPO3 和 RSPO4 框内连接至人 Fc 区, 使用杆状病毒在昆虫细胞中表达重组

RSP0-Fc 蛋白。使用蛋白 A 色谱从昆虫培养基中纯化融合蛋白。

[0302] 用 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 构建体瞬时转染 HEK-293 细胞。48 小时后,将转染细胞悬浮在含有 2%FBS 和肝素的冰冷 PBS 中,在 10 μ g/ml RSP01-Fc、RSP02-Fc、RSP03-Fc、RSP04-Fc 或 FZD8-Fc 融合蛋白的存在下在冰上温育 15 分钟。进行使用 100 μ l 缀合有 PE 的抗-人 Fc 第二抗体的第二温育,以检测由 Fc 融合蛋白结合的细胞。将细胞与作为阳性对照的抗-FLAG 抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 和与作为阴性对照的抗-PE 抗体一起温育。在 FACSCalibur 仪器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析所述细胞,使用 FlowJo 软件处理数据。

[0303] 如图 2 所示,RSP01、RSP02、RSP03 和 RSP04 都与在 HEK-293 细胞表面上表达的 LGR5 结合,而阴性对照 FZD8 不结合 LGR5。

[0304] 通过表面等离子共振对 RSP0 蛋白和 LGR5 之间的结合亲和性进行分析。使用标准重组 DNA 技术生成可溶性 LGR5-Fc 构建体。具体而言,将人 LGR5 的 1 ~ 564 位氨基酸框内连接至人 Fc,并且使用杆状病毒在昆虫细胞中表达重组 LGR5-Fc 融合蛋白。使用蛋白 A 色谱从昆虫培养基中纯化 LGR5-Fc 融合蛋白。LGR5 信号序列的切割产生含有 LGR5 的 22 ~ 564 位氨基酸的成熟 LGR5-Fc 融合蛋白。使用标准胺类化学 (NHS/EDC) 在 CM5 芯片上固定重组 RSP01-Fc、RSP02-Fc、RSP03-Fc 和 RSP04-Fc 融合蛋白。将可溶性 LGR5-Fc 的双倍稀释液注射在芯片表面上 (100nM ~ 0.78nM)。使用来自 Biacore Life Sciences (GE Healthcare) 的 Biacore2000 系统收集随时间推移的动力学数据,使用同时全拟合方程 (simultaneous global fit equation) 对数据进行拟合,以产生各 RSP0 蛋白的亲合常数 (K_D 值) (表 3)。

[0305] 表 3

[0306]

	LGR5 (nM)
RSP01	110
RSP02	14
RSP03	<1.0
RSP04	73

[0307] 人 RSP01、RSP02、RSP03 和 RSP04 都与 LGR5 结合,证明 RSP0 蛋白可以是 LGR 蛋白的配体。

[0308] 实施例 3

[0309] 抑制 β -连环素信号传导的体外测试

[0310] 为了制备细胞悬浮液,将在 NOD/SCID 小鼠中增殖的新鲜人肺腺癌异种移植物肿瘤 (表 2 中的肿瘤 #1) 切碎,并且在含有 300U/ml 的 3 型胶原酶 (Worthington, Lakewood, NJ) 和 200U/ml DNA 酶 I (Worthington, Lakewood, NJ) 的培养基 199 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中于 37 $^{\circ}$ C 消化 1 ~ 2 小时。通过 40 μ m 尼龙滤器 (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) 对肿瘤细胞进行过滤,并在 82 \times g 旋转 5 分钟。将红细胞在 ACK 缓冲液 (0.8% 氯化铵、0.1mM EDTA、10mM 碳酸氢钠、0.1N HCl) 中裂解、洗涤,并在由 HBSS (Mediatech, Manassas, VA)、25mM HEPES 缓

冲液 (Mediatech, Manassas, VA) 和 2% 热失活胎牛血清 (HI-FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) 组成的培养基中以 $150 \times g$ 离心 5 分钟。通过在 HI-FBS 的垫子上以 $82 \times g$ 离心 8 分钟而除去死细胞和碎片。在用 SM 中的 $5 \mu g/ml$ 生物素缀合的抗-H-2Kd 和 $2.5 \mu g/ml$ 抗小鼠 CD45 单克隆抗体 (BioLegend, San Diego, CA) 染色后, 每 10^6 细胞 /ml 使用 $50 \mu l$ MagnaBind 链亲和素珠 (Thermo Scientific, Waltham, MA) 使小鼠间质细胞耗尽。

[0311] 为了制造条件培养基, 在补充有 B27 补充剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 胰岛素-转铁因子-硒 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、青霉素-链霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、 $0.5 \mu g/ml$ 氢化可的松 (Stemcell Technologies, Vancouver, 加拿大)、 $20ng/ml$ EGF (MBL International, Woburn, MA)、 $20ng/ml$ 碱性 FGF (MBL International, Woburn, MA) 和 $5U/ml$ 肝素 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的 DMEM:F12(3:1) 培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中培养肺癌细胞。24 小时后, 收获所述条件培养基 (本文称为“LT”)。

[0312] 用 6xTCF- 荧光素酶报告基因载体稳定转染 STF-293 细胞。在经纯化可溶性 LGR5-Fc、FZD8-Fc、Jag-Fc 融合蛋白 ($10 \mu g/ml$)、抗-FZD 单克隆抗体 ($40 \mu g/ml$) 或抗体 LZ1 ($40 \mu g/ml$) 的存在下, 将 1 体积的肺癌细胞条件培养基 (LT) 或对照培养基添加至 STF-293 细胞。此外, 使用 Wnt3a L 细胞条件培养基作为阳性对照, 并且与肺癌细胞条件培养基 (LT) 以 1:4 的最终稀释度组合测试。使细胞温育 16 小时, 使用 Steady-Glo[®] Luciferase Assay System 根据制造商说明 (Promega, Madison, WI) 测定荧光素酶活性。

[0313] 将经纯化可溶性 LGR5-Fc 和 FZD8-Fc 融合蛋白的效应与对照 Jag1-Fc 蛋白比较, 将抗-FZD 单克隆抗体的效应与对照抗细菌溶菌酶抗体 LZ1 比较。如图 3 所示 (左侧), 肺癌细胞条件培养基 (LT) 含有增强 Wnt3a- 诱导的 β - 连环素活性的活性。在 LT 培养基中增强 β - 连环素活性的蛋白受到与 RSP0 蛋白结合的可溶性 LGR5-Fc 的抑制。该活性还被 FZD8-Fc 和抗-FZD 抗体 (为阻断 Wnt 信号传导的试剂) 抑制。可溶性 Jag-Fc 和 LZ1 不抑制所述活性。甚至在不存在 Wnt3a 时 (图 3 右侧), 所述 LT 培养基诱导 β - 连环素信号传导。可溶性 Jag-Fc 和 LZ1 不抑制该活性。与之相反, 可溶性 LGR5-Fc 抑制由 LT 培养基诱导的 β - 连环素信号传导, 将响应减少至几乎对照水平。该数据表明肺癌细胞产生具有 RSP0- 样活性的蛋白 (或多种蛋白), 该活性被 LGR5 抑制, 并且该活性区别于 Wnt3a 活性。

[0314] 使用利用肺癌细胞条件培养基和卵巢瘤细胞条件培养基的共培养检验进行类似的实验。如上所述, 将不含间质细胞的新处理肿瘤细胞培养过夜。将培养基和细胞转移至使用或不使用 Wnt3a L 细胞条件培养基的 STF-293 细胞。添加 LGR5-Fc 融合蛋白、FZD8-Fc 融合蛋白或对照 Fc 融合蛋白 ($10 \mu g/ml$)。使所述细胞温育 20 小时, 并如上所述测定荧光素酶活性。

[0315] 如图 13 所示, β - 连环素信号传导活性通过肿瘤细胞和上清液诱导, 并与 Wnt3a L 细胞条件培养基组合而得到进一步增强 (图 13A, 肺癌 LU2; 图 13B, 肺癌 LU25; 图 13C, 卵巢瘤 OV38)。FZD8-Fc (Wnt 途径抑制剂) 将 Wnt3a- 诱导的 β - 连环素活性几乎减少至背景水平, 而 LGR5-Fc 强烈地减少了肿瘤衍生的 β - 连环素活性。如上所述, 该数据表明肺癌和卵巢瘤细胞产生具有 RSP0- 样活性的蛋白 (或多种蛋白), 该活性被 LGR5 抑制, 并且该活性区别于 Wnt3a 活性。

[0316] 实施例 4

[0317] 通过可溶性 LGR5 抑制 RSP0 活性的体外测试

[0318] 如实施例 3 中所述制备来自人肺癌 #1 细胞的条件培养基,如实施例 2 中所述可溶性 LGR5-Fc 和 RSP02-Fc。

[0319] 用 6xTCF- 荧光素酶报告基因载体 (TOPflash, Millipore, Billerica, MA) 转染 HEK-293 细胞。24 至 48 小时后,将所转染的细胞与含有肺癌细胞条件培养基与 25%Wnt3a-L- 细胞条件培养基的培养基或含有 RSP02 (10ng/ml) 与 25%Wnt3a-L 细胞条件培养基的培养基一起温育。将可溶性 LGR5 以 20 μ g/ml \sim 0.02 μ g/ml 的 4 倍连续稀释液添加至所述细胞。使用 20 μ g/ml 的可溶性 Jag-Fc 蛋白作为阴性对照,使用 20 μ g/ml 的 FZD8-Fc 蛋白作为阳性对照。使细胞温育 16 小时,使用 **Steady-Glo[®]** Luciferase Assay System 根据制造商说明 (Promega, Madison, WI) 测定荧光素酶活性。

[0320] 如图 4 所示,渐增浓度的可溶性 LGR5-Fc 减少了 RSP02-Fc 与 Wnt3a- 条件培养基的组合 (-□-) 对荧光素酶活性的诱导,以及肺癌细胞条件培养基和 Wnt3a- 条件培养基的组合 (-■-) 对荧光素酶活性的诱导。阴性对照 Jag-Fc 蛋白不封闭所述荧光素酶活性,而会封闭 Wnt3a 的 FZD8-Fc 封闭了所述荧光素酶活性。重要的是,LGR5 展示了与 RSP02 蛋白和肺癌细胞条件培养基相同的抑制 EC50。该数据证明了由肺癌细胞产生的具有 RSP0- 样活性的蛋白被 LGR5 抑制,该行为与经纯化 RSP0 蛋白非常相似,并且表明肺癌细胞条件培养基中的该活性可归因于 RSP0 蛋白。

[0321] 实施例 5

[0322] 抗 -RSP01 单克隆抗体的生成

[0323] 针对重组人 RSP01 蛋白 31 ~ 263 位氨基酸生成抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。使用标准技术用 RSP01 蛋白对小鼠 (n=3) 进行免疫。在开始免疫后 70 天使用 FACS 分析就 RSP01 筛选来自个体小鼠的血清。在分离脾细胞以用于产生杂交瘤后选择具有最高抗体滴度的动物用于最后的抗原加强 (antigen boost)。使用 SP2/0 细胞作为小鼠脾细胞的融合伴侣。以 1 细胞 / 孔将杂交瘤细胞在 96 孔板上铺平板,并且针对人 RSP01 通过 FACS 分析筛选上清液。

[0324] 为了 FACS 筛选抗 -RSP01 抗体,构建能够使人 RSP01 的 N 末端弗林蛋白酶样结构域在细胞表面表达的嵌合融合蛋白。如图 5A 所示,该融合蛋白含有 N 末端 FLAG 标记和 C 末端绿色荧光蛋白标记,所述 N 末端 FLAG 标记在 RSP01 的两个弗林蛋白酶 (furin) 样结构域 (氨基酸 34 ~ 135) 之后,并且融合至人 CD4 的跨膜细胞内结构域 (FLAG-RSP01furin-CD4TM-GFP)。

[0325] 将 HEK-293 细胞用 FLAG-RSP01furin-CD4TM-GFP 转染。48 小时后,将所转染细胞悬浮在含有 2%FBS 和肝素的冰冷 PBS 中,并且在 50 μ l 杂交瘤上清液的存在下在冰上温育 30 分钟。进行使用 100 μ l 缀合有 PE 的抗 -人 Fc 第二抗体的第二温育,以检测由抗体结合的细胞。将细胞与作为阳性对照的抗 -FLAG 抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 和作为阴性对照的抗 -PE 抗体一起温育。在 FACSCalibur 仪器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析所述细胞,使用 FlowJo 软件处理数据。

[0326] 鉴定结合 RSP01 的数个杂交瘤,包括 89M2、89M4、89M5、89M7、89M19 和 89M25 (图 5B)。对来自数个这些抗体的重链可变区和轻链可变区进行测序。分析后,发现抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 包含相同的重链可变区和轻链可变区。将表达抗体 89M5 的杂交瘤

细胞系于 2011 年 8 月 30 日在布达佩斯条约的条件下保藏在 ATCC(10801University Boulevard, Manassas, VA, 美国), 并给予 ATCC 指定保藏号 PTA-11970。89M5 的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列是 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11。89M5 的重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列是 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:20。89M5 的重链 CDR 和轻链 CDR 列于本文表 1 中。89M5 的重链和轻链的氨基酸序列是 SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 ;89M5 的重链和轻链的核苷酸序列是 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:24。

[0327] 实施例 6

[0328] 抑制 RSP01 诱导 β -连环素信号传导的抗-RSP01 单克隆抗体的鉴定

[0329] 用 6xTCF- 荧光素酶报告基因载体 (TOPflash, Millipore, Billerica, MA) 转染 HEK-293 细胞。24 至 48 小时后, 将所转染的 HEK-293 细胞与 Wnt3a(5ng/ml) 和人 RSP01(10ng/ml, R&D BioSystems) 的组合在抗-RSP01 抗体 89M2、89M4、89M5、89M7、89M19 和 89M25 的存在下一起温育, 或者与无关对照抗体 254M14 和 254M26(10 μ g/ml \sim 0.625 μ g/ml 的 2 倍稀释液) 一起温育。使细胞温育 16 小时, 使用 **Steady-Glo[®]** Luciferase Assay System 根据制造商说明 (Promega, Madison, WI) 测定荧光素酶活性。

[0330] 如图 6 所示, 抗-RSP01 抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 每个都阻断信号传导, 而抗-RSP01 抗体 89M7 和 89M19 不阻断信号传导。如通过对重链可变区和轻链可变区进行测序所确定的, 抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 都包含相同的重链可变区和轻链可变区, 因此推断包含相同的抗原结合位点。这些结果证明抗-RSP01 抗体能够阻断 RSP01- 诱导的 β -连环素信号传导。

[0331] 实施例 7

[0332] 抗-RSP01 抗体阻断可溶性 RSP01 与 LGR5 的结合

[0333] 用 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 构建体瞬时转染 HEK-293 细胞 (之前在实施例 2 中描述)。48 小时后, 将所转染细胞悬浮在含有 2%FBS 和肝素的冰冷 PBS 中, 并且在 RSP01-Fc 蛋白 (10 μ g/ml) 和抗体 89M2、89M4、89M5、89M7、89M19 或 89M25(10 μ g/ml) 的存在下在冰上温育。进行使用 100 μ l 缀合有 PE 的抗人 Fc 第二抗体的第二温育, 以检测由 RSP01-Fc 融合蛋白结合的细胞。在 FACSCalibur 仪器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析所述细胞, 使用 FlowJo 软件处理数据。

[0334] 如图 7 所示, 抗-RSP01 抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 每个都阻断 RSP01 与 LGR5 的结合, 而抗-RSP01 抗体 89M7 和 89M19 不阻断 RSP01 与 LGR5 的结合。这些结果与实施例 6 中所示的结果相关, 其证明了在测定 β -连环素活性的诱导的检验中在 6xTCF 荧光素酶报告基因检验中抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 阻断 RSP01 信号传导的能力, 而抗体 89M7 和 89M19 不能阻断 RSP01 信号传导。如上所述, 抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 都包含相同的重链可变区和轻链可变区, 并且据推测包含相同的抗原结合位点, 因此预期这些抗体都以类似 (或相同) 的方式起作用。

[0335] 实施例 8

[0336] 抗-RSP01 抗体的结合亲和性

[0337] 使用来自 BiacoreLifeSciences (GE Healthcare) 的 Biacore2000 系统确定抗体 89M2、89M4、89M5 和 89M25 的 K_D 。使用标准胺类化学 (NHS/EDC) 将重组人 RSP01-Fc 或小鼠 RSP01-Fc 蛋白固定在 CM5 芯片上。在 HBS-P (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 0.005%v/v 表

面活性剂 P20) 中将所述抗体在 100nM ~ 0.78nM 范围内进行连续 2 倍稀释, 并注射在芯片表面上。随时间收集动力学数据, 并使用全拟合方程进行拟合, 以产生各抗体的亲合常数 (K_D 值)。

[0338] 表 4

[0339]

	人 RSP01 (nM)	小鼠 RSP01 (nM)
89M4	<0.1	<0.1
89M5	<0.1	<0.1
89M7	<0.1	<0.1
89M25	<0.1	<0.1

[0340] 如表 4 所示, 抗体 89M4、89M5、89M7 和 89M25 对人 RSP01 的亲合常数 (K_D) 都小于 0.1nM。这些抗体对小鼠 RSP01 的 K_D 也小于 0.1nM。

[0341] 实施例 9

[0342] 抗 -RSP01 抗体抑制卵巢瘤的体内生长

[0343] 在 6 至 8 周龄的 NOD/SCID 小鼠的乳房脂肪垫中注射解离的 OV19 卵巢瘤细胞 (1×10^5 细胞)。使肿瘤生长 45 天, 直到他们达到 134mm^3 的平均尺寸。将小鼠随机化 ($n=10$ 每组), 并用以下进行治疗: 抗 -RSP01 抗体 89M5; 89M25; 紫杉醇; 89M5 和紫杉醇的组合; 89M25 和紫杉醇的组合; 或对照抗体 1B7.11。每周一次以 15mg/kg 给药抗体, 并且每周一次以 7.5mg/ml 给药紫杉醇。通过注入腹腔进行所述抗体和紫杉醇的施用。监视肿瘤生长, 并且用电子卡尺在指定时间点测定肿瘤体积。数据表达为平均值 \pm S. E. M。

[0344] 在第 35 天, 与用对照抗体进行的治疗相比, 用抗体 89M5 进行的治疗导致使肿瘤生长减少 40%, 89M25 使肿瘤生长减少 25% (图 8, 分别为 $p=0.37$ 和 $p=0.19$)。89M5 或 89M25 与紫杉醇组合治疗导致的肿瘤生长减少大于用任一单独试剂进行的治疗。用 89M5 和紫杉醇进行治疗导致生长减少 48% ($p=0.12$, 相对于对照组), 用 89M25 和紫杉醇进行治疗导致生长减少 43% ($p=0.16$, 相对于对照组)。因此, 抗体 89M5 和 89M25 证明了作为单独试剂具有在 OV19 卵巢瘤模型中的抗肿瘤生长活性, 还展示了与紫杉醇组合的抗肿瘤生长活性。

[0345] 对来自在该实验中使用的小鼠 (对照小鼠和经治疗小鼠) 的肿瘤进行的随后分析揭示, 所述肿瘤是人卵巢瘤细胞 (OV19) 和鼠类 T 细胞淋巴瘤细胞的混合物。

[0346] 实施例 10

[0347] 抗 -RSP01 单克隆抗体 89M5 的表位作图

[0348] 为了进一步表征抗体 89M5 结合的 RSP01 的特定区, 进行表位作图实验。使用标准重组 DNA 技术产生包含人 RSP01 的不同区的一系列构建体 (参见图 9A)。构建体是各自含有 N 末端 FLAG 标记的融合蛋白, 所述 N 末端 FLAG 标记在 RSP01 蛋白的一部分之后, 并且融合至人 CD4 的跨膜细胞内结构域。在一些版本中, 所述融合蛋白还包含 C 末端绿色荧光蛋白标记。

[0349] 用各构建体转染 HEK-293 细胞。48 小时后, 将所转染细胞悬浮在含有 2%FBS 和肝素

的冰冷 PBS 中,并且在抗-RSP01 抗体 89M5 的存在下在冰上温育 30 分钟。进行使用 100 μ l 缀合有 PE 的抗-人 Fc 第二抗体的第二温育,以检测由抗体结合的细胞。将细胞与作为阳性对照的抗-FLAG 抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 和作为阴性对照的抗-PE 抗体一起温育。在 FACSCalibur 仪器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析所述细胞,使用 FlowJo 软件处理数据。

[0350] 如图 9B 中所示, FACS 分析表明, RSP01 的弗林蛋白酶 2 结构域内的氨基酸参与抗-RSP01 抗体 89M5 的结合位点 (实施例 10、图 9)。这些初步结果不排除以下事实:即其他 RSP01 结构域中的氨基酸可能不参与所述结合位点。

[0351] 实施例 11

[0352] 抗-RSP02 单克隆抗体的生成

[0353] 针对重组人 RSP02 蛋白 22-205 位氨基酸生成抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。使用标准技术用 RSP02 蛋白对小鼠 (n=3) 进行免疫。在开始免疫后 70 天使用 FACS 分析就 RSP02 筛选来自个体小鼠的血清。在分离脾细胞以用于产生杂交瘤后选择具有最高抗体滴度的动物用于最后的抗原加强。使用 SP2/0 细胞作为小鼠脾细胞的融合伴侣。以 1 细胞/孔将杂交瘤细胞在 96 孔板上铺平板,并且就人 RSP02 通过 FACS 分析筛选上清液。

[0354] 如实施例 5 中所示,为了 FACS 筛选抗-RSP02 抗体,构建能够细胞表面表达人 RSP02 的 N 末端弗林蛋白酶样结构域的嵌合融合蛋白。与图 5A 中关于 RSP01 所描述的相类似, RSP02 融合蛋白含有 N 末端 FLAG 标记和 C 末端绿色荧光蛋白标记,所述 N 末端 FLAG 标记在 RSP02 的两个弗林蛋白酶 (furin) 样结构域 (氨基酸 31 ~ 146) 之后,并且融合至人 CD4 的跨膜细胞内结构域 (FLAG-RSP02furin-CD4TM-GFP)。

[0355] 将 HEK-293 细胞用 FLAG-RSP02furin-CD4TM-GFP 转染。48 小时后,将所转染细胞悬浮在含有 2%FBS 和肝素的冰冷 PBS 中,并且在 50 μ l 杂交瘤上清液的存在下在冰上温育 30 分钟。进行使用 100 μ l 缀合有 PE 的抗-人 Fc 第二抗体的第二温育,以检测由抗体结合的细胞。将细胞与作为阳性对照的抗-FLAG 抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 和作为阴性对照的抗-PE 抗体一起温育。在 FACSCalibur 仪器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析所述细胞,使用 FlowJo 软件处理数据。

[0356] 鉴定出结合 RSP02 的数个杂交瘤,包括 130M23、130M24、130M25、130M26、130M27 和 130M28 (图 10)。对来自数个这些抗体的重链可变区和轻链可变区进行测序。将表达抗体 130M23 的杂交瘤细胞系于 2011 年 8 月 10 日在布达佩斯条约的条件下保藏在 ATCC (10801 University Boulevard, Manassas, VA, 美国),并赋予 ATCC 指定保藏号 PTA-12021。130M23 的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列是 SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28。130M23 的重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列是 SEQ ID NO:35 和 SEQ ID NO:36。130M23 的重链 CDR 和轻链 CDR 列于本文表 1 中。130M23 的重链和轻链的氨基酸序列是 SEQ ID NO:37 和 SEQ ID NO:38;130M23 的重链和轻链的核苷酸序列是 SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:40。

[0357] 实施例 12

[0358] 抑制 RSP02 诱导 β -连环素信号传导的抗-RSP02 单克隆抗体的鉴定

[0359] 用 6xTCF-荧光素酶报告基因载体 (TOPflash, Millipore, Billerica, MA) 转染

HEK-293 细胞。24 至 48 小时后,在抗-RSP02 抗体 130M23、130M24、130M25、130M26、130M27 和 130M28 的存在下将所转染 HEK-293 细胞与 Wnt3a (5ng/ml) 和人 RSP02 (10ng/ml, R&D BioSystems) 或人 RSP03 (10ng/ml, R&D BioSystems) 的组合一起温育。将细胞与 Wnt3a 和 RSP0 的组合、仅 Wnt3a 或不添加作为对照一起温育。使细胞温育 16 小时,使用 **Steady-Glo®** Luciferase Assay System 根据制造商说明 (Promega, Madison, WI) 测定荧光素酶活性。

[0360] 如图 11 所示,抗-RSP02 抗体 130M23、130M24、130M25、130M26、130M27 和 130M28 各自都减少 RSP02- 诱导的 β - 连环素信号传导,抗-RSP02 抗体 130M23、130M24 完全阻断 RSP02- 诱导的 β - 连环素信号传导。与之相反,这些抗体不阻断 RSP03 诱导的 β - 连环素信号传导。这些结果证明了抗体 130M23、130M24、130M25、130M26、130M27 和 130M28 是 RSP02 的特异性抑制剂,能够减少和 / 或完全阻断 RSP02- 诱导的 β - 连环素信号传导。

[0361] 实施例 13

[0362] 抗-RSP02 抗体阻断可溶性 RSP02 与 LGR5 的结合

[0363] 用 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 构建体瞬时转染 HEK-293 细胞 (之前在实施例 2 中描述)。48 小时后,将所转染细胞悬浮在含有 2%FBS 和肝素的冰冷 PBS 中,并且在 RSP02-Fc 蛋白 (10 μ g/ml) 和抗体 130M23、130M24、130M25、130M26、130M27 和 130M28 的存在下在冰上温育。进行使用 100 μ l 缀合有 PE 的抗-人 Fc 第二抗体的第二温育,以检测由 RSP02-Fc 融合蛋白结合的细胞。在 FACSCalibur 仪器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析所述细胞,使用 FlowJo 软件处理数据。

[0364] 如图 12 所示,抗-RSP02 抗体 130M23 和 130M24 各自阻断 RSP02 与 LGR5 的结合,而抗-RSP02 抗体 130M25、130M26、130M27 和 130M28 仅微弱阻断或不阻断 RSP02 与 LGR5 的结合。这些结果与实施例 11 所示的结果相关,其证明了抗体 130M23 和 130M24 完全阻断 RSP02- 诱导的 β - 连环素信号传导的能力,而抗体 130M25、130M26、130M27 和 130M28 是较弱的 RSP02- 诱导的 β - 连环素信号传导的抑制剂。

[0365] 实施例 14

[0366] 抗-RSP03 单克隆抗体的生成

[0367] 针对重组人 RSP03 蛋白 22 ~ 272 位氨基酸生成抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。使用标准技术用 RSP03 蛋白对小鼠 (n=3) 进行免疫。在开始免疫后 70 天使用 FACS 分析就 RSP03 筛选来自个体小鼠的血清。在分离脾细胞以用于产生杂交瘤后选择具有最高抗体滴度的动物用于最后的抗原加强。使用 SP2/0 细胞作为小鼠脾细胞的融合伴侣。以 1 细胞 / 孔将杂交瘤细胞在 96 孔板上铺平板,并且就人 RSP03 通过 FACS 分析筛选上清液。

[0368] 如实施例 5 中所示,为了 FACS 筛选抗-RSP03 抗体,构建能够细胞表面表达人 RSP0 的 N 末端弗林蛋白酶样结构域的嵌合融合蛋白。与图 5A 中关于 RSP01 所描述的相类似,RSP03 融合蛋白含有 N 末端 FLAG 标记和 C 末端绿色荧光蛋白标记,所述 N 末端 FLAG 标记在 RSP03 的弗林蛋白酶 (furin) 样结构域 (aa32-141) 之后,并且融合至人 CD4 的跨膜细胞内结构域 (FLAG-RSP03furin-CD4TM-GFP)。

[0369] 将 HEK-293 细胞用 FLAG-RSP03furin-CD4TM-GFP 转染。48 小时后,将所转染细胞悬浮在含有 2%FBS 和肝素的冰冷 PBS 中,并且在 50 μ l 杂交瘤上清液的存在下在冰上温育 30 分钟。进行使用 100 μ l 缀合有 PE 的抗-人 Fc 第二抗体的第二温育,以检测由抗体结合

的细胞。将细胞与作为阳性对照的抗-FLAG 抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 和作为阴性对照的抗-PE 抗体一起温育。在 FACSCalibur 仪器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析所述细胞,使用 FlowJo 软件处理数据。

[0370] 实施例 15

[0371] 抗-RSP02 抗体 130M23 的结合亲和性

[0372] 使用来自 BiacoreLifeSciences (GE Healthcare) 的 Biacore2000 系统确定 130M23 的 K_D 。使用标准胺类化学 (NHS/EDC) 将重组人 RSP02-Fc 或小鼠 RSP02-Fc 蛋白固定在 CM5 芯片上。在 HBS-P (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 0.005%v/v 表面活性剂 P20) 中将所述抗体在 100nM ~ 0.78nM 范围内进行连续 2 倍稀释,并注射在芯片表面上。随时间收集动力学数据,并使用全拟合方程进行拟合,以产生各抗体的亲合常数 (K_D 值)。

[0373] 抗体 130M23 对人 RSP02 的亲合常数 (K_D) 为 0.14nM, 对小鼠 RSP02 的 K_D 为 0.35nM。

[0374] 实施例 16

[0375] 抗-RSP02 抗体抑制 RSP0 活性的体外测试

[0376] 如实施例 3 中所述制备来自人肺癌 LU2 细胞的条件培养基,如实施例 2 中所述制备可溶性 LGR5-Fc。

[0377] 使 STF-293 与 LU2 细胞和 25% 的肺癌细胞条件培养基以及 25%Wnt3a-L 细胞条件培养基一起温育。将抗体 130M23 和可溶性 LGR5-Fc 以在 $50 \mu\text{g/ml} \sim 0.0006 \mu\text{g/ml}$ 范围内的 5 倍连续稀释液添加至所述细胞。使用经过类似稀释的无关单克隆抗体和对照 Fc 融合蛋白 ($50 \mu\text{g/ml}$) 作为阴性对照。使细胞温育 20 小时,使用 **Steady-Glo[®]** Luciferase Assay System 根据制造商说明 (Promega, Madison, WI) 测定荧光素酶活性。

[0378] 如图 14 所示,递增浓度的可溶性 LGR5-Fc (-●-) 减少了由肺癌细胞条件培养基和 Wnt3a 条件培养基的组合对荧光素酶活性的诱导。递增浓度的抗-RSP02 抗体 130M23 (-■-) 也减少了由肺癌细胞条件培养基和 Wnt3a 条件培养基的组合对荧光素酶活性的诱导。130M23 阻断了条件培养基诱导的活性, IC_{50} 为 129nM, 比 LGR5-Fc 的效力高 100 倍。对照 Fc 融合蛋白 (-△-), 以及无关抗体 (-□-) 不阻断荧光素酶活性。

[0379] 实施例 17

[0380] 抗-RSP0 抗体抑制胰腺瘤的体内生长

[0381] 将解离的 PN31 胰腺瘤细胞 (1×10^5 细胞) 皮下注入 6 至 8 周龄的 NOD/SCID 小鼠的侧腹中。使肿瘤生长 61 天,直到他们达到 120mm^3 的平均尺寸。将小鼠随机化 (n=10 每组),并用以下进行治疗:抗-RSP01 抗体 89M5;抗-RSP02 抗体 130M23;吉西他滨;89M5 和吉西他滨的组合;130M23 和吉西他滨的组合;或对照抗体 1B7.11。每周一次以 15mg/kg 给药抗体,并且每周一次以 30mg/ml 给药吉西他滨。通过注入腹腔进行所述抗体和吉西他滨的施用。监视肿瘤生长,并且用电子卡尺在特定时间点测定肿瘤体积。数据表达为平均值 \pm S. E. M。

[0382] 如图 15 所示,用抗-RSP01 抗体 89M5 或抗-RSP02 抗体 130M23 作为单独试剂进行治疗对肿瘤生长仅具有最小效果。与对照相比,用单独吉西他滨进行治疗将肿瘤生长减少 49% (p=0.09)。但是,89M5 或 130M23 与吉西他滨组合治疗导致的肿瘤生长减少大于用任一单独试剂进行的治疗。用 89M5 和吉西他滨进行的治疗导致生长减少 59% (p=0.015, 与对照组相比),用 130M23 和吉西他滨进行的治疗导致生长减少 58% (p=0.016, 与对照组相比)。

因此,抗-RSP01 抗体 89M5 和抗-RSP02 抗体 130M23 与的吉西他滨组合显示出在胰腺异种移植模型中的强效抗肿瘤生长活性。

[0383] 实施例 18

[0384] 抗-RSP0 抗体与 Wnt 途径抑制剂组合抑制胰腺瘤的体内生长

[0385] 将解离的 PN7 胰腺瘤细胞 (1×10^5 细胞) 皮下注入 6 至 8 周龄的 NOD/SCID 小鼠的侧腹中。使肿瘤生长 25 天,直到他们达到 130mm^3 的平均尺寸。将小鼠随机化 ($n=10$ 每组),并且用以下治疗小鼠:抗-RSP02 抗体 130M23;抗-FZD 抗体 18R5;吉西他滨;130M23 和吉西他滨的组合;18R5 和吉西他滨的组合;130M23 和 18R5 的组合;130M23、18R5 和吉西他滨的组合;或对照抗体 1B7.11。每周一次以 $10\text{mg}/\text{kg}$ 给药抗-RSP02 抗体 130M23,每周一次以 $20\text{mg}/\text{ml}$ 给药抗-FZD 抗体 18R5,并且每周一次以 $30\text{mg}/\text{ml}$ 给药吉西他滨。通过注入腹腔进行所述抗体和吉西他滨的施用。监视肿瘤生长,并且用电子卡尺在特定时间点测定肿瘤体积。数据表达为平均值 \pm S. E. M。平行实验组包括用 FZD8-Fc 可溶性受体 ($10\text{mg}/\text{kg}$) 与吉西他滨组合治疗和用 FZD8-Fc 与 130M23 和吉西他滨组合治疗。

[0386] 用抗体 130M23 或抗体 18R5 作为单独试剂进行治疗导致与用对照抗体进行治疗相比,肿瘤生长减少约 55% (图 16A, $p < 0.001$)。130M23 或 18R5 与吉西他滨组合治疗导致的肿瘤生长减少大于用任一单独试剂进行的治疗。用 130M23 和吉西他滨进行治疗导致生长减少 68% ($p < 0.001$, 相对于对照组),用 18R5 和吉西他滨进行治疗导致生长减少 75% ($p < 0.001$, 相对于对照组)。此外,130M23、吉西他滨和 18R5 的组合导致几乎完全抑制 PN7 肿瘤的生长 (图 16A)。用 130M23、吉西他滨和 FZD8-Fc 可溶性受体也看到类似的结果。因此,诸如 130M23 等抗-RSP02 抗体在抑制胰腺瘤生长方面具有单试剂活性。此外,抗-RSP02 抗体与吉西他滨的组合、或者抗-RSP02 抗体与吉西他滨以及 Wnt 途径抑制剂(诸如抗-FZD 抗体 18R5 或 FZD8-Fc 可溶性受体)的组合,据显示对于抑制胰腺瘤模型中的肿瘤生长而言是非常有效的治疗剂。

[0387] IHC 研究显示,与未治疗小鼠相比,抗-RSP02 抗体 130M23 在受治疗小鼠的 PN7 肿瘤中诱导了形态学改变。使用抗-Ki67 抗体,这些细胞还展示了增殖方面的显著下降。这些结果可能反映了肿瘤细胞的损失和间质的增加。

[0388] 对上述 PN7 肿瘤进行处理以产生单细胞悬浮液。使用生物素化抗-H2K^d 和抗-CD45 抗体和缀合有链亲和素的磁珠从细胞混合物除去小鼠细胞。将残留的人肿瘤细胞连续移植至新小鼠组中。将来自各治疗组的 90 个肿瘤细胞注入 NOD-SCID 小鼠 ($n=10$ 只小鼠/组) 的侧腹中。使肿瘤生长 40 天,不进行治疗,并且使用电子卡尺测定肿瘤体积。

[0389] 图 16C 显示来自各组中个体小鼠的肿瘤体积。与分离自用对照抗体治疗的小鼠的细胞相比,分离自用作为单试剂的抗-RSP02 抗体 130M23 或抗-FZD 抗体 18R5 或二者组合治疗的小鼠的细胞的致瘤性极大降低。该致瘤性的减少大于用单独吉西他滨观察到的致瘤性的减少。与分离自用对照抗体治疗的小鼠的细胞相比,分离自用吉西他滨和 130M23 的组合、吉西他滨和 18R5 的组合或者吉西他滨和 FZD8-Fc 的组合治疗的小鼠的细胞显示了仅轻微减少的致瘤性。令人感兴趣的是,分离自用 130M23、18R5 和吉西他滨的组合或者 130M23、FZD8-Fc 和吉西他滨的组合证明了肿瘤生长的惊人显著的缺乏,其高于任意单独的试剂或两种试剂的组合。这些结果显示,除了标准化学疗法之外抑制多种途径在减少致瘤性和癌干细胞方面具有加合效应并且可能具有协调效应。

[0390] 实施例 19**[0391] RSP0 抗体的人源化**

[0392] 生成针对人 RSP01 和 RSP02 的人源化抗体。基本上如 Larrick, J. M., 等, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160:1250 and Jones, S. T. & Bendig, M. M., 1991, *Bio/Technology* 9:88 所述使用简并 PCR 从杂交瘤系分离鼠类单克隆抗体 89M5 和 130M23 的重链可变区和轻链可变区, 并对其测序。然后将可能与亲本 89M5 或 130M23 抗体氨基酸序列结构相似的人重链和轻链可变框架区看作参照人框架区, 以帮助指导新型合成框架的设计。为了鉴定与鼠类框架具有相似性的人框架区, 针对 Genbank 中保藏的人序列, 利用 BLAST 搜索对由 89M5 和 130M23 的鼠类重链和轻链可变结构域编码的预测蛋白序列与由所表达的人 cDNA 编码的人抗体序列进行比较。对候选人源化框架重链和亲本鼠类多克隆抗体重链可变区和轻链可变区之间的氨基酸差异就可能的重要性进行评价, 对关于位置方面的每个差异是否促成正确折叠和可变区的功能进行判断。通过检查其他抗体片段的已解析晶体结构而指导该分析 (例如, 如 Trakhanov 等, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, 55:122-28 中描述的 Fab2E8 的结构以及其他蛋白晶体结构 (例如, 蛋白数据库结构 1ADQ 和 1GIG))。使用计算机软件 (包括 Jmol、快速 PDB 和 Pymol) 对结构建模。考虑特定位置处的氨基酸对 β 折叠框架、重链可变区和轻链可变区之间的相互作用、氨基酸侧链的溶剂暴露程度以及氨基酸影响 CDR 环的定位的可能性的潜在影响。由该分析, 设计出框内融合至人 IgG2 恒定区的候选重链可变区和框内融合至人 IgKC1 恒定区的候选轻链可变区并进行化学合成。候选重链和轻链包含: i) 设计成与天然人框架相似的合成框架, 和 ii) 亲本 89M5 或 130M23 鼠类抗体 CDR。

[0393] 通过共转染至哺乳动物细胞中来测试各候选变体人源化重链和轻链的功能性。将上述各候选变体人源化重链与鼠类轻链 cDNA 一起共转染至 HEK-293 细胞中, 并通过 FACS 就 RSP0 结合活性检验条件培养基。人源化 89M5 重链变体“89M5-H2”(SEQ ID NO:68) 展现了最强烈的结合, 因而选用。将 89M5-H2 人源化重链与每种候选人源化轻链共转染至 HEK-293 细胞中, 并再次通过 FACS 就抗原结合检验条件培养基。轻链变体“89M5-L2”(SEQ ID NO:69) 展现了最强烈的结合, 因而选用。类似地, 130M23 重链变体“130M23-H1”(SEQ ID NO:70) 展现了最强烈的结合, 因而选用。将 130M23-H1 人源化重链与每种候选人源化轻链共转染至 HEK-293 细胞中, 并再次通过 FACS 就抗原结合检验条件培养基。轻链变体“130M23-L2”(SEQ ID NO:71) 展现了最强烈的结合, 因而选用。

[0394] 为了增加抗体的产生, 生成 130M23-H1L2 变体。该变体包含与 130M23-H1L2 相同的重链, 但是具有修饰的轻链, 将其称为 h130M23-H1L6。

[0395] 实施例 20**[0396] 人源化 89M5 和人源化 130M23 的结合亲和性**

[0397] 使用来自 BiacoreLifeSciences (GE Healthcare) 的 Biacore2000 系统确定 h89M5-H2L2 的 K_D 。使用标准胺类化学 (NHS/EDC) 将重组人 RSP01-Fc 或小鼠 RSP01-Fc 蛋白固定在 CM5 芯片上。在 HBS-P (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 0.005%v/v 表面活性剂 P20) 中将所述抗体在 100nM ~ 0.78nM 范围内进行连续 2 倍稀释, 并注射在芯片表面上。随时间收集动力学数据, 并使用全拟合方程进行拟合, 以产生各抗体的亲合常数 (K_D 值)

[0398] h89M5-H2L2 对人 RSP01 和小鼠 RSP01 的亲合常数 (K_D) 小于 0.1nM。

[0399] 使用来自 BiacoreLifeSciences (GE Healthcare) 的 Biacore2000 系统确定 h130M23-H1L2 和 h130M23-H1L6 的 K_D 。使用标准胺类化学 (NHS/EDC) 将重组人 RSP02-Fc 蛋白固定在 CM5 芯片上。在 HBS-P (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 0.005%v/v 表面活性剂 P20) 中将所述抗体在 100nM ~ 0.78nM 范围内进行连续 2 倍稀释, 并注射在芯片表面上。随时间收集动力学数据, 并使用全拟合方程进行拟合, 以产生各抗体的亲合常数 (K_D 值)

[0400] h130M23-H1L2 对人 RSP02 的亲合常数 (K_D) 为 0.13nM, h130M23-H1L6 对人 RSP02 的亲合常数 (K_D) 为 0.15nM。

[0401] 实施例 21

[0402] 抗-RSP0 抗体的 FACS 结合

[0403] 用编码 FLAG-RSP01furin-CD4TM-GFP 的表达载体瞬时转染 HEK293 细胞。如实施例 5 中所示, FLAG-RSP01furin-CD4TM-GFP 是能够使人 RSP01 的 N 末端弗林蛋白酶样结构域在细胞表面表达的嵌合融合蛋白。在抗-RSP01 抗体 89M5 或人源化抗-RSP01 抗体 h89M5-H2L2 的存在下, 对经 FLAG-RSP01furin-CD4TM-GFP 转染的细胞进行温育。对每种抗体的 5 倍连续稀释液就其与表达 RSP01 的细胞结合的能力进行检查。用缀合有藻红蛋白的抗-IgG 对细胞染色, 以显示结合抗体。在 FACSCalibur 仪器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析所述细胞, 使用 FlowJo 软件处理数据。

[0404] 如图 17A 所示, 这些研究表明, 抗-RSP01 抗体 89M5 和人源化抗-RSP01 抗体 h89M5-H2L2 都与人 RSP01 结合。

[0405] 用编码 FLAG-RSP02furin-CD4TM-GFP 的表达载体瞬时转染 HEK293 细胞。如实施例 11 中所示, FLAG-RSP02furin-CD4TM-GFP 是能够使人 RSP02 的 N 末端弗林蛋白酶样结构域在细胞表面表达的嵌合融合蛋白。在抗-RSP02 抗体 130M23 或人源化抗-RSP02 抗体 h130M5-H1L2 的存在下, 对 FLAG-RSP02furin-CD4TM-GFP 转染的细胞进行温育。对每种抗体的 5 倍连续稀释液就其与表达 RSP02 的细胞结合的能力进行检查。用缀合有藻红蛋白的抗-IgG 对细胞染色, 以显示结合抗体。在 FACSCalibur 仪器 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析所述细胞, 使用 FlowJo 软件处理数据。

[0406] 如图 17B 所示, 这些研究表明, 抗-RSP02 抗体 130M23 和人源化抗-RSP02 抗体 h130M23-H1L2 都与人 RSP02 结合。

[0407] 实施例 22

[0408] 抗-RSP0 抗体与化学治疗剂组合抑制乳腺癌的体内生长

[0409] 将解离的 OMP-B39 乳腺癌细胞 (4×10^5 细胞) 皮下注入 6 至 8 周龄的 NOD/SCID 小鼠的侧腹中。OMP-039 是三阴性乳腺癌肿瘤, 具有高水平的 RSP02 表达。此外, RSP01 的表达高于实施例 1 中表征的其他乳腺癌 (参见表 2)。使肿瘤生长 39 天, 直到他们达到 120mm^3 的平均尺寸。将小鼠随机化 ($n=10$ 每组), 并用以下进行治疗: 抗-RSP01 抗体 89M5 和抗-RSP02 抗体 130M23 的组合; 顺铂; 抗-RSP01 和抗 RSP02 抗体与顺铂的组合; 或者对照抗体。每周一次以 15mg/kg 给药抗体, 并且每周一次以 1.5mg/ml 给药顺铂。通过注入腹腔进行所述抗体和顺铂的施用。监视肿瘤生长, 并且用电子卡尺在指定天数测定肿瘤体积。数据表达为平均值 \pm S. E. M。

[0410] 如图 18 所示, 抗-RSP01 抗体 89M5 和抗-RSP02 抗体 130M23 与顺铂的组合比仅顺铂更好地抑制肿瘤生长 ($p=0.04$, 组合组与仅顺铂相比)。三者组合具有更显著的效应, 但

事实上抗体 89M5 和 130M25 的组合（不具有顺铂）对该肿瘤仅具有最小效应。

[0411] 应该理解的是本文描述的实施例和实施方式仅出于说明性目的，会启示本领域技术人员考虑其各种改进或变化，并且其应包含在本申请的主旨和意图之内。

[0412] 本文引用的任何出版物、专利、专利申请、网址和登录号 / 数据库序列（包括多核苷酸序列和多肽序列）都是以全文引用的方式并入，其引用程度等同于将每个单独的出版物、专利、专利申请、网址和登录号 / 数据库序列特定且个别地以全文引用的方式并入。

[0413] 序列

[0414] 具有信号序列的人 RSP01 蛋白序列 (SEQ ID NO:1)

[0415] MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGKRQRRI SAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRCYPACPEGSSAANGTMECSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGGQGRREANRNLARKESKEAGAGSRRRKGGQQQQQQGTVGPLTSAGPA

[0416] 具有信号序列的人 RSP02 蛋白序列 (SEQ ID NO:2)

[0417] MQFRLFSFALIILNCDYSHCQGNRWRRSKRASYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGGYGHAPDMNRCARCIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGCEVGHWSEWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKPVKDTIPCPTIAESRRCKMTMRHCPGGKRTPKAKEKRNKKKKRKLIERAQEQHSVFLATDRANQ

[0418] 具有信号序列的人 RSP03 蛋白序列 (SEQ ID NO:3)

[0419] MHLRLISWLFIIILNFMEYIGSQNASRGRRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCPKRLLFFALERIGMKQIGVCLSSCPSGGYGYTRYPDINKCTKCKADCDFCNKFNCTKCKSGFYHLHGKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIVHCEVSEWNPWPSPCTKKGKTCGFKRGTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTNETRKTCTVQRKKCQKGERGKKGREKRRKKPNKGESKEAIPDSKSLESSKEIPEQRENKQQQKKRQVQDKQKSVSVSTVH

[0420] 具有信号序列的人 RSP04 蛋白序列 (SEQ ID NO:4)

[0421] MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCII CSEENGSTCQQRLFLFIRREGIRQYGKCLHDCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSDFCIRCKRQFYLYKGGKCLPTCPPGTLAHQNTRECQGECELGPWGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREAGRAGHEEAATCQVLSERKCP IQRPCPGERSPGQKKGRKDRRPRKDRKLDRLDVRPRQPGLQP

[0422] 不具有预测的信号序列的人 RSP01 蛋白序列 (SEQ ID NO:5)

[0423] SRGIKGKRQRRI SAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRCYPACPEGSSAANGTMECSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGGQGRREANRNLARKESKEAGAGSRRRKGGQQQQQQGTVGPLTSAGPA

[0424] 人 RSP01 弗林蛋白酶样结构域 1 (SEQ ID NO:6)

[0425] AEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFD

[0426] 人 RSP01 弗林蛋白酶样结构域 2 (SEQ ID NO:7)

[0427] MNKCIKCKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRCYPACPEGSSA

[0428] 人 RSP01 血小板反应蛋白结构域 (SEQ ID NO:8)

[0429] QCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCP

[0430] 人 RSP01 的 31 ~ 263 位氨基酸 (SEQ ID NO:9)

[0431] RISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKI
EHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRCPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERT
RRVLHAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSRRRKGGQQQQQQGT
VGPLTSAGPA

[0432] 89M5 重链可变区 (SEQ ID NO:10)

[0433] EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYFTFTGYTMHWVRQSHGKTLEWIGGINPNNGGTTYNQNFKGKAT
LTVEKSSTTAYLELRSLTSEDSALYYCARKEFSDGYFFAYWGQGLVTVSA

[0434] 89M5 轻链可变区 (SEQ ID NO:11)

[0435] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVIFAFAVYQQKPGQSPKLLIWASTRHTGVPDRFTGSVSGT
DYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWTFGGGKLEIK

[0436] 89M5 重链 CDR1 (SEQ ID NO:12)

[0437] TGYTMH

[0438] 89M5 重链 CDR2 (SEQ ID NO:13)

[0439] GINPNNGGTTYNQNFKG

[0440] 89M5 重链 CDR3 (SEQ ID NO:14)

[0441] KEFSDGYFFAY

[0442] 89M5 轻链 CDR1 (SEQ ID NO:15)

[0443] KASQDVIFAFA

[0444] 89M5 轻链 CDR2 (SEQ ID NO:16)

[0445] WASTRHT

[0446] 89M5 轻链 CDR3 (SEQ ID NO:17)

[0447] QQHYSTPW

[0448] FLAG 标记 (SEQ ID NO:18)

[0449] DYKDDDDK

[0450] 89M5 重链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:19)

[0451] GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAG
ACTTCTGGATACACATTCAGTGGATACACCATGCACTGGGTGAGGCAGAGCCATGGAAAGACCCTTGAGTGGATTGG
AGGTATTAATCCTAACAATGGTGGTACTACTTACAACCAGAACTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGAGAAGT
CCTCCACCACAGCCTACTTGGAGCTCCGACGCTGACATCTGAGGATCTGCACTCTATTACTGTGCAAGAAAGGAG
TTCTCTGATGGTTACTACTTTTTTGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0452] 89M5 轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:20)

[0453] GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTGGGAGACAGGGTCAACATCACCTG
CAAGGCCAGTCAGGATGTGATTTTTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAACTACTGATT
TACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGTATCTGGGACAGATTATACTCTC
ACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTGCAACATTATAGCACTCCGTGGACGTTT
GGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0454] 具有预测的下划线信号序列的 89M5 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:21)

[0455] MGWSWIFLFLLSGTAGVLESEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYFTFTGYTMHWVRQSHGKTLEWIG
GINPNNGGTTYNQNFKGKATLTVEKSSTTAYLELRSLTSEDSALYYCARKEFSDGYFFAYWGQGLVTVSSAKTT

PPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSET
VTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIKPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSW
FVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIIP
PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSV
LHEGLHNHHTKSLSHSPGK

[0456] 具有预测的下划线信号序列的 89M5 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:22)

[0457] MGFKMESQIQAFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVIFAVAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRHTGVPDRFTGVSVDYTLTISSVQAEDLALYYCQHYSTPWFVGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSS
EQLTSGGASVVCFLNFPYKIDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCETHK
TSTSPIVKSFNREC

[0458] 89M5 重链核苷酸序列 (SEQ ID NO:23)

[0459] ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCTCTGAGGTCCAGCTG
CAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCAC
TGGATACACCATGCACTGGGTGAGGCAGAGCCATGAAAAGACCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAATG
GTGGTACTACTTACAACCAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGAGAAGTCCACCACAGCCTACTTG
GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCACTCTAATACTGTGCAAGAAAGGAGTTCTCTGATGGTTACTACTT
TTTTGCTTACTGGGGCAAGGACTCTGGTCACTGTCTTTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGG
CCCCTGGATCTGCTGCCAAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTG
ACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACAC
TCTGAGCAGCTCAGTACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCA
GCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTA
TCATCTGTCTTATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGT
GGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGA
CGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCGCTCAGTCACTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTC
AATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAA
AGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGA
CCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTAATACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGA
AAGAACAATCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTG
GGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCC
ACTCTCCTGGTAAATGATAA

[0460] 89M5 轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO:24)

[0461] ATGGGCTTCAAGATGGAGTCAAGATTCAGGCATTTGTATTCTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGTGAC
GGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTGGGAGACAGGGTCAACATCACCTGCAAGGC
CAGTCAAGATGTGATTTTTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGG
CATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGTATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGC
AGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCACTTTATTAATACTGTGCAACATTAATAGCACTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCAC
CAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTG
GAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAATCTTACCCAAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGT
GAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCT

CACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCA
TTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGTGA

[0462] 不具有预测的信号序列的 89M5 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:25)

[0463] EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYFTFTGYTMHWVRQSHGKTLIEWIGGINPNNGGTTYNQNFKGKAT
LTVEKSSTTAYLELRSLTSEDSALYYCARKEFSDDGYFFAYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTL
GCLVKGYFPEPVTVTVNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVPSSETVTCNVAHPASSTKVDKIKVPRDC
GCKPCICTVPEVSSVFIKPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRS
VSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV
EWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGSYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK

[0464] 不具有预测的信号序列的 89M5 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:26)

[0465] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVIFAVAWYQQKPGQSPKLLIWASTRHTGVPDRFTGVSVSGT
DYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINV
KWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

[0466] 130M23 重链可变区 (SEQ ID NO:27)

[0467] EVKLVESGGGLVKPGGSLKFSKAASGFSFSSYAMSWVRQTPEKRLWVASISSGGSTYYPDSVKGRFTI
SRDNVRNILYLMSSLRSEDTAMYFCARGGDPGVYNGDYEDAMDYWGQGTSTVTVSS

[0468] 130M23 轻链可变区 (SEQ ID NO:28)

[0469] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIWASTRHTGVPDRFTNSGSGT
DYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

[0470] 130M23 重链 CDR1 (SEQ ID NO:29)

[0471] SSYAMS

[0472] 130M23 重链 CDR2 (SEQ ID NO:30)

[0473] SISSGGSTYYPDSVKG

[0474] 130M23 重链 CDR3 (SEQ ID NO:31)

[0475] RGGDPGVYNGDYEDAMDY

[0476] 130M23 轻链 CDR1 (SEQ ID NO:32)

[0477] KASQDVSSAVA

[0478] 130M23 轻链 CDR2 (SEQ ID NO:33)

[0479] WASTRHT

[0480] 130M23 轻链 CDR3 (SEQ ID NO:34)

[0481] QQHYSTP

[0482] 130M23 重链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:35)

[0483] GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAATTTTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTTCAGTTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTTCCGACACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGC
ATCCATTAGTAGTGGTGGTAGTACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGTCA
GGAACATCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTTCTGTGCACGAGGCGGGGAT
CCGGGGGTCTACAATGGTGACTACGAAGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0484] 130M23 轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:36)

[0485] GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTCGGAGACAGGGTCAGCATCACCTG

CAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTTCTGCTGTAGCCTGGTATCAACAAAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACTGATT
TACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAAACAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTC
ACCATCAGTAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTGAGCAACATTATAGCACTCCGTGGACGTTCC
GGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0486] 具有预测的下划线信号序列的 130M23 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:37)

[0487] MNFGLRLVFLVFLVFLKGVQCEVKLVESSGGLVKPGGSLKFSCAASGFSFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVA
SISGGSTYYPDVSVKGRFTISRDNVRNIIYLQMSLRSSEDTAMYFCARGGDPGVYNGDYEDAMDYWGQTSVTVSS
AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTW
PSETVTCNVAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEV
QFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIKTKGRPKAPQV
YTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGSYFVYSKLVNQQSNWEAGNTF
TCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

[0488] 具有预测的下划线信号序列的 130M23 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:38)

[0489] MGIKMESQIQAFVFLVLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSSAVAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRHTGVPDRFTNSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWTFFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSS
EQLTSGGASVVCFLNFPYKPDINVKWKIDGSERQNGVLSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCETHK
TSTSPIVKSFNREK

[0490] 130M23 重链核苷酸序列 (SEQ ID NO:39)

[0491] ATGAACCTCGGGCTGAGATTGGTTTTCTTGTCCCTGTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGAAGCTG
GTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAATTTCTGTGCAGCCTCTGGATTGAGTTTCAG
TAGTTATGCCATGTCTTGGGTTCCGACAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTA
GTACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGATAATGTCAGGAACATCCTGTACCTGCAA
ATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGATTTCTGTGCACGAGGCGGGGATCCGGGGGTCTACAATGGTGA
CTACGAAGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTG
TCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAAATACTCCATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCC
CCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAATCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGACGTC
TGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTACCTGCAACGTTG
CCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACA
GTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCACTTCCCCCAAAGCCAAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGT
CACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGC
ACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCCGCTCAGTCACTGAACTCCCATCATGCAC
CAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATA
AAGTCACTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGAATGGGCAGCCA
GCGGAGAACTACAAGAACAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCA
GAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGA
AGAGCCTCTCCACTCTCCTGGTAAATGA

[0492] 130M23 轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO:40)

[0493] ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGATTCAGGCATTTGTATTTCGTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGTGAC

GGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTCGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGC
 CAGTCAGGATGTGAGTTCTGCTGTAGCCTGGTATCAACAAAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGG
 CATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTACAAAACAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGT
 AGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTGACCAACTTATAGCACTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCAC
 CAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTG
 GAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGT
 GAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCT
 CACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTACCCCA
 TTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG

[0494] 不具有预测的信号序列的 130M23 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:41)

[0495] EVKLVESGGGLVKPGGSLKFSKAASGFSFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGSTYYPDSVKGRFTI
 SRDNVRNLYLQMSLRSEDTAMYFCARGDPGVYNGDYEDAMDYWGQGSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNS
 MVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVSETVTCNVAHPASSTKVDKIV
 PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIKPKPKDVLTIITLTPKVTGVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNS
 TFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFPE
 DITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

[0496] 不具有预测的信号序列的 130M23 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:42)

[0497] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTNSGSGT
 DYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWFVGGGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINV
 KWKIDGSEKQNGVLNSWTDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

[0498] 不具有预测的信号序列的人 RSP02 蛋白序列 (SEQ ID NO:43)

[0499] QGNRWRRSKRASVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYYGHRAPDM
 NRCARCRIENCDFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECEVGEVGHWSEWGTCSRNNRTCGFKW
 GLETRTRQIVKKPVKDTIPCPTIAESRRCKMTMRHCPGGKRTPKAKEKRNKKKKRKLIERAQEQHSVFLATDRANQ

[0500] 人 RSP02 的 22 ~ 205 位氨基酸 (SEQ ID NO:44)

[0501] QGNRWRRSKRASVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYYGHRAPDM
 NRCARCRIENCDFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECEVGEVGHWSEWGTCSRNNRTCGFKW
 GLETRTRQIVKKPVKDTIPCPTIAESRRCKMTMRHCPG

[0502] 人 RSP02 弗林蛋白酶样结构域 1 (SEQ ID NO:45)

[0503] YVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFLLRREGMRQYGECLHSCPSGYYG

[0504] 人 RSP02 弗林蛋白酶样结构域 2 (SEQ ID NO:46)

[0505] MNRCARCRIENCDFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAP

[0506] 人 RSP02 血小板反应蛋白结构域 (SEQ ID NO:47)

[0507] GCEVGHWSEWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKPVKDTIPCPTIAESRRCKMTMRHCP

[0508] 不具有预测的信号序列的人 RSP03 蛋白序列 (SEQ ID NO:48)

[0509] QNASRGRQRMMHPNVSQGCQGGCATCSYDNGCLSKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCPSGYYGTRYP
 DINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYHLGLKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCG
 FKRGTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTNETRKCTVQRKKCQKGERGKGRERKRKKPNKGESKEAIPDSKSLESSKEI
 PEQRENKQQQKKRQVQDKQKSVSVSTVH

- [0510] 人 RSP03 弗林蛋白酶样结构域 1 (SEQ ID NO:49)
- [0511] PNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCPSGYYG
- [0512] 人 RSP03 弗林蛋白酶样结构域 2 (SEQ ID NO:50)
- [0513] INKCTKCKADCDFNKNFCTKCKSGFYHLHLGKCLDNCPEGLEA
- [0514] 人 RSP03 血小板反应蛋白结构域 (SEQ ID NO:51)
- [0515] HCEVSEWNPWPCTKKGKTCGFKRGTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTNETRKCTVQRKKCQ
- [0516] h89M5-H2L2 重链核苷酸序列 (SEQ ID NO:52)
- [0517] ATGGACTGGACCTGGAGGATACTCTTTCTCGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCCTCCAGGTCCAGCTC
GTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCTGTGAAGGTTTCCTGCAAGACTTCTGGATACACCTTCAC
TGGATACACCATGCACTGGGTTAGACAGGCCCGGACAAAGGCTGGAGTGGATGGGAGGTATTAATCCTAACAATG
GTGGTACTACTTACAACCAGAACTTCAAGGGCAGAGTACCATTACCAGGGACACATCCGCAAGCACAGCCTACATG
GAGCTGTCCAGCCTGAGATCTGAAGACACAGCTGTGTATTACTGTGCAAGAAAGGAGTTCTCTGATGGATACTACTT
TTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCTAGCGTCTTCCCTCTGG
CTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGC
CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTG
GCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTTCAGCGTCCCTACCGTTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA
- [0518] 具有预测的下划线信号序列的 h89M5-H2L2 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:53)
- [0519] MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYFTFTGYTMHWVRQAPGQRLEWMG
GINPNNGGTTYNQNFKGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKEFSDGYFFAYWGQGLVTVSSASTK
GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQ
TYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPPEPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYT
LPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0520] h89M5-H2L2 重链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:54)
- [0521] CAGGTCCAGCTCGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCTGTGAAGGTTTCCTGCAAG
ACTTCTGGATACACCTTCACTGGATACACCATGCACTGGGTTAGACAGGCCCGGACAAAGGCTGGAGTGGATGGG
AGGTATTAATCCTAACAATGGTGGTACTACTTACAACCAGAACTTCAAGGGCAGAGTACCATTACCAGGGACACAT
CCGCAAGCACAGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGATCTGAAGACACAGCTGTGTATTACTGTGCAAGAAAGGAG

TTCTCTGATGGATACTACTTTTTTGGCTTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCAGCTCA

[0522] h89M5-H2L2 重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:55)

[0523] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYFTFTGYTMHWVRQAPGQRLEWMGGINPNNGGTTYNQNFKGRVT
ITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARKEFSDGYFFAYWGQGLVTVSS

[0524] h89M5-H2L2 轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO:56)

[0525] ATGGACATGAGGGTCCCCGCACAGCTCCTGGGGCTCCTGCTCCTCTGGCTCCGGGGTGCCAGATGTGAC
ATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTCGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAGGCCTCCCA
GGATGTGATTTTTGCTGTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTGGGCATCCA
CCCGGCACACTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTG
CAACCTGAAGATTTTTGCAACTTACTACTGTTCAGCAACATTATAGCACTCCTTGGACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGT
GGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT
CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAACACCCTGACACT
GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACAA
AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGCTAA

[0526] 具有预测的下划线信号序列的 h89M5-H2L2 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:57)

[0527] MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVIFAVAWYQQKPGKAPKLL
IYWASTRHTGVPSRFSGSGSDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQHYSTPWFVGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLNTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

[0528] h89M5-H2L2 轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:58)

[0529] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTCGGAGACAGAGTCACCATCACTTG
CAAGGCCTCCCAGGATGTGATTTTTGCTGTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATC
TATTGGGCATCCACCCGGCACACTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTC
ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTTGCAACTTACTACTGTTCAGCAACATTATAGCACTCCTTGGACTTTC
GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0530] h89M5-H2L2 轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:59)

[0531] DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVIFAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGT
DYTLTISSSLQPEDFATYYCQQHYSTPWFVGGGKVEIK

[0532] h130M23-H1L2 重链核苷酸序列 (SEQ ID NO:60)

[0533] ATGGAAGTGGGACTCAGATGGGTTTTCTCGTTGCTATTCTGGAAGGAGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTG
GTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGATCTCTGCGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCTC
CTCTTATGCCATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTCTCATCCATTTCTAGTGGAGGTA
GCACATATTATCCTGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACAGCCTGTATCTGCAA
ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCTGTGTATTACTGTGCTAGAGGTGGAGATCCTGGGGTCTACAATGGAGA
TTACGAAGATGCTATGGACTACTGGGGCAAGGAACAACAGTACAGTCAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCTAGCG
TCTTCCCTCTGGCTCCCTGCAGCAGGAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTC
CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACG

TAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCCGTGCCCA
GCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTACCGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTACGCGTCCTCACCGTT
GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA
AGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

[0534] 具有预测的下划线信号序列的 h130M23-H1L2 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:61)

[0535] MELGLRWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
SISGGSTYYPD^SSVKGRFTI^SSRDNAKNSLYLQMN^SSLRAEDTAVYYCARGGDPGVYNGDYEDAMDYWGQGT^STVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN
FGTQTYTCNV^DDHKPSNTKVDK^TVERKCCVECP^PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS^VLVTVVHQD^WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI^SSKTKGQPREP
QVY^TTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ^QGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0536] h130M23-H1L2 重链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:62)

[0537] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCC^TGGTCAAGCCTGGAGGATCTCTGCGGCTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTCTCCTCTTATGCCATGCTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTCTC
ATCCATTTCTAGTGGAGGTAGCACATATTATCCTGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCA
AGAACAGCCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCTGTGTATTACTGTGCTAGAGGTGGAGAT
CCTGGGGTCTACAATGGAGATTACGAAGATGCTATGGACTACTGGGGCAAGGAACAACAGTCACAGTCAGCTCA

[0538] h130M23-H1L2 重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:63)

[0539] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGGSTYYPD^SSVKGRFTI^S
SRDNAKNSLYLQMN^SSLRAEDTAVYYCARGGDPGVYNGDYEDAMDYWGQGT^STVTVSS

[0540] h130M23-H1L2 轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO:64)

[0541] ATGAAATACCTCCTCCCTACAGCTGCCGCTGGACTCCTCCTCGCTGCCAGCCTGCCATGGCCGAC
ATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCTCCCTGTCTGCTTCCGTCCGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAGGCCTCCCA
GGATGTGTCTCTGCTGTGCTTGGTATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATTGGGCATCCA
CCAGGCACACAGGAGTCCCTTCCAGGTTCTCCGGCTCTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCTCCGTG
CAAGCTGAAGATTTT^GCAACTTACTACTGTCAGCAACATTA^TAGCACTCCTTGGACATTCGGACAAGGGACCAAGGT
GGAAATCAAAGA^AACTGTGGCTGCACCTTCTGTCTT^CATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGCTCAAATCTGGA^ACTG
CCTCCGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCCGGTAACTCCCAGGAGTCTGTACAGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTCAGCAACACCCTGACACT
GTCTAAAGCTGACTACGAGAAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA^CCCATCAGGGACTGAGCTCCCCCGTCA^CAA
AATCCTTCAACAGGGGAGAGTGCTAA

[0542] 具有预测的下划线信号序列的 h130M23-H1L2 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:65)

[0543] MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSDFTLTISSVQAEDFATYYCQQHYSTPWFQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSNLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0544] h130M23-H1L2 轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:66)

[0545] GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCCTCCCTGTCTGCTTCCGTCGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAGGCCTCCCAGGATGTGTCCTCTGCTGTCGCTGGTATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATTGGGCATCCACCAGGCACACAGGAGTCCCTTCCAGGTTCTCCGGCTCTGGATCTGGGACAGATTCACCTCACCATCAGCTCCGTGCAAGCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAACATTATAGCACTCCTTGACATTCGGACAAGGGACCAAGGTGAAAATCAAAA

[0546] h130M23-H1L2 轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:67)

[0547] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSDFTLTISSVQAEDFATYYCQQHYSTPWFQGGTKVEIK

[0548] 不具有预测的信号序列的 h89M5-H2L2 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:68)

[0549] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFGTGMHWVRQAPGQRLEWMGGINPNNGGTTYNQNFKGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARKEFSDGYFFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPKPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD^WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI^SSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0550] 不具有预测的下划线信号序列的 h89M5-H2L2 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:69)

[0551] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVIFA^VAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSDFTLTISSVQAEDFATYYCQQHYSTPWFQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSNLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0552] 不具有预测的下划线信号序列的 h130M23-H1L2 重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:70)

[0553] EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSGGSTYYPD^SVKGRFTISRDNAKNSLYLQ^MNLSLRAEDTAVYYCARGGDPGVYNGDYEDAMDYWGQGT^VTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPKPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD^WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI^SSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0554] 不具有预测的下划线信号序列的 h130M23-H1L2 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:71)

[0555] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSDFTLTISSVQAEDFATYYCQQHYSTPWFQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSNLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0556] h130M23-H1L6 轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO:72)

[0557] ATGGGCATCAAGATGAGATCAGATTCAGGCATTTGTATTCGTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGTGACGGAGACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCCTCCCTGTCTGCTTCCGTCGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAGGCCTCCCAGGATGTGTCCTCTGCTGTCGCTTGGTATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATTGGG

CATCCACCAGGCACACAGGAGTCCCTTCCAGGTTCTCCGGCTCTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
TCCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGACAAACATTATAGCACTCCTTGGACATTCGGACAAGGGAC
CAAGGTGGAAATCAAAAAGAACTGTGGCTGCACCTTCTGTCTTCATCTTCCCTCCATCTGATGAGCAGCTCAAATCTG
GAACTGCCTCCGTTGTGTGCCTGCTGAATAAATTCTATCCTAGAGAGGCCAAAAGTCCAGTGAAGGTGGATAACGCC
CTCCAATCCGGTAACTCCCAGGAGTCTGTACAGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTCAGCAACACCCT
GACTGTCTAAAGCTGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGACTGAGCTCCCCCG
TCACAAAATCCTTCAACAGGGGAGAGTGCTAA

[0558] 具有预测的下划线信号序列的 h130M23-H1L6 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:73)

[0559] MGIKMESQIQAFVFLWLSGVDGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPK
LLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYSTPWFQGTQKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSNLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

[0560] 不具有预测的下划线信号序列的 h130M23-H1L6 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:74)

[0561] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGT
DFLTITSSLPEDFATYYCQQHYSTPWFQGTQKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSNLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0562] h130M23-H1L6 轻链可变区核苷酸序列 (SEQ ID NO:75)

[0563] GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCCTCCCTGTCTGCTTCCGTCGGAGACAGAGTCACCATCACTTG
CAAGGCCTCCCAGGATGTGCTCTGCTGTGCTTGGTATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCTCCTAAGCTCCTGATC
TATTGGGCATCCACCAGGCACACAGGAGTCCCTTCCAGGTTCTCCGGCTCTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCTCCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGACAAACATTATAGCACTCCTTGGACATTC
GGACAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

[0564] h130M23-H1L6 轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:76)

[0565] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGT
DFLTITSSLPEDFATYYCQQHYSTPWFQGTQKVEIK

A. RSP01

◆ ID	◆ 来源	◆ 纯度	◆ 治疗	◆ 组织类型	◆ Avg Sig	◆ STDev	◆ PA Calls			139	278	417	556
							◆ P	◆ A	◆ M				
结肠疾病	结肠	疾病	结肠::疾病...		4.86	0.14	0	21	0				
结肠良性	结肠	良性	结肠::良性...		4.92	0.09	0	24	0				
乳腺正常	乳腺	正常	乳腺::正常...		11.25	13.18	5	17	0				
乳腺恶性	乳腺	恶性	乳腺::恶性...		4.96	0.87	1	160	0				
乳腺良性	乳腺	良性	乳腺::良性...		42.26	72.70	2	7	0				
脑良性	脑	良性	脑::良性...		4.82	0.05	0	16	0				
脑恶性	脑	恶性	脑::恶性...		4.82	0.16	0	23	0				
肝良性	肝	良性	肝::良性...		4.91	0.14	0	4	0				
肾正常	肾	正常	肾::正常...		4.88	0.12	0	61	0				
肾恶性	肾	恶性	肾::恶性...		5.70	5.24	3	88	0				
肾良性	肾	良性	肾::良性...		4.94	0.12	0	15	0				
子宫内膜恶性	子宫内膜	恶性	子宫内膜::恶性...		11.76	22.09	5	52	0				
子宫内膜良性	子宫内膜	良性	子宫内膜::良性...		16.09	23.46	3	7	0				
结肠正常	结肠	正常	结肠::正常...		4.92	0.39	0	74	0				
结肠恶性	结肠	恶性	结肠::恶性...		4.93	0.85	1	140	0				
卵巢恶性	卵巢	恶性	卵巢::恶性...		33.80	85.09	32	105	1				
卵巢正常	卵巢	正常	卵巢::正常...		5.61	1.28	0	7	0				
肺正常	肺	正常	肺::正常...		5.33	0.95	1	63	0				
卵巢良性	卵巢	良性	卵巢::良性...		20.32	38.55	5	30	0				
肺恶性	肺	恶性	肺::恶性...		4.94	0.73	0	124	0				
肺良性	肺	良性	肺::良性...		4.80	0.08	0	5	0				
肝疾病	肝	疾病	肝::疾病...		4.89	0.22	0	22	0				
肝恶性	肝	恶性	肝::恶性...		4.92	0.15	0	25	0				
肝正常	肝	正常	肝::正常...		4.95	0.13	0	6	0				
前列腺恶性	前列腺	恶性	前列腺::恶性...		5.00	0.69	0	73	0				
前列腺正常	前列腺	正常	前列腺::正常...		6.03	6.23	0	32	0				
胰腺正常	胰腺	正常	胰腺::正常...		4.99	0.11	0	13	0				
前列腺疾病	前列腺	疾病	前列腺::疾病...		5.97	2.20	2	18	0				
胰腺良性	胰腺	良性	胰腺::良性...		4.93	0.13	0	5	0				
胰腺恶性	胰腺	恶性	胰腺::恶性...		4.79	0.11	0	66	0				
ID	来源	纯度	治疗	组织类型	Avg Sig	STDev	P	A	M	139	278	417	556



图 1

B. RSPO2

◆ ID	◆ 来源	◆ 纯度	◆ 治疗	◆ 组织类型	◆ Avg Sig	◆ STDev	PA Calls			152	304	456	609
							◆ P	◆ A	◆ M				
结肠疾病	结肠	疾病	结肠::疾病...		28.82	51.62	16	5	0				
结肠良性	结肠	良性	结肠::良性...		7.40	6.58	3	21	0				
乳腺正常	乳腺	正常	乳腺::正常...		7.04	7.00	1	21	0				
乳腺恶性	乳腺	恶性	乳腺::恶性...		5.82	2.16	5	156	0				
乳腺良性	乳腺	良性	乳腺::良性...		5.59	0.12	1	8	0				
脑良性	脑	良性	脑::良性...		5.66	0.15	0	16	0				
脑恶性	脑	恶性	脑::恶性...		16.70	30.11	11	12	0				
肝良性	肝	良性	肝::良性...		6.00	0.43	0	4	0				
肾正常	肾	正常	肾::正常...		5.76	0.22	0	61	0				
肾恶性	肾	恶性	肾::恶性...		5.61	0.20	1	90	0				
肾良性	肾	良性	肾::良性...		18.30	34.71	5	10	0				
子宫内腺恶性	子宫内腺	恶性	子宫内腺恶性...		6.31	3.17	7	49	1				
子宫内腺良性	子宫内腺	良性	子宫内腺良性...		5.54	0.10	0	10	0				
结肠正常	结肠	正常	结肠...		14.65	25.57	43	28	3				
结肠恶性	结肠	恶性	结肠::恶性...		6.67	11.61	10	130	1				
卵巢恶性	卵巢	恶性	卵巢::恶性...		10.33	50.15	7	131	0				
卵巢正常	卵巢	正常	卵巢::正常...		5.64	0.14	0	7	0				
肺正常	肺	正常	肺::正常...		16.18	14.17	53	11	0				
卵巢良性	卵巢	良性	卵巢::良性...		5.66	0.41	4	31	0				
肺恶性	肺	恶性	肺::恶性...		7.00	5.27	26	96	2				
肺良性	肺	良性	肺::良性...		5.61	0.15	0	5	0				
肝疾病	肝	疾病	肝::疾病...		6.30	2.71	1	21	0				
肝恶性	肝	恶性	肝::恶性...		5.91	0.42	0	24	1				
肝正常	肝	正常	肝::正常...		5.96	0.27	0	6	0				
前列腺恶性	前列腺	恶性	前列腺::恶性...		18.11	61.02	40	31	2				
前列腺正常	前列腺	正常	前列腺::正常...		18.65	23.89	22	9	1				
胰腺正常	胰腺	正常	胰腺::正常...		5.98	0.23	0	13	0				
前列腺疾病	前列腺	疾病	前列腺::疾病...		23.87	18.90	17	3	0				
胰腺良性	胰腺	良性	胰腺::良性...		156.95	337.67	1	4	0				
胰腺恶性	胰腺	恶性	胰腺::恶性...		5.57	0.17	1	65	0				
ID	来源	纯度	治疗	组织类型	Avg Sig	STDev	P	A	M	152	304	456	609

图 1

C. RSPO3

◆ ID	◆ 来源	◆ 纯度	◆ 治疗	◆ 组织类型	◆ Avg Sig	◆ STDev	PA Calls			1405	2810	4216	5621
							◆ P	◆ A	◆ M				
结肠疾病	结肠	疾病	结肠::疾病...		424.06	396.34	21	0	0				
结肠良性	结肠	良性	结肠::良性...		20.73	33.58	9	15	0				
乳腺正常	乳腺	正常	乳腺::正常...		176.15	140.69	21	1	0				
乳腺恶性	乳腺	恶性	乳腺::恶性...		75.62	435.84	133	26	2				
乳腺良性	乳腺	良性	乳腺::良性...		237.01	342.37	9	0	0				
脑良性	脑	良性	脑::良性...		803.28	1306.74	13	2	1				
脑恶性	脑	恶性	脑::恶性...		10.15	8.10	5	17	1				
肝良性	肝	良性	肝::良性...		87.84	68.68	4	0	0				
肾正常	肾	正常	肾::正常...		24.72	27.21	39	22	0				
肾恶性	肾	恶性	肾::恶性...		99.48	283.90	54	33	4				
肾良性	肾	良性	肾::良性...		1032.08	1889.99	7	8	0				
子宫内腺恶性	子宫内腺	恶性	子宫内腺::恶性...		176.43	285.60	43	14	0				
子宫内腺良性	子宫内腺	良性	子宫内腺::良性...		3288.94	1998.11	10	0	0				
结肠正常	结肠	正常	结肠::正常...		118.87	137.80	73	1	0				
结肠恶性	结肠	恶性	结肠::恶性...		108.15	360.84	119	20	2				
卵巢恶性	卵巢	恶性	卵巢::恶性...		154.28	556.65	76	61	1				
卵巢正常	卵巢	正常	卵巢::正常...		23.20	31.46	2	5	0				
肺正常	肺	正常	肺::正常...		60.79	43.83	62	2	0				
卵巢良性	卵巢	良性	卵巢::良性...		226.13	736.49	8	26	1				
肺恶性	肺	恶性	肺::恶性...		111.01	340.16	103	20	1				
肺良性	肺	良性	肺::良性...		189.94	406.63	1	4	0				
肝疾病	肝	疾病	肝::疾病...		67.81	46.12	22	0	0				
肝恶性	肝	恶性	肝::恶性...		48.36	128.64	14	11	0				
肝正常	肝	正常	肝::正常...		58.22	18.95	6	0	0				
前列腺恶性	前列腺	恶性	前列腺::恶性...		53.33	76.76	64	8	1				
前列腺正常	前列腺	正常	前列腺::正常...		101.58	188.93	30	2	0				
胰腺正常	胰腺	正常	胰腺::正常...		50.23	47.53	12	1	0				
前列腺疾病	前列腺	疾病	前列腺::疾病...		43.30	45.82	17	2	1				
胰腺良性	胰腺	良性	胰腺::良性...		31.14	27.97	3	2	0				
胰腺恶性	胰腺	恶性	胰腺::恶性...		66.48	83.74	54	10	2				
ID	来源	纯度	治疗	组织类型	Avg Sig	STDev	P	A	M	1405	2810	4216	5621



图 1

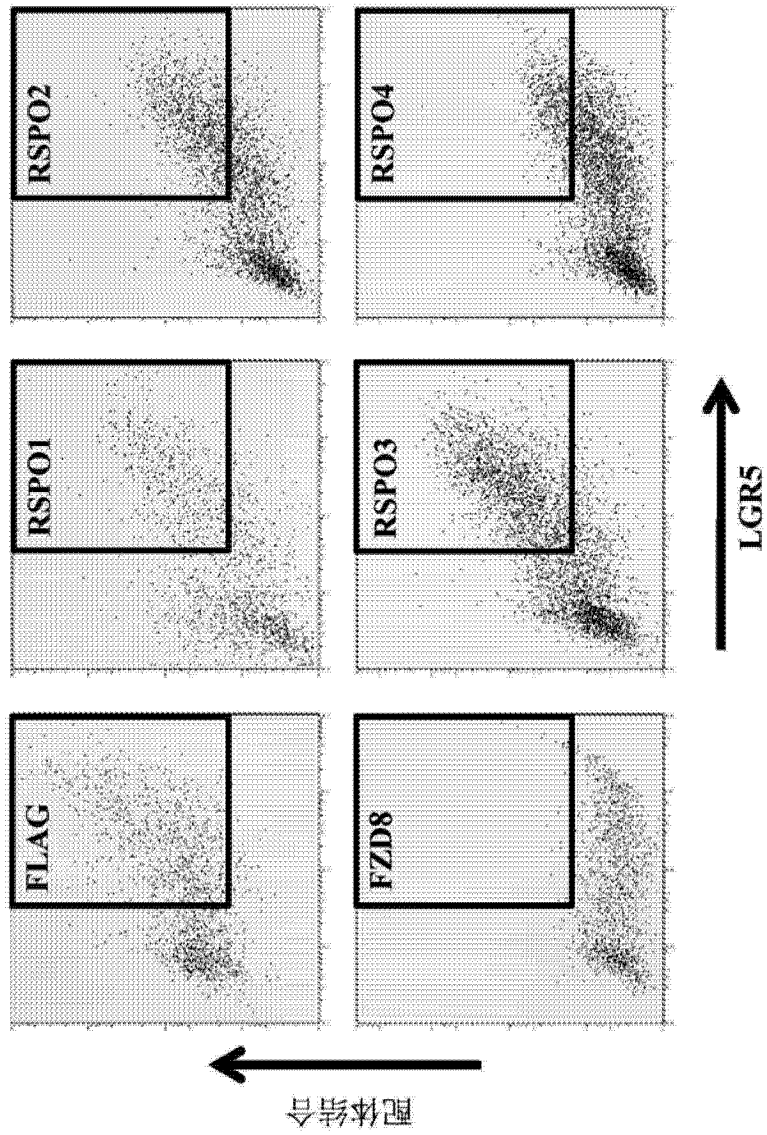


图 2

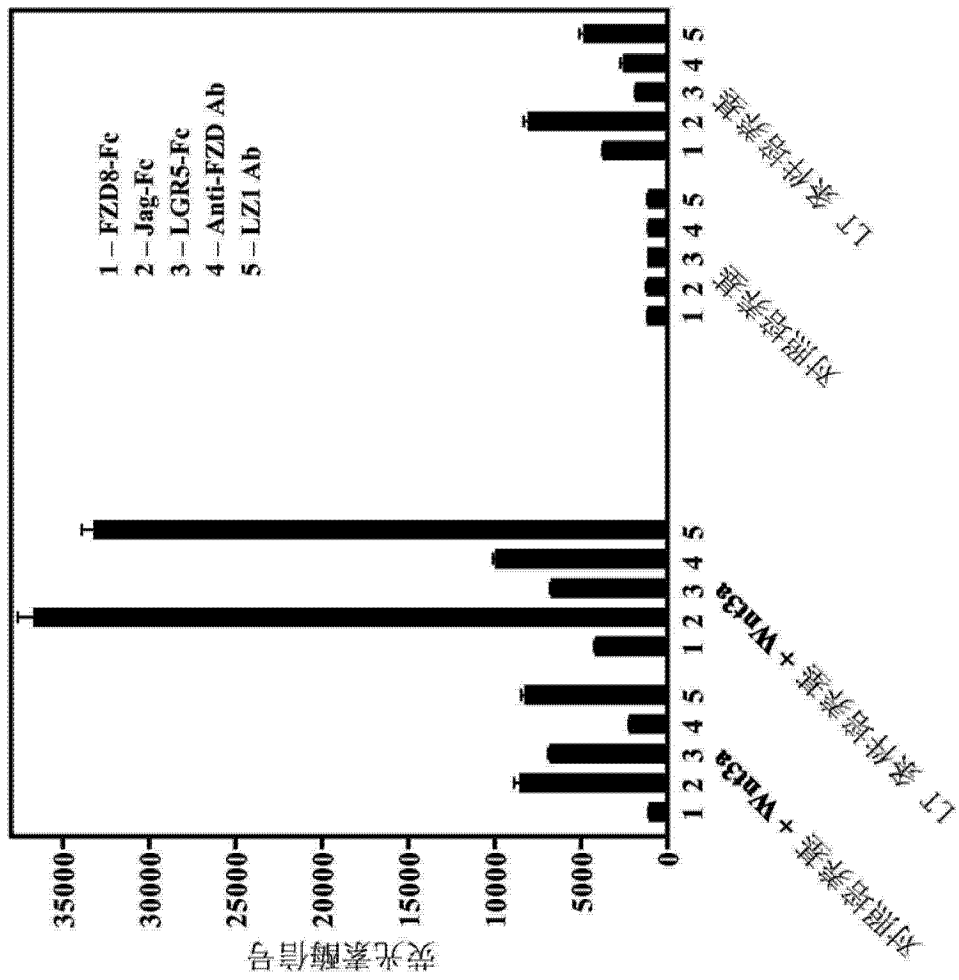


图 3

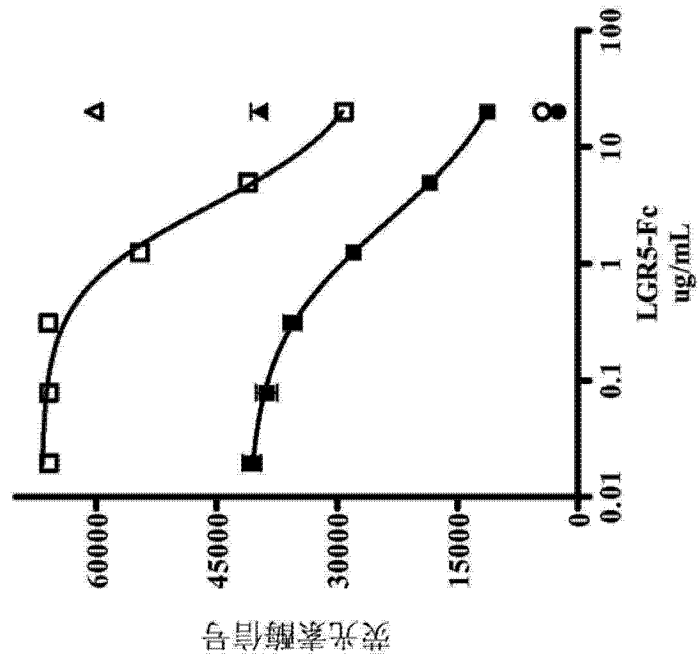


图 4

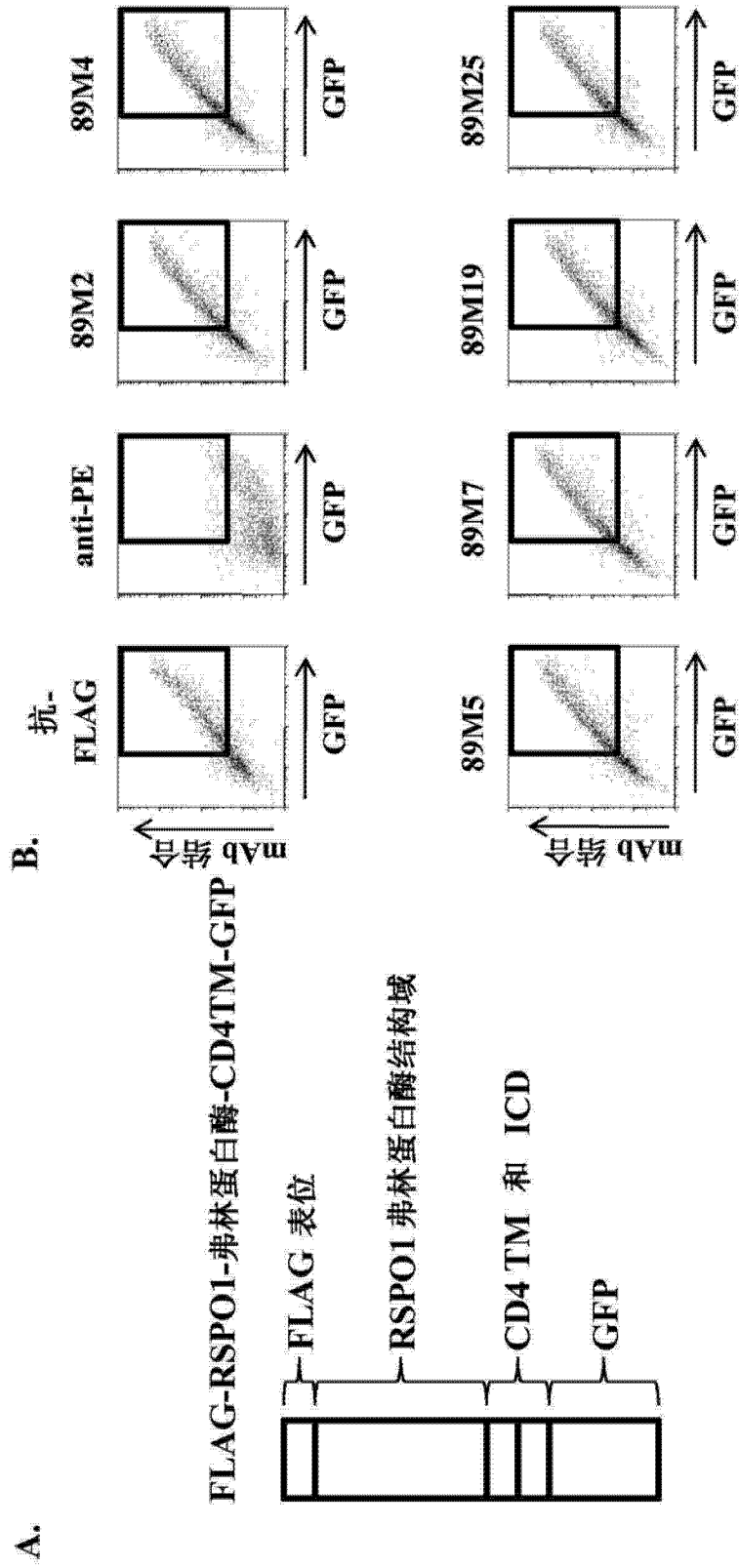


图 5

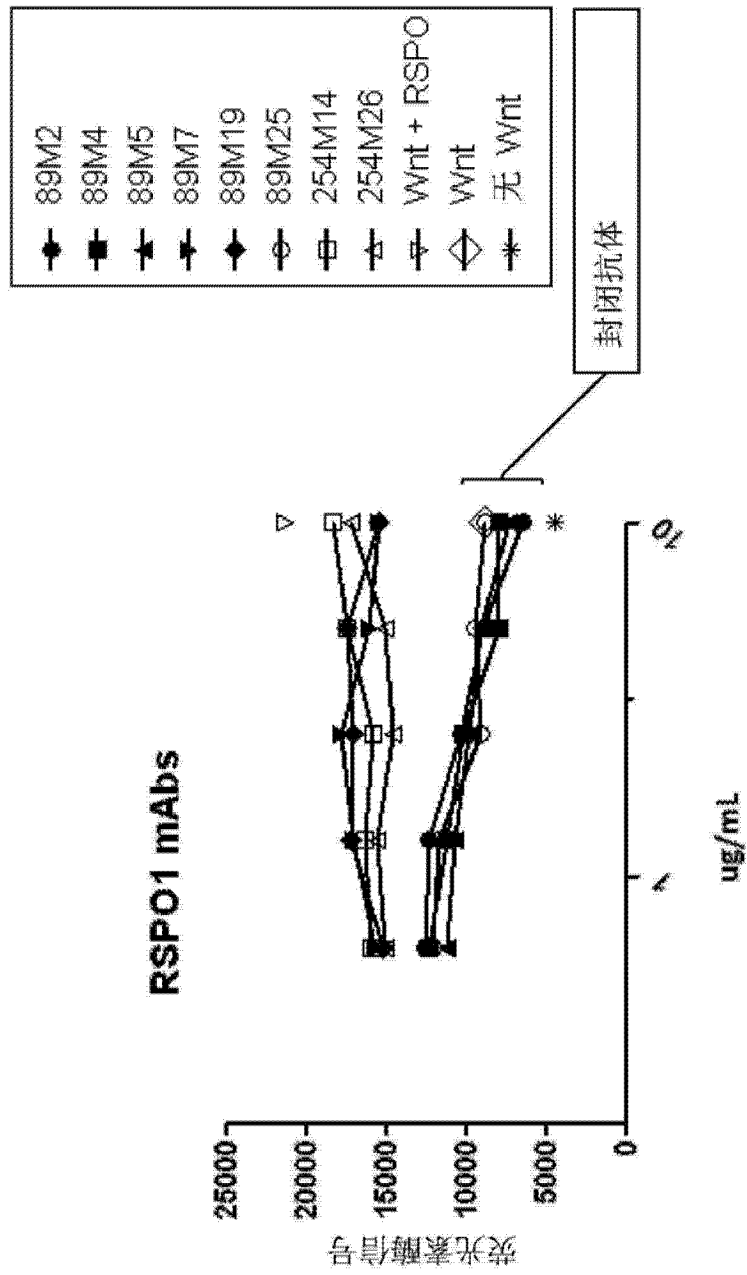


图 6

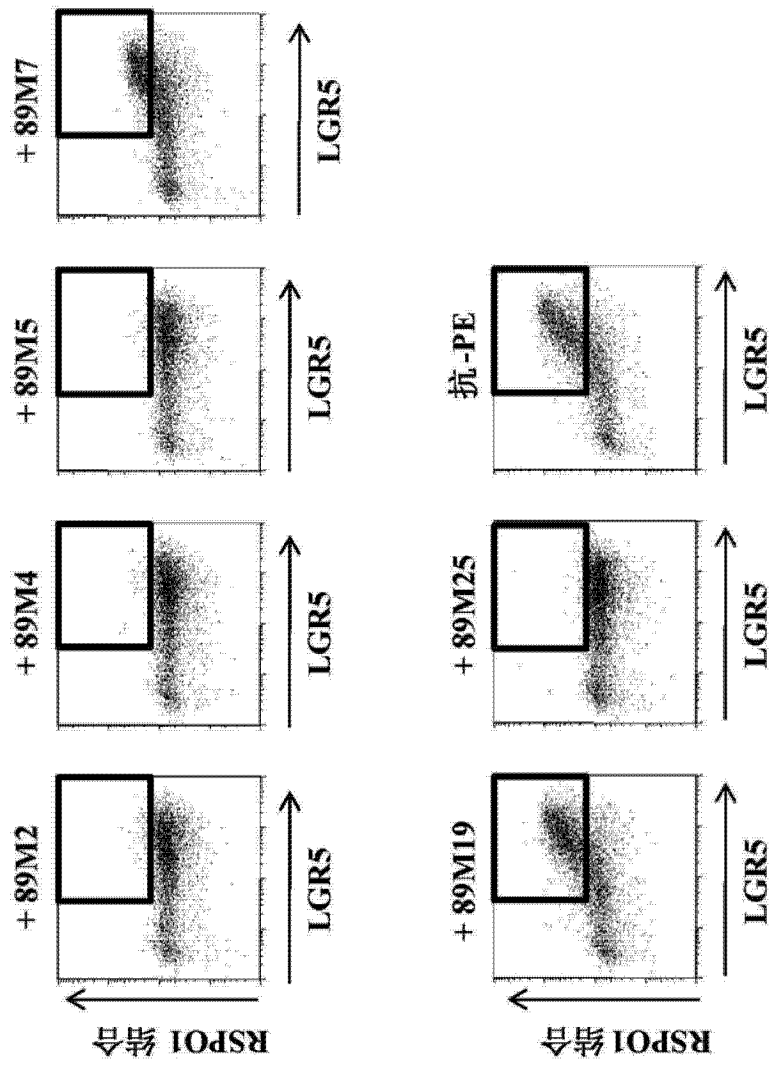


图 7

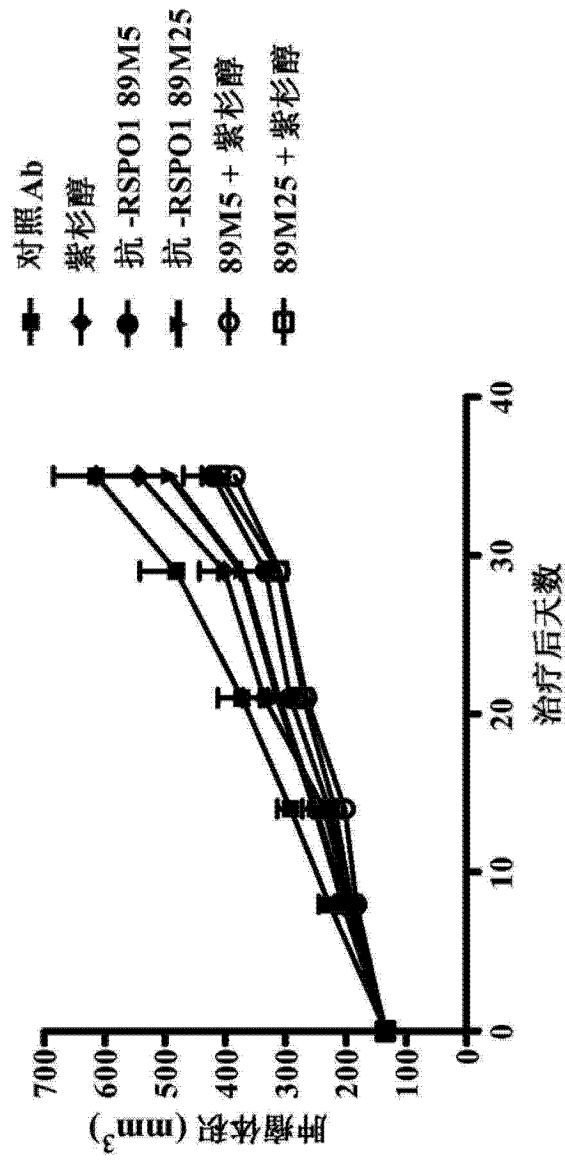
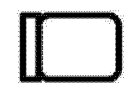
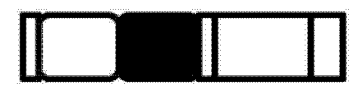
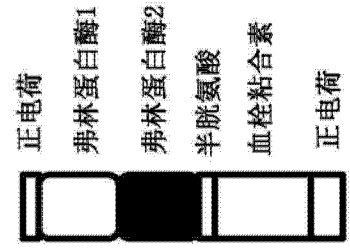


图 8



A.

B.

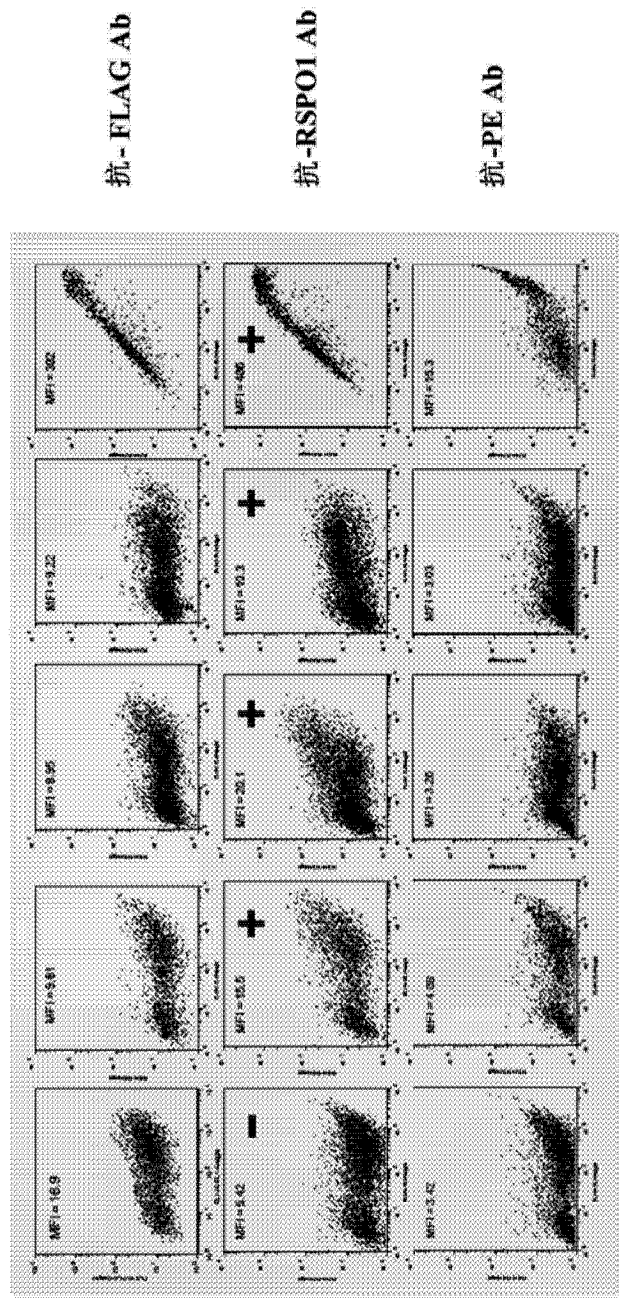


图 9

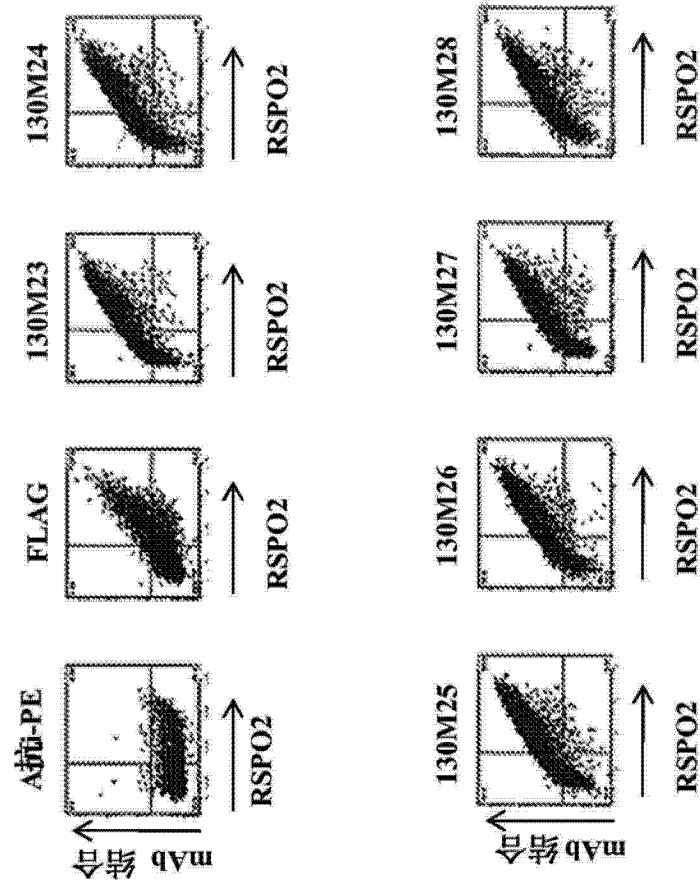


图 10

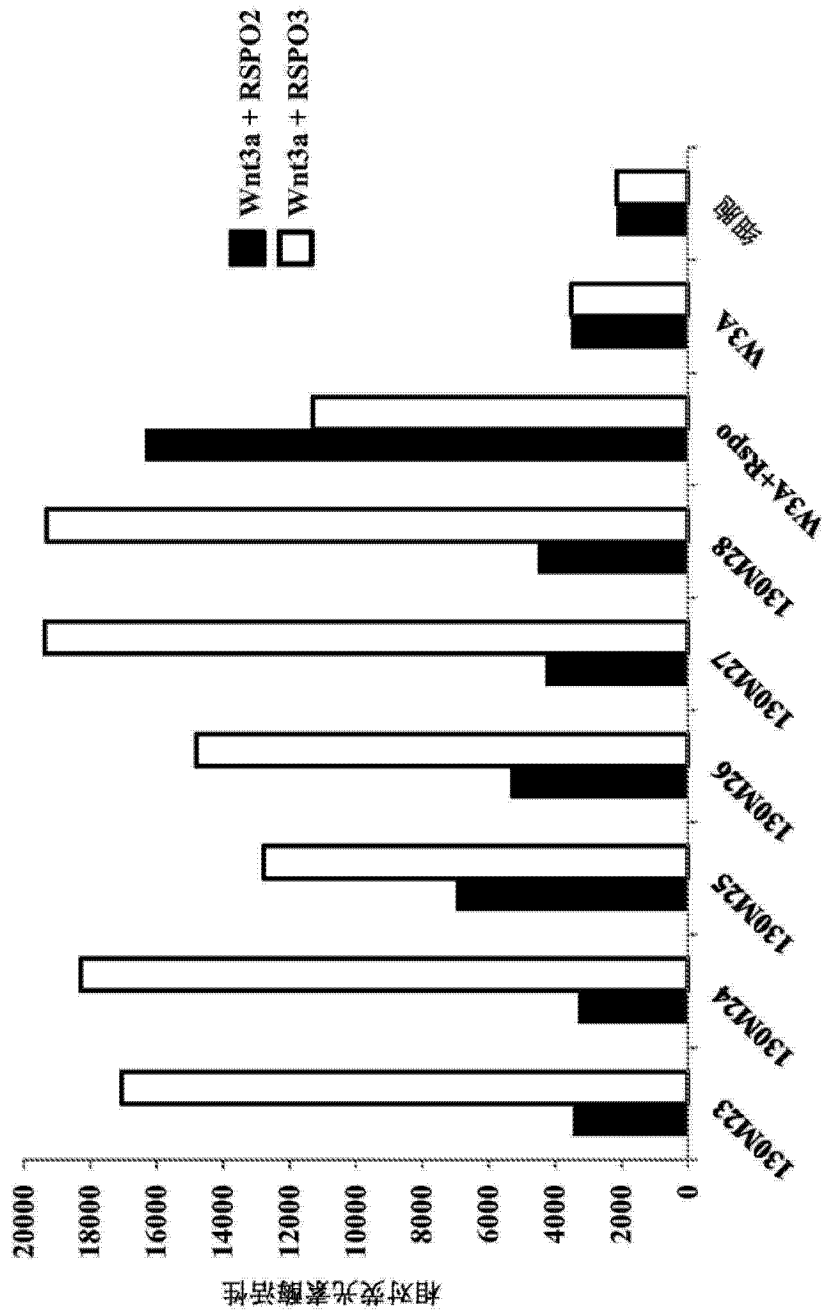


图 11

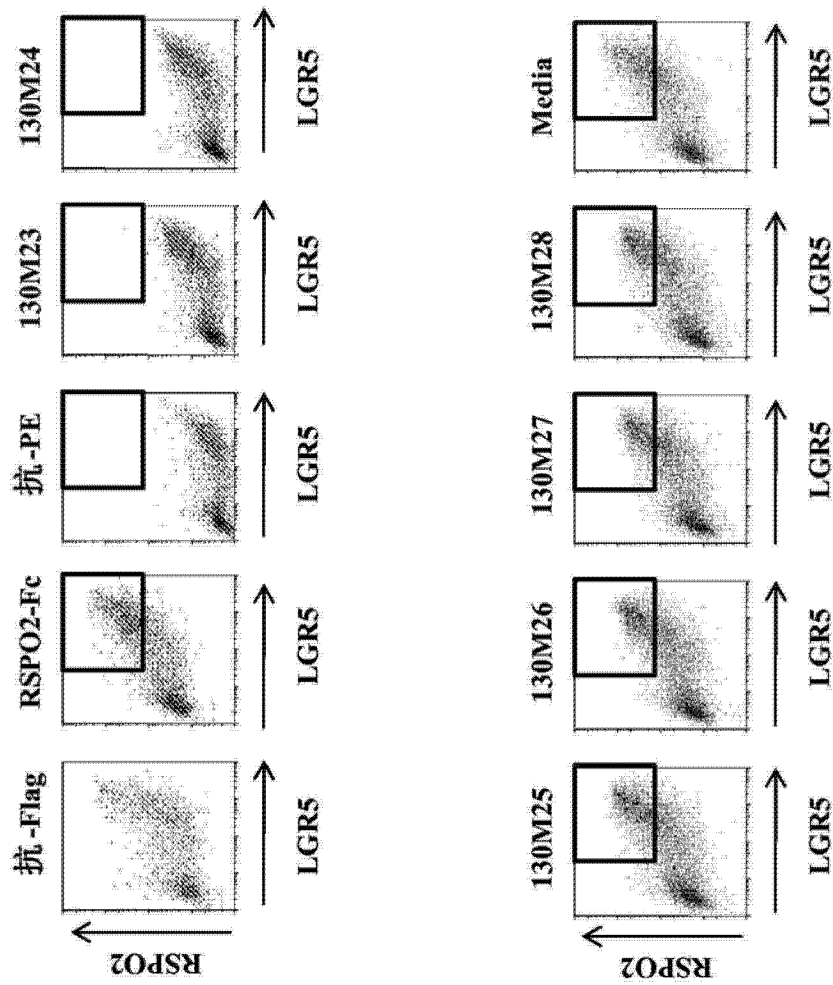


图 12

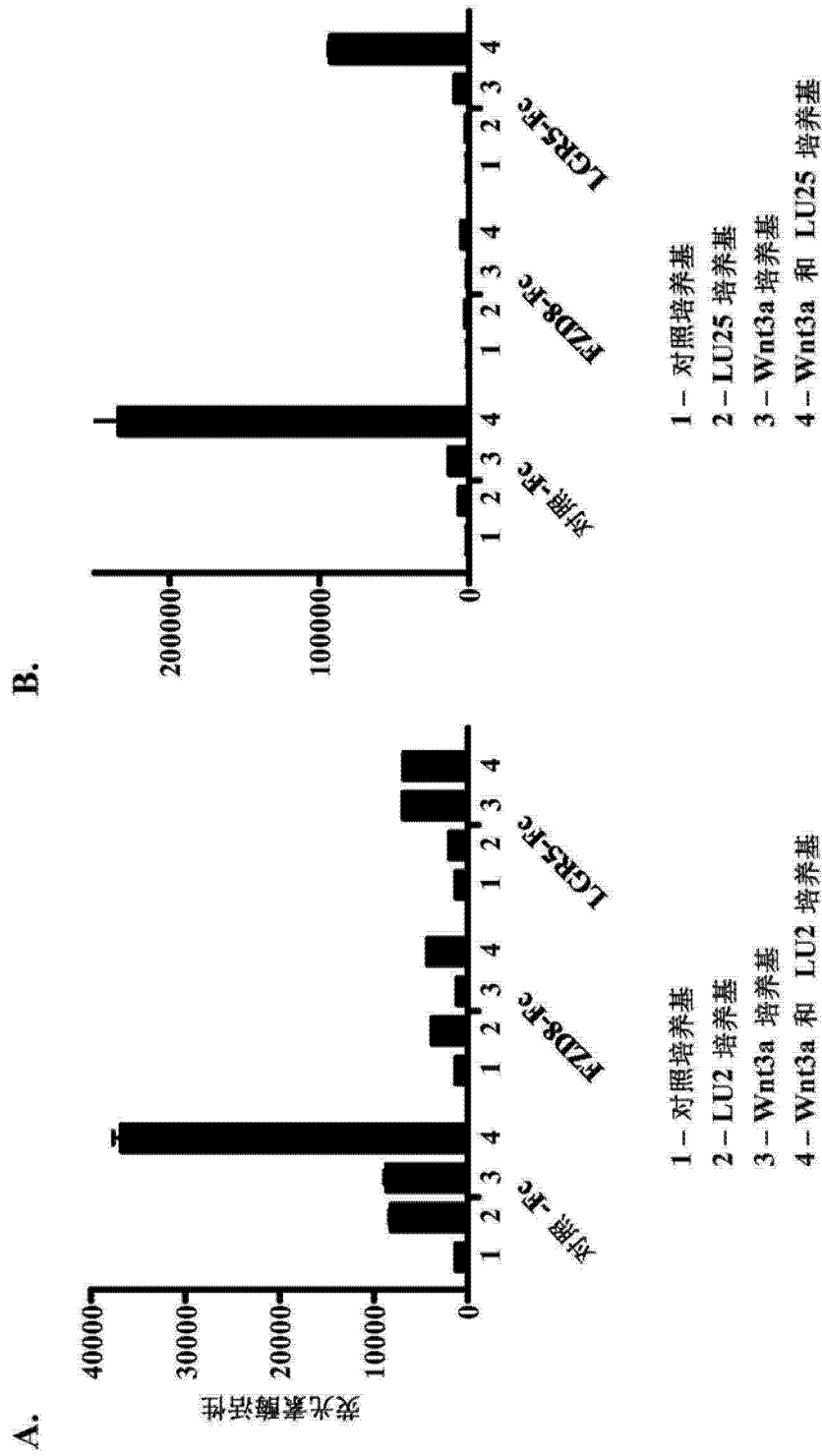


图 13

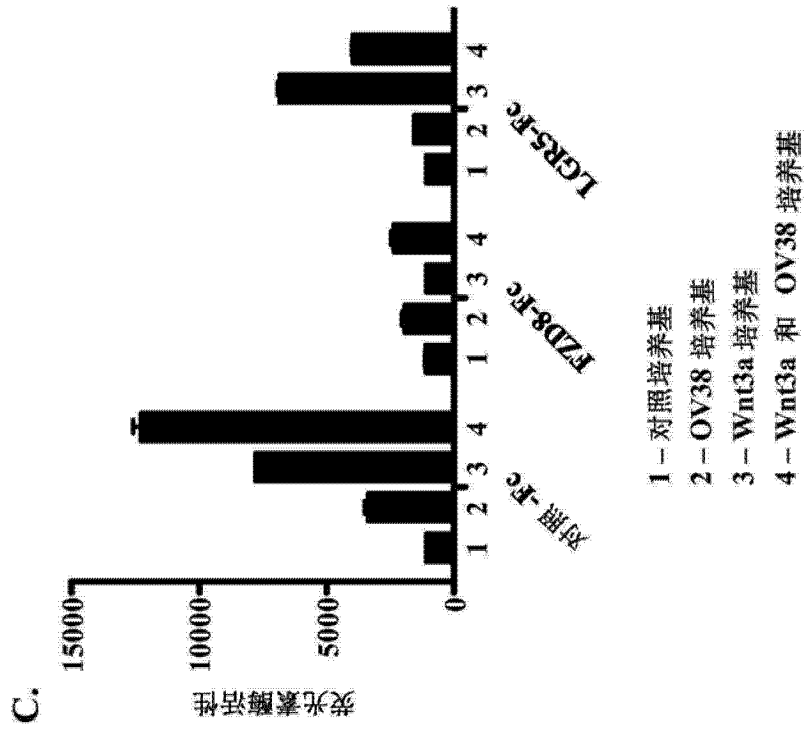


图 13

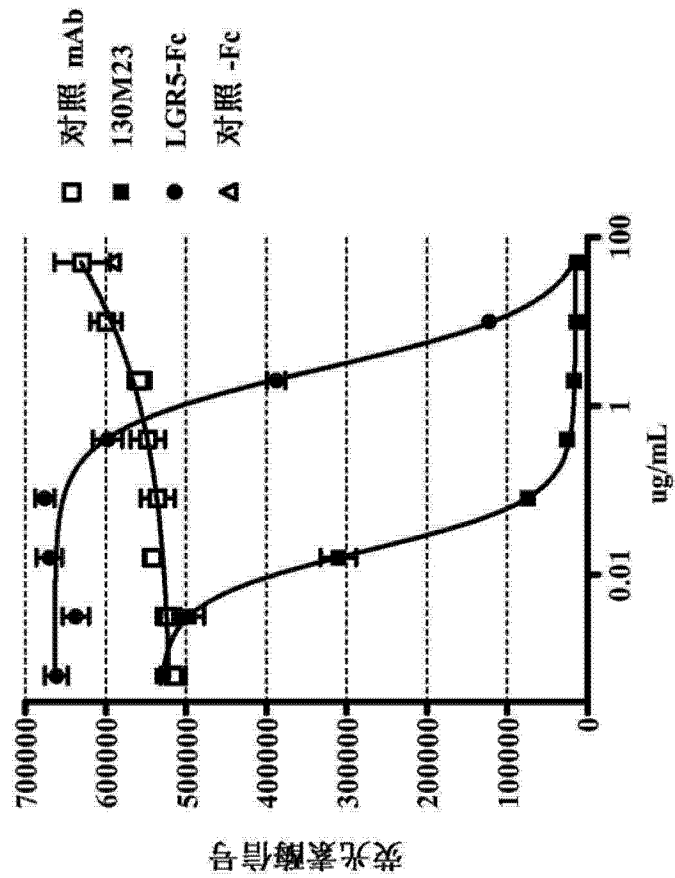


图 14

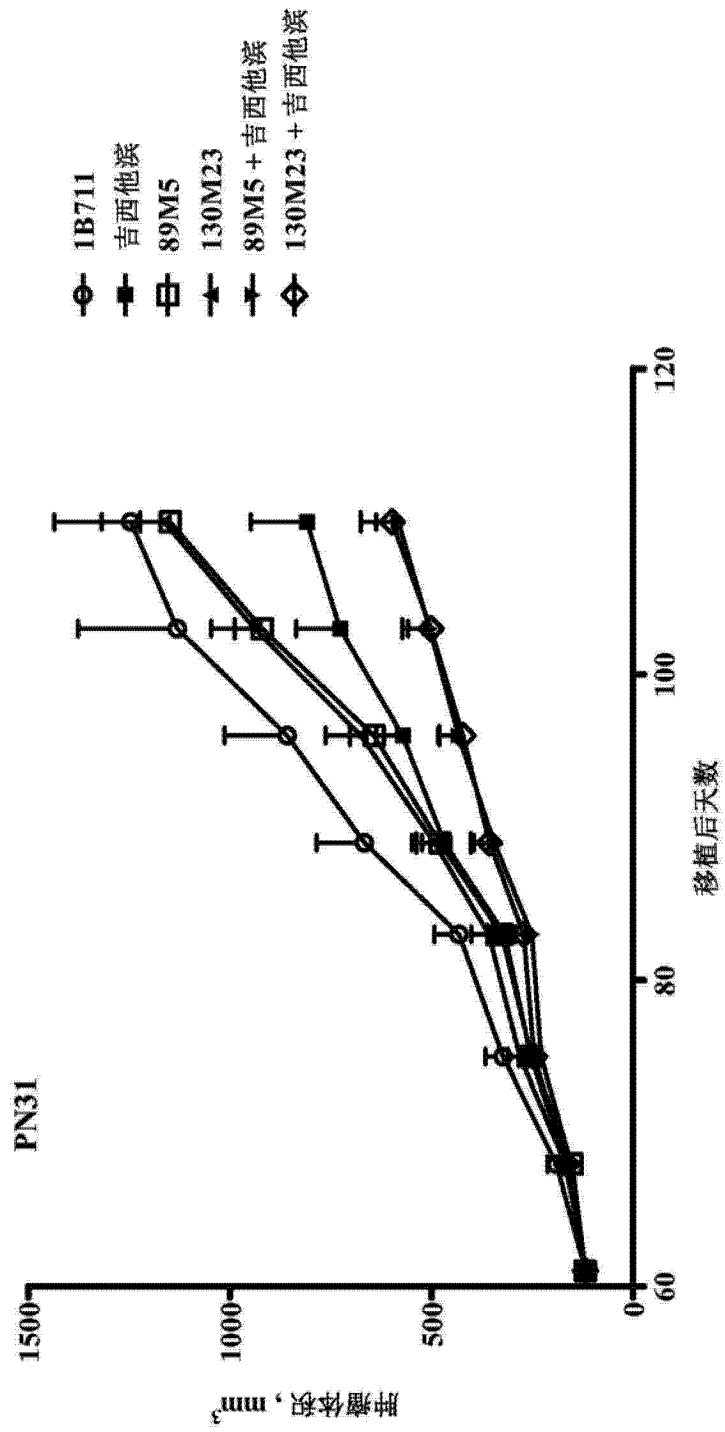


图 15

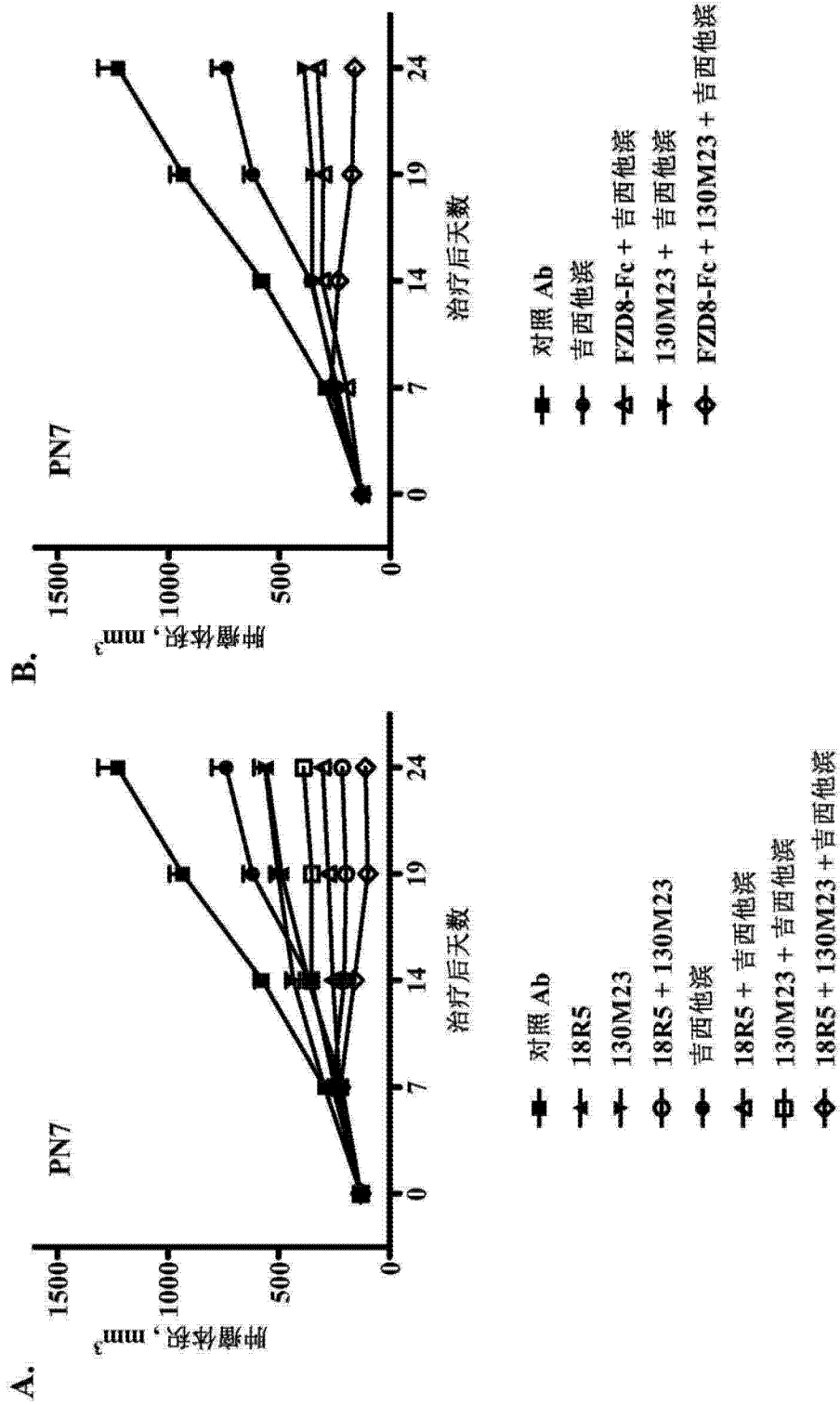


图 16

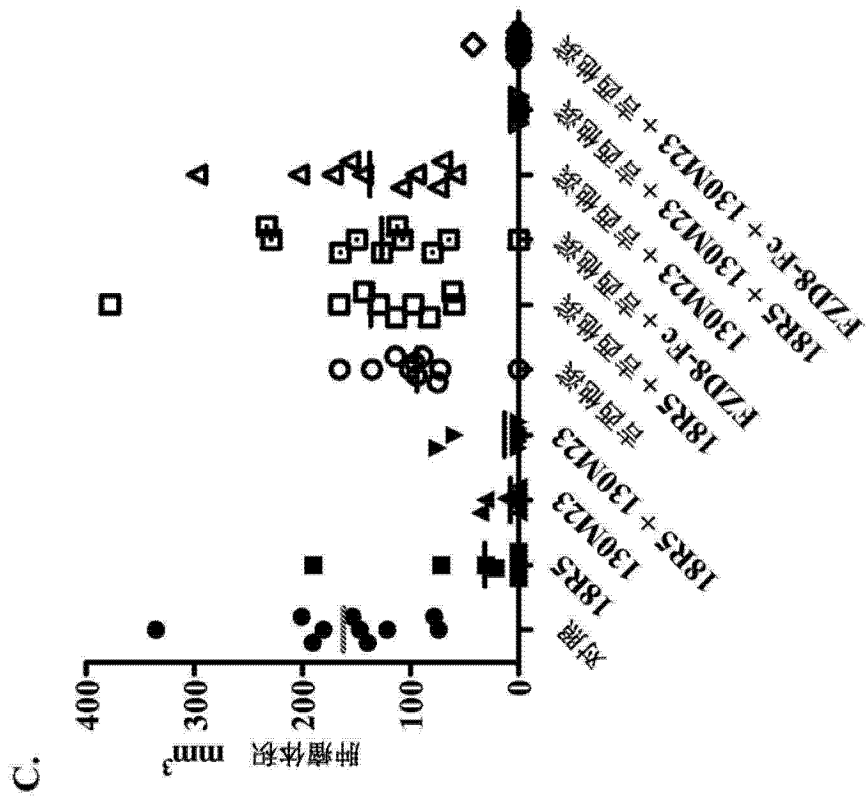


图 16

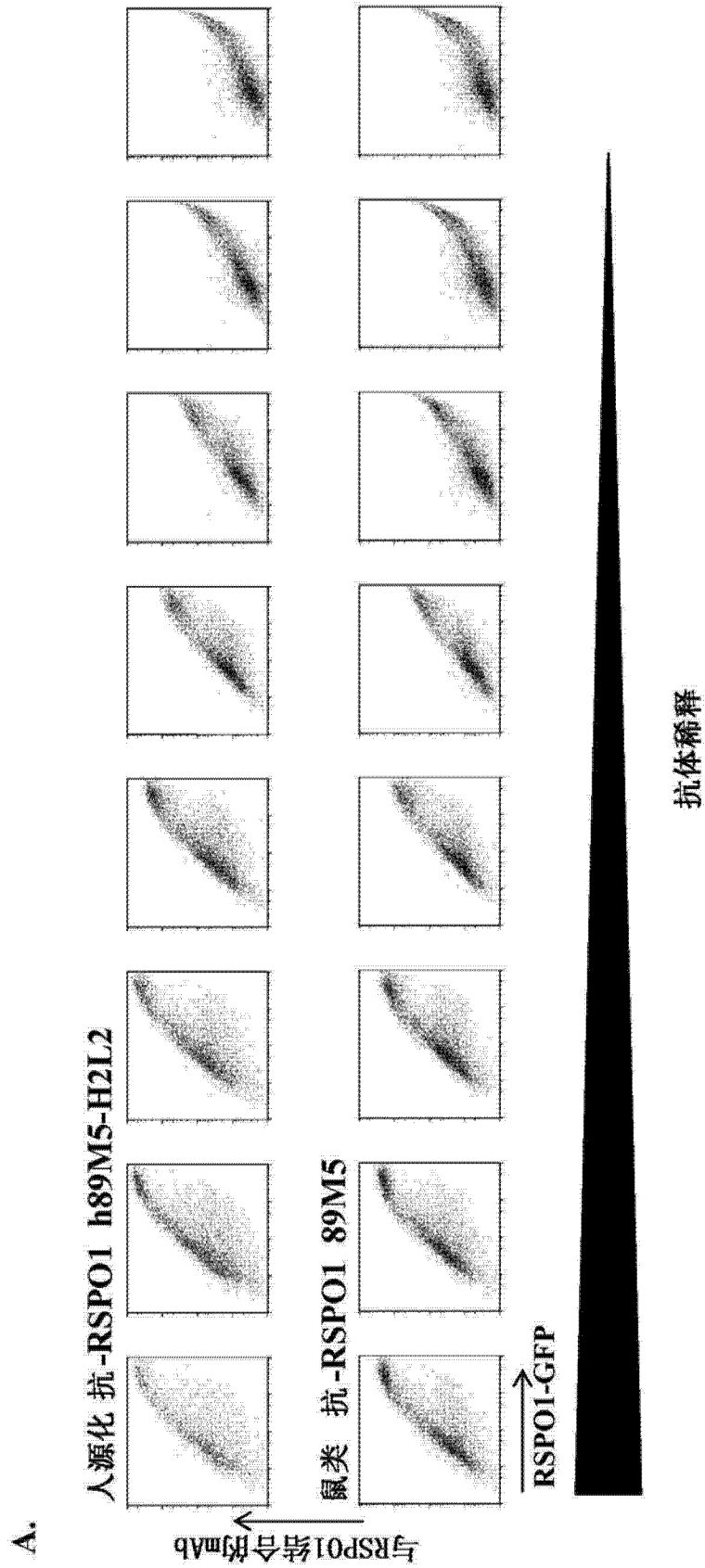


图 17

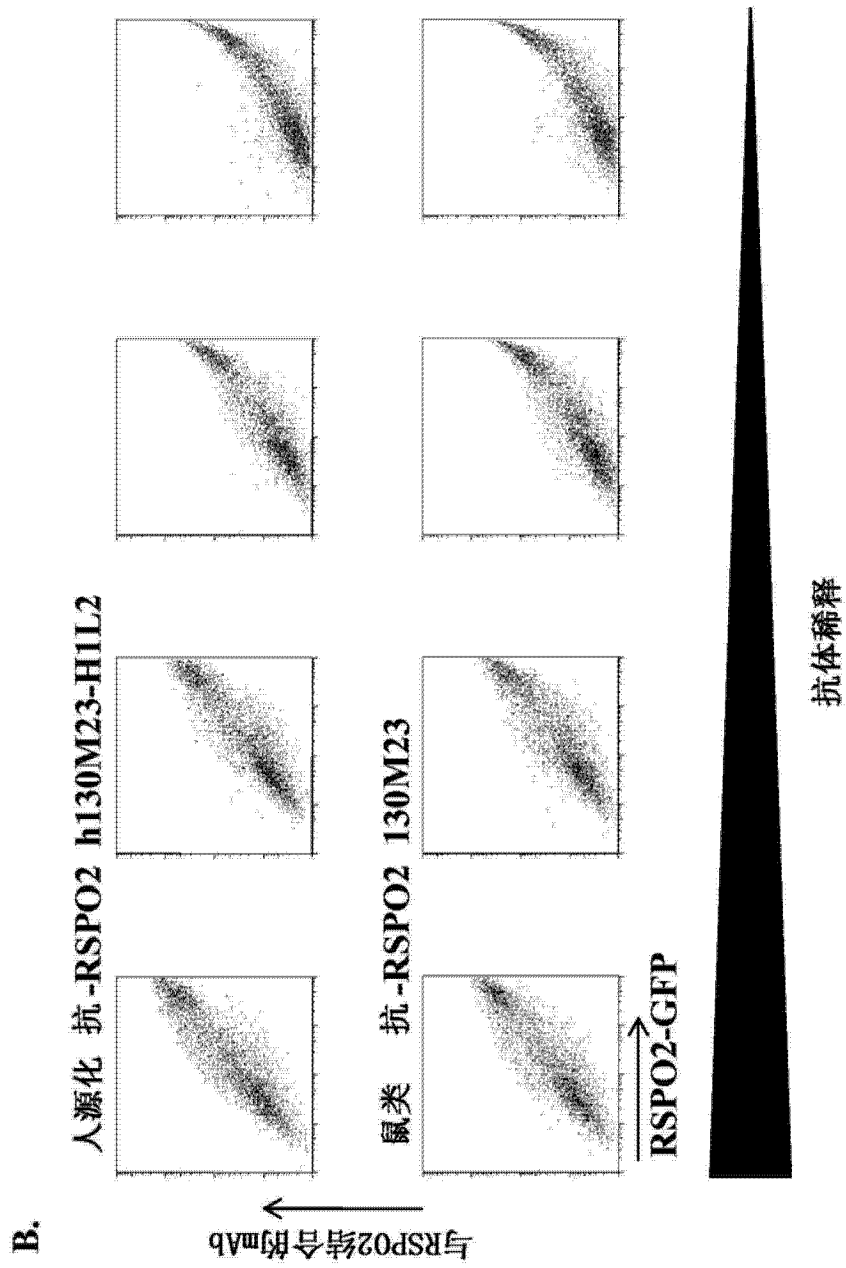


图 17

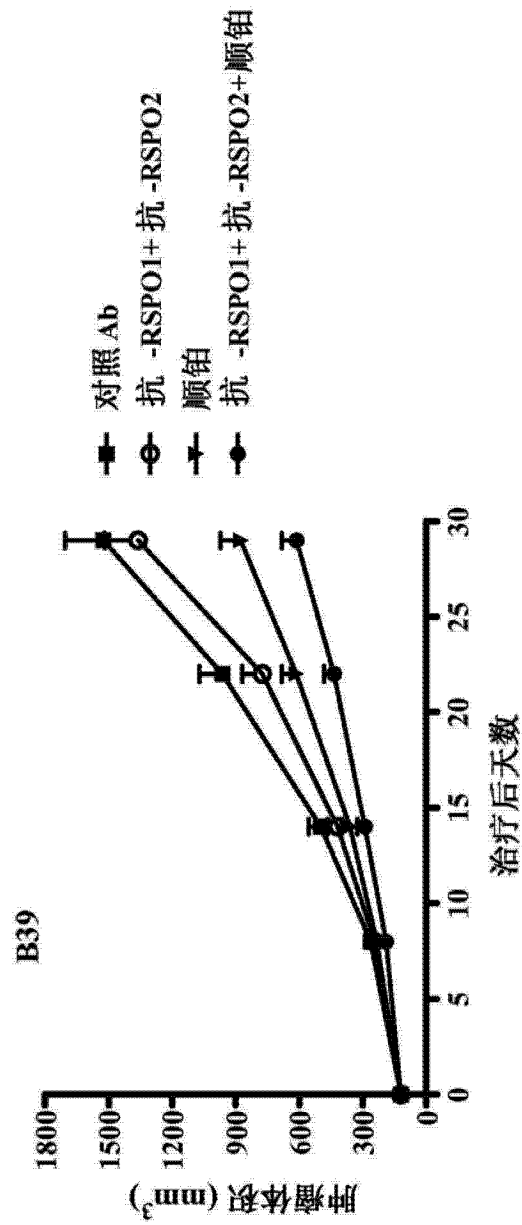


图 18