



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110381988 A

(43)申请公布日 2019.10.25

(21)申请号 201780049356.6

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

(22)申请日 2017.06.13

代理人 胡志君 黄革生

(30)优先权数据

62/350,257 2016.06.15 US

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/395(2006.01)

2019.02.11

A61K 31/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

G01N 33/00(2006.01)

PCT/IB2017/053507 2017.06.13

G01N 33/68(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/216724 EN 2017.12.21

A61P 7/00(2006.01)

(71)申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 丛枫 W·迪特里希 N·乔治

刘东 A·沙赫特 A·索尼 周劲

权利要求书6页 说明书110页

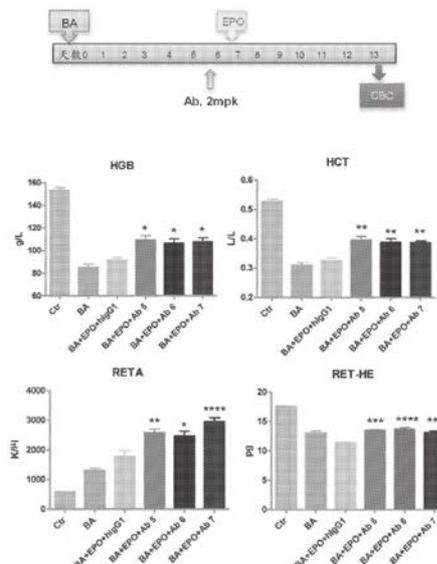
序列表44页 附图15页

(54)发明名称

使用骨形态发生蛋白6(BMP6)的抑制剂治疗疾病的方法

(57)摘要

本发明涉及使用BMP6拮抗剂进行治疗的方法。



1. 一种方法,所述方法在有需要的患者中选择性地:

a. 抑制BMP6;

b. 增加血清铁水平、转铁蛋白饱和度 (TAST)、网织红细胞血红蛋白含量 (CHr)、网织红细胞计数、红细胞计数、血红蛋白或血细胞比容;

c. 降低铁调素的活性或水平;

d. 治疗贫血;或

e. 增加或维持血红蛋白水平;

所述方法包括基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。

2. 一种采用BMP6拮抗剂治疗患有贫血的患者的方法,所述方法包括基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。

3. 一种采用BMP6拮抗剂选择性地治疗患有贫血的患者的方法,所述方法包括:

a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白水平;以及

b) 随后选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP9拮抗剂,

其中所述铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 。

4. 一种采用BMP6拮抗剂选择性地治疗患有贫血的患者的方法,所述方法包括:

a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白水平;

b) 随后基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用BMP6拮抗剂的治疗;以及

c) 随后向所述患者给予治疗有效量的BMP9拮抗剂。

5. 一种方法,所述方法在有需要的患者中选择性地:

a. 抑制BMP6;

b. 增加血清铁水平、转铁蛋白饱和度 (TAST)、网织红细胞血红蛋白含量 (CHr)、网织红细胞计数、红细胞计数、血红蛋白或血细胞比容;

c. 降低铁调素的活性或水平;

d. 治疗贫血;或

e. 增加或维持血红蛋白水平;

所述方法包括基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。

6. 一种采用BMP6拮抗剂治疗患有贫血的患者的方法,其包括基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。

7. 一种采用BMP6拮抗剂选择性地治疗患有贫血的患者的方法,所述方法包括:

a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白水平;以及

b) 随后选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP9拮抗剂,

其中所述铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

8. 一种采用BMP6拮抗剂选择性地治疗患有贫血的患者的方法,所述方法包括:

a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白水平;

b) 随后基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用BMP6拮抗剂的治疗;以及

c) 随后向所述患者给予治疗有效量的BMP9拮抗剂。

9. 一种用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在於,基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。

10. 一种用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在於,基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。

11. 一种用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在於:

a) 基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用所述BMP6拮抗剂的治疗;并且

b) 随后向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。

12. 一种用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在於:

a) 基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用所述BMP6拮抗剂的治疗;并且

b) 随后向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。

13. 一种用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在於:

a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白;并且

b) 基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。

14. 一种用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在於:

a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白;并且

b) 基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。

15. 一种用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在於:

a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白;

b) 基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用所述BMP6拮抗剂的治疗;并且

c) 选择性地向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。

16. 一种用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在於:

a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白;

b) 基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用所述BMP6拮抗剂的治疗;并且

c) 选择性地向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。

17. 一种预测患有贫血的患者对采用BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性的方法,所述方法包括测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白,其中铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 指示所述患者对采用所述BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性增加。

18. 一种预测患有贫血的患者对采用BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性的方法,所述方法包括测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白,其中铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 指示所述患者对采用所述BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性增加。

19. 根据权利要求17-18中任一项所述的方法,所述方法还包括从所述患者获得生物样品的步骤,其中获得步骤是在所述测定步骤之前进行。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的方法或用途,其中所述铁蛋白水平是铁蛋白蛋白质水平。

21. 根据权利要求3、4、7、8或13-19中任一项所述的方法,其中所述测定步骤包括选自下组的技术,该组由以下组成:免疫测定、免疫组织化学、ELISA、流式细胞术、蛋白质印迹、HPLC和质谱法。

22. 一种产生可传输形式的信息的方法,所述可传输形式的信息用于预测患有贫血的患者对采用BMP6拮抗剂的治疗的反应性,所述方法包括:

a) 基于来自所述患者的生物样品中铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的存在,确定所述患者对采用所述BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性增加;以及

b) 在有形或无形媒介形态上记录所述确定步骤的结果,以便用于传输。

23. 一种产生可传输形式的信息的方法,该可传输形式的信息用于预测患有贫血的患者对采用BMP6拮抗剂的治疗的反应性,该方法包括:

a) 基于来自所述患者的生物样品中铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的存在,确定所述患者对采用所述BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性增加;以及

b) 在有形或无形媒介形态上记录所述确定步骤的结果,以便用于传输。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法或用途,其中所述贫血是与慢性疾病相关的贫血。

25. 根据权利要求24所述的方法或用途,其中所述慢性疾病是慢性肾病、癌症或炎症。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的方法或用途,其中所述患者正在或已经采用红细胞生成刺激剂(ESA)治疗。

27. 根据权利要求26所述的方法或用途,其中所述ESA是红细胞生成素(EPO)。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的方法或用途,其中所述贫血是EPO低反应性贫血。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法或用途,其中所述贫血是铁限制性贫血,例如功能性铁限制性贫血。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的方法或用途,其中所述患者是慢性血液透析患者。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途还包括相对于在没有采用治疗有效量的所述BMP6拮抗剂治疗的情况下的所述EPO剂量需求和/或铁剂量需求,降低所述患者的铁剂量需求、降低所述患者的EPO剂量需求、或降低所述患者的铁剂量需求和所述患者的EPO剂量需求二者。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法或用途,其中所述生物样品是滑液、血液、血清、粪便、血浆、尿、泪液、唾液、脑脊液、白细胞样品或组织样品。

33. 根据权利要求32所述的方法或用途,其中所述生物样品是血清或血液。

34. 根据权利要求33所述的方法或用途,其中所述生物样品是血清。

35. 根据权利要求1-34中任一项所述的方法或用途,其中所述BMP6拮抗剂是BMP6结合分子。

36. 根据权利要求35所述的方法或用途,其中所述BMP6拮抗剂是抗BMP6抗体或其抗原结合片段。

37. 根据权利要求36所述的方法或用途,其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段是表1或表14中所述抗体的抗BMP6抗体或其抗原结合片段。

38. 根据权利要求36-37中任一项所述的方法或用途,其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 分别为SEQ ID NO:69、70和71的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:79、80和81的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

(b) 分别为SEQ ID NO:72、73和74的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:82、83和84的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

(c) 分别为SEQ ID NO:29、30和31的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:39、40和41的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

(d) 分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:42、43和44的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

(e) 分别为SEQ ID NO:49、50和51的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:59、60和61的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

(f) 分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

(g) 分别为SEQ ID NO:9、10和11的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:19、20和21的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

(h) 分别为SEQ ID NO:12、13和14的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:22、23和24的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

39. 根据权利要求36-38中任一项所述的方法或用途,其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段包含:

(a) SEQ ID NO:75的VH序列;

(b) SEQ ID NO:35的VH序列;

(c) SEQ ID NO:55的VH序列;或

(d) SEQ ID NO:15的VH序列。

40. 根据权利要求36-39中任一项所述的方法或用途,其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段包含:

(a) SEQ ID NO:85的VL序列;

(b) SEQ ID NO:45的VL序列;

(c) SEQ ID NO:65的VL序列;或

(d) SEQ ID NO:25的VL序列。

41. 根据权利要求36-40中任一项所述的方法或用途,其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段包含:

(a) SEQ ID NO:75的VH序列,和SEQ ID NO:85的VL序列;

(b) SEQ ID NO:35的VH序列,和SEQ ID NO:45的VL序列;

(c) SEQ ID NO:55的VH序列,和SEQ ID NO:65的VL序列;或

(d) SEQ ID NO:15的VH序列,和SEQ ID NO:25的VL序列。

42. 根据权利要求36-41中任一项所述的方法或用途,其中所述抗BMP6抗体或其抗原结

合片段包含：

- (a) SEQ ID NO:77的重链序列；
- (b) SEQ ID NO:37的重链序列；
- (c) SEQ ID NO:57的重链序列；或
- (d) SEQ ID NO:17的重链序列。

43. 根据权利要求36-42中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段包含：

- (a) SEQ ID NO:87的轻链序列；
- (b) SEQ ID NO:47的轻链序列；
- (c) SEQ ID NO:67的轻链序列；或
- (d) SEQ ID NO:27的轻链序列。

44. 根据权利要求36-43中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段包含：

- (a) SEQ ID NO:77的重链序列，和SEQ ID NO:87的轻链序列；
- (b) SEQ ID NO:37的重链序列，和SEQ ID NO:47的轻链序列；
- (c) SEQ ID NO:57的重链序列，和SEQ ID NO:67的轻链序列；或
- (d) SEQ ID NO:17的重链序列，和SEQ ID NO:27的轻链序列。

45. 根据权利要求36-44中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段：

- a) 以 $\leq 1$ nM的KD结合人BMP6；或
- b) 以 $\leq 0.1$ nM的KD结合人BMP6。

46. 根据权利要求36-45中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段：

- a) 对于人BMP6的亲合力比对于人BMP7的亲合力高至少约100倍；
- b) 对于人BMP6的亲合力比对于人BMP2、人BMP5或人BMP7的亲合力高至少约100倍；
- c) 对于人BMP6的亲合力比对于人BMP2、人BMP5或人BMP7的亲合力高至少约500倍；和/或
- d) 在ELISA中没有可检测出的与人BMP2和/或BMP7的结合。

47. 根据权利要求36-46中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段包含选自IgM和IgG的支架。

48. 根据权利要求36-47中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段是选自IgG1、IgG2以及IgG3或IgG4的IgG。

49. 根据权利要求36-48中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段选自下组，该组由以下组成：单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab和scFv。

50. 根据权利要求36-49中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段是免疫缀合物的组分。

51. 根据权利要求36-50中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结合片段通过Fc区的突变而具有改变的效应子功能。

52. 根据权利要求36-51中任一项所述的方法或用途，其中所述抗BMP6抗体或其抗原结

合片段与人BMP6表位结合,所述人BMP6表位包括序列QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO:98),例如由所述序列组成。

53. 根据权利要求36-52中任一项所述的方法或用途,其中将所述抗体或其抗原结合片段以范围为0.001mg/kg至0.1mg/kg的剂量给予。

54. 根据权利要求53所述的方法或用途,其中将所述抗体或其抗原结合片段以范围为0.0063至0.1mg/kg的剂量给予。

55. 根据权利要求36-53所述的方法或用途,其中将所述抗体或其抗原结合片段以0.001mg/kg、0.0016mg/kg、0.0025mg/kg、0.0040mg/kg、0.0063mg/kg、0.01mg/kg、0.016mg/kg、0.025mg/kg、0.040mg/kg、0.063mg/kg或0.1mg/kg的剂量给予。

56. 根据权利要求36-55中任一项所述的方法或用途,其中将所述抗体或其抗原结合片段多于一次给予所述患者。

57. 根据权利要求36-56中任一项所述的方法或用途,其中所述抗体或其抗原结合片段被:

- a) 静脉内给予;或
- b) 皮下给予。

58. 根据权利要求57所述的方法或用途,其中通过经约30至约60分钟的时间段输注来给予。

59. 根据权利要求1-58中任一项所述的方法或用途,其中所述铁蛋白水平为 $\leq 1900$ ng/mL、 $\leq 1800$ ng/mL、 $\leq 1700$ ng/mL、 $\leq 1600$ ng/mL、 $\leq 1500$ ng/mL、 $\leq 1400$ ng/mL、 $\leq 1300$ ng/mL、 $\leq 1200$ ng/mL、 $\leq 1100$ ng/mL或 $\leq 1000$ ng/mL。

60. 根据权利要求1-59中任一项所述的方法或用途,其中所述铁蛋白水平为 $\leq 1500$ ng/mL。

61. 根据权利要求1-60中任一项所述的方法或用途,其中所述铁蛋白水平为 $\geq 500$ ng/mL、 $\geq 600$ ng/mL、 $\geq 700$ ng/mL、 $\geq 800$ ng/mL、 $\geq 900$ ng/mL、 $\geq 1000$ ng/mL、 $\geq 1100$ ng/mL、 $\geq 1200$ ng/mL、 $\geq 1300$ ng/mL、 $\geq 1400$ ng/mL、 $\geq 1500$ ng/mL、 $\geq 1600$ ng/mL、 $\geq 1700$ ng/mL、 $\geq 1800$ ng/mL或 $\geq 1900$ ng/mL。

62. 根据权利要求1-60中任一项所述的方法或用途,其中所述铁蛋白水平为 $\geq 500$ ng/mL、 $\geq 600$ ng/mL、 $\geq 700$ ng/mL、 $\geq 800$ ng/mL、 $\geq 900$ ng/mL、 $\geq 1000$ ng/mL、 $\geq 1100$ ng/mL、 $\geq 1200$ ng/mL、 $\geq 1300$ ng/mL或 $\geq 1400$ ng/mL。

63. 根据权利要求1-4、9、11、13、15、17、22或23-62中任一项的方法或用途,其中所述铁蛋白水平为 $\geq 500$ ng/mL。

## 使用骨形态发生蛋白6 (BMP6) 的抑制剂治疗疾病的方法

[0001] 序列表

[0002] 申请含有已经以ASCII格式电子递交的序列表并且该序列表通过引用以其全文并入本文。2017年5月23日创建的所述ASCII拷贝命名为PAT057354-W0-PCT\_SL.txt,大小为82,879字节。

[0003] 引言

[0004] 本发明涉及使用骨形态发生蛋白6 (BMP6) 的抑制剂治疗贫血的方法。

### 背景技术

[0005] 贫血在慢性肾病 (CKD) 患者中普遍存在,并且伴随着较低的生活质量和较高的不良结果(包括心血管疾病和死亡)风险。CKD患者的几种贫血管理方式包括使用红细胞生成刺激剂 (ESA)、补充口服和静脉铁剂和输血。然而,许多患者对这些治疗没有充分反应或需要更高剂量的ESA和/或铁。高剂量的铁也可引起与氧自由基的生成相关的毒性以及过敏反应。这些治疗可能缺乏功效,因为它们没有完全解决贫血的潜在原因,即铁吸收受损和铁从体内存储的动员。

[0006] 目前通过共同给予高剂量肠胃外铁来进行管理红细胞生成素抗性的尝试。然而,来自静脉制剂的大多数铁首先由巨噬细胞加工,并且其在红细胞生成中的利用依赖于铁转运蛋白介导的铁输出。

[0007] 在许多贫血患者中,铁转运蛋白介导的铁输出被高水平的铁调素抑制。另外的证据表明,铁调素水平的增加与血液透析中较差的ESA反应性相关。因此,铁调素降低剂可能是改善该患者群体中ESA难治性贫血以及以铁限制为特征的其他形式的慢性病贫血 (ACD) 的有效策略。

[0008] 因此,降低循环铁调素水平的方法会增强铁吸收、促进封存铁的释放以及促进慢性肾病患者中存在的ESA难治性贫血的红细胞生成。

[0009] 尽管目前存在用于治疗与贫血相关的疾病和病症的治疗选择,但仍然需要有效且耐受良好的改进的贫血治疗方法。

### 发明内容

[0010] 铁蛋白是细胞内蛋白质,其指示储存的铁。铁蛋白水平可以用作体内储存的铁总量的间接标志物。不受理论束缚,认为BMP6的抑制剂可导致储存的铁从细胞释放,例如从巨噬细胞和/或肠细胞释放。同样,不受理论束缚,本发明部分基于以下发现:BMP6的抑制剂可有效治疗具有高铁蛋白例如血清铁蛋白水平(例如,治疗前铁蛋白水平高于500ng/mL)并因此具有高储存铁的患者中与封存铁相关的病况,例如贫血。

[0011] 在第一方面,本发明涉及一种方法,其在有需要的患者中选择性地:

[0012] a. 抑制BMP6;

[0013] b. 增加血清铁水平、转铁蛋白饱和度 (TAST)、网织红细胞血红蛋白含量 (CHr)、网织红细胞计数、红细胞计数、血红蛋白或血细胞比容;

[0014] c.降低铁调素的活性或水平;

[0015] d.治疗贫血;或

[0016] e.增加或维持血红蛋白水平;

[0017] 该方法包括基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

[0018] 在另一方面,本发明涉及采用BMP6拮抗剂治疗患有贫血的患者的方法,其包括基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

[0019] 在另一方面,本发明涉及采用BMP6拮抗剂选择性地治疗患有贫血的患者的方法,其包括:

[0020] a)测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白水平;以及

[0021] b)随后选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP9拮抗剂,其中所述铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

[0022] 在另一方面,本发明涉及采用BMP6拮抗剂选择性地治疗患有贫血的患者的方法,其包括:

[0023] a)测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白水平;

[0024] b)随后基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用BMP6拮抗剂的治疗;以及

[0025] c)随后向所述患者给予治疗有效量的BMP9拮抗剂。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

[0026] 在另一方面,本发明涉及一种方法,其在有需要的患者中选择性地:

[0027] a.抑制BMP6;

[0028] b.增加血清铁水平、转铁蛋白饱和度(TAST)、网织红细胞血红蛋白含量(CHr)、网织红细胞计数、红细胞计数、血红蛋白或血细胞比容;

[0029] c.降低铁调素的活性或水平;

[0030] d.治疗贫血;或

[0031] e.增加或维持血红蛋白水平;

[0032] 该方法包括基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。

[0033] 在另一方面,本发明涉及采用BMP6拮抗剂治疗患有贫血的患者的方法,其包括基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。

[0034] 在另一方面,本发明涉及采用BMP6拮抗剂选择性地治疗患有贫血的患者的方法,其包括:

[0035] a)测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白水平;以及

[0036] b)随后选择性地向所述患者给予治疗有效量的BMP9拮抗剂,其中所述铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

[0037] 在另一方面,本发明涉及采用BMP6拮抗剂选择性地治疗患有贫血的患者的方法,其包括:

- [0038] a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白水平;
- [0039] b) 随后基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用BMP6拮抗剂的治疗;以及
- [0040] c) 随后向所述患者给予治疗有效量的BMP9拮抗剂。
- [0041] 在包括任何前述方面的实施例中,铁蛋白水平是铁蛋白蛋白质水平。
- [0042] 在包括任何前述方面的实施例中,测定步骤包括选自下组的技术,该组由以下组成:免疫测定、免疫组织化学、ELISA、流式细胞术、蛋白质印迹、HPLC和质谱法。
- [0043] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在于,基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。
- [0044] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在于,基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,向所述患者给予治疗有效量的BMP6拮抗剂。
- [0045] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在于:
- [0046] a) 基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用所述BMP6拮抗剂的治疗;并且
- [0047] b) 随后向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。
- [0048] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在于:
- [0049] a) 基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用所述BMP6拮抗剂的治疗;并且
- [0050] b) 随后向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。
- [0051] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在于:
- [0052] a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白;并且
- [0053] b) 基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。
- [0054] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在于:
- [0055] a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白;并且
- [0056] b) 基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择性地向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。
- [0057] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在于:
- [0058] a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白;
- [0059] b) 基于来自铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用所述BMP6拮抗剂的治疗;并且
- [0060] c) 选择性地向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。
- [0061] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有贫血的患者的BMP6拮抗剂,其特征在于:
- [0062] a) 测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白;
- [0063] b) 基于来自铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的患者的生物样品,选择所述患者进行采用所

述BMP6拮抗剂的治疗;并且

[0064] c) 选择性地向所述患者给予治疗有效量的所述BMP6拮抗剂。

[0065] 另一方面,本发明涉及预测患有贫血的患者对采用BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性的方法,其包括测定来自患者的生物样品中的铁蛋白,其中铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 指示所述患者对采用BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性增加。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

[0066] 在另一方面,本发明涉及预测患有贫血的患者对采用BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性的方法,其包括测定来自所述患者的生物样品中的铁蛋白,其中铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 指示患者对采用BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性增加。

[0067] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述方法或用途还包括从所述患者获得生物样品的步骤,其中所述获得步骤在所述测定步骤之前进行。

[0068] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述铁蛋白水平是铁蛋白蛋白质水平。

[0069] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,测定步骤包括选自下组的技术,该组由以下组成:免疫测定、免疫组织化学、ELISA、流式细胞术、蛋白质印迹、HPLC和质谱法。

[0070] 在另一方面,本发明提供了一种产生可传输形式的信息的方法,该可传输形式的信息用于预测患有贫血的患者对采用BMP6拮抗剂的治疗的反应性,该方法包括:

[0071] a) 基于来自所述患者的生物样品中铁蛋白水平 $\leq 2000\text{ng/mL}$ 的存在,确定所述患者对采用所述BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性增加;以及

[0072] b) 在有形或无形媒介形态上记录所述确定步骤的结果,以便用于传输。在实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq 500\text{ng/mL}$ 。

[0073] 在另一方面,本发明提供了一种产生可传输形式的信息的方法,该可传输形式的信息用于预测患有贫血的患者对采用BMP6拮抗剂的治疗的反应性,该方法包括:

[0074] a) 基于来自所述患者的生物样品中铁蛋白水平 $\geq 500\text{ng/mL}$ 的存在,确定所述患者对采用所述BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性增加;以及

[0075] b) 在有形或无形媒介形态上记录所述确定步骤的结果,以便用于传输。

[0076] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述患者患有贫血。在实施例中,贫血是与慢性疾病相关的贫血。在实施例中,所述慢性疾病是慢性肾病、癌症或炎症。

[0077] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述患者正在或已经采用红细胞生成刺激剂(ESA)例如红细胞生成素(EPO)进行治疗。

[0078] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,贫血是EPO低反应性贫血。

[0079] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,贫血是铁限制性贫血,例如功能性铁限制性贫血。

[0080] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述患者是慢性血液透析患者。

[0081] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述方法或用途还包括

相对于在没有采用治疗有效量的BMP6拮抗剂治疗的情况下的EPO剂量需求和/或铁剂量需求,降低患者的铁剂量需求、降低患者的EPO剂量需求或降低患者的铁剂量需求和患者的EPO剂量需求二者。在实施例1中,包括在任何前述方面和实施例1的实施例中,所述方法或用途还包括或导致患者的ESA抗性指数(ERI)降低。

[0082] 在实施例1中,包括在任何前述方面和实施例1的实施例中,所述生物样品是滑液、血液、血清、粪便、血浆、尿、泪液、唾液、脑脊液、白细胞样品或组织样品。

[0083] 在实施例1中,包括在任何前述方面和实施例1的实施例中,所述生物样品是血清或血液。

[0084] 在实施例1中,包括在任何前述方面和实施例1的实施例中,所述生物样品是血清。

[0085] 在实施例1中,包括在任何前述方面和实施例1的实施例中,所述BMP6拮抗剂是BMP6结合分子。

[0086] 在实施例1中,包括在任何前述方面和实施例1的实施例中,BMP6拮抗剂是抗BMP6抗体或其抗原结合片段例如,如表1或表14中所述。

[0087] 在实施例1中,包括在任何前述方面和实施例1的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段包括:

[0088] (a) 分别为SEQ ID NO:69、70和71的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:79、80和81的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0089] (b) 分别为SEQ ID NO:72、73和74的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:82、83和84的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0090] (c) 分别为SEQ ID NO:29、30和31的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:39、40和41的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0091] (d) 分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:42、43和44的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0092] (e) 分别为SEQ ID NO:49、50和51的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:59、60和61的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0093] (f) 分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0094] (g) 分别为SEQ ID NO:9、10和11的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:19、20和21的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0095] (h) 分别为SEQ ID NO:12、13和14的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:22、23和24的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0096] 在实施例1中,包括在任何前述方面和实施例1的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段包括:

[0097] (a) SEQ ID NO:75的VH序列;

[0098] (b) SEQ ID NO:35的VH序列;

[0099] (c) SEQ ID NO:55的VH序列;或

[0100] (d) SEQ ID NO:15的VH序列。

[0101] 在实施例1中,包括在任何前述方面和实施例1的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段包括:

[0102] (a) SEQ ID NO:85的VL序列;

[0103] (b) SEQ ID NO:45的VL序列;

[0104] (c) SEQ ID NO:65的VL序列;或

[0105] (d) SEQ ID NO:25的VL序列。

[0106] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段包括:

[0107] (a) SEQ ID NO:75的VH序列,和SEQ ID NO:85的VL序列;

[0108] (b) SEQ ID NO:35的VH序列,和SEQ ID NO:45的VL序列;

[0109] (c) SEQ ID NO:55的VH序列,和SEQ ID NO:65的VL序列;或

[0110] (d) SEQ ID NO:15的VH序列,和SEQ ID NO:25的VL序列。

[0111] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段包括:

[0112] (a) SEQ ID NO:77的重链序列;

[0113] (b) SEQ ID NO:37的重链序列;

[0114] (c) SEQ ID NO:57的重链序列;或

[0115] (d) SEQ ID NO:17的重链序列。

[0116] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段包括:

[0117] (a) SEQ ID NO:87的轻链序列;

[0118] (b) SEQ ID NO:47的轻链序列;

[0119] (c) SEQ ID NO:67的轻链序列;或

[0120] (d) SEQ ID NO:27的轻链序列。

[0121] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段包括:

[0122] (a) SEQ ID NO:77的重链序列,和SEQ ID NO:87的轻链序列;

[0123] (b) SEQ ID NO:37的重链序列,和SEQ ID NO:47的轻链序列;

[0124] (c) SEQ ID NO:57的重链序列,和SEQ ID NO:67的轻链序列;或

[0125] (d) SEQ ID NO:17的重链序列,和SEQ ID NO:27的轻链序列。

[0126] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段以 $\leq 1\text{nM}$ 的KD结合人BMP6。

[0127] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段以 $\leq 0.1\text{nM}$ 的KD结合人BMP6。

[0128] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段对于人BMP6的亲合力比对于人BMP7的亲合力高至少约100倍。

[0129] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段对于人BMP6的亲合力比对于人BMP2、人BMP5或人BMP7的亲合力高至少约100倍。

[0130] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段对于人BMP6的亲合力比对于人BMP2、人BMP5或人BMP7的亲合力高至少约500倍。

[0131] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结

合片段在ELISA中没有可检测出的与人BMP2和/或BMP7的结合。

[0132] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段包括选自IgM和IgG的支架。

[0133] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段是选自IgG1、IgG2以及IgG3或IgG4的IgG。

[0134] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段选自下组,该组由以下组成:单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab和scFv。

[0135] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段是免疫缀合物的组分。

[0136] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段通过Fc区的突变而具有改变的效应子功能。

[0137] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,抗BMP6抗体或其抗原结合片段与人BMP6表位结合,所述人BMP6表位包括序列QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO:98),例如由所述序列组成。

[0138] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,将所述抗体或其抗原结合片段以范围为0.001mg/kg至0.1mg/kg的剂量给予。

[0139] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,将所述抗体或其抗原结合片段以范围为0.0063至0.1mg/kg的剂量给予。

[0140] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,将所述抗体或其抗原结合片段以0.001mg/kg、0.0016mg/kg、0.0025mg/kg、0.0040mg/kg、0.0063mg/kg、0.01mg/kg、0.016mg/kg、0.025mg/kg、0.040mg/kg、0.063mg/kg或0.1mg/kg的剂量给予。

[0141] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,将所述抗体或其抗原结合片段通过静脉内或皮下给予。

[0142] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,将所述抗体或其抗原结合片段通过静脉内给予。

[0143] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,通过经约30至约60分钟的时间段输注来给予。

[0144] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述铁蛋白水平为 $\leq 1900\text{ng/mL}$ 、 $\leq 1800\text{ng/mL}$ 、 $\leq 1700\text{ng/mL}$ 、 $\leq 1600\text{ng/mL}$ 、 $\leq 1500\text{ng/mL}$ 、 $\leq 1400\text{ng/mL}$ 、 $\leq 1300\text{ng/mL}$ 、 $\leq 1200\text{ng/mL}$ 、 $\leq 1100\text{ng/mL}$ 、 $\leq 1000\text{ng/mL}$ 、 $\leq 900\text{ng/mL}$ 、 $\leq 800\text{ng/mL}$ 、 $\leq 700\text{ng/mL}$ 、 $\leq 600\text{ng/mL}$ 或 $\leq 500\text{ng/mL}$ 。

[0145] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述铁蛋白水平为 $\leq 1500\text{ng/mL}$ 。在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述铁蛋白水平为 $\leq 1000\text{ng/mL}$ 。

[0146] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq$ 约200ng/mL、 $\geq$ 约250ng/mL、 $\geq$ 约300ng/mL、 $\geq$ 约350ng/mL、 $\geq$ 约400ng/mL、 $\geq$ 约450ng/mL、 $\geq$ 约500ng/mL、 $\geq$ 约600ng/mL、 $\geq$ 约700ng/mL、 $\geq$ 约800ng/mL、 $\geq$ 约900ng/mL、 $\geq$ 约1000ng/mL、 $\geq$ 约1100ng/mL、 $\geq$ 约1200ng/mL、 $\geq$ 约1300ng/mL、 $\geq$ 约1400ng/mL、 $\geq$ 约1500ng/mL、 $\geq$ 约1600ng/mL、 $\geq$ 约1700ng/mL、 $\geq$ 约1800ng/mL或 $\geq$ 约1900ng/mL。

[0147] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq$ 约500ng/mL、 $\geq$ 约600ng/mL、 $\geq$ 约700ng/mL、 $\geq$ 约800ng/mL、 $\geq$ 约900ng/mL、 $\geq$ 约1000ng/mL、 $\geq$ 约1100ng/mL、 $\geq$ 约1200ng/mL、 $\geq$ 约1300ng/mL或 $\geq$ 约1400ng/mL。

[0148] 在实施例中,包括在任何前述方面和实施例的实施例中,所述铁蛋白水平为 $\geq$ 约500ng/mL。

[0149] 定义

[0150] 除非另外定义,本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同意义。

[0151] 如本文所用,“BMP6”意指蛋白质骨形态发生蛋白6(BMP6)或编码BMP6的基因或核酸。Hahn等人1992 Genomics[基因组学]14:759-62;Sauermann等人1993 J.Neurosci.Res.[神经科学研究杂志]33:142-7;NCBI基因ID:654。BMP6也称为:BMP-6;VGR;VGR1;外部ID:OMIM:112266 MGI:88182;同源基因:1300;GeneCards:BMP6基因。直系同源:物种:人类:Entrez:654;Ensembl:ENSG00000153162;UniProt:P22004;RefSeq(mRNA):NM\_001718;RefSeq(蛋白质):NP\_001709;位置(UCSC):Chr 6:7.73-7.88Mb;物种:小鼠:Entrez:12161;Ensembl:ENSMUSG00000039004;UniProt:P20722;RefSeq(mRNA):NM\_007556;RefSeq(蛋白质):NP\_031582;位置(UCSC):Chr 13:38.35-38.5Mb。如本文所述,结合BMP6的抗体或抗原结合片段与BMP6蛋白结合。

[0152] 如本文所用,“BMP2”意指蛋白质骨形态发生蛋白2(BMP2)或编码BMP2的基因或核酸。BMP2也称为:BDA2;以及BMP2A;外部ID OMIM:112261 MGI:88177 HomoloGene:926 GeneCards:BMP2基因。物种:人类;Entrez:650;Ensembl:ENSG00000125845;UniProt:P12643;RefSeq(mRNA):NM\_001200;RefSeq(蛋白质):NP\_001191;位置(UCSC):Chr 20:6.75-6.76Mb。物种:小鼠;Entrez:12156;Ensembl:ENSMUSG00000027358;UniProt:P21274;RefSeq(mRNA):NM\_007553;RefSeq(蛋白质):NP\_031579;位置(UCSC):Chr 2:133.55-133.56Mb。如本文所述,结合BMP2的抗体或抗原结合片段与BMP2蛋白结合。

[0153] 如本文所用,“BMP5”意指蛋白质骨形态发生蛋白5(BMP5)或编码BMP5的基因或核酸。BMP5也称为:MGC34244;外部ID OMIM:112265 MGI:88181 HomoloGene:22412 GeneCards:BMP5基因。物种:人类;Entrez:653;Ensembl:ENSG00000112175;UniProt:P22003;RefSeq(mRNA):NM\_021073;RefSeq(蛋白质):NP\_066551;位置(UCSC):Chr 6:55.62-55.74Mb。物种:小鼠;Entrez:12160;Ensembl:ENSMUSG00000032179;UniProt:P49003;RefSeq(mRNA):NM\_007555;RefSeq(蛋白质):NP\_031581;位置(UCSC):Chr 9:75.78-75.9Mb。如本文所述,结合BMP5的抗体或抗原结合片段与BMP5蛋白结合。

[0154] 如本文所用,“BMP7”意指蛋白质骨形态发生蛋白7(BMP7)或编码BMP7的基因或核酸。BMP7也称为:成骨蛋白-1;OP-1;外部ID OMIM:112267 MGI:103302 HomoloGene:20410 GeneCards:BMP7基因。物种:人类;Entrez:655;Ensembl:ENSG00000101144;UniProt:P18075;RefSeq(mRNA):NM\_001719;RefSeq(蛋白质):NP\_001710;位置(UCSC):Chr 20:55.74-55.84Mb。物种:小鼠;Entrez:12162;Ensembl:ENSMUSG00000008999;UniProt:P23359;RefSeq(mRNA):NM\_007557;RefSeq(蛋白质):NP\_031583;位置(UCSC):Chr 2:172.87-172.94Mb。如本文所述,结合BMP7的抗体或抗原结合片段与BMP7蛋白结合。

[0155] “铁调素”意指基因铁调素或蛋白质铁调素,即一种肽激素。铁调素也称为:HAMP

(铁调素抗微生物蛋白或肽);HEPC;HFE2B;LEAP1 (LEAP-1);PLTR;OMIM:606464;HomoloGene:81623;GeneCards:HAMP基因;Entrez 57817;Ensembl ENSG00000105697;UniProt P81172;RefSeq (mRNA) NM\_021175;RefSeq (蛋白质) NP\_066998;位置 (UCSC) Chr 19:35.77-35.78Mb。Krause等人FEBS Lett. [FEBS快报]480:147-150;和Pigeon等人2001 J.Biol.Chem. [生物化学杂志]276:7811-9。还参见:Ganz 2003 Blood [血液]102:783-8;Roy等人2005 Curr.Opin.Hemat. [当前血液学观点]12:107-111;Fleming等人2006 Semin.Liver Dix.25:411-9;Park等人2001 J.Biol.Chem. [生物化学杂志]276:7806-10;Majore等人2002 Haematologica [血液病学]87:221-2;Kluver等人2002 J.Pept.Re s. [肽研究杂志]59:241-8;Hunter等人2002 J.Biol.Chem. [生物化学杂志]277:37597-603;Weinstein等人2003 Blood [血液]100:3776-81;Nemeth等人2003 Blood [血液]101:2461-3;Roetto等人2003 Nat.Genet. [自然基因组学]33:21-2;Strausberg等人2003 Proc.Natl.Acad.Sci USA [美国国家科学院院刊]99:16899-903;Gehrke等人2003 Blood [血液]102:371-6;Merryweather-Clarke等人2004 Human Mol.Genet. [人类分子遗传学]12:2241-7;Clark等人2003 Genome Res. [基因组研究]13:2265-70;Roetto等人2004 Blood [血液]103:2407-9;Jacolot等人2004 Blood [血液]103:2835-40;以及Ota等人2004 Nat.Genet. [自然基因组学]36:40-45。

[0156] 如本文所用,“BMP6拮抗剂”是指能够拮抗(例如,降低、抑制、减少、延迟)BMP6功能、表达和/或信号传导(例如,通过阻断BMP6与BMP6受体的结合)的分子。BMP6拮抗剂的非限制性实例包括BMP6结合分子和BMP6受体结合分子。在所披露的方法、方案、试剂盒、过程、用途和组合物的一些实施例中,使用BMP6拮抗剂。

[0157] 如本文所用,“BMP6结合分子”是指能够结合单独的或与其他分子缔合的人BMP6抗原的任何分子。所述结合反应可以通过标准方法(定性测定)显示,包括例如结合测定、竞争测定或用于确定BMP6与BMP6受体结合的抑制的生物测定或任何种类的结合测定,其中参考使用具有不相关特异性但理想上具有相同同种型的抗体的阴性对照测试。BMP6结合分子的非限制性实例包括与B细胞或杂交瘤产生的BMP6结合的小分子、BMP6受体诱饵和抗体和嵌合的CDR移植的或人抗体或其任何片段(例如F(ab')<sub>2</sub>和Fab片段),以及单链或单结构域抗体。优选地,BMP6结合分子拮抗(例如,降低、抑制、减少、延迟)BMP6功能、表达和/或信号传导。在所披露的方法、方案、试剂盒、过程、用途和组合物的一些实施例中,使用BMP6结合分子。

[0158] “BMP6受体结合分子”意指能够结合单独的或与其他分子缔合的人BMP6受体的任何分子。所述结合反应可以通过标准方法(定性测定)显示,包括例如结合测定、竞争测定或用于确定BMP6受体与BMP6结合的抑制的生物测定或任何种类的结合测定,其中参考使用具有不相关特异性但理想上具有相同同种型的抗体的阴性对照测试。BMP6受体结合分子的非限制性实例包括小分子、BMP6诱饵和通过B细胞或杂交瘤产生的BMP6受体的抗体和嵌合的CDR移植的或人抗体或其任何片段例如F(ab')<sub>2</sub>和Fab片段,以及单链或单结构域抗体。优选地,BMP6受体结合分子拮抗(例如,降低、抑制、减少、延迟)BMP6功能、表达和/或信号传导。在所披露的方法、方案、试剂盒、过程、用途和组合物的一些实施例中,使用BMP6受体结合分子。

[0159] 如本文所用,“贫血”意指随着血液携带氧的能力降低,血液中红细胞数量减少或

血红蛋白或铁的量减少。

[0160] 如本文中可互换使用的,“EPO抗性指数”或“ERI”意指作为血红蛋白水平的函数的ESA例如EPO剂量(单位/kg体重)的变化。在实施例中,每周测量ESA剂量/血红蛋白水平。在实施例中,每月测量ESA剂量/血红蛋白水平。在实施例中,在多次测量中比较ESA剂量/血红蛋白水平以达到ERI。

[0161] 可以使用本领域已知的任何方法诊断贫血,其包括作为非限制性实例,在男性中根据血红蛋白小于约130至140g/L(13至14g/dL)而在女性中血红蛋白小于约120至130g/L(12至13g/dL)。Janz等人2013Emerg.Med.Pract.[新兴医学实践]15:1-15;和Smith 2010 Am.J.Man.Care[美国管理式医疗杂志]增刊16 S59-66。

[0162] 如本文所用,术语“BMP6抗体”、“抗人BMP6抗体”、“BMP6结合抗体”、“BMP6拮抗剂抗体”等(及其抗原结合片段)包括与蛋白质BMP6结合的抗体(及其抗原结合片段)。

[0163] 如本文所用,术语“抗体”、“其抗原结合片段”、“抗原结合部分”等包括整个抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。天然存在的“抗体”是包含由二硫键互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(在本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域,即CH1、CH2以及CH3组成。每个轻链由轻链可变区(在本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),它们散布着称为框架区(FR)的较保守的区。每个VH和VL由从氨基末端到羧基末端以如下列顺序排列的三个CDR和四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q))的结合。

[0164] 如本文所用,术语“抗原结合片段”、“其抗原结合片段”、抗体的“抗原结合部分”等是指完整抗体的一个或多个片段,该一个或多个片段保留特异性地结合给定抗原(例如,BMP6)的能力。抗体的抗原结合功能可以由完整抗体的片段来执行。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括Fab片段,一种由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)<sub>2</sub>片段,一种包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;单结构域抗体(dAb)片段(Ward等人,1989Nature[自然]341:544-546),其由VH结构域组成;以及分离的互补决定区(CDR)。

[0165] 此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH是由单独的基因编码的,但是可以使用重组方法将这两个结构域通过能够使它们形成成为单条蛋白质链的人工肽接头来接合,其中VL区和VH区组配对形成单价分子(被称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等人,1988Science[科学]242:423-426;和Huston等人,1988Proc.Natl.Acad.Sci.[美国国家科学院院刊]85:5879-5883)。此类单链抗体包含抗体的一个或多个“抗原结合部分”。这些抗体片段是使用本领域的技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式针对效用来筛选这些片段。

[0166] 抗原结合部分还可以掺入到单结构域抗体、大型抗体(maxibody)、微型抗体(minibody)、胞内抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体、v-NAR和bis-scFv中(参见例如,Hollinger和Hudson,2005,Nature Biotechnology[自然生物技术],23,9,1126-1136)。可

以基于多肽诸如III型纤连蛋白(Fn3)将抗体的抗原结合部分移植到支架中(参见美国专利号6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽单体)。

[0167] 抗原结合部分可以掺入包含一对串联Fv区段(VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,该单链分子与互补轻链多肽共同形成一对抗原结合区(Zapata等人,1995Protein Eng.[蛋白质工程]8(10):1057-1062;和美国专利号5,641,870)。

[0168] 如本文所用,术语“亲和力”是指抗体和抗原之间在单个抗原位点处的相互作用强度。在每个抗原位点内,抗体“臂”的可变区在许多位点通过弱抗非共价力与抗原相互作用;相互作用越多,亲和力越强。

[0169] 如本文所用,术语“亲合力”是指抗体-抗原复合物的总体稳定性或强度的信息量度。它受三个主要因素控制:抗体表位亲和力;抗原和抗体二者的化合价;以及相互作用部分的结构布置。最终,这些因素决定了抗体的特异性,即特定抗体与精确抗原表位结合的可能性。

[0170] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来经修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和邻磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构(即与氢结合的 $\alpha$ 碳、羧基、氨基和R基团,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷)的化合物。这种类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有如下结构的化合物,所述结构与氨基酸的一般化学结构不同但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用。

[0171] 如本文所用,术语“结合特异性”是指单个抗体结合位点仅与一种抗原决定簇反应的能力。抗体的结合位点位于分子的Fab部分中,并且由重链和轻链的高变区构建。抗体的结合亲和力是单个抗原决定簇与抗体上的单个结合位点之间的反应强度。它是在抗原决定簇与抗体的结合位点之间运行的吸引力和排斥力的总和。

[0172] 两个实体之间的特异性结合意指具有至少 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 或 $10^{11} M^{-1}$ 的平衡常数( $K_A$ 或 $K_A$ )的结合。短语“特异性地(或选择性地)结合”抗体(例如,BMP6结合抗体)是指结合反应,其决定着蛋白质和生物制剂的异质群体中同源抗原(例如,人BMP6蛋白)的存在。除了上述平衡常数( $K_A$ )之外,本发明的BMP6结合抗体通常还具有约 $1 \times 10^{-2} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 或更低的解离速率常数( $K_d$ 或 $K_D$ 或 $K_D$ ),并且以比其对于非特异性抗原(例如BMP2、BMP5或BMP7)的结合亲和力大至少两倍的亲和力结合BMP6。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原有特异性的抗体”在本文中术语“与抗原特异性地结合的抗体”可互换使用。

[0173] 两个实体之间的特异性结合意指具有如下平衡常数( $K_A$ )( $k_{on}/k_{off}$ )的结合:至少 $10^2 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^2 M^{-1}$ 、至少 $10^3 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^3 M^{-1}$ 、至少 $10^4 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、至少 $10^5 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、至少 $10^6 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、至少 $10^{10} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、至少 $10^{11} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、至少 $10^{12} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、至少 $10^{13} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、至少 $10^{14} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 、至少 $10^{15} M^{-1}$ 或至少 $5 \times 10^{15} M^{-1}$ 。

[0174] 术语“嵌合抗体”(或其抗原结合片段)是抗体分子(或其抗原结合片段),其中(a)所述恒定区或其部分被改变、替代或更换,使得抗原结合位点(可变区)与不同或改变类别、

效应子功能和/或种类的恒定区连接,或者与赋予嵌合抗体新特性的完全不同的分子(例如酶、毒素、激素、生长因素、药物等)连接;或(b)所述可变区或其部分被改变、替代或更换为具有不同或改变的抗原特异性的可变区。例如,可以通过用来自人免疫球蛋白的恒定区替代其恒定区来修饰小鼠抗体。由于被人恒定区替代,所述嵌合抗体可以保留其识别抗原的特异性,同时与原始小鼠抗体相比在人体中具有降低的抗原性。

[0175] 术语“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列二者。关于特定的核酸序列,保守修饰的变体是指那些编码相同或基本相同的氨基酸序列的核酸,或者其中所述核酸不编码基本上相同的序列的氨基酸序列。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在密码子指定丙氨酸的每个位置,密码子可以改变为任何所述的相应密码子而不改变所编码的多肽。这种核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰变异的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了AUG,其通常是甲硫氨酸的唯一密码子,和TGG,其通常是色氨酸的唯一密码子)可以被修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异隐含在每个所描述的序列中。

[0176] 对于多肽序列,“保守修饰的变体”包括对多肽序列的单独取代、缺失或添加,其导致用化学上相似的氨基酸取代氨基酸。提供功能相似的氨基酸的保守取代表是本领域公知的。这种保守修饰的变体是对本发明的多态变体、种间同源染色体和等位基因的补充,并且不排除它们。以下八组含有彼此保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见例如,Creighton,Proteins[蛋白质](1984))。在一个实施例中,术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。

[0177] 如本文所用,术语“阻断”是指阻止或防止相互作用或过程,例如阻止配体依赖性或非依赖性信号传导。

[0178] 如本文所用,术语“识别”是指抗体或其抗原结合片段,其找到并与其构象表位相互作用(例如,结合)。

[0179] 术语“交叉阻断”(“cross-block”、“cross-blocked”和“cross-blocking”)、“竞争”、“交叉竞争”和相关术语在本文中可互换使用,意指抗体或其他结合剂在标准竞争性结合测定中干扰其他抗体或结合剂与BMP6的结合。

[0180] 抗体或其他结合剂能够干扰另一种抗体或结合分子与BMP6的结合的能力或程度,以及因此是否可以称为根据本发明的交叉阻断,可以使用标准竞争结合测定来确定。一种合适的测定包括使用Biacore技术(例如通过使用BIAcore 3000仪器(Biacore,乌普萨拉(Uppsala),瑞典)),其可以使用表面等离子体共振技术测量相互作用的程度。用于测量交叉阻断的另一种测定使用基于ELISA的方法。

[0181] 术语“中和”意指抗体在与其靶标结合后降低靶标的活性、水平或稳定性;例如,BMP6抗体在与BMP6结合后通过至少部分地降低BMP6的活性、水平或稳定性(如信号传导或其在铁调素水平和贫血中的作用)来中和BMP6。

[0182] 术语“表位”意指能够与抗体特异性结合的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学

活性表面基团组成,比如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位和非构象表位差别在于:在变性溶剂的存在下,对构象表位(而不是非构象表位)的结合丧失。

[0183] 术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白或以其他方式与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团组成,如氨基酸BMP6或碳水化合物或糖侧链,并且可以具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以是“线性的”或“构象的”。

[0184] 术语“线性表位”是指具有蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用点的表位沿着蛋白质的一级氨基酸序列(连续)线性地发生。

[0185] 如本文所用,术语对于IgG抗体的“高亲和力”是指抗体对于靶抗原例如BMP6具有 $10^{-8}$ M或更低、 $10^{-9}$ M或更低或 $10^{-10}$ M或 $10^{-11}$ M或更低的KD。然而,对于其他抗体同种型,“高亲和力”结合可以变化。例如,对于IgM同种型的“高亲和力”结合是指抗体具有 $10^{-7}$ M或更低或 $10^{-8}$ M或更低的KD。

[0186] 如本文所用,术语“人抗体”(或其抗原结合片段)旨在包括具有可变区的抗体(及其抗原结合片段),其中框架区和CDR区均源自人来源的序列。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区还源自此类人序列,例如人种系序列或突变形式的人种系序列。本发明的人抗体及其抗原结合片段可以包括不是由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过在体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变来引入的突变)。

[0187] 如本文所用,短语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”(或其抗原结合片段)是指多肽(包括抗体、抗体片段、双特异性抗体等),它们具有基本上相同的氨基酸序列或源自相同的遗传来源。该术语还包括具有单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物展现出对具体表位的单一结合特异性和亲和力。

[0188] 术语“人单克隆抗体”(或其抗原结合片段)是指具有可变区的展现出单一结合特异性的抗体(及其抗原结合片段),其中框架区和CDR区均源自人序列。在一个实施例中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括从转基因非人动物(例如转基因小鼠)获得的B细胞,该转基因非人动物具有与永生化细胞融合的包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0189] 本文所用的短语“重组人抗体”(或其抗原结合片段)包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的全部人抗体(及其抗原结合片段),如从动物(例如小鼠)(该动物对于人免疫球蛋白基因是转基因或转染色体的)或由此制备的杂交瘤分离的抗体、从被转化以表达人抗体的宿主细胞分离(例如从转染瘤分离)的抗体、从重组、组合人抗体文库分离的抗体,以及通过包括将人免疫球蛋白基因、序列中的全部或部分剪接成其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。这种重组人抗体具有可变区,其中框架区和CDR区源自人种系免疫球蛋白序列。在一个实施例中,可以对这种重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用针对人Ig序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是如下序列,当所述序列源自且与人种系VH和VL序列相关时可能不是体内人抗体种系库中天然存在的。

[0190] 如本文所用,“人源化”抗体(或其抗原结合片段)是保留非人抗体的反应性同时在人体中具有较低免疫原性的抗体(或其抗原结合片段)。例如,这可以通过保留非人CDR区并

用其人类对应物(即恒定区以及可变区的框架部分)替代抗体的其余部分来实现。参见例如,Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],81:6851-6855,1984;Morrison和Oi,Adv.Immunol.[免疫学进展],44:65-92,1988;Verhoeyen等人,Science[科学],239:1534-1536,1988;Padlan,Molec.Immun.[分子免疫学],28:489-498,1991;和Padlan,Molec.Immun.[分子免疫学],31:169-217,1994。人类工程技术的其他实例包括但不限于美国专利号5,766,886中披露的Xoma技术。

[0191] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同”或“一致性”百分比是指两个或更多个相同的序列或子序列。当在比较窗口或指定区域中进行比较和比对以寻求使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量的最大对应时,如果两个序列具有规定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即,在规定区域内或当没有指定时则在整个序列上,60%一致性,任选65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%一致性),则两个序列是“基本上相同的”。任选地,一致性存在于长度为至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或更优选地存在于长度为100至500或1000个或更多个核苷酸(或20、50、200个或更多个氨基酸)的区域上。任选地,一致性存在于长度为至少50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或更优选地存在于长度为100至500或1000个或更多个核苷酸(或20、50、200个或更多个氨基酸)的区域上。

[0192] 对于序列比较,通常一个序列充当参考序列,将测试序列与之进行比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机中,指定子序列坐标(如果需要的话)并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列一致性百分比。

[0193] 如本文所用,“比较窗口”包括提及选自下组的多个邻接位置中的任何一个的区段,该组由20至600,通常约50至约200,更通常约100至约150组成,其中在两个序列最佳比对后,可以将序列与相同数量的邻接位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域公知的。用于比较的序列的最佳比对可以例如通过如下方法进行:例如,通过Smith和Waterman(1970)Adv.Appl.Math.[应用数学进展]2:482c的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443,1970的同源性比对算法,通过Pearson和Lipman,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]85:2444,1988的寻找相似性方法,通过这些算法的计算机实现(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group[威斯康辛遗传学软件包,遗传学计算机组],575Science[科学]Dr.,Madison,Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)或通过手动比对和目视检查(参见例如,Brent等人,Current Protocols in Molecular Biology[当前分子生物学方案],John Wiley&Sons公司(ringbou编,2003))。

[0194] 适用于确定序列一致性和序列相似性百分比的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,它们分别描述在Altschul等人,Nuc.Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402,1977;和Altschul等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-410,1990中。用于进行BLAST分析的软件是通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公共可获得的。该算法包括首先通过鉴定查询序列中长度为W的短词来鉴定高评分序列对(HSP),当与数据库序列中的相同长度的词比对时,所述长度为W的短词匹配或满足一些正值阈值得分T。T被称为邻域词得分阈值(Altschul等人,同上)。这些最初的邻

域字命中作为种子,用于启动搜索以找到包含它们的更长的HSP。词命中沿着每个序列在两个方向上扩展,远至可以增加累积比对得分。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;总是>0)和N(错配残基的罚分;总是<0)计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积得分。在以下情况下,每个方向上的词命中的扩展停止:累积比对得分从其最大实现值下降数量X;由于一个或多个负评分残基比对的累积,累积得分为零或低于零;或达到任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)默认使用字长(N)为11、期望值(E)为10、M=5、N=-4以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序默认使用字长为3和期望值(E)为10,以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:10915,1989)比对(B)为50、期望值(E)为10、M=5、N=-4以及两条链的比较。

[0195] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如,Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:5873-5787,1993)。BLAST算法提供的一种相似性量度是最小总和概率(P(N)),其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.2,更优选地小于约0.01,并且最优选地小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0196] 两个氨基酸序列之间的一致性百分比也可以使用已并入ALIGN算法(2.0版)中的E.Meyers和W.Miller(Comput.Appl.Biosci.[计算机应用生物科学],4:11-17,1988)的算法,利用PAM120权重残基表、空位长度罚分为12、空位罚分为4来确定。另外,两个氨基酸序列之间的百分比一致性可以使用已经并入GCG软件包中的GAP程序(可从www.gcg.com获得)中的Needleman和Wunsch(J.Mol,Biol.[分子生物学杂志]48:444-453,1970)算法,利用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵和空位权重为16、14、12、10、8、6或4以及长度权重为1、2、3、4、5或6来确定。

[0197] 除了上述序列一致性百分比之外,两个核酸序列或多肽基本上相同的另一个指示是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体进行免疫交叉反应,如下所述。因此,多肽通常与第二多肽基本上相同,例如其中所述两种肽仅通过保守取代而不同。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是所述两个分子或它们的补体在严格条件下彼此杂交,如下所述。两个核酸序列基本上相同的又另一个指示是相同的引物可用于扩增序列。

[0198] 如本文所用,术语“分离的抗体”(或其抗原结合片段)是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(或其抗原结合片段)(例如,特异性地结合BMP6的分离的抗体基本上不含特异性地结合除BMP6以外的抗原的抗体)。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学品。

[0199] 术语“同种型”是指由重链恒定区基因提供的抗体类别(例如,IgM、IgE、IgG如IgG1或IgG4)。同种型还包括这些类别之一的修饰形式,其中已经对Fc功能进行了修饰,例如以增强或降低效应子功能或与Fc受体的结合。

[0200] 如本文所用,术语“Kassoc”或“Ka”或“KA”或“K<sub>A</sub>”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而如本文所用的术语“Kdis”或“Kd”旨在指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。在一个实施例中,如本文所用,术语“K<sub>D</sub>”旨在指解离常数,其由Kd与Ka的比(即Kd/Ka)

获得并表示为摩尔浓度(M)。可以使用本领域中的完善方法测定抗体的 $K_D$ 值。用于测定抗体的 $K_D$ 的方法是通过使用表面等离子体共振或使用生物传感器系统如Biacore®系统。

[0201] 如本文所用,术语“单克隆抗体”(或其抗原结合片段)或“单克隆抗体(或其抗原结合片段)组合物”是指具有单分子组成的抗体分子(或其抗原结合片段)的制剂。单克隆抗体组合物展现出对具体表位的单一结合特异性和亲和力。

[0202] 术语“核酸”在本文中与术语“多核苷酸”可互换使用,并且是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语包括含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸,该核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的,具有与参考核酸相似的结合特性,并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。这种类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

[0203] 除非另外指出,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)和互补序列以及明确指明的序列。具体地,如下详述,简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得,在这些序列中,一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人,Nucleic Acid Res.[核酸研究]19:5081,1991;Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]260:2605-2608,1985;和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes[分子细胞探针]8:91-98,1994)。

[0204] 术语“可操作地连接”是指两个或更多个多核苷酸(例如DNA)区段之间的功能关系。通常,它指转录调节序列与转录序列的功能关系。例如,如果启动子或增强子序列在合适的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录,则其与编码序列可操作地连接。通常,与转录序列可操作地连接的启动子转录调节序列与转录序列在物理上邻接,即它们是顺式作用的。然而,一些转录调控序列如增强子不需要在物理上邻接或位于极为接近(所述转录调控序列增强其转录的)编码序列的位置。

[0205] 如本文所用,术语“优化的”意指核苷酸序列已被改变为使用在产生细胞或生物(通常为真核细胞,例如毕赤酵母属的细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人类细胞)中优选的密码子编码氨基酸序列。优化的核苷酸序列被工程化以完全或尽可能多地保留最初由起始核苷酸序列编码的氨基酸序列,该起始核苷酸序列也称为“亲本”序列。本文优化的序列已被工程化以具有在哺乳动物细胞中优选的密码子。然而,本文还设想了这些序列在其他真核细胞或原核细胞中的优化表达。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也称为优化的。

[0206] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另有说明,否则特定多肽序列也隐含地包括其保守修饰的变体。

[0207] 本文所用的术语“重组人抗体”(或其抗原结合片段)包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的全部人抗体(及其抗原结合片段),如从动物(例如小鼠)(该动物对于人免疫球蛋白基因是转基因或转染色体的)或由此制备的杂交瘤分离的抗体、从被转化以表达人抗体的宿主细胞分离(例如从转染瘤分离)的抗体、从重组、组合人抗体文库分离的抗体,以及通过包括将人免疫球蛋白基因、序列中的全部或部分剪接成其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。这种重组人抗体具有可变区,其中框架区和CDR区源自人种系免疫球蛋白序列。然而,在一个实施例中,可以对这种重组人抗体进行体外诱变(或

者,当使用针对人Ig序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是如下序列,当所述序列源自且与人种系VH和VL序列相关时可能不是体内人抗体种系库中天然存在的。

[0208] 术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)是指已引入重组表达载体的细胞。应当理解,这种术语不仅意指特定的本发明的细胞,而且意指这种细胞的后代。因为某些变化可在后代中由于突变或环境影响而发生,这种子代可能在事实上与亲代细胞不同,但是仍然包括在如在此使用的术语“宿主细胞”范围内。

[0209] 术语“受试者”包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物如非人灵长类、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非另有说明,否则术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。

[0210] 术语“治疗”包括给予组合物或抗体以预防或延迟疾病(例如贫血)的症状、并发症、或生化指征的发作、缓解症状或阻止或抑制疾病、病状或病症的进一步发展。治疗可以是预防性的(以预防或延迟疾病的发作,或以防止其临床或亚临床症状的显现)或在疾病显现后对症状的治疗性抑制或缓解。

[0211] 术语“载体”意指能够转运与其连接的另一多核苷酸的多核苷酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指环状双链DNA环,其中可以连接附加的DNA区段。另一种类型的载体是病毒载体,其中附加的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞中后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们可操作地连接的基因的表达。这种载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明旨在包括这种其他形式的表达载体如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),它们具有相同的功能。

[0212] 如本文所用,术语“血细胞比容”(“hematocrit”或“haematocrit”)也称为红细胞压积(PCV)或红细胞体积分数(EVF),并且是血液中红细胞的体积(%)。对于血细胞比容,男性通常为约45%而女性为约50%。它与血红蛋白浓度、白细胞计数和血小板计数一起被认为是一个人的全血细胞计数结果的组成部分。在一个实施例中,贫血是指异常低的血细胞比容,与红细胞增多相反,红细胞增多是异常高的血细胞比容。

[0213] 术语“测定”用于指鉴定、筛选、探测、测试测量或确定的行为,该行为可以通过任何常规手段进行。例如,可以通过使用ELISA测定、RNA印迹、成像、血清分型、细胞分型、基因测序、表型分析、单体型分析、免疫组织化学、蛋白质印迹、质谱法等,测定样品中的特定遗传或蛋白质标志物的存在。术语“检测”(等等)意指从给定来源提取特定信息的行为,其可以是直接的或间接的。在本文披露的预测方法的一些实施例中,在生物样品中间接地检测给定物的存在或水平(例如,蛋白质水平等),例如通过查询数据库。术语“测定”和“确定”涵盖物质的转化,例如,通过对样品进行物理测试,将生物样品(例如血液样品或其他组织样品)从一种状态转化为另一种状态。

[0214] 术语“获得”意指以任何方式取得例如获取拥有,例如通过物理干预(例如活检、抽血)或非物理干预(例如经由服务器传输信息)。

[0215] 短语“测定生物样品……”等用于意指可以(直接或间接)测试样品中给定标志物(例如蛋白质)的存在或水平。应当理解,在物质水平表示可能性的情况下,这种物质的水平可用于指导治疗决策。例如,可以通过定量或相对定量的方法(例如,相对于其他样品中的水平的水平)测定其存在来确定患者中铁蛋白的水平。所披露的方法尤其包括确定患者中特定标志物(例如铁蛋白)的水平。

[0216] 如本文所用,关于患者的“选择”和“被选择的”用于意指特定患者是基于(由于)具有预定标准的特定患者而从较大的患者组中特别选择的,例如,该患者具有例如如本文所述的特定水平的铁蛋白。类似地,“选择性治疗”是指向患有特定疾病的患者提供治疗,其中该患者是基于具有预定标准的特定患者而从较大的患者组中特别选择的,例如贫血患者由于该患者具有例如如本文所述的特定的铁蛋白水平而特别选择用于治疗。类似地,“选择性给予”是指向患者给予药物,该患者是基于(由于)具有预定标准(例如特定遗传或其他生物标志物,例如如本文所述的特定的铁蛋白水平)的特定患者而从较大的患者组中特别选择的。通过选择,选择性地治疗和选择性地给予,其意指基于患者的特定生物学向该患者递送个性化疗法,而不是仅基于患有特定疾病的患者来递送标准治疗方案。关于本文所用的治疗方法,选择不是指对具有特定标志物的患者的偶然治疗,而是指基于具有特定标志物(例如,如本文所述的特定的铁蛋白水平)的患者而慎重选择向该患者给予BMP6拮抗剂。因此,选择性治疗不同于标准治疗,该标准治疗向全部患者递送特定药物,而不管其标志物状态如何。

[0217] 如本文所用,“预测”表示本文所述的方法提供信息以使得医疗保健提供者能够确定患有疾病(例如贫血)的个体将对采用BMP6结合分子的治疗有反应或有利地反应的可能性。它并不是指以100%准确度预测响应的能力。相反,技术人员将理解它指的是增加的概率。

[0218] 如本文所用,“可能性”和“很可能”是对事件可能发生的可能性的测量。它可以与“概率”互换使用。可能性是指大于推测但小于确定性的概率。因此,如果使用常识、训练或经验的合理的理性自然人得出结论认为鉴于当前情形事件是可能的,则事件是可能的。在一些实施例中,一旦确定了可能性,可以采用BMP6结合分子治疗患者(或继续治疗,或者进行剂量增加的治疗),或者可以不采用BMP6结合分子治疗患者(或中断治疗,或者进行剂量降低的治疗)。

[0219] 短语“增加的可能性”是指事件发生的概率增加。例如,本文的一些方法允许预测患者与不具有所述标志物(例如,如本文所述的铁蛋白水平)的患有相同或相似疾病的患者相比,是否将展现对采用BMP6结合分子的治疗有反应的可能性增加或对采用BMP6结合分子的治疗更好地反应的可能性增加。

## 附图说明

[0220] 图1A示出了在报告基因测定中通过拮抗剂抗体5、6和7对BMP活性的抑制。示出了针对BMP2、BMP5、BMP6和BMP7的活性。图1B示出了测试结合人BMP6、人BMP7、人BMP5、小鼠BMP6、hBaffR、BSA和Neu的抗体7的ELISA结合测定。在该图和各个其他图中,以及说明书中的其他地方,Ab 5=抗体5;Ab 6=抗体6;且Ab 7=抗体7。

[0221] 图2示出了单剂量大鼠分类PK研究的药效动力学曲线。使用抗体5、6和7。在给药

(10mg/kg, IV) 后1hr、6hr、1天、2天、4天、8天、16天测量血清铁调素和铁水平。

[0222] 图3示出了BMP6抗体对铁代谢的血清生物标志物的剂量依赖性作用。上图：在单次IV注射指定剂量下的抗体6后血清hIgG浓度随时间的变化。下图：左图是单次抗体6或对照人IgG注射后血清铁调素浓度的定量分析，而右图是血清铁浓度。

[0223] 图4示出了在炎症小鼠模型的ESA抗性贫血中BMP6抗体的治疗性处理。上图：炎症模型的BA诱导的ESA抗性贫血的实验方案。下图：BA处理后第13天的红细胞生成参数。HGB：血红蛋白；HCT：血细胞比容；RETA：网织红细胞计数；RET-HE：网织红细胞血红蛋白当量。相对于BA+EP0+hIgG1, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ 。

[0224] 图5示出了通过HDxMS (与质谱分析偶联的氢/氘交换) 的线性表位作图。示出了抗体7结合的BMP6的表位 (人BMP6的残基88-102 (QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO:98)))。使用HDxMS, 发现抗体676 (人源化形式的市售BMP6抗体) 结合由人BMP6的残基23-35 (VSSASDYNSSELK (SEQ ID NO:99)) 组成的表位。

[0225] 图6示出了用于研究BMP6抗体的安全性和功效的临床程序的第1部分的方案。

[0226] 图7示出了用于研究BMP6抗体的安全性和功效的临床程序的剂量调整决策树。

[0227] 图8示出了用于研究BMP6抗体的安全性和功效的临床程序的第2部分的方案。

[0228] 图9示出了雄性大鼠中单剂量抗体7的药代动力学曲线。

[0229] 图10示出了抗体7对大鼠中铁代谢的血清生物标志物的剂量依赖性作用。示出了在指定剂量下的单次抗体7或对照 (媒剂) 注射后血清铁调素浓度的定量分析。左图示出了给药后的前24小时内效果的扩展视图。

[0230] 图11示出了抗体7对大鼠中血清铁的依赖性作用。示出了在指定剂量下的单次抗体7或对照 (媒剂) 注射后血清铁浓度的定量分析。左图示出了给药后的前24小时内效果的扩展视图。

[0231] 图12示出了在食蟹猴中单剂量IV注射抗体7 (3mg/kg) 的浓度-时间曲线。绘制了抗体7总浓度 (游离和BMP6结合的)。

[0232] 图13示出了以3mg/kg的剂量单次静脉内注射抗体7后雄性食蟹猴中的血清铁调素和Fe浓度。示出了来自三只不同猴子的数据以及平均值。

[0233] 图14示出了治疗前 (基线) 和采用0.01mg/kg抗体7 (Ab7) 治疗后3天 (给药后3天) 血液透析患者的TSAT峰值 (铁饱和度, %)。群组1患者的治疗前铁蛋白水平平均小于或等于500ng/mL。群组2患者的治疗前铁蛋白水平平均在500与1000ng/mL之间。粗线示出了每组的中值TSAT水平。

## 具体实施方式

[0234] 本发明提供了采用BMP6的抑制剂治疗与还原铁相关的病症 (例如贫血) 的方法。

[0235] BMP6抑制剂

[0236] 多种BMP6拮抗剂可用于本发明的方法, 例如抗体、融合蛋白、adnectin、适体、anticalins、脂质运载蛋白、核酸 (例如, 反义分子如RNA干扰剂和核酶)、免疫缀合物 (例如, 与治疗剂缀合的抗体)、小分子、融合蛋白、BMP6衍生的肽化合物和基于受体的拮抗剂 (例如可溶性BMP6受体结构域)。

[0237] 核酸/反义分子

[0238] 在另一个实施例中,本发明方法中使用的BMP6拮抗剂是与编码BMP6的基因或与该基因的一部分互补的反义核酸分子或编码反义核酸分子的重组表达载体。如本文所用,“反义”核酸包含核苷酸序列,其与编码蛋白质的“有义”核酸互补,例如与双链cDNA分子的编码链互补、与mRNA序列互补或与基因的编码链互补。因此,反义核酸可以与有义核酸进行氢键合。

[0239] 使用反义核酸下调细胞中特定蛋白质的表达是本领域公知的(参见例如,Weintraub,H.等人,Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis[反义RNA作为基因分析的分子工具],Reviews—Trends in Genetics[综述-遗传学趋势],1卷(1)1986;Askart,F.K.和McDonnell,W.M. (1996) N.Eng.J.Med. [新英格兰医学杂志]334:316-318;Bennett,M.R.和Schwartz,S.M. (1995) Circulation[循环]92:1981-1993;Mercola,D.和Cohen,J.S. (1995) Cancer Gene Ther. [癌症基因疗法]2:47-59;Rossi,J.J. (1995) Br.Med.Bull. [英国医学通报]51:217-225;Wagner,R.W. (1994) Nature[自然]372:333-335)。反义核酸分子包含与另一核酸分子(例如mRNA序列)的编码链互补的核苷酸序列,因此能够与另一核酸分子的编码链进行氢键合。与mRNA序列互补的反义序列可以与mRNA的编码区、mRNA的5'或3'非翻译区或桥接编码区和非翻译区(例如,在5'非翻译区和编码区的接合点)的区域中发现的序列互补。此外,反义核酸可以在序列上与编码mRNA的基因的调节因子区域互补,例如转录起始序列或调节元件。优选地,设计反义核酸以便与以下区域互补,该区域在编码链上/或在mRNA的3'非翻译区中起始密码子之前或跨越起始密码子。

[0240] 可以根据Watson和Crick碱基配对的规则设计反义核酸。所述反义核酸分子可以与BMP6 mRNA的整个编码区互补,但该反义核酸分子更优选地是寡核苷酸,该寡核苷酸仅与BMP6 mRNA的编码区或非编码区的一部分反义。例如,该反义寡核苷酸可以与BMP6 mRNA的翻译起始位点周围的区域互补。反义寡核苷酸的长度可以是例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸。可以使用本领域已知的程序使用化学合成和酶促连接反应构建反义核酸。例如,反义核酸(例如,反义寡核苷酸)可以使用天然存在的核苷酸或不同地修饰的核苷酸化学合成,所述不同地修饰的核苷酸被设计为增加所述分子的生物稳定性或增加反义与有义核酸之间形成的双链体的物理稳定性,例如可以使用硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸。可以用于生成反义核酸的修饰的核苷酸的实例包括5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰基胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖基腺苷、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、β-D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫代-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、怀丁苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷(queosine)、2-硫代胞嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶、(acp3)w以及2,6-二氨基嘌呤。可替代地,所述反义核酸可以在生物学上使用表达载体产生,其中核酸已经在反义方向上被亚克隆至该表达载体中(即从插入的核酸转录的RNA将在感兴趣的靶核酸的反义方向上,如以下小节中进一步讨论的)。

[0241] 通常向受试者给予或原位生成可用于本发明方法的反义核酸分子,使得它们与编码BMP6的细胞mRNA和/或基因组DNA杂交或结合,从而通过抑制转录和/或翻译来抑制表达。杂交可以通过常规核苷酸互补性形成稳定的双链体,或者例如在能结合DNA双链体的反义核酸分子的情况下通过双螺旋的大沟中的特异性相互作用。反义核酸分子的给药途径的实例包括在组织部位直接注射。可替代地,可以修饰反义核酸分子以靶向选择的细胞,然后全身给予。例如,对于全身给予,可以修饰反义分子,使得它们特异性地结合在选择的细胞表面上表达的受体或抗原,例如通过将分子中的反义核酸连接至与细胞表面受体或抗原结合的肽或抗体。反义核酸分子也可以使用本领域公知的和描述在例如US20070111230(其全部内容并入本文)中的载体递送至细胞。为了获得足够的细胞内反义分子浓度,优选如下载体构建体,其中所述反义核酸分子被置于强pol II或pol III启动子控制下。

[0242] 在又一个实施例中,本发明方法使用的反义核酸分子可包括 $\alpha$ -异头核酸分子。 $\alpha$ -异头核酸分子与互补RNA形成特异性双链杂交体,其中与通常的 $\beta$ -单元相反,链彼此平行(Gaultier等人(1987)Nucleic Acids.Res.[核酸研究]15:6625-6641)。反义核酸分子还可以包含2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue等人(1987)Nucleic Acids Res.[核酸研究]15:6131-6148)或嵌合RNA-DNA类似物(Inoue等人(1987)FEBS Lett.[FEBS快报]215:327-330)。

[0243] 在另一个实施例中,用于本发明方法的反义核酸是介导RNAi的化合物。RNA干扰剂包括但不限于核酸分子,包括与BMP6或其片段同源的RNA分子、“短干扰RNA”(siRNA)、“短发夹”或“小发夹RNA”(shRNA)和通过RNA干扰(RNAi)来干扰或抑制靶基因表达的小分子。RNA干扰是一种转录后的靶向基因沉默技术,它使用双链RNA(dsRNA)降解含有与dsRNA相同序列的信使RNA(mRNA)(Sharp,P.A.和Zamore,P.D.287,2431-2432(2000);Zamore,P.D.等人Cell[细胞]101,25-33(2000).Tuschl,T.等人Genes Dev.[基因开发]13,3191-3197(1999))。当内源核糖核酸酶将较长的dsRNA切割成较短的21或22个核苷酸长的RNA(称为小干扰RNA或siRNA)时发生该过程。然后较小的RNA区段介导靶mRNA的降解。用于合成RNAi的试剂盒可从例如New England Biolabs和Ambion商购获得。在一个实施例中,可以使用用于反义RNA的一种或多种上述化学反应。

[0244] 在又一个实施例中,反义核酸是核酶。核酶是具有核糖核酸酶活性的催化RNA分子,其能够切割单链核酸如mRNA,所述催化RNA分子具有针对该单链核酸的互补区。因此,核酶例如锤头状核酶(描述在Haselhoff和Gerlach,1988,Nature[自然]334:585-591中)可用于催化切割BMP6 mRNA转录物,从而抑制BMP6 mRNA的翻译。

[0245] 可替代地,可以通过靶向与BMP6的调节区(例如,启动子和/或增强子)互补的核苷酸序列来抑制基因表达,以形成阻止BMP6基因转录的三螺旋结构。通常参见,Helene,C.,1991,Anticancer Drug Des.[抗癌药物开发]6(6):569-84;Helene,C.等人,1992,Ann.N.Y.Acad.Sci.[纽约科学学术年报]660:27-36;和Maher,L.J.,1992,Bioassays[生物测定]14(12):807-15。

[0246] 融合蛋白和BMP6衍生的肽化合物

[0247] 在另一个实施例中,用于本发明方法的BMP6拮抗剂是源自BMP6氨基酸序列的融合蛋白或肽化合物。特别地,抑制性化合物包含BMP6的融合蛋白或一部分(或其模拟物),其介导BMP6与靶分子的相互作用,使得BMP6与该融合蛋白或肽化合物的接触竞争性地抑制BMP6与靶分子的相互作用。可以使用本领域已知的标准技术制备这种融合蛋白和肽化合物。例

如,肽化合物可以使用标准肽合成技术通过化学合成制备,然后通过本领域已知的用于将肽引入细胞(例如脂质体等)中的各种方法引入细胞中。

[0248] 本发明的融合蛋白或肽化合物的体内半衰期可以通过进行肽修饰来改善,如将N连接的糖基化位点加入到BMP6肽化合物中,或将肽BMP6化合物与聚乙二醇缀合(PEG;聚乙二醇化),例如经由赖氨酸-单聚乙二醇化。已证明这种技术有益于延长治疗性蛋白质药物的半衰期。预期本发明的BMP6多肽的聚乙二醇化可产生类似的药物优势。

[0249] 此外,通过引入非天然氨基酸,可以在本发明多肽的任何部分实现聚乙二醇化。某些非天然氨基酸可以通过Deiters等人,J Am Chem Soc[美国化学学会杂志]125:11782-11783,2003;Wang和Schultz,Science[科学]301:964-967,2003;Wang等人,Science[科学]292:498-500,2001;Zhang等人,Science[科学]303:371-373,2004或在美国专利号7,083,970中描述的技术引入。简而言之,这些表达系统中的一些包括定点诱变以将无义密码子如琥珀TAG引入编码本发明多肽的开放阅读框中。然后将这种表达载体引入可利用对于引入的无义密码子有特异性的tRNA的宿主中,并装有所选择的非天然氨基酸。对于将部分与本发明的多肽缀合的目的有益的特定非天然氨基酸包括具有乙炔和叠氮基侧链的那些非天然氨基酸。然后可以在蛋白质中的这些选择的位点将含有这些新氨基酸的BMP6多肽聚乙二醇化。

[0250] 基于受体的拮抗剂

[0251] 在另一个实施例中,用于本发明方法的BMP6拮抗剂是基于受体的拮抗剂。基于受体的拮抗剂包括分别结合BMP6(或其部分)并破坏BMP6活性和/或功能的可溶性BMP6受体。在一个具体实施例中,基于受体的拮抗剂包括但不限于可溶性血幼素或BMP I型或II型受体。可溶性血幼素的形式包括专利申请披露US 2010/0136015中描述的那些形式。

[0252] BMP6抗体及其抗原结合片段

[0253] 本发明提供了作为可用于本文所述的本发明的方法和其他实施例和方面的BMP6抑制剂的抗体及其抗原结合片段,所述抗体及其抗原结合片段特异性地结合人BMP6。

[0254] BMP6是一种分泌型BMP家族生长因子配体,其已被鉴定为铁代谢激素铁调素的肝表达的关键内源性调节因子。不受任何特定理论的束缚,本披露表明,预期BMP6拮抗剂抗体作为降铁调素疗法通过克服对红细胞生成刺激剂(ESA)的抗性而使患有铁限制性贫血的患者受益,这大大增加了潜在疾病的发病率且通常是不良后果的预测因子。

[0255] 这种抗人BMP6抗体的实例是抗体3、5、6和7,其序列列于表1中,且抗人BMP6抗体列于表14中。

[0256] 抗体5、6和7均以高亲和力结合人BMP6,其中选择性高于BMP7、人BMP5和人BMP2(参见图1A)。这些抗体也均显示出大鼠中血清铁调素的降低和血清铁的增加(参见图2)。

[0257] 抗人BMP6抗体的其他实例是LY3113593(参见例如,临床试验NCT02604160)。抗人BMP6抗体的其他实例描述于PCT申请公开号W0 2014/099391中,其内容通过引用其整体并入本文。W0 2014/099391的特定抗人BMP6抗体包括表14中描述的抗体。

[0258] 表14:抗人BMP6抗体的实例

[0259]	序列名称	序列	SEQ ID NO:

[0260]

抗体 1		
LCDR1	RSENIYRNLA	1
LCDR2	AATNLAD	2
LCDR3	QGIWGTPLT	3
轻链可变区 (aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSENIYRNLA WYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQGIW GTPLTFFGGGTKVEIK	4
轻链 (aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSENIYRNLA WYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQGIW GTPLTFFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SLTTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	5
HCDR1	GYTFTSYAMH	6
HCDR2	YINPYNDGTYNENFK	7
HCDR3	RPFGNAMDI	8
重链可变区 (aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQ GLEWMGYINPYNDGTYNENFKGR VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCARRPFGNAMDIWGQGLVTVSS	92
重链 (aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQ GLEWMGYINPYNDGTYNENFKGR VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCARRPFGNAMDIWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTC NVDHKP	93

[0261]

	SNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG	
抗体 2		
LCDR1	RSENIYRNLA	1
LCDR2	AATNLAD	2
LCDR3	QGIWGTPLT	3
轻链可变区 (aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSENIYRNLA WYVQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQGIWGT PLTFGGGTKVEIK	4
轻链 (aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSENIYRNLA WYVQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQGIWGT PLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSLSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	5
HCDR1	GYTFTSYAMH	6
HCDR2	YINPYNRGTKYNENFK	94
HCDR3	RPFGNAMDI	8
重链可变区 (aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYTFTSYAM HWVRQAPGQGLEWMGYINPYNRGTKYNENFKGR	95

	VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRPFG NAMDIWGQGLVTVSS	
[0262]	重链 (aa) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTSYAM HWVRQAPGQGLEWMGYINPYNRGTKYNENFKGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRPFG NAMDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG	96

[0263] 为了进一步证明靶向该途径可以改善功能性终点,我们测试了BMP6特异性抗体(抗体5至7)调节正常小鼠和大鼠中铁代谢的血清生物标志物以及逆转炎症性贫血的小鼠模型中ESA抗性贫血的能力。我们发现给动物单次注射BMP6抗体导致血清铁水平持续增加,伴随着对循环铁调素的有效抑制。此外,对经受炎症诱导的贫血的小鼠的治疗性处理显著改善了响应于同时红细胞生成素治疗的红细胞生成参数。

[0264] 在本披露中,在炎症性贫血的小鼠模型中对BMP6信号传导的抑制显著改善了铁依赖性红细胞参数。

[0265] 本文披露的BMP6拮抗剂抗体代表了安全地改善伴有红细胞生成素低反应性的贫血的新型治疗方法。不受任何特定理论的束缚,本披露表明,所述新型治疗方法可以通过铁储存的动员和可用性以满足来自红细胞室的需求。

[0266] 在一个实施例中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其以比对人BMP5或人BMP7蛋白中的任何一种的亲和力高100、500或1000倍的对人BMP6蛋白的亲和力结合。不与BMP7结合的针对BMP6的特异性是重要的,因为敲除BMP6对小鼠是不致命的。然而,敲除BMP7的小鼠在出生后死于肾、眼和骨缺陷。任何基因的单独敲除都不会改变心脏发生,但BMP6和BMP7的双重敲除显示心脏中的多种缺陷和延迟;胚胎死于心功能不全。BMP7在预防与纤维化相关的慢性心脏病的进展中是重要的。因此,抗BMP6抗体与BMP7的交叉反应性是不希望的。本文提供的抗体对BMP6的特异性高于BMP7;参见例如,表4A。图1B还示出了对于人BMP6的结合特异性超过对于人BMP2、BMP5和BMP7蛋白的结合特异性的证据。相反,例如,来自R&D Systems的市售BMP6抗体显示在报告基因测定中具有与BMP7强烈的交叉反应性,

并且抑制BMP6和BMP7。

[0267] 本发明的抗体包括但不限于如实例中所述分离的人单克隆抗体(参见下文第6部分)。

[0268] 这种抗人BMP6抗体的实例是抗体3、5、6和7,其序列列于表1中。

[0269] 成熟抗体7源自NOV0442\_VL (YGQ) Germlining/PTM去除,其源自亲本IgG命中NOV0442 (VH3\_3-15, V11\_1e)。抗体7在ELISA结合测定中以高亲和力结合人BMP6,其中选择性比人BMP7高500倍(即对人BMP6的亲和力比对人BMP7的亲和力高500倍)。该抗体对人BMP2或BMP5也没有可检测的活性。由亲本IgG NOV0442和抗体7识别的BMP6肽显示在图5中。该肽包含人BMP6的氨基酸QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO:98)。与IgG NOV0442和抗体7相反,人源化mAb507 (R&D Systems) 结合人BMP6的序列VSSASDYNSELK (SEQ ID NO:99)。因此,由IgG NOV0442和抗体7识别的表位代表新的BMP6表位。抗体7还在体外抑制BMP6与受体的结合。BMP6与BMPRI1A的结合最多被抑制59%;与BMPRI1B的结合最多被抑制85%;并且与RGM-c的结合最多被抑制72%。在大鼠中单次10mg/kg治疗导致循环铁调素的持续抑制。小鼠中估计的最小有效剂量小于或等于0.1mg/kg。血清铁也显示出增加,并且在猴子中3mg/kg的单次抗体剂量后铁调素显示出降低。在使用流产布鲁氏菌抗原模拟贫血的小鼠中,抗体7 (2mg/kg) 的治疗效果与针对慢性EPO疗法的临床显著的红细胞生成反应一致,其中血红蛋白从基线逐渐增加>2.0g/dL。

[0270] 在抗体7中,通过LCDR2内的N51Q突变去除潜在的翻译后修饰位点,以增加随后的产物同质性。源自VH3/λ1框架的抗体经过工程化以匹配最接近的人种系序列:在VH中通过V40A突变,在VL中通过D1Q、I2S突变和引入氨基酸Y49和G50以修复所述框架,其中最初缺少2个残基。

[0271] 该项工作产生抗体7 (=NOV0958=NOV0806\_VH[V40A]\_VL[D1Q、I2S、Y49、G50、N51Q])。

[0272] 与人BMP2、BMP5或BMP7蛋白相比,抗体3、5、6和7均显示出对人BMP6蛋白的高特异性。预测所有这些抗体的表位是相同的,因为它们亲和力成熟之前均来自单一的亲本Fab。例如,抗体3在HCDR2的亲和力成熟之前与抗体5和7共用相同的Fab克隆。抗体5源自NOV0442 (VH3\_3-15, VI1\_1e) → NOV0442\_VL (YGQ) → (HCDR2亲和力成熟) → 抗体5。抗体3源自NOV0442 (VH3\_3-15, VI1\_1e) → NOV0442\_VL (YGS) → (HCDR2亲和力成熟) → 抗体3。在实例中提供了关于生成本文所述抗体的其他细节。

[0273] 本发明提供了特异性地结合BMP6 (例如人BMP6蛋白) 的抗体,所述抗体包含表1和/或表14中列出的VH结构域。本发明还提供了特异性地结合BMP6蛋白的抗体,所述抗体包含具有表1和/或表14中列出的VH CDR中任一个的氨基酸序列的VH CDR。特别地,本发明提供了特异性地结合BMP6蛋白的抗体,所述抗体包含(或可替代地,由以下组成) 具有表1和/或表14中列出的任何VH CDR的氨基酸序列的一个、两个、三个、四个、五个或更多个VH CDR。

[0274] 本发明还提供了特异性地结合BMP6的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含(或可替代地,由以下项组成) 表1和/或表14中列出的VH氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中不超过约10个氨基酸已经突变(其中作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)。本发明还提供了特异性地结合BMP6的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含(或可替代地,由以下项组成) 表1和/或表14中列出的

VH氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中不超过10个氨基酸已经突变(其中作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)。

[0275] 本发明还提供了特异性地结合BMP6的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含(或可替代地,由以下项组成)表1和/或表14中列出的VH氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中不超过约20个氨基酸已经突变(其中作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)。本发明还提供了特异性地结合BMP6的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含(或可替代地,由以下项组成)表1和/或表14中列出的VH氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中不超过20个氨基酸已经突变(其中作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)。

[0276] 本发明还提供了特异性地结合BMP6的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含(或可替代地,由以下项组成)表1和/或表14中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中不超过约10个氨基酸已经突变(其中作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)。本发明还提供了特异性地结合BMP6的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含(或可替代地,由以下项组成)表1和/或表14中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中不超过10个氨基酸已经突变(其中作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)。

[0277] 本发明还提供了特异性地结合BMP6的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含(或可替代地,由以下项组成)表1和/或表14中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中不超过约20个氨基酸已经突变(其中作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)。本发明还提供了特异性地结合BMP6的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含(或可替代地,由以下项组成)表1和/或表14中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中不超过20个氨基酸已经突变(其中作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)。

[0278] 本发明提供了特异性地结合BMP6蛋白的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含表1和/或表14中列出的VL结构域。本发明还提供了特异性地结合BMP6蛋白的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含具有表1和/或表14中列出的VL CDR中任一个的氨基酸序列的VL CDR。特别地,本发明提供了特异性地结合BMP6蛋白的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段(或可替代地,由以下组成)具有表1和/或表14中列出的任何VL CDR的氨基酸序列的一个、两个、三个或更多个VL CDR。

[0279] 本发明的其他抗体及其抗原结合片段包括如下氨基酸,所述氨基酸已经突变但在CDR区中与表1和/或表14中描述的序列中描绘的CDR区具有至少60%、70%、80%、90%或95%一致性。在一个实施例中,其包括突变氨基酸序列,其中当与表1和/或表14中描述的序列中描绘的CDR区相比时,CDR区中不超过1、2、3、4或5个氨基酸已经突变。

[0280] 本发明还提供了编码特异性地结合BMP6蛋白的抗体及其抗原结合片段的VH、VL、全长重链和全长轻链的核酸序列。可优化这种核酸序列以在哺乳动物细胞中表达(例如,表1示出了抗体3、5、6和7的重链和轻链的实例核酸序列)。

[0281] 表1. 本发明的BMP6抗体的实例

[0282]

抗体 3			<b>SEQ</b>
			<b>ID NO:</b>
Kabat	HCDR1	SYVVH	9

Kabat	HCDR2	RIKDHKQGYTTAYAASVKG	10
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	11
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	12
Chothia	HCDR2	KDHKQGYT	13
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	14
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRIKDHK QGYTTAYAASVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN WGQGLVTVSS	15
[0283]	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGT GGCCTGGTGAACACCAGGCGGCAGCCTG CGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGATTC ACCTTTTCTTCTTACGTTGTTCAATTGGGT GCGCCAGGCCCGGGCAAAGGTCTCGA GTGGGTGGGCCGTATCAAAGACCACAA ACAGGGCTACACTACTGCTTATGCCGC CTCTGTGAAAGGCCGCTTACCATTAGC CGCGATGATTCGAAAAACACCCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAA GATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT GTTGAACGTTCTAAATCTGGTTTCGATA ACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTG TTAGCTCA	16
	重链	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRIKDHK QGYTTAYAASVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN	17

		<p>WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST                  SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL                  TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL                  GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD                  KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL                  MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV                  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT                  VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT                  ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS                  LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK                  TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG                  NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>[0284]</p>	<p>DNA 重链</p>	<p>CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGT                  GGCTGGTGAAACCAGGCGGCAGCCTG                  CGCCTGAGCTGCGCCGCCTCCGGATTC                  ACCTTTTCTTCTTACGTTGTTTCATTGGGT                  GCGCCAGGCCCCGGGCAAAGGTCTCGA                  GTGGGTGGGCCGTATCAAAGACCACAA                  ACAGGGCTACACTACTGCTTATGCCGC                  CTCTGTGAAAGGCCGCTTACCATTAGC                  CGCGATGATTCGAAAAACACCCTGTAT                  CTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAA                  GATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT                  GTTGAACGTTCTAAATCTGGTTTCGATA                  ACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTG                  TTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATC                  GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG                  AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG</p>	<p>18</p>

[0285]

		GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCA CACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCAT CGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAACA ACTACAAGACCACGCC	
--	--	--	--

[0286]

		TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	19
Kabat	LCDR2	GSSERPS	20
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	21
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	22
Chothia	LCDR2	GSS	23
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	24
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG AGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGSSERPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVL	25
	DNA VL	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGC GTGAGCGGTGCACCGGGCCAGCGCGTG ACCATTAGCTGTACCGGCAGCAGCAGC AACATTGGTGCTGGTACTCTGTGCATT GGTACCAGCAGCTGCCGGGCACGGCGC CGAAACTGCTGATCTATGGTAGCTCTG AACGCCCAGCGGCGTGCCGGATCGCT TTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCG CCAGCCTGGCGATTACCGGCCTGCAAG CAGAAGACGAAGCGGATTATTAAGTCC AGTCTTGGGACTCTTCTCAGACTCTGGT TGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAAC	26

		CGTCCTA	
	轻链	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG AGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGSSERPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	27
[0287]	DNA 轻链	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGC GTGAGCGGTGCACCGGGCCAGCGCGTG ACCATTAGCTGTACCGGCAGCAGCAGC AACATTGGTGCTGGTTACTCTGTGCATT GGTACCAGCAGCTGCCGGGCACGGCGC CGAAACTGCTGATCTATGGTAGCTCTG AACGCCCAGCGGCGTGCCGGATCGCT TTAGCGGATCCAAAAGCGGCACCAGCG CCAGCCTGGCGATTACCGGCCTGCAAG CAGAAGACGAAGCGGATTATTACTGCC AGTCTTGGGACTCTTCTCAGACTCTGGT TGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGTTAAC CGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCC CTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCT GAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACA CTGGTGTGTCTCATAAGTGACTIONTACC CGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGG CAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAG TGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAA	28

		GCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCT ATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGA AGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGG TCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGA AGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA	
<b>抗体 5</b>			
Kabat	HCDR1	SYVVH	29
Kabat	HCDR2	RIKRESSSYTTMYAAPVKG	30
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	31
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	32
Chothia	HCDR2	KRESSSYT	33
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	34
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRIKRESS SYTTMYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNW GQGLTVSS	35
	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCCTGGG TCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGG AGTGGGTCGGACGGATTAAGAGAGAGT CCTCTAGCTACACTACTATGTACGCCGC TCCCGTGAAGGGCCGGTCACTATCTCT AGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAG GACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGA	36

[0288]

[0289]

		GTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTTCGAT AACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACC GTGTCTAGC	
	重链	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRIKRESS SYTTMYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
	DNA 重链	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGC ACTGGG TCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGG AGTGGGTTCGGACGGATTAAGAGAGAGT CCTCTAGCTACACTACTATGTACGCCGC TCCCGTGAAGGGCCGGTTC ACTATCTCT AGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTAC	38

[0290]

		CTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAG GACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGA GTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTTCGAT AACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACC GTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCA AGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCA AGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCT GGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTC TGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACAC CTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC AGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCA GACCTATATCTGCAACGTGAACCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCCAGCTCCA GAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTT CTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACC CTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAC GAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCA GTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAA AGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCC	
--	--	--	--

[0291]

		AATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTA CACCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGA TATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCAC CCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAG CTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG	
Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	39
Kabat	LCDR2	GQSERPS	40
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	41
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	42
Chothia	LCDR2	GQS	43
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	44
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG AGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVL	45
	DNA VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGGTCAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCTA ATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCACT GGTATCAGCAGCTGCCCCGGCACCGCCC	46

[0292]

		<p>CTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCAG                  AGCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT                  TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCG                  CTAGTCTGGCTATCACCGGCCTGCAGG                  CTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTC                  AGTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG                  TGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGA                  CCGTGCTG</p>	
	轻链	<p>QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG                  AGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERPS                  GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD                  YYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVLGQPK                  AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY                  PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQS                  NNKYAASSYLSTPEQWKSQRSYSCQVT                  HEGSTVEKTVAPTECS</p>	47
	DNA 轻链	<p>CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC                  GTCAGCGGCGCTCCCGGTCAGAGAGTG                  ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCTA                  ATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCACT                  GGTATCAGCAGCTGCCCCGGCACCGCCC                  CTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCAG                  AGCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT                  TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCG                  CTAGTCTGGCTATCACCGGCCTGCAGG                  CTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTC                  AGTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG                  TGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGA</p>	48

[0293]

		CCGTGCTGGGTCAGCCTAAGGCTGCCC CCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCA GCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCA CCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTA CCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAA GGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGG CGTGGAGACCACCACCCCAGCAAGCA GAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAG CTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTG GAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCA GGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGA AAAGACCGTGGCCCCAACCGAGTGCAG C	
<b>抗体 6</b>			
Kabat	HCDR1	SYVVH	49
Kabat	HCDR2	RTRHSDMGYATSYAAPVKG	50
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	51
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	52
Chothia	HCDR2	RHSDMGYA	53
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	54
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRTRHSD MGYATSYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN WGQGTLVTVSS	55
	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC	56

[0294]

		<p>ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCACCTGGG                  TCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGG                  AGTGGGTCCGACGGACTAGACACTCAG                  ATATGGGCTACGCTACTAGCTACGCCG                  CTCCCGTGAAGGGCCGGTTCCTATCTC                  TAGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTA                  CCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGA                  GGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAG                  AGTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTTCGA                  TAACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCAC                  CGTGTCTAGC</p>	
	重链	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT                  FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRTRHSD                  MGYATSYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYL                  QMNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDN                  WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST                  SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL                  TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL                  GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD                  KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL                  MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV                  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT                  VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT                  ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS                  LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK                  TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG                  NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	57
	DNA 重链	<p>CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCCGGC</p>	58

[0295]

		GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCACCTGGG TCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGG AGTGGGTTCGGACGGACTAGACACTCAG ATATGGGCTACGCTACTAGCTACGCCG CTCCCGTGAAGGGCCGGTTCCTATCTC TAGGGACGACTCTAAGAACCCTGTA CCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGA GGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAG AGTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTTCGA TAACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCAC CGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCC AAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGC AAGTCTACTTCCGGCGGAAGTCTGCTGCC CTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGT CTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCGTGCTGCAGAGCAGCG GCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA CAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCC AGACCTATATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGA CCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCC AGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTT CCTGTTCCCCCAAGCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGT	
--	--	---	--

[0296]

		<p>GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCA                  CGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTG                  GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA                  CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGC                  AGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGT                  CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT                  GGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCA                  AAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCC                  CAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCA                  AGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGT                  ACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGA                  TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCT                  GTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCG                  ATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG                  GCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCA                  CCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA                  GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGT                  GGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAA                  CGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGA                  GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA                  GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>	
Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	59
Kabat	LCDR2	GQSERPS	60
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	61
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	62
Chothia	LCDR2	GQS	63
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	64
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG	65

[0297]

		AGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVL	
	DNA VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGGTCAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCTA ATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCACT GGTATCAGCAGCTGCCCGGCACCGCCC CTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCAG AGCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCG CTAGTCTGGCTATCACCGGCCTGCAGG CTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTC AGTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG TGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGA CCGTGCTG	66
	轻链	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG AGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSWDSSQTLVVFGGGTKLTVLGQPK AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	67
	DNA 轻链	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGGTCAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCTA ATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGCACT	68

[0298]

		GGTATCAGCAGCTGCCCGGCACCGCCC CTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCAG AGCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCG CTAGTCTGGCTATCACCGGCCTGCAGG CTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTC AGTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG TGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGA CCGTGCTGGGTCAGCCTAAGGCTGCCC CCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCA GCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCA CCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTA CCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAA GGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGG CGTGGAGACCACCACCCCAGCAAGCA GAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAG CTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTG GAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCA GGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGA AAAGACCGTGGCCCCAACCGAGTGCAG C	
<b>抗体 7</b>			
Kabat	HCDR1	SYVVH	69
Kabat	HCDR2	RIRLETHGYAAEYAASVKG	70
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	71
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	72
Chothia	HCDR2	RLETHGYA	73
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	74

[0299]

	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRIRLETH GYAAEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNW GQGTLVTVSS	75
	DNA VH	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCCTGGG TCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGG AGTGGGTCGGACGGATTAGACTGGAAA CTCACGGCTACGCCGCCGAGTACGCCG CTAGTGTGAAGGGCCGGTTCCTACTATCTC TAGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTA CCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGA GGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAG AGTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTTCGA TAACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCAC CGTGTCTAGC	76
	重链	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYVHWVRQAPGKGLEWVGRIRLETH GYAAEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARVERSKSGFDNW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL	77

[0300]

		<p>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV          DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT          VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT          ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS          LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK          TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG          NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
	DNA 重链	<p>CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGC          GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG          AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC          ACCTTCTCTAGCTACGTGGTGCCTGGG          TCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTGG          AGTGGGTCGGACGGATTAGACTGGAAA          CTCACGGCTACGCCGCCGAGTACGCCG          CTAGTGTGAAGGGCCGGTTCCTACTATCTC          TAGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTA          CCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGA          GGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAG          AGTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTTCGA          TAACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCAC          CGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCC          AAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGC          AAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCC          CTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC          CCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGA          ACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACA          CCTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCG          GCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA</p>	78

[0301]

		CAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCC AGACCTATATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGA CCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCC AGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTT CCTGTTCCCCCCAAGCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCA CGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGC AGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGT CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCA AAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCC CAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCA AGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGT ACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCT GTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCG ATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCCGAGAACA ACTACAAGACCA CCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGT GGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAA CGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA	
--	--	---	--

		GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG	
Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	79
Kabat	LCDR2	GQSERPS	80
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	81
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	82
Chothia	LCDR2	GQS	83
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	84
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG AGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSWDSSQTLVVFEGGGTKLTVL	85
[0302]	DNA VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC GTCAGCGGCGCTCCCGGTCAGAGAGTG ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCTA ATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGC ACT GGTATCAGCAGCTGCCCCGGCACCGCCC CTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCAG AGCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCG CTAGTCTGGCTATCACCGGCTGCAGG CTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTC AGTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG TGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGA CCGTGCTG	86
	轻链	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG AGYSVHWYQQLPGTAPKLLIYGQSERPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSWDSSQTLVVFEGGGTKLTVLGQPK	87

		<p>AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY                  PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS                  NNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVT                  HEGSTVEKTVAPTECS</p>	
<p>[0303]</p>	<p>DNA 轻链</p>	<p>CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGC                  GTCAGCGGCGCTCCCGGTCAGAGAGTG                  ACTATTAGCTGCACCGGCTCTAGCTCTA                  ATATCGGCGCTGGCTATAGCGTGC ACT                  GGTATCAGCAGCTGCCCGGCACCGCCC                  CTAAGCTGCTGATCTACGGTCAGTCAG                  AGCGGCCTAGCGGCGTGCCCGATAGGT                  TTAGCGGCTCTAAGTCAGGCACTAGCG                  CTAGTCTGGCTATCACCGGCCTGCAGG                  CTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTC                  AGTCCTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG                  TGGTGTTCGGCGGAGGCACTAAGCTGA                  CCGTGCTGGGTCAGCCTAAGGCTGCCC                  CCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCA                  GCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCA                  CCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTA                  CCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAA                  GGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGG                  CGTGGAGACCACCACCCCAGCAAGCA                  GAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAG                  CTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTG                  GAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCA                  GGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGA                  AAAGACCGTGGCCCCAACCGAGTGCAG</p>	<p>88</p>
<p>[0304]</p>		<p>C</p>	

[0305] 本发明的其他抗体及其抗原结合片段包括如下那些抗体及其抗原结合片段,其中所述氨基酸或编码所述氨基酸的核酸已经突变但与表1和/或表14中描述的序列具有至少60%、70%、80%、90%或95%一致性。在一个实施例中,其包括突变氨基酸序列,其中当与表1和/或表14中描述的序列中描绘的可变区相比时,在可变区中不超过1、2、3、4或5个氨基酸已经突变,但同时基本上保持相同的治疗活性。

[0306] 在另一个具体实施例中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人BMP6并分别包含SEQ ID NO:9、10和11的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别包含SEQ ID NO:19、20和21的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0307] 在另一个具体实施例中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人BMP6并分别包含SEQ ID NO:12、13和14的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别包含SEQ ID NO:22、23和24的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0308] 在另一个具体实施例中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人BMP6并分别包含SEQ ID NO:29、30和31的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别包含SEQ ID NO:39、40和41的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0309] 在另一个具体实施例中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人BMP6并分别包含SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别包含SEQ ID NO:42、43和44的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0310] 在另一个具体实施例中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人BMP6并分别包含SEQ ID NO:49、50和51的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别包含SEQ ID NO:59、60和61的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0311] 在另一个具体实施例中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人BMP6并分别包含SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别包含SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0312] 在另一个具体实施例中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人BMP6并分别包含SEQ ID NO:69、70和71的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别包含SEQ ID NO:79、80和81的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0313] 在另一个具体实施例中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人BMP6并分别包含SEQ ID NO:72、73和74的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别包含SEQ ID NO:82、83和84的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0314] 由于这些抗体中的每一种都可以与BMP6结合,因此VH、VL、全长轻链和全长重链序列(氨基酸序列和编码该氨基酸序列的核苷酸序列)可以是“混合且匹配的”以产生本发明的其他BMP6结合抗体及其抗原结合片段。可以使用本领域已知的结合测定(例如,ELISA和实例部分中描述的其他测定)来测试这种“混合且匹配的”BMP6结合抗体。当这些链被混合且匹配时,来自特定VH/VL配对的VH序列应当用结构上相似的VH序列替代。同样,来自特定全长重链/全长轻链配对的全长重链序列应当用结构上相似的全长重链序列替代。同样,来自特定VH/VL配对的VL序列应当用结构上相似的VL序列替代。同样,来自特定全长重链/全长轻链配对的全长轻链序列应当用结构上相似的全长轻链序列替代。

[0315] 在另一方面,本发明提供了BMP6结合抗体,其包含表1和/或表14中所述的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3或其组合。使用Kabat系统(Kabat等人1991Sequences of Proteins

of Immunological Interest[免疫相关蛋白质的序列],第五版,U.S.Department of Health and Human Services[美国卫生与公众服务部],NIH公开号91-3242)或使用 Chothia系统[Chothia等人1987J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917;和Al-Lazikani等人1997J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]273:927-948]描绘CDR区。

[0316] 鉴于这些抗体中的每一种都可以与BMP6结合且抗原结合特异性主要由CDR1、2和3区提供,VH CDR1、2和3序列以及VL CDR1、2和3序列可以“混合且匹配”(即,来自不同抗体的CDR可以被混合且匹配),但每种抗体必须含有VH CDR1、2和3以及VL CDR1、2和3以产生本发明的其他BMP6结合分子。可以使用本领域已知的结合测定和实例中描述的那些结合测定(例如,ELISA)来测试这种“混合且匹配的”BMP6结合抗体。当VH CDR序列混合且匹配时,来自特定VH序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应该用结构上相似的一个或多个CDR序列替代。同样地,当VL CDR序列混合且匹配时,来自特定VL序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应该用结构上相似的一个或多个CDR序列替代。对于普通技术人员来说容易清楚的是,可以通过使来自对于本发明单克隆抗体的本文所示CDR序列的具有结构相似序列的一个或多个VH和/或VL CDR区序列突变来产生新的VH和VL序列。

[0317] 因此,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合区,其包含:重链可变区CDR1,其包含选自SEQ ID NO:29、49、69、12、32、52、72或9中的任何一个的氨基酸序列;重链可变区CDR2,其包含选自SEQ ID NO:10、30、50、70、13、33、53或73中的任何一个的氨基酸序列;重链可变区CDR3,其包含选自SEQ ID NO:11、31、51、71、14、34、54或74中的任何一个的氨基酸序列;轻链可变区CDR1,其包含选自SEQ ID NO:19、39、59、79、22、42、62或82中的任何一个的氨基酸序列;轻链可变区CDR2,其包含选自SEQ ID NO:20、40、60、80、23、43、63或83中的任何一个的氨基酸序列;和轻链可变区CDR3,其包含选自SEQ ID NO:21、41、61、81、24、44、64或84中的任何一个的氨基酸序列;其中所述抗体特异性地结合BMP6。

[0318] 在一个实施例中,特异性地结合BMP6的抗体是表1和/或表14中描述的抗体。

[0319] 如本文所用,人抗体包含重链或轻链可变区或全长重链或轻链,如果所述抗体的可变区或全长链是从使用人种系免疫球蛋白基因的系统获得的,则所述重链或轻链可变区或全长重链或轻链是特定种系序列的“产物”或“源自”特定种系。这种系统包括用感兴趣的抗原对携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠进行免疫或用感兴趣的抗原筛选展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库。通过比较人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列并选择在序列中与人抗体序列最接近(即,最大的一致性%)的人种系免疫球蛋白序列,可以照此来鉴定人抗体是人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“源自”人种系免疫球蛋白序列。作为特定人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“源自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体可由于例如天然存在的体细胞突变或有意引入定点突变而含有与种系序列相比的氨基酸差异。然而,在VH或VL框架区中,选择的人抗体的氨基酸序列通常与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少90%相同并且含有当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如,鼠种系序列)相比时将人抗体鉴定为属于人类的氨基酸残基。在某些情况下,人抗体的氨基酸序列可以与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少60%、70%、80%、90%或至少95%或甚至至少96%、97%、98%或99%相同。通常,重组人抗体在VH或VL框架区中显示出与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不超过10个氨基酸差异。在某些情况下,人抗体可以显示出与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不超过5个或甚至不超

过4、3、2或1个氨基酸差异。

[0320] BMP家族成员和铁调素

[0321] 在一个实施例中,本发明提供特异性地结合BMP6的抗体或其结合片段。在一个实施例中,所述抗体或其结合片段描述在表1和/或表14中。

[0322] 在一个实施例中,所述抗体或其结合片段特异性地结合BMP6但不结合其他BMP蛋白(例如BMP2、BMP5或BMP7)。

[0323] BMP6是分泌的BMP家族生长因子配体,它是其成熟活性形式的30kDa二硫键连接的同型二聚体。该蛋白质是TGF- $\beta$ 超家族的成员。骨形态发生蛋白因其诱导骨和软骨生长的能力而闻名。BMP6能够诱导间充质干细胞中的所有成骨标志物。

[0324] 骨形态发生蛋白(BMP)是分泌的信号传导分子家族,其可诱导异位骨生长。BMP是转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族的一部分。BMP最初通过脱矿骨提取物在骨外部位诱导体内软骨内骨生成的能力来鉴定。基于其在胚胎发生早期的表达,由该基因编码的BMP在早期发育中具有一定的作用。此外,该BMP与BMP5和BMP7密切相关的事实导致了对可能的骨诱导活性的推测。已经鉴定了BMP6的其他功能,如Nature Genetics[自然遗传学]四月;41[4]:386-8中所述。

[0325] 敲除BMP6的小鼠是活的且可育的,并显示正常的骨和软骨发育。

[0326] BMP6是铁调素的关键调节因子,它是肝脏分泌的小肽,是哺乳动物铁代谢的主要调节因子。铁调素控制十二指肠中吸收的膳食铁的和网状内皮细胞释放的铁。铁调素通过多种刺激(包括炎症和铁超负荷)上调并且通过贫血、缺氧和缺铁下调。

[0327] 不受任何特定理论的束缚,本披露表明,预期BMP6拮抗剂抗体作为降铁调素疗法通过克服对红细胞生成刺激剂(ESA)的抗性而使患有铁限制性贫血的患者受益,这大大增加了潜在疾病的发病率且通常是不良后果的预测因子。通过所述抗体与BMPRI和BMPRII受体的相互作用,它诱导受体二聚化和铁调素的转录。BMP6还与肝和肌肉细胞中的HJV共受体结合。

[0328] 因此,已知BMP6增加铁调素的表达。已知铁调素是参与铁稳态的关键激素。高铁调素水平与ACD中铁限制性红细胞生成有关。

[0329] WO 2010/056981披露了向小鼠给予抗BMP6的抗体降低铁调素且增加铁。

[0330] BMP6在本领域中有进一步的描述,例如:Hahn等人1992Genomics[基因组学]14:759-62;Sauermann等人1993J.Neurosci.Res.[神经科学研究杂志]33:142;Celeste等人1991Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]87:9843;Schluesener等人1995Atherosclerosis[动脉粥样硬化]113:153;Gitelman等人1994 J.Cell Biol.[细胞生物学杂志]126:1595;Barnes等人1997 W.J.Urol.[泌尿学杂志]13:337;和Hamdy等人1997Cancer Res.[癌症研究]57:4427。

[0331] 与其他骨形态发生蛋白一样,BMP2在骨和软骨的发育中起重要作用。它参与hedgehog途径、TGF- $\beta$ 信号传导途径和细胞因子间受体相互作用。它还参与心肌细胞分化和上皮至间充质转换。BMP2具有许多重要作用,如Kishimoto等人1997 Dev.[发育]124:4457;Ma等人2005 Dev.[发]132:5601;Wang等人Bone[骨]48:524;和Rosen 2009Cyt.Growth Fact.Rev.20:475所述。因此优选BMP6抗体不与BMP2结合。

[0332] BMP2尤其进一步描述于:Sampath等人1990 J.Biol.Chem.[生物化学杂志]265:

13198;Chen等人2004 Growth Factors[生长因子]22:233;Marie等人2002 Histol.Histopath.[组织学和病理组织学]17:877;Nickel等人2001 J.Bone Joint Surg.[骨关节手术杂志]83-A增刊1:S7-14;Kirsch等人2000 FEBS Lett.[FEBS快报]468:215;Kirsch等人2000 EMBO J.[EMBO杂志]19:3314;Gilboa等人2000 Mol.Biol.Cell[分子生物学细胞]11:1023。

[0333] BMP5也是TGF- $\beta$ 超家族的成员。与其他BMP一样,它以诱导骨和软骨发育的能力而闻名。BMP5在小梁网和视神经乳头中表达,并且可能在发育和正常功能中起作用。它也在肺和肝中表达。

[0334] 关于BMP5的其他信息是本领域已知的,例如Hahn等人1992Genomics[基因组学]14:759;Beck等人2003 BMC Neurosci.[BMC神经科学]2:12;Celeste等人1991 Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]87:9843;和Sakaue等人1996 Biochem.Biophys.Res.Comm.[生物化学和生物物理研究通讯]221:768。

[0335] BMP7也是TGF- $\beta$ 超家族的成员。与BMP蛋白质家族的其他成员一样,它在间充质细胞转化为骨和软骨中起关键作用。它诱导SMAD1和SMAD5的磷酸化,这进而诱导许多成骨基因的转录。

[0336] 如上所述,敲除BMP6的小鼠是活的且可育的,并显示正常的骨和软骨发育。然而,敲除BMP7的小鼠在出生后死于肾、眼和骨缺陷。任何基因的单敲除都不会改变心脏发生,但BMP6和BMP7的双重敲除显示心脏中的多种缺陷和延迟;胚胎死于心功能不全。BMP7在预防与纤维化相关的慢性心脏病的进展中是重要的。因此,抗BMP6抗体与BMP7的交叉反应性是不希望的。

[0337] 本领域中提供了与BMP7有关的其他信息,例如Hahn等人1992Genomics[基因组学]14:759;Chen等人2004 Growth Factors[生长因子]22:233;Itoh等人2001 EMBO J.20:4132;Zeisberg等人2003 Am.J.Physiol.Renal Physiol.[美国生理期刊-肾生理学]285:F1060;Kallui等人2009 J.Clin.Invest.[临床研究杂志]119:1420;和Wang等人2001 J.Am.Soc.Neph.[美国肾脏病学杂志]12:2392。

[0338] 铁调素是一种肽激素,也称为HAMP(铁调素抗微生物蛋白或肽)。

[0339] 小鼠进化中最近的基因重复事件已导致小鼠中存在两个相似的铁调素基因,即铁调素1和铁调素2。Ilyin等人2003 FEBS Lett.[FEBS快报]542:22-26。小鼠铁调素2缺乏哺乳动物铁调素中发现的几个保守残基。Lou等人2004 Blood[血液]103:2816-2821。

[0340] 铁调素基因产物参与维持铁稳态,并且它是调节巨噬细胞中的铁储存以及肠铁吸收所必需的。这些肽显示出抗微生物活性。

[0341] 将前原蛋白(或前激素原或前原铁调素)(84aa)和蛋白原(或激素原或铁调素原)(60aa)加工成具有20、22和25个氨基酸的成熟肽。25-aa肽主要由肝分泌,并被认为是铁代谢的“主要调节因子”。20和22-aa代谢物存在于尿中。铁调素的N-末端区域是功能所必需的;5个N-末端氨基酸的缺失导致功能丧失。

[0342] 活性铁调素肽富含半胱氨酸,其形成稳定其 $\beta$ 片层结构的分子内键。

[0343] 铁调素主要在肝中合成,其中发现较少的量在其他组织中合成。Bekri等人2006 Gastroent.131:788-96。

[0344] 25-aa铁调素肽主要由肝分泌,并被认为是铁代谢的“主要调节因子”。铁调素通过

与铁输出通道铁转运蛋白结合来抑制铁转运,该铁输出通道铁转运蛋白位于肠上皮细胞的基底外侧表面和网状内皮细胞(巨噬细胞)的质膜上。通过抑制铁转运蛋白,铁调素阻止肠的肠细胞将铁分泌至肝门静脉系,从而在功能上减少铁的吸收。铁从巨噬细胞的释放也通过铁转运蛋白抑制被阻止;因此,铁调素维持铁稳态。在慢性炎症性贫血如炎性肠病、慢性心力衰竭、癌、类风湿性关节炎和肾衰竭中观察到的,铁调素活性也是造成铁封存的部分原因。

[0345] 铁调素基因的突变引起2B型血色病,也称为青少年血色病,一种由导致心肌病、肝硬化和内分泌衰竭的严重铁超负荷引起的疾病。大多数青少年血色病病例是由于铁调素调节蛋白(一种铁调素产生的调节因子)的突变引起的。

[0346] 经工程化以过表达铁调素的基因修饰小鼠在出生后不久因严重缺铁死亡,这表明了其在铁调节中的核心而非多余的作用。当研究人员检查来自不响应铁补充剂的两名患有严重小细胞性贫血的肝肿瘤患者的组织时,出现了将铁调素与炎症性贫血联系起来的第一个证据。肿瘤组织过度产生铁调素,并且通过手术切除肿瘤治愈贫血。

[0347] 存在许多这样的疾病,其中未能充分吸收铁有助于缺铁和缺铁性贫血。治疗将取决于铁调素水平,因为如果铁调素阻断肠吸收则口服治疗将很可能无效。

[0348] 在一个实施例中,给予BMP6的抗体或其结合片段降低了铁调素的活性和/或水平,并因此可用于治疗贫血。在一个实施例中,本发明涉及降低有需要的患者中铁调素的活性或水平的方法,该方法包括向患者给予BMP6的抗体或其抗原结合片段的步骤。在一个实施例中,铁调素的活性或水平降低至少50%。

[0349] 针对铁调素的抑制剂如BMP6抗体可用于治疗与铁调素相关的疾病。这包括与铁调素和/或突变和/或野生型的过表达和/或突变铁调素相关的任何疾病,和/或其中疾病进展因如下原因而增强或预后恶化的疾病:铁调素的存在和/或突变和/或野生型的过表达和/或突变铁调素的存在,和/或经由尿对铁调素的肾消除的减少。与铁调素相关的疾病的非限制性实例包括:贫血、缺铁性红细胞生成、血铁过少、膳食铁摄取受损、铁封存、炎症性贫血(AI)、动脉粥样硬化、糖尿病和多种神经变性疾病(如阿尔茨海默病、帕金森病和Friedrich共济失调)、心力衰竭、慢性肾病、心肾-贫血综合征、感染、失血、溶血、维生素B12或叶酸缺乏、甲状旁腺功能亢进、血红蛋白病和恶性肿瘤、癌症、AIDS、手术、生长萎缩和/或脱发。在一个实施例中,受试者是透析患者。在一个实施例中,与铁调素相关的疾病是贫血,并且受试者是透析患者。慢性血液透析群体中铁和ESA难治性贫血的患病率高。

[0350] 贫血尤其包括慢性疾病性贫血(ACD)、慢性肾病性贫血(CKD)、肿瘤性贫血、红细胞生成刺激剂(ESA)抗性贫血和/或铁限制性贫血。

[0351] CKD贫血是慢性肾病的常见和早期并发症。肿瘤性贫血是由血液恶性肿瘤和一些实体瘤引起的。如本文所定义,该术语还包括化疗诱导的贫血,它是由化学治疗剂引起的贫血。慢性肾病中的贫血可以加重糖尿病神经病变、心血管疾病、视网膜病变和其他问题。癌症相关的贫血伴随着增加的死亡风险。

[0352] 一些慢性疾病如癌症、肾病和自身免疫性疾病可导致贫血。过度活跃的炎性细胞因子可引起铁稳态失调、红细胞生成减少和红细胞寿命缩短。贫血的一些治疗包括给予ESA、红细胞生成素、铁(作为膳食补充剂)或输血。

[0353] 铁调素是参与铁稳态的关键激素。高水平的铁调素与ACD中的铁限制性红细胞生

成有关。已知BMP6增加铁调素的表达。

[0354] 下面描述了各种类型的BMP6的抗体及其抗原结合片段。

[0355] 同源抗体

[0356] 在又一个实施例中,本发明提供了包含与表1和/或表14中所述序列同源的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段,并且所述抗体结合BMP6并保留表1和/或表14中描述的那些抗体的所需功能特性。

[0357] 例如,本发明提供了包含重链可变区和轻链可变区的分离的单克隆抗体(或其功能性抗原结合片段),其中所述重链可变区包含与选自由SEQ ID NO:16、36、56或76组成的组的氨基酸序列至少80%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与选自由SEQ ID NO:26、46、66或86组成的组的氨基酸序列至少80%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列;所述抗体特异性地结合BMP6蛋白且所述抗体可以在溶血测定中抑制红细胞裂解,其中溶血测定是本领域已知的。在一个具体实例中,当使用用100pM人BMP6重构的人BMP6耗尽的血清时,这种抗体在溶血测定中具有20-200pM的IC<sub>50</sub>值。

[0358] 在一个实施例中,VH和/或VL氨基酸序列可以与表1和/或表14中所示的序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。在一个实施例中,VH和/或VL氨基酸序列可以是相同的,不同之处是在不超过1、2、3、4或5个氨基酸位置中的氨基酸取代。与表1和/或表14中描述的那些的VH和VL区具有高(即,80%或更高)一致性的VH和VL区的抗体可通过分别编码SEQ ID NO:16、36、56或76以及26、46、66或86的核酸分子的诱变(例如,定点或PCR介导的诱变)获得,然后使用本文所述的功能测定来测试所编码的改变的抗体的保留功能。

[0359] 在一个实施例中,全长重链和/或全长轻链氨基酸序列可以与表1和/或表14所示的序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。含有与SEQ ID NO:18、38、58或78中的任何一个的全长重链和SEQ ID NO:28、48、68或88中的任何一个的全长轻链分别具有高(即80%或更高)一致性的全长重链和全长轻链的抗体可通过分别编码这种多肽的核酸分子的诱变(例如,定点或PCR介导的诱变)获得,然后使用本文所述的功能测定来测试所编码的改变的抗体的保留功能。

[0360] 在一个实施例中,全长重链和/或全长轻链核苷酸序列可以与表1和/或表14中所示的序列60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0361] 在一个实施例中,重链和/或轻链核苷酸序列的可变区可以与表1和/或表14所示的序列60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0362] 如本文所用,两个序列之间的一致性百分比是序列共用的相同位置数量的函数(即,一致性%等于相同位置数量/位置总数×100),将缺口数量和每个缺口的长度考虑在内,需要引入它们以便最佳比对两个序列。序列的比较和两个序列之间的一致性百分比的确定可以使用数学算法完成,如下面的非限制性实例中所述。

[0363] 另外或可替代地,本发明的蛋白质序列可进一步用作“查询序列”以在公共数据库中进行搜索,从而例如鉴定相关序列。例如,可以使用Altschul,等人,1990 J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-10的BLAST程序(2.0版)进行这种搜索。

[0364] 具有保守修饰的抗体

[0365] 在一个实施例中,本发明的抗体具有包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和

包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文所述抗体或其保守修饰的序列的特定氨基酸,并且其中所述抗体保留了本发明的BMP6结合抗体及其抗原结合片段的所需功能特性。因此,本发明提供了分离的单克隆抗体或其功能性抗原结合片段,其由包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区组成,其中:重链可变区CDR1包含选自SEQ ID NO:29、49、69、12、32、52、72或9中的任何一个的氨基酸序列或其保守变体;重链可变区CDR2包含选自SEQ ID NO:10、30、50、70、13、33、53或73中的任何一个的氨基酸序列或其保守变体;重链可变区CDR3包含选自SEQ ID NO:11、31、51、71、14、34、54或74中的任何一个的氨基酸序列或其保守变体;轻链可变区CDR1包含选自SEQ ID NO:19、39、59、79、22、42、62或82中的任何一个的氨基酸序列或其保守变体;轻链可变区CDR2包含选自SEQ ID NO:20、40、60、80、23、43、63或83中的任何一个的氨基酸序列或其保守变体;并且轻链可变区CDR3包含选自SEQ ID NO:21、41、61、81、24、44、64或84中的任何一个的氨基酸序列或其保守变体;所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合BMP6,并在溶血测定中抑制红细胞裂解。

[0366] 在一个实施例中,优化用于在哺乳动物细胞中表达的本发明抗体具有全长重链序列和全长轻链序列,其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述抗体的特定氨基酸序列或其保守修饰,并且其中所述抗体保留了本发明的BMP6结合抗体及其抗原结合片段的所需功能特性。因此,本发明提供了优化用于在哺乳动物细胞中表达的分离的单克隆抗体,其由全长重链和全长轻链组成,其中:所述全长重链具有选自SEQ ID NO:18、38、58或78的组的氨基酸序列及其保守修饰;并且所述全长轻链具有选自SEQ ID NO:28、48、68或88的组的氨基酸序列及其保守修饰;所述抗体特异性地结合BMP6;并且如本文所述,所述抗体在溶血测定中抑制红细胞裂解。在一个具体实施例中,当使用用100pM人BMP6重构的人BMP6耗竭的血清时,这种抗体在溶血测定中具有20-200pM的IC<sub>50</sub>值。

[0367] 与相同表位结合的抗体

[0368] 本发明提供了与表1和/或表14中列出的BMP6结合抗体所结合表位相同的表位结合的抗体。抗体7结合的表位如图5所示。因此,另外的抗体可以基于它们在BMP6结合测定中与本发明的其他抗体及其抗原结合片段的交叉竞争(例如,以统计学上显著的方式竞争性地抑制本发明的其他抗体及其抗原结合片段的结合)的能力进行鉴定。测试抗体抑制本发明的抗体及其抗原结合片段与BMP6蛋白结合的能力表明,该测试抗体可以与该抗体竞争结合BMP6;根据非限制性理论,这样的抗体可以结合BMP6上与其竞争的抗体的相同或相关(例如,结构上相似或空间上近端)的表位。在某个实施例中,结合BMP6上与本发明的抗体及其抗原结合片段的相同表位的抗体是人单克隆抗体。可如本文所述那样制备和分离此类人单克隆抗体。

[0369] 一旦确定了抗原上的所需表位,就有可能例如使用本发明中所述的技术生成针对该表位的抗体。可替代地,在发现过程中,抗体的产生和表征可以阐明关于所需表位的信息。根据该信息,然后可以竞争性地筛选抗体以结合相同的表位。实现该方法的方法是进行交叉竞争研究以找到彼此竞争性结合的抗体,例如抗体竞争结合抗原。在国际专利申请号WO 2003/48731中描述了基于抗体的交叉竞争将其“分箱”的高通量方法。如本领域技术人员所理解的,实际上抗体可以特异性结合的任何东西都可以是表位。表位可包含抗体结合的那些残基。

[0370] 通常,对特定靶抗原有特异性的抗体将优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中靶抗原上的表位。

[0371] 可以使用本领域公知的任何数量的表位作图技术鉴定包含表位的给定多肽的区域。参见例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology[分子生物学方法中的表位作图方案],第66卷(Glenn E.Morris编,1996)Humana出版社,托托瓦(Totowa),新泽西州(New Jersey)。例如,线性表位可以通过例如在固体支持物上同时合成大量肽来确定,所述肽对应于蛋白质分子的部分且肽与抗体反应的同时肽仍然附着于支持物。这种技术是本领域已知的且描述在例如,美国专利号4,708,871;Geysen等人,(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]8:3998-4002;Geysen等人,(1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]82:78-182;Geysen等人,(1986) Mol.Immunol.[分子免疫学]23:709-715。类似地,通过测定氨基酸BMP6的空间构象如通过氢/氘交换、X射线晶体学和二维核磁共振,可以容易地鉴定构象表位。参见例如,Epitope Mapping Protocols[表位作图方案],同上。还可以使用标准抗原性和亲水性图来鉴定蛋白质的抗原区域,如使用例如可从牛津分子集团(Oxford Molecular Group)获得的Omega 1.0版软件程序计算的那些图。该计算机程序采用Hopp/Woods方法(Hopp等人,(1981) Proc.Natl.Acad.Sci USA[美国国家科学院院刊]78:3824-3828)用于确定抗原性曲线且采用Kyte-Doolittle技术(Kyte等人,(1982) J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]157:105-132)用于亲水性图。

[0372] 工程化和修饰的抗体

[0373] 本发明的抗体还可以使用具有一种或多种本文所示的VH和/或VL序列的抗体作为起始材料来制备,以将修饰的抗体工程化,该修饰的抗体可以具有与起始抗体相比改变的特性。可以通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内例如在一个或多个CDR区内和/或在一个或多个框架区内的一个或多个残基将抗体工程化。另外或可替代地,可以通过修饰一个或多个恒定区内的残基将抗体工程化,例如从而改变抗体的一个或多个效应子功能。

[0374] 可以进行的一种可变区工程化是CDR移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此,CDR内的氨基酸序列在各个抗体之间比CDR外部的序列更加多样化。因为CDR序列与大多数抗体-抗原相互作用有关,所以可以通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体的特性的重组抗体,所述表达载体包含被移植在来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上的来自所述特定天然存在的抗体的CDR序列(参见例如,Riechmann,L.等人,1998Nature[自然]332:323-327;Jones,P.等人,1986 Nature[自然]321:522-525;Queen,C.等人,1989 Proc.Natl.Acad.,U.S.A.[美国国家科学院院刊]86:10029-10033;Winter的美国专利号5,225,539和Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)。

[0375] 这种框架序列可以从包含种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开参考文献获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库(可从因特网www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase获得)中找到,以及在Kabat,E.A.,等人,1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫相关蛋白质的序列],第五版,U.S.Department of Health and Human Services[美国卫生与公众服务部],NIH公开号91-3242;Tomlinson,I.M.,等人,1992 J.fol.Biol.227:776-798;和Cox,J.P.L.等人,1994

Eur. J Immunol. [欧洲免疫学杂志]24:827-836中找到;其中的每一个的内容通过引用明确地并入本文。

[0376] 用于本发明的抗体及其抗原结合片段的框架序列的实例是与本发明的选择的抗体及其抗原结合片段所使用的框架序列在结构上相似的那些序列,例如有序列和/或本发明的单克隆抗体使用的框架序列。可以将VH CDR1、2和3序列以及VL CDR1、2和3序列移植到框架区上,所述框架区具有与框架序列所来源的种系免疫球蛋白基因中发现的序列相同的序列,或可以将CDR序列移植到与种系序列相比含有一个或多个突变的框架区上。例如,已经发现在某些情况下使框架区内的残基突变以维持或增强抗体的抗原结合能力是有益的(参见例如,Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)。

[0377] 另一种类型的可变区修饰是使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基突变,从而改善感兴趣的抗体的一种或多种结合特性(例如,亲和力),称为“亲和力成熟”。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入一个或多个突变,并且可以在如本文所述且在实例中提供的体外或体内测定中评估对抗体结合或其他感兴趣的功能特性的影响。可以引入保守修饰(如上所讨论的)。所述突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。此外,通常CDR区内不超过一个、两个、三个、四个或五个残基被改变。

[0378] 将抗原结合结构域移植到替代框架或支架中

[0379] 可以使用多种抗体/免疫球蛋白框架或支架,只要所得多肽包含至少一个特异性结合BMP6的结合区即可。这种框架或支架包括5种主要独特型的人免疫球蛋白、其抗原结合片段,并且包括其他动物物种的免疫球蛋白,优选具有人源化方面。就这点而言,单个重链抗体如在骆驼科动物中鉴定的那些抗体是特别令人感兴趣的。本领域技术人员将继续发现和开发新的框架、支架和片段。

[0380] 在一个方面,本发明涉及使用非免疫球蛋白支架生成基于非免疫球蛋白的抗体的方法,在所述非免疫球蛋白支架上可以移植本发明的CDR。可以使用已知的或未来的非免疫球蛋白框架和支架,只要它们包含对靶BMP6蛋白有特异性的结合区即可。已知的非免疫球蛋白框架或支架包括但不限于纤连蛋白(化合物治疗剂公司(Compound Therapeutics, Inc.),沃尔瑟姆(Waltham),马萨诸塞州(Mass.))、锚蛋白(分子配偶体公司(Molecular Partners AG,苏黎世(Zurich),瑞士(Switzerland))、结构域抗体(Domantis, Ltd.,坎布里奇(Cambridge),马萨诸塞州(Mass.)),和Ablynx nv, Zwijnaarde, 比利时)、脂质运载蛋白(Pieris Proteolab AG,弗赖辛(Freising),德国)、小型模块化免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc.,西雅图(Seattle),华盛顿州(Wash.))、maxybody(Avidia, Inc.,山景城(Mountain View),加利福尼亚州(Calif.))、蛋白质A(亲合体公司(Affibody AG),瑞典)和affilin( $\gamma$ -晶体蛋白或泛素)(SciI Proteins GmbH,哈雷(Halle),德国)。

[0381] 纤连蛋白支架基于纤连蛋白III型结构域(例如,III型纤连蛋白的第十个模块(10Fn3结构域))。纤连蛋白III型结构域具有分布在两个 $\beta$ 片层之间的7或8个 $\beta$ 链,它们自身彼此包裹以形成蛋白质的核心且还含有将 $\beta$ 链彼此连接且暴露于溶剂中的环(类似于CDR)。在 $\beta$ 片层夹心的每个边缘处存在至少三个这样的环,其中所述边缘是垂直于 $\beta$ 链方向的蛋白质的边界(参见美国专利号6,818,418)。这些基于纤连蛋白的支架不是免疫球蛋白,但整体折叠与最小功能性抗体片段(重链可变区)的折叠密切相关,所述最小功能性抗体片段包含骆驼和美洲驼IgG中的完整抗原识别单元。由于这种结构,非免疫球蛋白抗体模拟抗原结合

特性,其在性质和亲和力上与抗体的那些抗原结合特性相似。这些支架可用于体外环随机化和改组策略,其类似于体内抗体亲和力成熟的过程。这些基于纤连蛋白的分子可以用作支架,其中可以使用标准克隆技术用本发明的CDR替代分子的环区。

[0382] 锚蛋白技术基于使用具有锚蛋白衍生的重复模块的蛋白质作为支架,该支架用于承载可用于结合不同的靶标的可变区。锚蛋白重复模块是33个氨基酸多肽,其由两个反平行的 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -转角组成。可变区的结合主要通过使用核糖体展示来优化。

[0383] Avimer源自含有天然A结构域的蛋白质,如LRP-1。这些结构域天然地用于蛋白质间相互作用,并且在人类中超过250种蛋白质在结构上基于A结构域。Avimer由经由氨基酸接头连接的许多不同的“A结构域”单体(2-10)组成。可以使用例如美国专利申请公开号20040175756、20050053973、20050048512和20060008844中描述的方法产生可与靶抗原结合的Avimer。

[0384] 亲合体(affibody)亲和配体是由基于蛋白质A的IgG结合结构域之一的支架的三螺旋束组成的小而简单的蛋白质。蛋白质A是来自细菌金黄色葡萄球菌的表面蛋白。该支架结构域由58个氨基酸组成,其中13个随机化以生成具有大量配体变体的亲合体文库(参见例如,美国专利号5,831,012)。亲合体分子类似抗体,其分子量为6kDa,而抗体的分子量为150kDa。尽管其尺寸小,但是亲合体分子的结合位点与抗体的结合位点相似。

[0385] Anticalin是由Pieris ProteoLab AG公司开发的产品。它们源自脂质运载蛋白,脂质运载蛋白是一种广泛分布的小而健壮的蛋白质,其通常参与化学敏感或不溶性化合物的生理运输或储存。几种天然脂质运载蛋白存在于人体组织或体液中。蛋白质结构让人联想到免疫球蛋白,其中高变环在刚性框架的顶部。然而,与抗体或其重组片段相反,脂质运载蛋白由仅略微大于单个免疫球蛋白结构域的具有160至180个氨基酸残基的单个多肽链组成。构成结合口袋的四个环的组显示出明显的结构可塑性并且容许各种侧链。因此,结合位点可以在专有过程中重新成形,以便以高亲和力和特异性识别不同形状的规定靶分子。脂质运载蛋白家族的一种蛋白质,欧洲粉蝶的后胆色素结合蛋白(BBP)已被用于通过诱变四个环的组来产生anticalin。描述anticalin的专利申请的一个实例是PCT公开号WO 199916873。

[0386] Affilin分子是小的非免疫球蛋白蛋白质,其针对对于蛋白质和小分子的特定亲和力和设计。可以从两个文库中非常快速地选择新的affilin分子,每个文库基于不同的人源支架蛋白。Affilin分子不显示与免疫球蛋白蛋白质的任何结构同源性。目前,使用两种affilin支架,其中一种是 $\gamma$ 晶体,即人结构性眼晶状体蛋白质,而另一种是“泛素”超家族蛋白质。两种人支架都非常小,显示出高温稳定性并且几乎耐受pH变化和变性剂。这种高稳定性主要是由于蛋白质的扩大的 $\beta$ 片层结构。WO 200104144中描述了 $\gamma$ 晶体衍生蛋白的实例,并且WO 2004106368中描述了“泛素类”蛋白质的实例。

[0387] 蛋白质表位模拟物(PEM)是中等大小的环状肽类分子(MW 1-2kDa),其模拟蛋白质的 $\beta$ -发夹二级结构,它是参与蛋白质间相互作用的主要二级结构。

[0388] 可以使用本领域已知的方法生成BMP6结合抗体。例如,人类工程化技术用于将非人抗体转化为工程化人抗体。美国专利公开号20050008625描述了一种体内方法,其用于采用抗体中的人可变区替代非人抗体可变区,同时保持相对于非人抗体的相同结合特征或提供更好的结合特征的体内方法。该方法依赖于表位引导的采用完全人抗体替代非人参考

抗体的可变区。得到的人抗体通常与参考非人抗体在结构上不相关,但结合与参考抗体的相同抗原上的相同表位。简而言之,在存在响应测试抗体与抗原的结合的报告系统的情况下,通过在细胞中“竞争物”和参考抗体(“lest抗体”)的多种杂合体的文库之间建立针对结合有限量的抗原的竞争来实现连续表位引导的互补替代方法。竞争物可以是参考抗体或其衍生物,如单链Fv片段。竞争物也可以是抗原的天然或人工配体,其结合与参考抗体相同的表位。对竞争物的唯一要求是它结合与参考抗体相同的表位,并且它与参考抗体竞争抗原结合。测试抗体具有来自非人参考抗体的一个共同的抗原结合V区,以及从多种来源(如人抗体的文库)中随机选择的另一个V区。来自参考抗体的共同V区用作指导,从而将测试抗体定位在抗原上的相同表位上并且以相同方向定位,使得选择偏向于对参考抗体的最高抗原结合保真度。

[0389] 许多类型的报告系统可用于检测测试抗体与抗原之间的所需的相互作用。例如,互补报告片段可以分别与抗原和测试抗体连接,使得通过片段互补的报告基因激活仅在该测试抗体与该抗原结合时发生。当测试抗体和抗原报告片段融合物与竞争物共表达时,报告基因激活变得依赖于测试抗体与竞争物竞争的能力,该能力与测试抗体对抗原的亲和力成正比。可以使用的其他报告系统包含如美国专利申请系列号10/208,730(公开号20030198971)中披露的自身抑制的报告基因再激活系统(RAIR)或美国专利申请系列号10/076,845(公开号20030157579)中披露的竞争激活系统的再激活物。

[0390] 利用连续表位引导的互补替代系统,进行选择以鉴定表达单个测试抗体以及竞争物、抗原和报告组分的细胞。在这些细胞中,每种测试抗体与竞争物一对一竞争结合有限量的抗原。报告基因的活性与结合至测试抗体的抗原的量成正比,而结合至测试抗体的抗原的量与测试抗体对抗原的亲和力和测试抗体的稳定性成比例。当表达为测试抗体时,测试抗体最初基于其相对于参考抗体的活性进行选择。第一轮选择的结果是一组“杂合”抗体,其中每个抗体由来自参考抗体的相同非人V区和来自文库的人V区组成,并且每个抗体都结合与参考抗体相同的抗原表位。在第一轮中选择的一种或多种杂合抗体具有与参考抗体相当或更高的对抗原的亲和力。

[0391] 在第二V区替代步骤中,在第一步中选择的人V区用作指导,用于选择其余非人参考抗体V区进行多样的同源人V区文库的人替代。在第一轮中选择的杂合抗体也可以用作对于第二轮选择的竞争物。第二轮选择的结果是一组完全人抗体,其在结构上不同于参考抗体,但其与参考抗体竞争结合相同抗原。一些选择的人抗体结合与参考抗体的相同抗原上的相同表位。在这些选择的人抗体中,一种或多种以相当于或比参考抗体的亲和力更高的亲和力与相同表位结合。

[0392] 使用上述小鼠或嵌合BMP6结合抗体中的一种作为参考抗体,该方法可以容易地用于生成以相同的结合特异性和相同或更好的结合亲和力与人BMP6结合的人抗体。另外,这种人BMP6结合抗体也可以从通常生产人抗体的公司例如KaloBios, Inc. (山景城(Mountain View),加利福尼亚州(Calif.))商业获得。

[0393] 骆驼科动物抗体

[0394] 从包括新的世界成员如美洲驼物种(Lama paccos、大羊驼和瘦驼)在内的骆驼和单峰骆驼(双峰骆驼和Calelus dromaderius)家族成员获得的抗体蛋白质已经关于大小、结构复杂性和对于人类受试者的抗原性进行了表征。来自自然界中发现的该哺乳动物家族

的某些IgG抗体缺乏轻链,因此在结构上不同于来自其他动物的抗体的具有两条重链和两条轻链的典型四链四级结构。参见PCT/EP 93/02214(1994年3月3日公开的WO 94/04678)。

[0395] 通过基因工程化获得骆驼科动物抗体的区域(它是被鉴定为VHH的小的单个可变结构域)以产生对靶标具有高亲和力的小蛋白质,从而产生称为“骆驼科动物纳米抗体”的低分子量抗体衍生蛋白。参见1998年6月2日发表的美国专利号5,759,808;还参见Stijlemans,B.等人,2004 J Biol Chem[生物化学杂志]279:1256-1261;Dumoulin,M.等人,2003 Nature[自然]424:783-788;Pleschberger,M.等人2003Bioconjugate Chem[生物缀合化学]14:440-448;Cortez-Retamozo,V.等人2002 Int J Cancer[国际癌症杂志]89:456-62;和Lauwereys,M.等人1998 EMBO J 17:3512-3520。骆驼科动物抗体和抗体片段的工程化文库可例如从比利时根特(Ghent)的Ablynx商购获得。与非人来源的其他抗体及其抗原结合片段一样,可以重组改变骆驼科动物抗体的氨基酸序列以获得更接近地类似于人序列的序列,即纳米抗体可以是“人源化的”。因此,可以进一步降低骆驼科动物抗体对人的天然低抗原性。

[0396] 骆驼科动物纳米抗体的分子量为人IgG分子的约十分之一,并且该蛋白质的物理直径仅为几纳米。小尺寸的一个结果是骆驼科动物纳米抗体结合抗原位点的能力,所述抗原位点对于较大的抗体蛋白质是功能上不可见的,即,骆驼科动物纳米抗体可用作检测对于使用经典免疫学技术而言隐蔽的抗原的试剂,以及可用作可能的治疗剂。因此,小尺寸的又一个结果是骆驼科动物纳米抗体可以由于结合靶蛋白的沟槽或狭窄裂缝中的特异性位点而抑制,因此可以具有与经典抗体相比更接近地类似于经典低分子量药物的功能的能力。

[0397] 低分子量和紧凑的尺寸还导致骆驼科动物纳米抗体极其热稳定、对极端pH和蛋白水解消化稳定,并且抗原性差。另一个结果是骆驼科动物纳米抗体容易从循环系统移动到组织中,甚至穿过血脑屏障并且可以治疗影响神经组织的病症。纳米抗体还可以促进跨越血脑屏障的药物转运。参见2004年8月19日公开的美国专利申请20040161738。这些特征与对人的低抗原性相结合显示了巨大的治疗潜力。此外,这些分子可以在原核细胞如大肠杆菌中完全表达,并且表达为具有噬菌体的融合蛋白并且是功能性的。

[0398] 因此,本发明的特征是对BMP6具有高亲和力的骆驼科动物抗体或纳米抗体。在本文的一个实施例中,骆驼科动物抗体或纳米抗体在骆驼科动物中天然产生,即,在使用对于其他抗体的本文所述的技术用BMP6或其肽片段免疫后,由骆驼科动物产生。可替代地,BMP6结合骆驼科动物纳米抗体被工程化,即如本文实例中所述通过以BMP6为靶标使用淘选程序,例如从展现出适当诱变的骆驼科动物纳米抗体蛋白质的噬菌体文库中选择产生。通过基因工程可以进一步定制工程化纳米抗体,以在受体受试者中具有45分钟至两周的半衰期。在一个具体实施例中,骆驼抗体或纳米抗体通过将本发明的人抗体的重链或轻链的CDR序列移植到纳米抗体或单结构域抗体框架序列中而获得,如例如PCT/EP93/02214中所述。

[0399] 双特异性分子和多价抗体

[0400] 在另一方面,本发明的特征在于包含本发明的BMP6结合抗体或其片段的双特异性或多特异性分子。本发明的抗体或其抗原结合区可以衍生化或连接至另一种功能分子,例如另一种肽或蛋白质(例如,另一种抗体或受体的配体),以生成结合至少两个不同的结合位点或靶分子的双特异性分子。事实上,本发明的抗体可以衍生化或连接至多于一种的其

他功能分子,以生成结合多于两个不同结合位点和/或靶分子的多特异性分子;这种多特异性分子也旨在由本文所用的术语“双特异性分子”涵盖。为了产生本发明的双特异性分子,本发明的抗体可以功能性地连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他方式)至一种或多种其他结合分子,如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,从而产生双特异性分子。

[0401] 因此,本发明包括双特异性分子,其包含对BMP6的至少一种第一结合特异性和对第二靶表位的第二结合特异性。例如,第二靶表位是不同于第一靶表位的BMP6的另一表位。

[0402] 另外,对于双特异性分子是多特异性的发明,除了第一和第二靶表位之外,所述分子还可以包含第三结合特异性。

[0403] 在一个实施例中,本发明的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段的结合特异性,包括例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或单链Fv。抗体也可以是轻链或重链二聚体或其任何最小片段,如Ladner等人的美国专利号4,946,778中所述的Fv或单链构建体。

[0404] 双抗体是二价双特异性分子,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,通过接头连接,所述接头太短而不允许在同一链上的两个结构域之间配对。VH和VL结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点(参见例如,Holliger等人,1993 Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:6444-6448;Poijak等人,1994 Structure[结构]2:1121-1123)。可以通过在相同细胞内表达具有结构VHA-VLB和VHB-VLA(VH-VL构型)或VLA-VHB和VLB-VHA(VL-VH构型)的两条多肽链来产生双抗体。它们中的大多数可以在细菌中以可溶性形式表达。单链双抗体(scDb)通过将两个形成双抗体的多肽链与约15个氨基酸残基的接头连接而产生(参见Holliger和Winter,1997 Cancer Immunol.Immunother.[癌症免疫学,免疫疗法],45(3-4):128-30;Wu等人,1996 Immunotechnology[免疫技术],2(1):21-36)。scDb可以在细菌中以可溶的活性单体形式表达(参见Holliger和Winter,1997 Cancer Immunol.Immunother.[癌症免疫学,免疫疗法],45(34):128-30;Wu等人,1996 Immunotechnology[免疫技术],2(1):21-36;Pluckthun和Pack,1997 Immunotechnology[免疫技术],3(2):83-105;Ridgway等人,1996 Protein Eng.[蛋白质工程],9(7):617-21)。双抗体可以与Fc融合以生成“二-双抗体”(参见Lu等人,2004J.Biol.Chem.[生物化学杂志],279(4):2856-65)。

[0405] 可用于本发明双特异性分子的其他抗体是鼠嵌合和人源化单克隆抗体。

[0406] 本发明的双特异性分子可以通过使用本领域已知的方法缀合组分结合特异性来制备。例如,双特异性分子的每种结合特异性可以单独生成,然后彼此缀合。当结合特异性是蛋白质或肽时,多种偶联剂或交联剂可用于共价缀合。交联剂的实例包括蛋白质A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)(参见例如Karpovsky等人,1984 J.Exp.Med.[实验医学杂志]160:1686;Liu,M A等人,1985 Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]82:8648)。其他方法包括Paulus,1985 Behring Ins.Mitt.第78期,118-132;Brennan等人,1985 Science[科学]229:81-83以及Glennie等人,1987 J.Immunol.[免疫学杂志]139:2367-2375中描述的那些方法。缀合剂是SATA和磺基-SMCC,两者均可从Pierce Chemical Co.(罗克福德(Rockford),伊利诺伊州)

获得。

[0407] 当结合特异性是抗体时,它们可以通过两条重链的C-末端铰链区的巯基键合而缀合。在具体实施例中,铰链区被修饰为例如在缀合之前含有奇数个巯基残基。

[0408] 可替代地,两种结合特异性可以在相同载体中编码,并在相同宿主细胞中表达和组装。当双特异性分子是mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')<sub>2</sub>或配体×Fab融合蛋白时,该方法特别有用。本发明的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和一个结合决定簇的单链分子,或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两个单链分子。制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498;和美国专利号5,482,858中。

[0409] 双特异性分子与其特异性靶标的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(REA)、FACS分析、生物测定(例如生长抑制)或蛋白质印迹测定来证实。这些测定中的每一种通常通过使用对感兴趣的复合物有特异性的标记试剂(例如,抗体)来检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在。

[0410] 在另一方面,本发明提供了多价化合物,其包含与BMP6结合的本发明抗体及其抗原结合片段的至少两个相同或不同的抗原结合部分。抗原结合部分可以经由蛋白质融合或共价或非共价连接而连接在一起。可替代地,已经描述了双特异性分子的连接方法。四价化合物可以例如通过将本发明的抗体及其抗原结合片段与结合本发明的抗体及其抗原结合片段的恒定区(例如Fc或铰链区)的抗体或抗原结合片段交联而获得。

[0411] 三聚结构域描述于例如Boreau专利EP 1 012 280B1中。五聚模块描述于例如PCT/EP 97/05897中。

[0412] 具有延长半衰期的抗体

[0413] 本发明提供了特异性地结合BMP6的抗体,其在体内具有延长的半衰期。

[0414] 许多因素可以影响蛋白质在体内的半衰期。例如,肾过滤、肝代谢、蛋白水解酶(蛋白酶)降解和免疫原性应答(例如通过抗体中和蛋白质和通过巨噬细胞和树突细胞摄取)。可以使用多种策略来延长本发明的抗体及其抗原结合片段的半衰期。例如,通过与聚乙二醇(PEG)、reCODE PEG、抗体支架、聚唾液酸(PSA)、羟乙基淀粉(HES)、白蛋白结合配体和碳水化合物屏蔽的化学连接;通过与结合血清蛋白(如白蛋白、IgG、FcRn)的蛋白质的基因融合和转移;通过与结合血清蛋白的其他结合部分(如纳米抗体、Fab、DARPin、avimer、亲合体和anticalin)偶联(遗传地或化学地);通过与rPEG、白蛋白、白蛋白的结构域、白蛋白结合蛋白和Fc的基因融合;或通过掺入纳米载体、缓释制剂或医疗装置中。

[0415] 为了延长体内抗体的血清循环,可以通过PEG与抗体的N-末端或C-末端的位点特异性缀合或经由赖氨酸残基上存在的ε-氨基,将惰性聚合物分子(如高分子量PEG)附接至具有或不具有多功能接头的抗体或其片段。为了使抗体聚乙二醇化,通常在一个或多个PEG基团附接至该抗体或抗体片段的条件下使该抗体、其抗原结合片段与聚乙二醇(PEG)(如PEG的反应性酯或醛衍生物)反应。聚乙二醇化可以通过酰化反应或烷基化反应采用反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)来进行。如本文所用,术语“聚乙二醇”旨在涵盖已用于衍生其他蛋白质的任何形式的PEG,如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在一个实施例中,待聚乙二醇化的抗体是非糖基化抗体。将使用导致

最小生物活性损失的线性或支化聚合物衍生化。可以通过SDS-PAGE和质谱法密切监测缀合程度,以确保PEG分子与抗体的适当缀合。可以通过尺寸排阻或通过离子交换色谱法将未反应的PEG与抗体-PEG缀合物分离。可以使用本领域技术人员公知的方法,例如通过本文所述的免疫测定,测试PEG衍生化抗体的结合活性以及体内功效。聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的,并且可以应用于本发明的抗体及其抗原结合片段。参见例如,Nishimura等人的EP 0 154 316和Ishikawa等人的EP 0 401 384。

[0416] 其他改良的聚乙二醇化技术包括重构化学正交定向工程技术(ReCODE PEG),其经由包含tRNA合成酶和tRNA的重构系统将化学上指定的侧链掺入生物合成蛋白中。该技术能够将超过30个新氨基酸掺入大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞中的生物合成蛋白中。tRNA在琥珀密码子所定位的任何位置掺入规范性氨基酸,从而将琥珀从终止密码子转换成发出掺入化学上指定的氨基酸的信号密码子。

[0417] 重组聚乙二醇化技术(rPEG)也可用于血清半衰期延长。该技术一般包括将300-600个氨基酸非结构化蛋白质尾部与现有的药物蛋白质基因融合。因为这种非结构化蛋白质链的表观分子量比其实际分子量大约15倍,所以蛋白质的血清半衰期大大增加。与需要化学缀合和再纯化的传统PEG化相反,该制备过程大大简化并且产物是均匀的。

[0418] 聚唾液酸化是另一种技术,它利用天然聚合物聚唾液酸(PSA)来延长活性寿命和提高治疗性肽和蛋白质的稳定性。PSA是唾液酸的聚合物(一种糖)。当用于蛋白质和治疗性肽药物递送时,聚唾液酸在缀合时提供保护性微环境。这增加了治疗性蛋白质在循环中的活性寿命并防止其被免疫系统识别。PSA聚合物天然存在于人体中。它被某些细菌采用,这些细菌已经进化了数百万年以用它来包被其细胞壁。然后,这些天然的聚唾液酸化细菌凭借分子模拟能够阻止身体的防御系统。PSA-大自然的终极秘密技术,可以容易地大量产自这种细菌并具有预定的物理特征。即使与蛋白质偶联,细菌PSA也是完全非免疫原性的,因为它在化学上与人体中的PSA相同。

[0419] 另一种技术包括使用与抗体连接的羟乙基淀粉(“HES”)衍生物。HES是一种源自蜡质玉米淀粉的改性天然聚合物,并可以通过人体的酶代谢。通常给予HES溶液以替代缺乏的血液体积并改善血液的流变学特性。抗体的Hes化能够通过增加分子的稳定性以及通过降低肾清除率来延长循环半衰期,从而导致生物活性增加。通过改变不同的参数如HES的分子量,可以定制多种HES抗体缀合物。

[0420] 还可以生成具有增加的体内半衰期的抗体,其将一个或多个氨基酸修饰(即,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选Fc或铰链Fc结构域片段)。参见例如,国际公开号W0 98/23289;国际公开号W0 97/34631;和美国专利号6,277,375。

[0421] 此外,抗体可以与白蛋白缀合,以使抗体或抗体片段在体内更稳定或在体内具有更长的半衰期。这些技术是本领域中公知的,参见例如,国际公开号W0 93/15199、W0 93/15200和W0 01/77137;和欧洲专利号EP 413,622。

[0422] 增加半衰期的策略尤其可用于纳米抗体、基于纤连蛋白的结合剂以及需要增加体内半衰期的其他抗体或蛋白质。

[0423] 抗体缀合物

[0424] 本发明提供了抗体或其抗原结合片段,其特异性地结合与异源蛋白质或多肽(或其抗原结合片段,优选与至少10、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、

至少90或至少100个氨基酸的多肽)重组融合或化学缀合(包括共价和非共价缀合)的BMP6以生成融合蛋白。特别地,本发明提供了融合蛋白,其包含本文所述抗体的抗原结合片段(例如,Fab片段、Fd片段、Fv片段、F(ab)<sub>2</sub>片段、VH结构域、VH CDR、VL结构域或VL CDR)和异源蛋白质、多肽或肽。将蛋白质、多肽或肽与抗体或抗体片段融合或缀合的方法是本领域已知的。参见例如,美国专利号5,336,603,5,622,929,5,359,046,5,349,053,5,447,851和5,112,946;欧洲专利号EP 307,434和EP 367,166;国际专利号WO 96/04388和WO 91/06570; Ashkenazi等人,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]88:10535-10539; Zheng等人,1995,J.Immunol.[免疫学杂志]154:5590-5600;以及Vil等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:11337-11341。

[0425] 可以通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)的技术生成另外的融合蛋白。DNA改组可用于改变本发明的抗体及其抗原结合片段的活性(例如,具有更高亲和力和更低解离速率的抗体及其抗原结合片段)。一般参见美国专利号5,605,793,5,811,238,5,830,721,5,834,252和5,837,458;Patten等人,1997,Curr.Opinion Biotechnol.[当前生物技术观点]8:724-33;Harayama,1998,Trends Biotechnol.[生物技术趋势]16(2):76-82;Hansson,等人,1999,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]287:265-76;以及Lorenzo和Blasco,1998,Biotechniques[生物技术]24(2):308-313(这些专利和出版物中的每一个均通过引用其全文并入本文)。抗体及其抗原结合片段或编码的抗体及其抗原结合片段可以通过在重组之前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变来改变。编码特异性地结合BMP6的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一个或多个组分、基序、区域(section)、部分、结构域、片段等重组。

[0426] 此外,抗体及其抗原结合片段可以与标志物序列如肽融合以促进纯化。在一个实施例中,标志物氨基酸序列是六组氨酸肽(SEQ ID NO:97),如pQE载体中提供的标记(凯杰公司(QIAGEN, Inc.),伊顿大街(Eton Avenue)9259号,查茨沃思(Chatsworth),加利福尼亚州,91311)等,其中许多是商购可得的。如Gentz等人,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]86:821-824中所述,例如六组氨酸(SEQ ID NO:97)提供了融合蛋白的方便纯化。用于纯化的其他肽标记包括但不限于对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson等人,1984,Cell 37:767)的血凝素(“HA”)标记以及“旗帜”标记。

[0427] 在一个实施例中,本发明的抗体及其抗原结合片段与诊断剂或可检测剂缀合。这种抗体可用于监测或预后疾病或病症的发作、发展、进展和/或严重程度,其作为临床试验程序(如确定特定疗法的功效)的一部分。这种诊断和检测可以通过将抗体与可检测物质偶联来实现,所述可检测物质包括但不限于各种酶,例如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,例如但不限于链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;荧光材料,例如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,例如但不限于鲁米诺;生物发光材料,例如但不限于荧光素酶、荧光素和水母素;放射性物质,例如但不限于碘(131I、125I、123I和121I)、碳(14C)、硫(35S)、氚(3H)、铟(115In、113In、112In和111In)、锝(99Tc)、钛(201Ti)、镓(68Ga、67Ga)、钯(103Pd)、钼(99Mo)、氙(133Xe)、氟(18F)、153Sm、177Lu、159Gd、149Pm、140La、175Yb、166Ho、90Y、47Sc、186Re、188Re、142Pr、105Rh、97Ru、68Ge、57Co、65Zn、85Sr、32P、

153Gd、169Yb、51Cr、54Mn、75Se、113Sn和117Tm；以及使用各种正电子发射断层扫描的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

[0428] 本发明还包括与治疗部分缀合的抗体及其抗原结合片段的用途。抗体及其抗原结合片段可以与治疗部分如细胞毒素缀合，例如细胞抑制剂或杀细胞剂、治疗剂或放射性金属离子（例如 $\alpha$ -发射体）。细胞毒素剂或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何药剂。

[0429] 此外，抗体及其抗原结合片段可以与调节给定生物反应的治疗部分或药物部分缀合。治疗部分或药物部分不应解释为限于经典的化学治疗剂。例如，药物部分可以是具有所需生物活性的蛋白质、肽或多肽。这种蛋白质可包括例如毒素，如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素；蛋白质，如肿瘤坏死因子、 $\alpha$ -干扰素、 $\beta$ -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤溶酶原激活物、凋亡剂、抗血管生成剂；或生物反应调节剂如淋巴因子。

[0430] 此外，抗体可以与治疗部分如放射性金属离子（如 $\alpha$ -发射体，如 $^{213}\text{Bi}$ ）或用于将放射性金属离子（包括但不限于 $^{131}\text{In}$ 、 $^{131}\text{Lu}$ 、 $^{131}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{Ho}$ 、 $^{131}\text{Sm}$ ）与多肽缀合的大环螯合剂缀合。在一个实施例中，大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸（DOTA），其可以经由接头分子附接至抗体。这种接头分子是本领域公知的，并描述于Denardo等人，1998, Clin Cancer Res. [临床癌症研究] 4(10):2483-90；Peterson等人，1999, Bioconjug. Chem. [生物缀合化学] 10(4):553-7；和Zimmerman等人，1999, Nucl. Med. Biol. [核医学和生物学] 26(8):943-50，其每一个均通过引用全文并入。

[0431] 用于将治疗部分与抗体缀合的技术是公知的，参见例如，Amon等人，“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy [癌症疗法中用于药物免疫靶向的单克隆抗体]”，Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy [单克隆抗体和癌症疗法]、Reisfeld等人（编），第243-56页（Alan R. Liss, Inc. 1985）；Hellstrom等人，“Antibodies For Drug Delivery [用于药物递送的抗体]”，Controlled Drug Delivery [药物控制释放]（第2版）、Robinson等人（编），第623-53页（Marcel Dekker, Inc. 1987）；Thorpe，“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review [癌症疗法中细胞毒性剂的抗体载体：综述]”，Monoclonal Antibodies [单克隆抗体] 84: Biological And Clinical Applications [生物和临床应用]、Pinchera等人（编），第475-506页（1985）；“Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy [放射标记的抗体在癌症疗法中的治疗用途的未来前景]”，Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy [用于癌症检测和治疗的单克隆抗体]、Baldwin等人（编），第303-16页（Academic Press [学术出版社] 1985）以及Thorpe等人，1982, Immunol. Rev. [免疫学综述] 62:119-58。

[0432] 抗体也可以附接至固体支持物，这尤其科用于免疫测定或靶抗原的纯化。这种固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0433] 产生本发明抗体的方法编码抗体的核酸

[0434] 本发明提供了基本上纯化的核酸分子，其编码包含上述BMP6结合抗体链的区段或结构域的多肽。本发明的一些核酸包含编码SEQ ID NO:16、36、56或76中的任何一个所示的重链可变区的核苷酸序列，和/或编码SEQ ID NO:26、46、66或86中的任何一个所示的轻链可变区的核苷酸序列。在具体实施例中，核酸分子是表1中鉴定的那些核酸分子。本发明的

一些其他核酸分子包含与表1中鉴定的那些核酸分子的核苷酸序列基本上相同(例如,至少65%、80%、95%或99%)的核苷酸序列。当从适当的表达载体表达时,由这些多核苷酸编码的多肽能够显示出BMP6抗原结合能力。

[0435] 本发明还提供了多核苷酸,其编码表1和/或表14中所示的BMP6结合抗体的重链或轻链的至少一个CDR区和通常所有三个CDR区。一些其他多核苷酸编码表1和/或表14中所示的BMP6结合抗体的重链和/或轻链的全部或基本上全部可变区序列。由于密码的简并性,多种核酸序列将编码免疫球蛋白氨基酸序列中的每一种。

[0436] 本发明的核酸分子可以编码抗体的可变区和恒定区。本发明的一些核酸序列包含编码成熟重链可变区序列的核苷酸,所述成熟重链可变区序列与SEQ ID NO:16、36、56或76中任何一个所示的成熟重链可变区序列基本上相同(例如,至少80%、90%或99%)。一些其他核酸序列包含编码成熟轻链可变区序列的核苷酸,所述成熟轻链可变区序列与SEQ ID NO:26、46、66或86中任何一个所示的成熟轻链可变区序列基本上相同(例如,至少80%、90%或99%)。

[0437] 多核苷酸序列可以通过从头固相DNA合成或通过PCR诱变编码BMP6结合抗体或其结合片段的现有序列(例如,如下文实例中所述的序列)来产生。核酸的直接化学合成可以通过本领域已知的方法完成,如Narang等人,1979,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:90的磷酸三酯方法;Brown等人,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:109,1979的磷酸二酯方法;Beaucage等人,Tetra.Lett.[四面体快报],22:1859,1981的二乙基亚磷酰胺方法;以及美国专利号4,458,066的固体支持物方法。通过PCR向多核苷酸序列引入突变可以如以下文献中所述进行,例如PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification[PCR技术:用于DNA扩增的原理和应用],H.A.Erlich(编辑),Freeman Press[弗里曼出版社],NY,N.Y.,1992;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications[PCR方案:方法和应用指南],Innis等人(编辑),Academic Press[学术出版社],圣地亚哥,加利福尼亚州,1990;Mattila等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究]19:967,1991;以及Eckert等人,PCR Methods and Applications[PCR方法和应用]1:17,1991。

[0438] 本发明还提供了用于产生上述BMP6结合抗体的表达载体和宿主细胞。可以使用各种表达载体来表达编码BMP6结合抗体链或结合片段的多核苷酸。基于病毒的载体和非病毒表达载体均可用于在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体和系统包括质粒、附加型载体(通常具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒)以及人类人工染色体(参见例如,Harrington等人,Nat Genet.[自然遗传学]15:345,1997)。例如,用于在哺乳动物(例如人)细胞中表达BMP6结合多核苷酸和多肽的非病毒载体包括pThioHis A,B&C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A,B&C(英杰公司(Invitrogen),圣地亚哥(San Diego),加利福尼亚州(Calif.))、MPSV载体以及本领域已知的用于表达其他蛋白质的许多其他载体。有用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的载体,基于SV40、乳头瘤病毒、HBP EB病毒、牛痘病毒载体和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus,SFV)的载体。参见Brent等人,同上;Smith,Annu.Rev.Microbiol.[年度微生物学评论]49:807,1995;以及Rosenfeld等人,Cell[细胞]68:143,1992。

[0439] 表达载体的选择取决于要在其中表达载体的预期宿主细胞。通常,表达载体含有启动子和其他调节序列(例如增强子),其与编码BMP6结合抗体链抗原结合片段的多核苷酸

可操作地连接。在一个实施例中,除诱导条件外,使用诱导型启动子来阻止插入序列的表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。转化生物的培养物可以在非诱导条件下扩增,而不会使群体偏向编码序列,所述编码序列的表达产物被宿主细胞更好地耐受。除了启动子之外,还可能需要或期望其他调节元件以有效表达BMP6结合抗体链抗原结合片段。这些元件通常包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。此外,通过包含适合于使用中的细胞系统的增强子,可以提高表达效率(参见例如,Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.[细胞分化中的结果和问题]20:125,1994;和Bittner等人,Meth.Enzymol.[酶学方法],153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可用于增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0440] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置,以与通过插入的BMP6结合抗体序列编码的多肽形成融合蛋白。更常见的是,插入的BMP6结合抗体序列在包含在载体中之前与信号序列连接。用于接收编码BMP6结合抗体轻链和重链可变结构域的序列的载体有时也编码恒定区或其部分。这种载体允许可变区表达为具有恒定区的融合蛋白,从而导致产生完整抗体及其抗原结合片段。通常,这种恒定区是人类的。

[0441] 用于包含和表达BMP6结合抗体链的宿主细胞可以是原核的或真核的。大肠杆菌是一种可用于克隆和表达本发明多核苷酸的原核宿主。适合使用的其他微生物宿主包括杆菌(如枯草杆菌)和其他肠杆菌科(如沙门氏菌属、沙雷氏菌属)以及各种假单胞菌属的种。在这些原核宿主中,还可以制备表达载体,其通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制的起点)。此外,将存在任何数量的各种公知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 $\beta$ -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 $\lambda$ 的启动子系统。启动子通常任选采用操纵基因序列控制表达且具有核糖体结合位点序列等,以用于启动和完成转录和翻译。其他微生物如酵母也可用于表达本发明的BMP6结合多肽。也可以使用与杆状病毒载体组合的昆虫细胞。

[0442] 在一个实施例中,哺乳动物宿主细胞用于表达和产生本发明的BMP6结合多肽。例如,它们可以是表达内源免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系(例如,实例中描述的1D6.C9骨髓瘤杂交瘤克隆)或含有外源表达载体的哺乳动物细胞系(例如,以下举例说明的SP2/0骨髓瘤细胞)。这些包括任何正常的必死或正常或异常的永生的动物或人类细胞。例如,已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。利用哺乳动物组织细胞培养表达多肽一般在例如Winnacker, FROM GENES TO CLONES[从基因到克隆], VCH出版商, 纽约, 纽约州, 1987中讨论。哺乳动物宿主细胞的表达载体可包括表达控制序列如复制的起点、启动子和增强子(参见例如,Queen, 等人, Immunol.Rev.[免疫学评论]89:49-68,1986)和必要的处理信息位点如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有源自哺乳动物基因或源自哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的和/或可调制的或可调节的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP poIIIII启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如人类即早期CMV启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0443] 用于引入含有感兴趣的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型而

变化。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主。(一般参见Sambrook等人,同上)。其他方法包括例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、冲击法、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子、与疱疹病毒结构蛋白VP22的融合物(Elliot和O'Hare,Cell[细胞]88:223,1997)、药剂增强的DNA摄取和离体转导。对于重组蛋白的长期高产量生产,通常需要稳定的表达。例如,可以使用含有病毒复制起点或内源性表达元件和可选择标志物基因的本发明表达载体来制备稳定表达BMP6结合抗体链或结合片段的细胞系。在引入载体后,可以使细胞在富集培养基中生长1-2天,然后将它们转换为选择性培养基。所述可选择标志物的目的是给选择带来阻力,并且它的存在允许能在选择性培养基中成功地表达引入的序列的细胞的生长。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来增殖抗性的、稳定转染的细胞。

[0444] 生成本发明的单克隆抗体

[0445] 单克隆抗体(mAb)可通过多种技术产生,包括常规单克隆抗体方法,例如Kohler和Milstein,1975Nature[自然]256:495的标准体细胞杂交技术。可以使用许多用于产生单克隆抗体的技术,例如B淋巴细胞的病毒或致癌转化。

[0446] 用于制备杂交瘤的动物系统是鼠系统。小鼠中的杂交瘤产生是完善的程序。免疫方案和分离免疫脾细胞用于融合的技术是本领域已知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0447] 可以基于如上所述制备的鼠单克隆抗体的序列制备本发明的嵌合或人源化抗体及其抗原结合片段。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可以从感兴趣的鼠杂交瘤中获得,并使用标准分子生物学技术工程化以含有非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠可变区与人恒定区连接(参见例如Cabilly等人的美国专利号4,816,567)。为了产生人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠CDR区插入人框架中。参见例如,Winter的美国专利号5,225,539和Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6180370。

[0448] 在某个实施例中,本发明的抗体是人单克隆抗体。可以使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠来生成这种针对BMP6的人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括在本文中分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在本文中统称为“人Ig小鼠”。

[0449] HuMAb **Mouse**<sup>®</sup> (Medarex, Inc.) 含有编码未重排的人重链( $\mu$ 和 $\gamma$ )和 $\kappa$ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因miniloci,以及使内源性 $\mu$ 和 $\kappa$ 链基因座失活的靶向突变(参见例如,Lonberg,等人,1994Nature[自然]368(6474):856-859)。因此,小鼠显示出小鼠IgM或K降低的表达,并且响应于免疫,引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以生成高亲和力人IgG- $\kappa$ 单克隆(Lonberg, N. 等人,1994同上;在Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology[实验药理学手册]113:49-101;Lonberg, N. 和Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. [国际免疫学评论]13:65-93以及Harding, F. 和Lonberg, N., 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. [纽约科学学术年报]764:536-546中综述)。HuMAb小鼠的准备和使用以及通过这种小鼠携带的基因组修饰描述于Taylor, L. 等人, 1992 Nucleic Acids Research[核酸研究]20:6287-6295;Chen, J. 等人, 1993 International Immunology[国际免疫学]5:647-656;Tuailon等人, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA[美国

国家科学院院刊]94:3720-3724;Choi等人,1993 Nature Genetics[自然遗传学]4:117-123;Chen,J.等人,1993 EMBO J[EMBO杂志].12:821-830;Tuailon等人,1994 J.Immunol.[免疫学杂志]152:2912-2920;Taylor,L.等人,1994 International Immunology[国际免疫学]579-591;和Fishwild,D.等人,1996 Nature Biotechnology[自然生物技术]14:845-851,所有这些文献的内容均通过引用其全文特别并入本文。还参见Lonberg和Kay的美国专利号5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299和5,770,429;Surani等人的美国专利号5,545,807;Lonberg和Kay的PCT公开号W0 92103918、W0 93/12227、W0 94/25585、W0 97113852、W0 98/24884和W0 99/45962;以及Korman等人的PCT公开号W0 01/14424。

[0450] 在另一个实施例中,本发明的人抗体可以使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠,如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠中产生。这种小鼠在本文中称为“KM小鼠”,它在Ishida等人的PCT公开W0 02/43478中有详细描述。

[0451] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转基因动物系统是本领域可获得的,并且可用于产生本发明的BMP6结合抗体及其抗原结合片段。例如,可以使用称为Xenomouse (Abgenix, Inc.)的备选转基因系统。这种小鼠描述于例如Kucherlapati等人的美国专利号5,939,598、6,075,181、6,114,598、6,150,584和6,162,963中。

[0452] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转染色体动物系统是本领域可获得的,并且可用于产生本发明的BMP6结合抗体。例如,可以使用携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠,它称为“TC小鼠”;这种小鼠描述于Tomizuka等人,2000 Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]97:722-727中。此外,本领域已经描述了携带人重链和轻链转染色体的牛(Kuroiwa等人,2002 Nature Biotechnology[自然生物技术]20:889-894),并且可以用于产生本发明的BMP6结合抗体。

[0453] 还可以使用针对筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法来制备本发明的人单克隆抗体。用于分离人抗体的这种噬菌体展示方法在本领域中建立或在以下实例中描述。参见例如,Ladner等人的美国专利号5,223,409、5,403,484和5,571,698;Dower等人的美国专利号5,427,908和5,580,717;McCafferty等人的美国专利号5,969,108和6,172,197;以及Griffiths等人的美国专利号5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915和6,593,081。

[0454] 本发明的人单克隆抗体也可以使用SCID小鼠制备,人免疫细胞已经重建至该SCID小鼠中,使得免疫时可以产生人抗体应答。这种小鼠描述于Wilson等人的美国专利号5,476,996和5,698,767中。

[0455] 框架或Fc工程化

[0456] 本发明的工程化抗体及其抗原结合片段包括如下这些:其中已对VH和/或VL内的框架残基进行了修饰,例如以改善抗体的特性。通常进行这样的框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个框架残基“向回突变”为相应的种系序列。更具体地,已经历体细胞突变的抗体可以含有与衍生抗体的种系序列不同的框架残基。可以通过将抗体框架序列与衍生抗体的种系序列进行比较来鉴定这种残基。为了使框架区序列恢复为其种系构型,可以通过例如定点诱变将体细胞突变“向回突变”为种系序列。这种“向回突变的”抗体也旨在包括在本发明中。

[0457] 另一种类型的框架修饰包括使框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基突变以去除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。该方法也称为“去免疫化”,并在Carr等人的美国专利公开号20030153043中进一步详细描述。

[0458] 除了在框架或CDR区内进行的修饰之外或作为在框架或CDR区内进行的修饰的替代方案,可以将本发明的抗体工程化以包含Fc区内的修饰,通常是为了改变抗体的一种或多种功能特性,如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明的抗体可以被化学修饰的(例如,一个或多个化学部分可以附接至抗体)或被修饰以改变其糖基化,从而再次改变抗体的一种或多种功能特性。以下更详细地描述了这些实施例中的每一个。Fc区中残基的编号是Kabat的EU索引的编号。

[0459] 在一个实施例中,修饰CH1的铰链区,使得铰链区中半胱氨酸残基的数目改变,例如增加或减少。该方法在Bodmer等人的美国专利号5,677,425中进一步描述。改变CH1铰链区中半胱氨酸残基的数目,以便例如促进轻链和重链的组装或增加或降低抗体的稳定性。

[0460] 在另一个实施例中,使抗体的Fc铰链区突变以降低抗体的生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区域中,使得抗体具有相对于天然Fc铰链结构域SpA结合而言受损的葡萄球菌蛋白质A (SpA) 结合。该方法在Ward等人的美国专利号6,165,745中进一步详细描述。

[0461] 在另一个实施例中,修饰抗体以增加其生物半衰期。可以采用各种方法。例如,可以引入以下突变中的一种或多种:T252L、T254S、T256F,如Ward的美国专利号6,277,375中所述。可替代地,为了增加生物半衰期,可以在CH1或CL区内改变抗体,以含有从IgG的Fc区的CH2结构域的两个环采集的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利号5,869,046和6,121,022中所述。

[0462] 在一个实施例中,通过用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替代一个或多个氨基酸,使得抗体对效应配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。改变亲和力的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。该方法在Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中进一步详细描述。

[0463] 在另一个实施例中,选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基替代,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。该方法在Idusogie等人的美国专利号6,194,551中进一步详细描述。

[0464] 在另一个实施例中,改变一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。该方法在Bodmer等人的PCT公开W0 94/29351中进一步描述。

[0465] 在另一个实施例中,修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或通过修饰一个或多个氨基酸来增加抗体对Fc- $\gamma$ 受体的亲和力。该方法由Presta在PCT公开W0 00/42072中进一步描述。此外,已经绘制了人IgG1上针对Fc- $\gamma$  RI、Fc- $\gamma$  RII、Fc- $\gamma$  RIII和FcRn的结合位点,并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见Shields,R.L.等人,2001J.Biol.Chem.[生物化学杂志]276:6591-6604)。

[0466] 在又一个实施例中,修饰抗体的糖基化。例如,可以制备非糖基化的抗体(即,抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对“抗原”的亲和力。这种碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多

个氨基酸取代,其导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种糖基化可以增加抗体对抗原的亲合力。这样的方法在Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中进一步详细描述。

[0467] 另外或可替代地,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。已经证明这种改变的糖基化模式增加了抗体的ADCC能力。这种碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来实现。具有改变的糖基化机制的细胞已在本领域中描述,并且可用作宿主细胞,在该宿主细胞中表达本发明的重组抗体,从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,Hang等人的EP1,176,195描述了具有功能破坏的FUT8基因的细胞系,其编码岩藻糖基转移酶,使得在这种细胞系中表达的抗体显示出低岩藻糖基化。Presta的PCT公开W0 03/035835描述了变体CHO细胞系LecI3细胞,其将岩藻糖衔接至Asn(297)连接的碳水化合物的能力降低,还导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(还参见Shields,R.L.等人,2002J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开W0 99/54342描述了如下细胞系,该细胞系被工程化以表达糖蛋白修饰糖基转移酶(例如, $\beta(1,4)$ -N乙酰基葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII)),使得在工程化细胞系中表达的抗体显示出增加的二等分GlcNac结构,该二等分GlcNac结构导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等人,1999Nat.Biotech.[自然生物技术]17:176-180)。

[0468] 使改变的抗体工程化的方法

[0469] 如上所述,本文所示的具有VH和VL序列或全长重链和轻链序列的BMP6结合抗体可用于通过修饰全长重链和/或轻链序列、VH和/或VL序列或与其衔接的一个或多个恒定区来产生新的BMP6结合抗体。因此,在本发明的另一个方面,本发明的BMP6结合抗体的结构特征用于产生结构上相关的BMP6结合抗体,其保留本发明的抗体及其抗原结合片段的至少一种功能特性,如与人BMP6结合并且还抑制BMP6的一种或多种功能特性(例如,在溶血测定中抑制红细胞裂解)。

[0470] 例如,本发明的抗体及其抗原结合片段的一个或多个CDR区或其突变可以与已知的构架区和/或其他CDR重组组合以产生另外的重组工程化的本发明BMP6结合抗体及其抗原结合片段,如上所讨论。其他类型的修饰包括先前部分中描述的那些修饰。用于工程化方法的起始材料是本文提供的一种或多种VH和/或VL序列,或其一个或多个CDR区。为了产生工程化抗体,不必实际制备(即,表达为蛋白质)具有本文提供的一种或多种VH和/或VL序列的抗体,或其一个或多个CDR区。相反,一种或多种序列中包含的信息用作起始材料以产生源自一种或多种原始序列的一种或多种“第二代”序列,然后该一种或多种“第二代”序列进行制备并表达为蛋白质。

[0471] 还可以通过筛选具有如US 2005025552所述的固定的CDR3序列或最小必需结合决定簇以及CDR1和CDR2序列的多样性的抗体文库来制备改变的抗体序列。所述筛选可以根据适合于筛选来自抗体文库的抗体的任何筛选技术进行,如噬菌体展示技术。

[0472] 标准分子生物学技术可用于制备和表达改变的抗体序列。由一种或多种改变的抗体序列编码的抗体是保留本文所述的BMP6结合抗体的一种、一些或全部功能特性的抗体,所述功能特性包括但不限于与人BMP6蛋白特异性结合;并且该抗体在溶血测定中抑制红细胞裂解。

[0473] 可以使用本领域可获得的和/或本文描述的标准测定如实例中所述的那些测定(例如,ELISA)评估改变的抗体的功能特性。

[0474] 在本发明的抗体及其抗原结合片段的工程化方法的一个实施例中,可以沿着BMP6结合抗体编码序列的全部或部分随机或选择性地引入突变,并且可以针对结合活性和/或如本文所述的其他功能特性筛选所得的修饰的BMP6结合抗体。本领域中已经描述了突变方法。例如,Short的PCT公开W0 02/092780描述了使用饱和诱变、合成连接组装或其组合产生并筛选抗体突变的方法。可替代地,Lazar等人的PCT公开W0 03/074679描述了使用计算筛选方法来优化抗体的生理化学特性的方法。

[0475] 本发明抗体的表征

[0476] 本发明的抗体及其抗原结合片段可通过各种功能测定来表征。例如,可通过其抑制BMP6的能力来对它们进行表征。

[0477] 抗体与BMP6结合的能力可以通过直接标记感兴趣的抗体来检测,或者所述抗体可以是未标记的并且使用本领域已知的各种夹心式测定形式间接检测结合。

[0478] 在一个实施例中,本发明的BMP6结合抗体及其抗原结合片段阻断参考BMP6结合抗体或与参考BMP6结合抗体竞争结合BMP6多肽。这些可以是上述完全人BMP6结合抗体。它们还可以是与参考抗体结合相同表位的其他小鼠、嵌合或人源化BMP6结合抗体。阻断参考抗体结合或与参考抗体竞争结合的能力表明测试中的BMP6结合抗体结合与参考抗体所定义的相同或相似的表位,或结合与参考BMP6结合抗体所结合的表位足够接近的表位。这种抗体尤其可能具有针对参考抗体鉴定的有利特性。阻断参考抗体或与参考抗体竞争的能力可以通过例如竞争结合测定来确定。使用竞争结合测定,检查所述测试中的测试抗体抑制参考抗体与共同抗原(如BMP6多肽)的特异性结合的能力。如果过量的测试抗体实质上抑制参考抗体的结合,则测试抗体与参考抗体竞争与抗原的特异性结合。实质性抑制意指测试抗体通常使参考抗体的特异性结合降低至少10%、25%、50%、75%或90%。

[0479] 许多已知的竞争结合测定可用于评估抗体与参考抗体竞争结合特定蛋白质,该特定蛋白质在这种情况下是BMP6。这些竞争结合测定包括例如固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心式竞争测定(参见Stahli等人,Methods in Enzymology[酶学的方法]9:242-253,1983);固相直接生物素-亲和素EIA(参见Kirkland等人,J.Immunol.[免疫学杂志]137:3614-3619,1986);固相直接标记测定,固相直接标记夹心式测定(参见Harlow&Lane,同上);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel等人,Molec.Immunol.[分子免疫学]25:7-15,1988);固相直接生物素-亲和素EIA(Cheung等人,Virology[病毒学]176:546-552,1990);和直接标记的RIA(Moldenhauer等人,Scand.J.Immunol.[免疫学杂志]32:77-82,1990)。典型地,这种测定涉及使用结合固体表面或细胞的纯化抗原,该固体表面或细胞携带这些未标记的测试BMP6结合抗体和标记的参考抗体中的任何一种。通过确定在测试抗体存在下结合固体表面或细胞的标签的量来测量竞争性抑制。通常,测试抗体过量存在。通过竞争测定(即,竞争抗体)鉴定的抗体包括与参考抗体结合相同表位的抗体和结合邻近表位的抗体,该邻近表位与参考抗体所结合的表位足够接近以发生位阻。

[0480] 为了确定所选择的BMP6结合单克隆抗体是否结合唯一的表位,可以使用可商购获得的试剂(例如来自伊利诺伊州罗克福德的皮尔斯公司(Pierce,Rockford,Ill.)的试剂)

将每种抗体生物素化。可以使用BMP6多肽包被的ELISA平板来进行使用未标记单克隆抗体和生物素化单克隆抗体的竞争研究。可以用链霉亲和素-碱性磷酸酯酶探针检测生物素化MAb结合。为了确定纯化的BMP6结合抗体的同种型,可进行同种型ELISA。例如,微量滴定板的孔可以在4℃下用1 $\mu$ g/ml的抗人IgG涂覆过夜。用1%BSA封闭后,使平板与1 $\mu$ g/ml或更少的单克隆BMP6结合抗体或纯化的同种型对照在环境温度下反应一至两个小时。这些孔然后可以与人IgG1或人IgM特异性碱性磷酸酯酶缀合的探针反应。然后将板显色,并对其进行分析,以便确定纯化抗体的同种型。

[0481] 为了证明单克隆BMP6结合抗体与表达BMP6多肽的肝细胞的结合,可以使用流式细胞术。简而言之,可以将表达BMP6的细胞系(在标准生长条件下生长)与含0.1%BSA和10%胎牛血清的PBS中各种浓度的BMP6结合抗体混合,并在37℃下温育1小时。洗涤后,细胞与荧光素标记的抗人IgG抗体在与一级抗体染色相同的条件下反应。可通过FACScan仪器使用光和侧向散射特性门控单个细胞来分析样品。(除了或者替代)流式细胞术测定,还可使用利用荧光显微术的备选测定法。可将细胞如上所述那样染色并且通过荧光显微术检查。该方法允许可视化单个细胞,但可以根据抗原的密度具有降低的灵敏度。

[0482] 可以通过蛋白质印迹进一步测试本发明的BMP6结合抗体及其抗原结合片段与BMP6多肽或抗原片段的反应性。简而言之,可以制备纯化的BMP6多肽或融合蛋白,或来自表达BMP6的细胞的细胞提取物,并且进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳之后,将分离的抗原转移至硝酸纤维素膜,用10%胎牛血清进行封闭,并且用有待测试的单克隆抗体进行探测。可以使用抗人IgG碱性磷酸酯酶检测人IgG结合,并且用BCIP/NBT底物片剂(密苏里州圣路易斯的西格玛化学公司(Sigma Chem.Co., St.Louis, Mo.))进行显色。

[0483] 功能测定的实例也在下面的实例部分中描述。

[0484] 预防和治疗用途

[0485] 本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体及其抗原结合片段来治疗与BMP6活性增加有关的疾病或病症的方法。在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体及其抗原结合片段来治疗贫血的方法。

[0486] 本发明的抗体及其抗原结合片段尤其可用于预防贫血的进展。它还可以与其他疗法组合用于治疗贫血患者。

[0487] 在一个实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体及其抗原结合片段来治疗BMP6相关疾病或病症的方法。已知的BMP6相关疾病或病症的实例包括:贫血,其包括非限制性实例:慢性疾病性贫血(ACD)、慢性肾病性贫血(CKD)、肿瘤性贫血、炎症性贫血、红细胞生成刺激剂(ESA)抗性贫血(例如红细胞生成素(EPO)抗性贫血)、ESA低反应性贫血(例如,EPO低反应性贫血)、功能性缺铁性贫血和/或铁限制性贫血。

[0488] 在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体及其抗原结合片段来治疗BMP6相关疾病或病症的方法,其中所述疾病或病症是贫血。在实施例中,贫血是慢性疾病性贫血。在实施例中,所述慢性疾病是慢性肾病。在实施例中,所述慢性疾病是癌症。在实施例中,所述慢性疾病是炎症。在实施例中,贫血(例如,慢性疾病性贫血)是ESA(例如,EPO)抗性贫血。在实施例中,贫血(例如,慢性疾病性贫血)是ESA(例如,EPO)低反应性贫血。在实施例中,贫血(例如,慢性疾病性贫血)是铁限制性贫血。在实施例中,包括在任何上述实施例中,所述受试者是慢性血液透析(HD)受试者。在实施例中,包

括任何上述实施例中,所述受试者患有肾病,例如终末期肾病。

[0489] 在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体及其抗原结合片段来治疗BMP6相关疾病或病症的方法,其中所述疾病或病症是功能性缺铁性贫血。在实施例中,所述受试者是ESA(例如,EPO)治疗的慢性血液透析患者。在实施例中,所述受试者是患有慢性肾病的ESA(例如,EPO)治疗的慢性血液透析患者。

[0490] 在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的包含本发明抗体的组合物来治疗贫血的方法。在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的包含本发明抗体的组合物来治疗贫血的方法。在实施例中,贫血是慢性肾病性贫血。在实施例中,贫血是ESA(例如,EPO)抗性贫血。在实施例中,贫血是ESA(例如,EPO)低反应性贫血。在实施例中,贫血是铁限制性贫血。在实施例中,贫血是与肾病例如慢性肾病相关的贫血。在实施例中,包括在任何上述实施例中,所述受试者是慢性血液透析(HD)受试者。在实施例中,包括任何上述实施例中,所述受试者患有肾病,例如终末期肾病。

[0491] 在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的包含本发明的抗体的组合物来治疗BMP6相关疾病或病症的方法,其中所述疾病或病症是功能性缺铁性贫血。在实施例中,所述受试者是ESA(例如,EPO)治疗的慢性血液透析患者。在实施例中,所述受试者是患有慢性肾病的ESA(例如,EPO)治疗的慢性血液透析患者。

[0492] 在具体实施例中,本发明提供了治疗贫血的方法。

[0493] 在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段来降低受试者的ESA(例如,EPO)给药需求的方法。在实施例中,贫血是慢性疾病性贫血。在实施例中,所述慢性疾病是慢性肾病。在实施例中,所述慢性疾病是癌症。在实施例中,所述慢性疾病是炎症。在实施例中,贫血(例如,慢性疾病性贫血)是ESA(例如,EPO)抗性贫血。在实施例中,贫血(例如,慢性疾病性贫血)是ESA(例如,EPO)低反应性贫血。在实施例中,贫血(例如,慢性疾病性贫血)是铁限制性贫血。在实施例中,包括在任何上述实施例中,所述受试者是慢性血液透析(HD)受试者。在实施例中,包括任何上述实施例中,所述受试者患有肾病,例如终末期肾病。

[0494] 在实施例中,本发明的方法和用途导致患者ESA抗性指数(ERI)降低。

[0495] 在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段来降低受试者的ESA(例如,EPO)给药需求的方法,其中所述受试者患有功能性缺铁性贫血。在实施例中,所述受试者是ESA(例如,EPO)治疗的慢性血液透析患者。在实施例中,所述受试者是患有慢性肾病的ESA(例如,EPO)治疗的慢性血液透析患者。

[0496] 在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的包含本发明的抗体的组合物来降低受试者的ESA(例如,EPO)给药需求的方法。在实施例中,受试者患有贫血。在实施例中,贫血是慢性疾病性贫血。在实施例中,所述慢性疾病是慢性肾病。在实施例中,所述慢性疾病是癌症。在实施例中,所述慢性疾病是炎症。在实施例中,贫血(例如,慢性疾病性贫血)是ESA(例如,EPO)抗性贫血。在实施例中,贫血(例如,慢性疾病性贫血)是ESA(例如,EPO)低反应性贫血。在实施例中,贫血(例如,慢性疾病性贫血)是铁限制性贫血。在实施例中,包括在任何上述实施例中,所述受试者是慢性血液透析(HD)受试者。在实施例中,包括任何上述实施例中,所述受试者患有肾病,例如终末期肾病。

[0497] 在具体实施例中,本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的包含本发明

的抗体的组合物来降低受试者的ESA (例如, EPO) 给药需求的方法, 其中所述受试者患有功能性缺铁性贫血。在实施例中, 所述受试者是ESA (例如, EPO) 治疗的慢性血液透析患者。在实施例中, 所述受试者是患有慢性肾病的ESA (例如, EPO) 治疗的慢性血液透析患者。

[0498] 在具体实施例中, 本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体及其抗原结合片段来降低受试者的铁 (例如, IV铁) 给药需求的方法。在实施例中, 受试者患有贫血。在实施例中, 贫血是慢性疾病性贫血。在实施例中, 所述慢性疾病是慢性肾病。在实施例中, 所述慢性疾病是癌症。在实施例中, 所述慢性疾病是炎症。在实施例中, 贫血 (例如, 慢性疾病性贫血) 是ESA (例如, EPO) 抗性贫血。在实施例中, 贫血 (例如, 慢性疾病性贫血) 是ESA (例如, EPO) 低反应性贫血。在实施例中, 贫血 (例如, 慢性疾病性贫血) 是铁限制性贫血。在实施例中, 包括在任何上述实施例中, 所述受试者是慢性血液透析 (HD) 受试者。在实施例中, 包括任何上述实施例中, 所述受试者患有肾病, 例如终末期肾病。

[0499] 在具体实施例中, 本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体及其抗原结合片段来降低受试者的铁 (例如, IV铁) 给药需求的方法, 其中所述受试者患有功能性缺铁性贫血。在实施例中, 所述受试者是ESA (例如, EPO) 治疗的慢性血液透析患者。在实施例中, 所述受试者是患有慢性肾病的ESA (例如, EPO) 治疗的慢性血液透析患者。

[0500] 在具体实施例中, 本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的包含本发明的抗体的组合物来降低受试者的铁 (例如, IV铁) 给药需求的方法。在实施例中, 受试者患有贫血。在实施例中, 贫血是慢性疾病性贫血。在实施例中, 所述慢性疾病是慢性肾病。在实施例中, 所述慢性疾病是癌症。在实施例中, 所述慢性疾病是炎症。在实施例中, 贫血 (例如, 慢性疾病性贫血) 是ESA (例如, EPO) 抗性贫血。在实施例中, 贫血 (例如, 慢性疾病性贫血) 是ESA (例如, EPO) 低反应性贫血。在实施例中, 贫血 (例如, 慢性疾病性贫血) 是铁限制性贫血。在实施例中, 包括在任何上述实施例中, 所述受试者是慢性血液透析 (HD) 受试者。在实施例中, 包括任何上述实施例中, 所述受试者患有肾病, 例如终末期肾病。

[0501] 在具体实施例中, 本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的包含本发明的抗体的组合物来降低受试者的铁 (例如, IV铁) 给药需求的方法, 其中所述受试者患有功能性缺铁性贫血。在实施例中, 所述受试者是ESA (例如, EPO) 治疗的慢性血液透析患者。在实施例中, 所述受试者是患有慢性肾病的ESA (例如, EPO) 治疗的慢性血液透析患者。

[0502] 在具体实施例中, 本发明提供了降低受试者的铁 (例如, IV铁) 给药需求和降低受试者的ESA (例如, EPO) 给药需求的方法, 其包括给予本发明的抗体或抗原结合片段或包含所述抗体或抗原结合片段的组合物。在实施例中, 贫血是慢性疾病性贫血。在实施例中, 所述慢性疾病是慢性肾病。在实施例中, 所述慢性疾病是癌症。在实施例中, 受试者患有贫血。在实施例中, 所述慢性疾病是炎症。在实施例中, 贫血 (例如, 慢性疾病性贫血) 是ESA (例如, EPO) 抗性贫血。在实施例中, 贫血 (例如, 慢性疾病性贫血) 是ESA (例如, EPO) 低反应性贫血。在实施例中, 贫血 (例如, 慢性疾病性贫血) 是铁限制性贫血。在实施例中, 包括在任何上述实施例中, 所述受试者是慢性血液透析 (HD) 受试者。在实施例中, 包括任何上述实施例中, 所述受试者患有肾病, 例如终末期肾病。

[0503] 在实施例中, 本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的本发明的抗体及其抗原结合片段来动员封存铁的方法。

[0504] 在实施例中, 本发明提供了通过向有需要的受试者给予有效量的包含本发明抗体

的组合物来动员封存铁的方法。

[0505] 在实施例中,本发明提供了用于提高(例如,增加)患有贫血的受试者中血红蛋白水平,同时降低采用红细胞生成素和/或铁(例如IV铁)的给药需求的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予本发明的抗体或其抗原结合片段。在实施例中,贫血是与慢性疾病相关的贫血。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将该水平提高至临床实践指南(例如肾病:改善全球预后(KDIGO)贫血工作组)所规定的水平。KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease[美洲慢性肾病的KDIGO临床实践指南].Kidney inter.[国际肾脏],增刊2012;2:279-335,其内容通过引用其全文并入本文。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将血红蛋白的水平提高到至少约11.0g/dL,例如提高到约11.0g/dL至约12.5g/dL。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将血红蛋白的水平提高到至少11.0g/dL,例如提高到11.0g/dL至12.5g/dL。

[0506] 在实施例中,本发明提供了用于提高(例如,增加)患有贫血的受试者中血红蛋白水平,同时降低采用红细胞生成素和/或铁(例如IV铁)的给药需求的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予包含本发明抗体的组合物。在实施例中,贫血是与慢性疾病相关的贫血。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将该水平提高至临床实践指南(例如肾病:改善全球预后(KDIGO)贫血工作组)所规定的水平。KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease[美洲慢性肾病的KDIGO临床实践指南].Kidney inter.[国际肾脏],增刊2012;2:279-335,其内容通过引用其全文并入本文。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将血红蛋白的水平提高到至少约11.0g/dL,例如提高到约11.0g/dL至约12.5g/dL。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将血红蛋白的水平提高到至少11.0g/dL,例如提高到11.0g/dL至12.5g/dL。

[0507] 在实施例中,本发明提供了用于维持患有贫血的受试者中血红蛋白水平,同时降低采用红细胞生成素和/或铁(例如IV铁)的给药需求的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予本发明的抗体或其抗原结合片段。在实施例中,贫血是与慢性疾病相关的贫血。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将该水平提高至临床实践指南(例如肾病:改善全球预后(KDIGO)贫血工作组)所规定的水平。KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease[美洲慢性肾病的KDIGO临床实践指南].Kidney inter.[国际肾脏],增刊2012;2:279-335,其内容通过引用其全文并入本文。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将血红蛋白的水平提高到至少约11.0g/dL,例如提高到约11.0g/dL至约12.5g/dL。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将血红蛋白的水平提高到至少11.0g/dL,例如提高到11.0g/dL至12.5g/dL。

[0508] 在实施例中,本发明提供了用于维持患有贫血的受试者中血红蛋白水平,同时降低采用红细胞生成素和/或铁(例如IV铁)的给药需求的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予包含本发明抗体的组合物。在实施例中,贫血是与慢性疾病相关的贫血。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将该水平提高至临床实践指南(例如肾病:改善全球预后(KDIGO)贫血工作组)所规定的水平。KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease[美洲慢性肾病的KDIGO临床实践指南].Kidney inter.[国际肾脏],增刊2012;2:279-335,其内容通过引用其全文并入本文。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将血红蛋白的水平提高到至少约11.0g/dL,例如提高到约11.0g/dL至约12.5g/dL。

dL。在实施例中,提高血红蛋白的水平包括将血红蛋白的水平提高到至少11.0g/dL,例如提高到11.0g/dL至12.5g/dL。

[0509] 在一个实施例中,可以将表1和/或表14中描述的分离的抗体或其抗原结合片段与治疗方法或程序(如本文所述或本领域已知的治疗方法或程序)组合给予有需要的患者。作为非限制性实例,这种方法或程序包括:给予治疗有效量的ESA(例如,EPO)、红细胞生成素或铁以及输血。治疗通常以一定的时间间隔持续一周、一个月、三个月、六个月或一年的时间。在一些患者中,患者的余生都在给予治疗。

[0510] 当本发明的治疗剂与另一种药剂一起给予时,这两者可以按顺序依次给予或同时给药。在一些方面,将本发明的抗体给予也接受采用第二种药剂或方法(例如,ESA、红细胞生成素、铁、输血)的疗法的受试者。在其他方面,结合分子与手术治疗一起给予。

[0511] 用于与BMP6结合抗体组合治疗的合适药剂包括本领域已知的抑制或减少BMP6的表达、水平、稳定性和/或活性的药剂。这些药剂包括抗体、siRNA和BMP6的小分子。

[0512] BMP6的各种抗体是本领域已知的,尤其包括以下文献中描述的那些抗体:

[0513] Andriopoulos等人2009 *Nat.Genet.*[自然遗传学]41:482-487;

[0514] Arndt等人2010 *Gastroent.*138:372-382;

[0515] Bames等人1995 *World J.Urol.*[世界泌尿学杂志]13:337-343;

[0516] Camaschella等人2009 *Nat.Genet.*[自然遗传学]41:386-388;

[0517] Celement等人1999 *Int.J.Cancer*[国际癌症杂志]80:250-256;

[0518] Corradini等人2011 *Hepatol.*[肝病学]54:273-284;

[0519] Crews等人2010 *J.Neuro.*[神经学杂志]30:12252-12262;

[0520] Dai等人2005 *Cancer Res.*[癌症研究]65:8274;

[0521] Darby等人2007 *J.Pathol.*[病理学杂志]214:394-404;

[0522] Hadziahmetovic等人2011 179:335-348;

[0523] Hamdy等人1997 *Cancer Res.*[癌症研究]57:4427;

[0524] Haudenschild等人2004 *Cancer Res.*[癌症研究]64:8276;

[0525] Hee等人2008 *J.Orth.Res.*27:162-168;

[0526] Herrera等人2009 *BMC Cell Biol.*[BMC细胞生物学]10:20;

[0527] Inagaki等人2005 *Endocrin.*[内分泌学]147:2681-2689;

[0528] Jung等人2008 *Stem Cells*[干细胞]26:2042-2051;

[0529] Kaiser等人1998 *J.Invest.Derm.*[研究皮肤科学杂志]111:1145-1152;

[0530] Kautz等人2011 *Haematol.*[血液病学]96:199-203;

[0531] Khalaf等人2012 *Eur.J.Endocrin.*[内分泌学]168:437-444;

[0532] Kochanowska等人2002 *Exp.Biol.Med.*[实验生物医学]227:57-62;

[0533] Li等人2006 *Int.J.Med.Sci.*[国际医学科学杂志]3:97-105;

[0534] Meynard等人2011 *Blood*[血液]118:747-756;

[0535] Pederson等人2008 *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*[美国国家科学院院刊]105:20764-69;

[0536] Plant等人2002 *J.Bone Min.Res.*[骨与矿物研究杂志]17:782-790;

[0537] Schluesener等人1994 *Atheroscl.*[动脉粥样硬化]113:153-156;

- [0538] Schluesener等人2004 GLIA 12:161-164;
- [0539] Shi等人2009 Fert.Steril.92:1794-1798;
- [0540] Varley等人1996 Exp.Neur.[实验神经病学]140:84-94;
- [0541] Wang等人2007 Mol.Cell.Neurosci.[分子细胞神经科学]34:653-661;以及
- [0542] Zhang等人2006 Neurosci.[神经科学]138:47-53;
- [0543] 美国专利号8,795,665;和
- [0544] WO 2010/056981;
- [0545] BMP6的其他抗体是本领域已知的;许多是商购可得的。
- [0546] BMP6的各种siRNA是本领域中已知的,尤其包括以下文献中描述的那些siRNA:
- [0547] He等人2003 Cell.Signal.[细胞信号]25:1372-1378;
- [0548] Ikeda等人2012 PLoS 0040465;
- [0549] Kautz等人2008 Blood[血液]112:1503;
- [0550] Mi等人2011 J.Cancer Res.Clin.Oncol.[癌症研究与临床肿瘤学杂志]137:245;
- [0551] Xia等人2007 J.Biol.Chem.[生物化学杂志]282:18129-18140;
- [0552] Xia等人2008 Blood[血液]111:5195;和
- [0553] Yang等人2009 Int.J.Bioch.Cell Biol.[国际生物化学与细胞生物学杂志]41:853-861。
- [0554] 其他的BMP6抑制剂是已知的。这些中的任何一种都可以与本文披露的任何抗体或其抗原结合片段组合使用。
- [0555] 组合治疗方案可以是加和的,或者它可以产生协同结果(例如,BMP6活性的降低比对于两种药剂的组合使用的预期更多)。在一个实施例中,本发明提供了用于采用本发明的BMP6结合抗体和抗贫血剂或方法(如ESA、红细胞生成素、铁或输血)预防和/或治疗如上所述的贫血或另一种BMP6相关疾病的组合法。
- [0556] 诊断用途
- [0557] 在一个方面,本发明包括诊断测定,其用于在来自患有疾病或病症或具有发展伴有贫血病症的风险的个体的生物样品(例如,血液、血清、细胞、组织)的背景下,测定BMP6和/或核酸表达以及BMP6功能。诊断测定如竞争性测定依赖于标记的类似物(“示踪剂”)与测试样品分析物竞争共同结合配偶体上的有限数量的结合位点的能力。结合配偶体通常在竞争之前或之后不溶解,然后将结合至结合配偶体的示踪剂和分析物与未结合的示踪剂和分析物分离。通过倾析(其中结合配偶体预先溶解)或通过离心(其中结合配偶体在竞争反应后沉淀)完成所述分离。测试样品分析物的量与通过标志物物质的量所测量的结合示踪剂的量成反比。制作具有已知量的分析物的剂量响应曲线,并与测试结果进行比较,以定量地测定测试样品中存在的分析物的量。当酶用作可检测标志物时,这些测定称为ELISA系统。在该形式的测定中,抗体与BMP6结合抗体之间的竞争性结合导致结合的BMP6,优选本发明的BMP6表位(作为血清样品中抗体的量度)最特别地中和血清样品中的抗体。
- [0558] 该测定的显著优点是测量直接由中和抗体(即干扰BMP6结合的那些抗体,特别是表位)组成。这种测定,特别是以ELISA测试的形式,在临床环境和常规血液筛查中具有相当大的应用。
- [0559] 在患有伴有贫血的病症的患者的临床诊断或监测中,与来自正常受试者的相应生

物样品中的水平相比,检测到BMP6蛋白指示患有伴有贫血的病症的患者。

[0560] 体内诊断或成像描述于US 2006/0067935中。简而言之,这些方法通常包括向患者给予或向患者引入可操作地衔接至可通过非侵入性方法检测的标志物或标签的诊断有效量的BMP6结合分子。允许抗体-标志物缀合物有足够的时间定位并结合BMP6。然后将患者暴露于检测装置以鉴定可检测标志物,从而形成BMP6结合分子在患者组织中的位置的图像。通过确定抗体标志物是否结合组织的组分来检测BMP6结合抗体或其抗原结合片段的存在。与没有贫血的正常个体相比,检测到BMP6蛋白质或蛋白质组合的水平增加指示伴有贫血的病症的倾向和/或发作。本发明的这些方面还用于组织成像方法和组合的诊断和治疗方法。

[0561] 本发明还涉及预测医学领域,其中诊断测定、预后测定、药物基因组学和监测临床试验用于预后(预测)目的,从而预防性地治疗个体。

[0562] 本发明还提供了用于确定个体是否具有发展伴有BMP6途径活性失调的病症的风险的预后(或预测)测定。例如,可以在生物样品中测定BMP6基因中的突变。这种测定可用于预后或预测目的,从而在具有BMP6、核酸表达或活性特征或与BMP6、核酸表达或活性相关的病症发作之前预防性地治疗个体。

[0563] 本发明的另一方面提供了用于测定个体中BMP6核酸表达或BMP6活性从而为该个体选择合适的治疗剂或预防剂的方法(本文称为“药物基因组学”)。药物基因组学允许基于个体的基因型(例如,个体的基因型被检查以测定个体对特定药剂的反应能力)选择用于治疗性或预防性治疗个体的药剂(例如药物)。

[0564] 本发明的又另一方面提供了监测药剂(例如药物)对临床试验中BMP6的表达或活性的影响的方法。

[0565] 药物组合物

[0566] 本发明提供了药物组合物,其包含与药学上可接受的载体一起配制的BMP6结合抗体或其结合片段。该组合物可另外含有适用于治疗或预防BMP6相关疾病(例如贫血)的一种或多种其他治疗剂。药物载体增强或稳定组合物或促进组合物的制备。药学上可接受的载体包括生理上相容的溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0567] 本发明的药物组合物可通过本领域已知的各种方法给予。给药途径和/或方式根据所需结果而变化。给药可以是静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下或在靶标部位附近给药。药学上可接受的载体应适合于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮给药(例如,通过注射或输注)。根据给药途径,活性化合物(即抗体,双特异性和多特异性分子)可以包被在材料中以保护化合物免受酸和可能使化合物失活的其他自然条件的作用。

[0568] 该组合物应该是无菌和流动的。可以例如通过使用涂层(如卵磷脂)、通过在分散液的情况下维持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂例如糖、多元醇(如甘露醇或山梨糖醇)和氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝或明胶)来实现可注射组合物的长期吸收。

[0569] 本发明的药物组合物可以按照本领域公知和常规实施的方法制备。参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy[药学的科学与实践],Mack出版公司,第20版,2000;和Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems[缓释和控释药物递送系统],J.R.Robinson编,Marcel Dekker公司,New York[纽约],1978。药物

组合物优选在GMP条件下制备。通常,治疗有效(effective或efficacious)剂量的BMP6结合抗体用于本发明的药物组合物中。通过本领域技术人员已知的常规方法将BMP6结合抗体配制成药学上可接受的剂型。调节剂量方案以提供最佳的希望反应(例如,治疗反应)。例如,如由治疗情况的紧急状态所指示的,可以给予单次推注,可以随着时间的过去给予若干个分次剂量,或可以按比例地减少或增加剂量。特别有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物以便给药和剂量统一。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有经计算与所要求的药物载体联合产生所希望的治疗效果的预定量的活性化合物。

[0570] 可以改变本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得一定量的活性成分,该活性成分的量有效地实现对于特定的患者、组合物和给药方式的所需的治疗反应,而对该患者没有毒性。所选的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所用的本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、正在使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、正在治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康和既往病史。

[0571] 医生或兽医可以以低于达到期望治疗效果所需的水平开始药物组合物中使用的本发明的抗体及其抗原结合片段的剂量,并逐渐增加剂量直至达到期望效果。通常,用于治疗本文所述的过敏性炎症病症的本发明组合物的有效剂量根据许多不同因素而变化,包括给药方式、靶位点、患者的生理状态、患者是人还是人动物、给予的其他药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。需要滴定治疗剂量以优化安全性和功效。对于用抗体全身给予,剂量范围为约0.0001至100mg/kg宿主体重,且更通常为0.001至15mg/kg宿主体重。示例性治疗方案需要按照给药时间表全身给予(例如,静脉内或皮下)一次或多于一次(例如,重复给药),例如每两周一次、每三周一次或每月一次或每3至6个月一次。对于用抗体进行玻璃体内给药,剂量范围为约0.0001至约10mg。示例性治疗方案需要每两周一次、每三周一次或每月一次或每3至6个月一次全身给予。

[0572] 抗体通常在多种情况下给予。单次剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。如通过测量患者中BMP6结合抗体的血液水平所示,间隔也可以是无规律的。在一些全身给予方法中,调节剂量以达到1-1000 $\mu$ g/ml的血浆抗体浓度,并且在一些方法中达到25-500 $\mu$ g/ml。可替代地,抗体可以作为持续释放制剂给予,在这种情况下需要不太频繁的给药。剂量和频率根据患者中抗体的半衰期而不同。通常,人源化抗体显示出比嵌合抗体和非人抗体更长的半衰期。给予的剂量和频率可以根据治疗是预防性还是治疗性而变化。在预防性应用中,在长时间段内以相对不频繁的间隔给予相对较低的剂量。一些患者在余生中继续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对较短的间隔给予相对较高的剂量直至疾病进展减少或终止,并且优选直至患者显示疾病症状的部分或完全改善。此后,可以向患者给予预防方案。

[0573] 在具体实施例中,将包含本发明的抗体或抗原结合片段的组合物以0.001mg/kg与0.1mg/kg之间的剂量(抗体或其抗原结合片段)给予。在具体实施例中,将包含本发明的抗体或抗原结合片段的组合物以约0.001mg/kg与约0.1mg/kg之间的剂量给予。在具体实施例中,将包含本发明抗体或抗原结合片段的组合物以0.001mg/kg、0.0016mg/kg、0.0025mg/kg、0.0040mg/kg、0.0063mg/kg、0.01mg/kg、0.016mg/kg、0.025mg/kg、0.040mg/kg、

0.063mg/kg或0.1mg/kg的剂量给予。在具体实施例中,将包含本发明抗体或抗原结合片段的组合物以约0.001mg/kg、约0.0016mg/kg、约0.0025mg/kg、约0.0040mg/kg、约0.0063mg/kg、约0.01mg/kg、约0.016mg/kg、约0.025mg/kg、约0.040mg/kg、约0.063mg/kg或约0.1mg/kg的剂量给予。在实施例中,静脉内给予(包括例如以上述任何剂量)包含本发明抗体或抗原结合片段的组合物。在实施例中,静脉内给予是静脉内输注。在实施例中,输注进行30-60分钟。在实施例中,输注进行约30-60分钟。

#### [0574] 铁蛋白的水平

[0575] 所披露的方法可以包括测定来自生物样品(例如血液或血清)的铁蛋白水平,并且在实施例中,基于铁蛋白水平患者例如患有本文所述疾病(例如贫血)的患者被选择进行采用BMP6拮抗剂(例如如本文所述,例如BMP6抗体,例如抗体7,例如如表1中所述)的治疗,或被预测对BMP6拮抗剂疗法有反应。

[0576] 在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平为 $\leq$ 约1500ng/mL。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平为 $\leq$ 1500ng/mL。在实施例中,铁蛋白水平为 $<$ 1500ng/mL。在实施例中,铁蛋白水平为 $\leq$ 约2000ng/mL。在实施例中,铁蛋白水平为 $\leq$ 2000ng/mL。在实施例中,铁蛋白水平为 $<$ 约2000ng/mL。

[0577] 在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平为 $\leq$ 约1450ng/mL,例如 $\leq$ 约1400ng/mL、 $\leq$ 约1350ng/mL、 $\leq$ 约1300ng/mL、 $\leq$ 约1250ng/mL、 $\leq$ 约1200ng/mL、 $\leq$ 约1150ng/mL、 $\leq$ 约1100ng/mL、 $\leq$ 约1050ng/mL或 $\leq$ 约1000ng/mL等。

[0578] 在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平为 $\geq$ 约200ng/mL,例如 $\geq$ 约250ng/mL、 $\geq$ 约300ng/mL、 $\geq$ 约350ng/mL、 $\geq$ 约400ng/mL、 $\geq$ 约450ng/mL、 $\geq$ 约500ng/mL、 $\geq$ 约550ng/mL、 $\geq$ 约600ng/mL、 $\geq$ 约650ng/mL、 $\geq$ 约700ng/mL、 $\geq$ 约750ng/mL、 $\geq$ 约800ng/mL、 $\geq$ 约850ng/mL、 $\geq$ 约900ng/mL、 $\geq$ 约950ng/mL、 $\geq$ 约1000ng/mL或 $\geq$ 约1500ng/mL等。在实施例中,铁蛋白水平在上述任何水平与约2000ng/mL之间。

[0579] 在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平为 $\geq$ 约500ng/mL、 $\geq$ 约550ng/mL、 $\geq$ 约600ng/mL、 $\geq$ 约650ng/mL、 $\geq$ 约700ng/mL、 $\geq$ 约750ng/mL、 $\geq$ 约800ng/mL、 $\geq$ 约850ng/mL、 $\geq$ 约900ng/mL、 $\geq$ 约950ng/mL、 $\geq$ 约1000ng/mL或 $\geq$ 约1500ng/mL等。在实施例中,铁蛋白水平在上述任何水平与约2000ng/mL之间。

[0580] 在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平为 $\geq$ 约500ng/mL。在实施例中,铁蛋白水平在约500ng/mL与约2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平在约500ng/mL与约1000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平在约500ng/mL与约1500ng/mL之间。

[0581] 在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在约200ng/mL与约1500ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在约300ng/mL与约1500ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水













1900ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1200ng/mL与1900ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1300ng/mL与1900ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1400ng/mL与1900ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1500ng/mL与1900ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1600ng/mL与1900ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1700ng/mL与1900ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1800ng/mL与1900ng/mL之间。在优选的实施例中,所有范围都包含所列举的端点值。

[0592] 在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在200ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在300ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在400ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在500ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在600ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在700ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在800ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在900ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1000ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1100ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1200ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1300ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1400ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1500ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1600ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1700ng/mL与2000ng/mL之间。在实施例中,铁蛋白水平例如预测对采用BMP6的治疗有反应(例如,增加的反应)的铁蛋白水平在1800ng/mL与2000ng/mL之间。在优选的实施例中,所有范围都包含所列举的端点值。

[0593] 在实施例中,上述铁蛋白的水平是从选自血液和血清的生物样品中测量的。在实施例中,从血清中测量上述铁蛋白的水平。

[0594] 测定技术、诊断方法和产生可传输形式的信息的方法

[0595] 所披露的方法可用于治疗、预防或改善与低铁水平相关的疾病(例如本文所述的疾病,例如贫血)以及预测疾病患者对采用BMP6拮抗剂例如抗体7(例如,如表1中所述)治疗有反应的可能性。这些方法尤其用来确定患者是否在来自该患者的样品中具有特定的铁蛋白水平,例如,如本文所述。可以通过任何适用的常规手段测定来自患者的生物样品中的铁蛋白水平。

[0596] 许多生物样品可用于鉴定标志物例如蛋白质的存在、基因或蛋白质的表达水平以及蛋白质的活性,例如血液、滑液、血沉棕黄层、血清、血浆、淋巴、粪便、尿、泪液、唾液、脑脊液、颊拭子、痰或组织。生物样品中的各种来源可以用于所披露的方法中,例如人们可以测定来自患者的生物样品(例如血液或血清)中的铁蛋白水平。

[0597] 我们已经确定铁蛋白水平可能是确定或预测对采用BMP9拮抗剂的治疗的反应的有用生物标志物。因此,技术人员将理解,可以通过测定来自患者的生物样品(例如血液或血清)中的铁蛋白水平来鉴定受试者是否具有给定的铁蛋白水平。在优选的实施例中,分析患者血清以确定受试者是否具有特定的铁蛋白水平。在其他优选的实施例中,分析患者血液以确定受试者是否具有特定的铁蛋白水平。

[0598] 如本文所述,本发明部分基于以下结论:铁蛋白水平可用于预测对于贫血或本文所述的其他疾病的BMP6拮抗作用(例如,表1中所述的抗体7)的改善的反应。铁蛋白的检测可以使用本领域任何已知的方法进行,其包括但不限于免疫细胞化学染色、ELISA、流式细胞术、蛋白质印迹、分光光度法、HPLC和质谱法。用于检测样品中多肽产物的一种方法是借助于探针,该探针是能够与标志物蛋白(例如,能够结合铁蛋白蛋白质的抗体)特异性相互作用的结合蛋白。优选地,可以使用标记的抗体、其结合部分或其他结合配偶体。抗体在来源上可以是单克隆的或多克隆的,或者可以是生物合成的。结合配偶体也可以是天然存在的分子或通过合成产生。使用本领域描述的标准蛋白质检测方法测定复合蛋白质的量。免疫学测定设计、理论和方案的详细综述可以在本领域的许多文献中找到,包括Practical Immunology[实践免疫学],Butt,W.R.,等人,Marcel Dekker,New York[纽约],1984。多种测定可用于检测具有标记抗体的蛋白质。直接标签包括衔接至抗体的荧光或发光标记、金属、染料、放射性核素等。间接标签包括本领域公知的各种酶,如碱性磷酸酶、过氧化氢酶等。在一步测定中,将多肽产物(如果存在的话)固定并与标记的抗体一起温育。标记的抗体与固定的靶分子结合。洗涤去除未结合的分子后,测定样品的标签。

[0599] 本披露还考虑使用对蛋白质或多肽有特异性的固定化抗体。可以将抗体固定在各种固体支持物上,如磁性或色谱基质颗粒、测定位置的表面(例如微量滴定孔)、固体基底材料(如塑料、尼龙、纸)等。可以通过将抗体或多种抗体以阵列形式涂覆在固体支持物上来制备测定条。然后将该条带浸入测试样品中,随后通过洗涤和检测步骤快速处理以生成可测量的信号,如有色斑点。

[0600] 在两步测定中,固定化标志物(例如铁蛋白)可以与未标记的抗体一起温育。然后将未标记的抗体复合物(如果存在的话)与对未标记的抗体有特异性的第二标记的抗体结合。洗涤样品并测定标签的存在。用于标记抗体的标志物的选择将根据应用而变化。然而,对于本领域技术人员来说,标志物的选择是可容易确定的。抗体可以用放射性原子、酶、发色团或荧光部分或比色标记来标记。标记标签的选择还依赖于所需的检测限。酶测定(ELISA)通常允许检测由酶标记的复合物与酶底物相互作用形成的有色产物。放射性原子

的一些实例包括<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H和<sup>14</sup>P。酶的一些实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。发色团部分的一些实例包括荧光素和罗丹明。可以通过本领域已知的方法将抗体与这些标签缀合。例如，酶和发色分子可以通过偶联剂(如二醛、碳二亚胺、二马来酰亚胺等)与抗体缀合。可替代地，缀合可以通过配体-受体对发生。一些合适的配体-受体对包括例如生物素-亲和素或生物素-链霉亲和素和抗体-抗原。

[0601] 在一个方面，本披露考虑使用夹心技术检测生物样品中的多肽产物。该技术需要两种能够结合感兴趣的蛋白质的抗体：例如，一种固定在固体支持物上，而一种在溶液中游离，但用一些可容易检测的化合物标记。可用于第二抗体的化学标签的实例包括但不限于放射性同位素、荧光化合物和酶或在暴露于反应物或酶底物时生成有色或电化学活性产物的其他分子。当含有多肽产物的样品置于该系统中时，多肽产物与固定化抗体和标记的抗体结合。结果是支持物表面上的“夹心”免疫复合物。通过洗去未结合的样品组分和过量的标记抗体，并测量与支持物表面上的蛋白质复合的标记抗体的量来检测复合蛋白质。夹心免疫测定具有高度特异性且非常灵敏，只要使用具有良好检测限的标签即可。

[0602] 优选地，通过放射免疫测定或酶联免疫测定、竞争性结合酶联免疫测定、斑点印迹、蛋白质印迹、色谱法(优选高效液相色谱法(HPLC))或本领域中已知的其他测定来检测样品中多肽产物的存在。可以直接或间接检测抗体与蛋白质或多肽的特异性免疫结合。

[0603] 本领域技术人员常规实施斑点印迹，以使用抗体作为探针来检测所需蛋白质(Promega Protocols and Applications Guide[普洛麦格方案和应用指南]，第二版，1991，第263页，Promega Corporation[普洛麦格公司])。使用斑点印迹装置将样品施加到膜上。将标记的探针与膜一起温育，并检测蛋白质的存在。

[0604] 蛋白质印迹分析是本领域技术人员公知的(Sambrook等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual[分子克隆实验室手册]，1989，第3卷，18章，Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室])。在蛋白质印迹中，通过SDS-PAGE分离样品。将凝胶转移到膜上。将膜与标记的抗体一起温育以检测所需蛋白质。

[0605] 上述测定包括步骤，例如但不限于免疫印迹、免疫扩散、免疫电泳或免疫沉淀。在一些实施例中，使用自动分析仪来测定铁蛋白的存在和/或水平。

[0606] 铁蛋白活性的水平可以通过本领域披露的各种方法测定，例如经由Kochan等人(2011)，Proc Natl Acad Sci U S A.[美国国家科学院院刊]108(19):7745-50中所述的方法。

[0607] 为了比较目的，可以将来自患者的铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的水平与来自对照的铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的水平进行比较。根据具体情况，对照可以是源自已知对采用BMP6拮抗剂(例如，表1中描述的抗体7)的治疗反应良好的受试者(例如，贫血患者)，或已知对采用BMP6拮抗剂(例如，表1中描述的抗体7)的治疗反应不佳的受试者的铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的参考水平。对照表达水平可以源自参考受试者(即已知对采用BMP6拮抗剂(例如，表1中描述的抗体7)的治疗反应良好的贫血患者)，或已知对采用BMP6拮抗剂(例如，表1中描述的抗体7)的治疗反应不佳的受试者，或可以简单地是先前源自参考受试者的数值标准(例如，平均值、中值、范围、[+/-标准偏差])。在一些实施例中，对照是源自已知对采用BMP6拮抗剂的治疗反应不佳的受试者的铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的参考水平，并将来自患者的铁蛋白表达、铁蛋白蛋

白质或铁蛋白活性(根据具体情况)与该对照进行比较。在其他实施例中,对照是源自已知对采用BMP6拮抗剂的治疗反应良好的受试者的铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的参考水平,并将来自待治疗的患者的铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的水平与该对照进行比较,其中患者(相对于对照)中铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的相似(例如,统计学上相似)的水平提供了如下指示,即所述患者对采用BMP6拮抗剂(例如,表7中描述的抗体7)的治疗有反应的可能性增加。

[0608] 在执行本文所述的任何需要测定铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的存在或水平的方法时,可以通过查阅数据库来进行这种测定,所述数据库含有关于患者的组合物的足够信息以确定患者是否具有感兴趣的标志物(或标志物的水平)。优选地,数据储存库列出了个体中感兴趣的标志物和标志物的水平。数据库可以包括个人的患者记录、医疗数据卡、可由计算机或其他电子或非电子介质访问的文件(例如,平面ASCII文件),在该文件上可以存储适当的信息或基因数据。如本文所用,医疗数据卡是便携式存储设备,如磁性数据卡、具有有机载处理单元并且由供应商如德国慕尼黑西门子公司(Siemens of Munich Germany)销售的智能卡或闪存卡。如果数据库是计算机可访问的文件;这种文件可以位于各种介质上,包括:服务器、客户端、硬盘、CD、DVD、个人数字助理如智能手机、掌上电脑、磁带录音机、zip磁盘、计算机内部ROM(只读存储器)或互联网或万维网。用于存储计算机可访问的文件的其他介质对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0609] 通常,一旦确定铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的水平,就可以将结果告知医生或遗传咨询师或患者或其他研究人员。具体地,所述结果可以以可传输的信息形式传播,该信息可以传达或传输给其他研究人员或医生或遗传咨询师或患者。这种形式可以变化,并且可以是有形的或无形的。测试个体的结果可以呈现在描述性陈述、图表、照片、图表、图像或任何其他视觉形式中。例如,凝胶电泳或捕获测定的图像可用于解释结果。关于铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的水平的陈述也可用于表明测试结果。这些陈述和视觉形式可以记录在有形介质上,如纸、计算机可读介质(如软盘、光盘等),或者记录在无形介质上,例如电子邮件形式的电子介质或互联网或内联网上的网站。另外,结果还可以以声音形式记录,并通过任何合适的介质(例如模拟或数字电缆线路、光纤电缆等)经由电话、传真、无线移动电话、网络电话等传输。所有这种形式(有形和无形)都将构成“可传输形式的信息”。因此,可以在世界的任何地方产生关于测试结果的信息和数据并将其传输至不同的位置。因此,可传输形式的测试结果可以输入至美国。因此,本披露还包括用于产生含有个体中铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的水平的可传递形式的信息的方法。这种形式的信息可用于预测患有本文所述疾病(例如贫血)的患者与BMP6拮抗剂的反应性,用于基于该信息选择治疗过程,以及用于基于该信息选择性地治疗患者。

[0610] 本文披露了预测具有铁蛋白蛋白质水平的患者对采用BMP6拮抗剂的治疗有反应(例如,以相对于患有相同或相似疾病的一般患者群体增强的功效反应)的可能性的方法,包括检测来自患者的生物样品中铁蛋白的水平,其中本文所述的铁蛋白水平例如 $\leq 1500\text{ng/mL}$ 表明患者对采用BMP6拮抗剂的治疗有反应的可能性增加。

[0611] 在一些实施例中,所述方法还包括从所述患者获得生物样品的步骤,其中所述获得步骤在所述测定步骤之前进行。

[0612] 在一些实施例中,所述生物样品选自下组,该组由以下组成:滑液、血液、血清、粪

便、血浆、尿、泪液、唾液、脑脊液、白细胞样品和组织样品。在一些实施例中，生物样品是血液或血清。

[0613] 在一些实施例中，通过选自下组的技术检测铁蛋白表达、铁蛋白蛋白质或铁蛋白活性的存在和/或水平，该组由以下组成：免疫测定、免疫组织化学、ELISA、流式细胞术、蛋白质印迹、HPLC和质谱法。

[0614] 在披露的方法和用途的一些实施例中，BMP6拮抗剂是BMP6结合分子或BMP6受体结合分子。在一些实施例中，BMP6结合分子或BMP6受体结合分子是BMP6结合分子。在一些实施例中，BMP6结合分子是BMP6抗体或其抗原结合部分。

[0615] 在披露的方法和用途的一些实施例中，BMP6抗体是抗体7，例如如表1中所述。

[0616] 治疗方法和BMP6拮抗剂的用途

[0617] 所披露的方法允许临床医生为患有本文所述疾病的患者（例如贫血患者）提供个性化疗法，即，它们允许确定是否采用BMP6拮抗剂选择性地治疗患者（例如抗体7，例如如表1中所述）。以这种方式，临床医生可以使患有本文所述疾病（例如贫血）的整个患者群体中的益处最大化并使BMP6拮抗作用的风险最小化。应当理解，BMP6拮抗剂例如BMP6结合分子（例如BMP6抗体或其抗原结合部分，例如抗体7，例如如表1中所述）或BMP6受体结合分子（例如BMP6受体抗体或其抗原结合部分）可用于治疗、预防或改善本文所述的疾病，例如本文披露的贫血（例如，体征和症状等），特别是在具有本文所述的铁蛋白水平的患者中。

[0618] 实例

[0619] 提供以下实例以进一步说明本发明，但不限制其范围。本发明的其他变型对于本领域普通技术人员来说是容易清楚的，并且由所附权利要求涵盖。

[0620] 实例1-抗BMP6抗体的体外和体内活性和PK/PD

[0621] 材料

[0622] 测试化合物是在pH 7.0的50mM柠檬酸盐缓冲液，150mM NaCl中浓度为约8mg/ml的抗体5、6和7（表8），并且在动物给予前在PBS中稀释。使用雄性C56BL/6小鼠或Sprague Dawley大鼠（表9）。

[0623] 表8. BMP6拮抗剂抗体的特性

[0624]

抗体 ID	框架	KD(nM) BMP6	IC50(ug/ml) BMP6 报告基因
抗体 5	VH3_15, V11	0.1	0.06

[0625]

抗体 ID	框架	KD(nM) BMP6	IC50(ug/ml) BMP6 报告基因
抗体 6	VH3_15, V11	< 0.1	0.08
抗体 7	VH3_15, V11	0.1	0.07

[0626] 表9.动物特征

[0627]

物种	品系	类别	供应商	性别	年龄
小鼠(小家鼠)	C57BL/6	野生型	Jackson 实验室 (Jackson Laboratory), 巴尔港 (Bar Harbor), 缅因州 (ME)	雄性	8-9 周
大鼠(褐家鼠)	Sprague Dawley	野生型	Charles River 实验室 (Charles River Laboratory), 威明顿 (Wilmington), 马萨 诸塞州 (MA)	雄性	8-12 周

[0628] 对于BMP报告基因测定,构建了在启动子中含有BMP反应元件BRE的慢病毒载体 [Korchynskyi等人2002.J.Biol.Chem. [生物化学杂志]277:4882-91],从而驱动源自pGL4-BRE2-Luc2的萤火虫荧光素酶。慢病毒载体用于稳定转染HEP3B肝癌细胞系。将细胞系维持在含有10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素和5ug/ml杀稻瘟素的EMEM中。重组人BMP蛋白购自R&D Systems公司。

[0629] 在60ml瓶子中的流产布鲁氏菌环测试抗原(Brucella abortus Ring Test Antigen) (菌株1119-3) 购自爱荷华州艾姆斯的美国农业部动植物卫生检验处,国家兽医服务实验室。布鲁氏菌病环测试抗原含有在酚化缓冲液中杀死的染色的流产布鲁氏菌菌株1119-3细胞的悬浮液。每个60mL瓶子的浓度为约 $10^9$ 个颗粒/ml。以如下方式洗涤和制备 $5 \times 10^9$ 原液。首先,从冰箱中取出60ml瓶子并完全混合。然后将500ml的BA转移至500mL离心瓶中。然后使用超速离心机以10,000rpm离心15分钟。去除上清液并重悬于100mL PBS中,得到 $5 \times 10^9$ 个颗粒/ml原液,将其等分并在 $-80^\circ\text{C}$ 下冷冻。

[0630] 动物保养条件

[0631] 在驯化和研究期间,动物被社会性地圈养在微型隔离实底笼中。将动物在如下的标准光照循环下保持:12小时黑暗、12小时光照(开灯:6:30AM,关灯:6:30PM),其中室温为 $21^\circ\text{C}$ - $23^\circ\text{C}$ 且湿度为30%-70%。在驯化和研究期间,动物可随意(没有限制地)获取啮齿动物饮食和水。

[0632] 实验条件

[0633] BMP报告基因测定中抗体活性的测定

[0634] 在典型的测定中,将 $0.6 \times 10^4$ 个BRE-Luc2 HEP3B细胞接种在384孔板上的25u1基础培养基(但血清减少至2%)中。第二天,添加在PBS中稀释的抗体,然后加入BMP6至终浓度为10ng/ml。用不含任何血清的EMEM培养基使体积达到50u1,从而使最终血清浓度为1%。作

为相对的测定,平行进行采用BMP2/4/7的激活。根据制造商的说明,使用Envision酶标仪(珀金埃尔默公司(PerkinElmer)),在抗体加入后24小时进行BrighGlo测定(普洛麦格公司(Promega))。将数据计算为与通过对照抗体的完全报告基因激活相比每种抗体的抑制百分比。

[0635] 大鼠中单剂量抗体药代动力学研究

[0636] 大鼠PK分类研究并非旨在确定具有确定的统计可靠性的经典PK参数,而是提供测试抗体的血清半衰期的估计。向3只动物注射单次IV剂量的抗体。

[0637] 对于小鼠剂量反应PK/PD研究,将动物分成2个相同数量的单独群组。每个群组包含媒介剂和化合物处理的小鼠。在第2天、第4天分析一个群组,而在抗体注射后第6天、第8天分析第二群组。分群组的原因是减少连续出血的需要,使得对血清铁参数的影响保持最小。动物组示于表10。

[0638] 表10. 设计、动物分配和测试品剂量

[0639]

实验	组	数量	剂量 (mg/kg, IV)	频率
小鼠 PK/PD	对照 hIgG	5	0.5	一次
	0.05 mpk 抗体 6	5	0.05	一次
	0.1 mpk 抗体 6	5	0.1	一次
	0.5 mpk 抗体 6	5	0.5	一次
小鼠 BA 贫血	空白 (无 BA)	6	0	0
	BA, EPO+ 对照 hIgG	6	2	一次
	BA, EPO+抗体 5	6	2	一次
	BA, EPO+抗体 6	7	2	一次
	BA, EPO+抗体 7	6	2	一次

[0640] 建立小鼠炎症性贫血及治疗性处理

[0641] 以如下方式制备用于注射的 $5 \times 10^8$ 个BA颗粒(对于10只小鼠的实例)。起始浓度需为 $2.5 \times 10^9$ 个颗粒/ml,因为将注射 $200 \mu\text{l}$ /小鼠。用PBS稀释原液2倍。例如,需要10只小鼠乘以 $0.200 \mu\text{l} = 2\text{ml} + 20\%$ 过量 $= 2.2\text{mL}$ 的 $2.5 \times 10^9$ 个颗粒/ml。 $1.1\text{ml}$  BA原液+ $1.1\text{mL}$  PBS。在ESA治疗前1至8天BA给予显示出在6至7天后导致迟钝的HGB反应。

[0642] 向C57BL/6小鼠注射BA ( $3 \times 10^8$ 个颗粒/小鼠),并在5小时后通过ELISA (KMC0061, 生命技术公司 (Life Technologies)) 测量血清IL6水平以确定炎症反应。从研究中排除IL6浓度低于所有BA治疗的动物的平均值的95%置信区间的动物,从而导致一些组中少于5-6只小鼠。进行该排除过程以减小通过包括没有足够炎症以钝化ESA反应的动物而产生假阳性结果的概率。在排除过程后,相对于BA治疗,如所指示的在第6天给小鼠IV注射抗体,并且在第7天以100mg/kg给予EPO (100g/kg皮下达贝泊汀 $\alpha$ ,安进公司 (Amgen))。6天后测量对ESA和抗体疗法的反应。

[0643] 分析药代动力学、药效动力学和疗效终点

[0644] 对于小鼠和大鼠PK/PD研究,在抗体注射后的指定时间点收集血清样品。血清的等分试样用于通过自动化高通量免疫测定系统 (Gyros) 测定循环抗体浓度,其中生物素化的抗人IgG作为一级捕获抗体。每种样品的第二血清等分试样用于定量比色铁测定 (Quntichrom, DIFE-250, 博世生物技术公司 (Bioassay Systems))。按照前面描述的改进程序,处理第三等分试样用于大鼠或小鼠铁调素-25肽的LC-MS定量。Li等人2009. J. Pharm. Tox. Meth. [药物毒理学方法杂志] 59:171-80。

[0645] 对于BA诱导的贫血和抗体治疗研究,在通过心脏穿刺终止时获得EDTA涂覆的BD Microtainer管中的最终出血。全血用于XT-2000iV血液分析仪上的全血计数分析。疗效终点包括HGB、HCT、RETA和RET-HE。

[0646] 统计分析

[0647] 进行单向方差分析 (ANOVA), 然后进行Bonferroni事后检验,以分析血液学参数中的组差异 ( $p < 0.05$ 被认为是显著的)。数据报告为平均值  $\pm$  SEM。

[0648] 结果

[0649] BMP6拮抗剂抗体在细胞BMP依赖性转录测定中的生物活性

[0650] 所有三种BMP6拮抗剂抗体5、6和7均完全抑制重组人BMP6诱导的BMP报告基因 (BRE-luc) 活性在人肝癌细胞系Hep3B中的生物活性 (针对0.3nM rhBMP6的 $IC_{50} = 0.4nM$ ), 因此在1:1Ag/mAb摩尔比或更高摩尔比下具有活性。抗体显示出相对于相关BMP家族蛋白 (包括BMP2、5和7) 而言的良好选择性,具有500倍或更高的窗口。参见图1。

[0651] 大鼠中BMP6拮抗剂抗体的快照药代动力学和药效动力学曲线

[0652] 通过经jugular静脉导管以10mg/kg体重IV注射,在Sprague Dawley大鼠中对BMP6抗体5、6和7进行单剂量分类药代动力学研究。将三种抗体的血清中的总抗体浓度-时间关系 (特别是 $t_{1/2}$ , MRT) 与标准曲线进行比较,表明了与典型的人IgG一致的特征 (参见图2和表11)。没有证据表明靶介导的药物处置。在该剂量下,所有BMP6抗体在注射后第1天将血清铁调素抑制至低于检测水平。在第16天,铁调素表达的持续强烈抑制仍然明显,这表明活性持续时间长。相应地,在抗体注射后第2天观察到循环铁浓度的瞬时峰值升高,并且在第16天水平保持升高。

[0653] 在单次抗体注射后超时测量血清抗体浓度。在给药 (10mg/kg, IV) 后1hr、6hr、1天、2天、4天、8天、16天、28天收集样品。

[0654] 表11. 单剂量大鼠分类PK研究中的关键参数

[0655]

参数	抗体5	抗体6	抗体7
----	-----	-----	-----

T <sub>1/2</sub> (天)	9.1	7.8	9.2
C <sub>max</sub> (ug/ml)	140.7	189.0	146.2
平均停留时间(天)	8.6	7.0	6.9

[0656] 同样地,在指定时间单次IV注射抗体7后,在大鼠和食蟹猴中通过ELISA测量抗体7(游离的和BMP6结合的二者)的总血清浓度(在大鼠中,剂量为10、3、1、0.3、0.1和0.03mg/kg;在猴子中为3mg/kg),其中在大鼠中LLOQ为46ng/mL(虚线)且在猴子中LLOQ为0.2ug/mL(虚线)。结果示于图9(大鼠)和12(猴子)。

[0657] 在小鼠和食蟹猴中经BMP6抗体处理后血清铁参数的剂量依赖性反应

[0658] 为了进一步确定铁代谢对BMP6抗体治疗的剂量依赖性反应,给天然C57BL/6小鼠注射如所示范围为0.02至0.5mg/kg的增加剂量的抗体6。选择抗体6作为3种抗体的代表,因为它们具有相似的框架、啮齿动物PK谱和体外活性。0.5或0.1mg/kg的单剂量显著抑制血清铁调素并因此在治疗后2天增加血清铁浓度。然而,仅在0.5mg/kg下观察到在注射后8天对铁代谢的强烈持续影响。参见图3。这些结果表明,使用有效的BMP6拮抗剂抗体可以容易地实现剂量依赖性可饱和的靶中和。

[0659] 参见图3,BMP6抗体对铁代谢的血清生物标志物的剂量依赖性影响。上图:在单次IV注射指定剂量下的抗体6后血清hIgG浓度随时间的变化。下图:左图是单次抗体6或对照人IgG注射后血清铁调素浓度的定量分析,而右图是血清铁浓度。

[0660] 用抗体7进行类似的实验。在雄性Sprague-Dawley大鼠中测试抗体7对循环血清铁调素的剂量和时间依赖性抑制。在通过IV注射给予剂量范围为0.03mg/kg至10mg/kg的单剂量的抗体7后,在给药后0.25hr、1hr、2hr、6hr和1d、2d、4d、7d和14d收集血清样品。通过LC/MS测量血清铁调素水平,其中LLOQ=9ng/mL。在相同的动物中,还测量了血清铁水平。结果报告在图11中。

[0661] 这些结果表明,本发明的抗BMP6抗体能够引起血清铁的剂量依赖性增加。抗体给予后效果稳健且持续至少2周。

[0662] 还在食蟹猴中测试了对抗BMP6抗体有反应的血清铁参数的影响。向雄性食蟹猴给予剂量为3mg/kg的抗体7的单次静脉内注射。在注射后的指定天数,收集血清样品并分析总血清铁(Fe)和铁调素浓度。结果示于图13中。显示了来自3只个体动物的数据(相对于给药前基线水平绘制)。平均值由“x”线表示。在抗体给予后24hr观察到血清铁的增加和血清铁调素的抑制,并且在28天研究结束时效果保持(相对于给药前水平)。这些结果表明,本发明的BMP6抗体有效地诱导铁调素表达并降低非人灵长类动物中的循环铁浓度。

[0663] 在小鼠的炎症驱动的ESA抗性贫血中BMP6抗体对红细胞参数的影响

[0664] 进行实验以评估抗BMP6抗体在炎症性贫血的小鼠模型中的治疗效用。参见图4。6天后用流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)抗原(BA)治疗的小鼠出现贫血。用间隔一天开始抗BMP6以及抗体重组红细胞生成素(EPO)治疗贫血动物,并且在第13天监测抗体疗法相对于BA对贫血进展的影响。在治疗开始与第13天之间,HGB和HCT值降低,这对单独的EPO治疗具有抗性。组合的BMP6抗体和EPO治疗有效地恢复了EPO反应并显著提高了HGB和HCT水平。这种效果与红细胞生成素活性的伴随刺激有关,如RETA的持续增加以及恢复的网织红细胞血红蛋白含量所反映的,这表明了由于红细胞生成室中的功能性缺铁导致的血红素合成的校正。

[0665] 参见图4,在ESA抗性贫血的炎症小鼠模型中BMP6抗体的治疗性处理。上图:炎症模型的BA诱导的ESA抗性贫血的实验方案。下图:BA处理后第13天的红细胞生成参数。HGB:血红蛋白;HCT:血细胞比容;RETA:网织红细胞计数;RET-HE:网织红细胞血红蛋白当量。

[0666] 相对于BA+EPO+hIgG1,\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001,\*\*\*\*p<0.0001

[0667] 实例2-用于测试人体中BMP6抗体的临床计划临床试验计划:使用结合人BMP6的抗体或其抗原结合片段评估疗法。

[0668] 患有终末期肾病(ESRD)的患者产生很少(如果有的话)红细胞生成素(EPO)并且通常需要定期给予外源性EPO和静脉内(IV)输注铁以实现EPO诱导的Hgb合成。高达三分之一的慢性血液透析(HD)患者对EPO没有充分反应,这主要是由于铁的细胞内封存。铁调素主要通过肾脏清除,而通过透析清除是不够的。因此,慢性HD患者倾向于具有显著升高的铁调素水平,其阻断动员铁进行红细胞生成。一旦体内铁储存达到临界水平(由高血清铁蛋白水平指示),IV铁疗法不再有效或不推荐。目前的指南建议不要向具有高铁蛋白水平的贫血透析患者给予IV铁,因此这些患者可能接受甚至更高的EPO剂量,其具有潜在的EPO低反应性贫血的相关风险(2012年肾病改善全球预后(KDIGO)贫血工作组)。EPO低反应性贫血导致与血液透析(Kilpatrick等人2008、Lopez-Gomez等人2008,Fukuma等人2012)和腹膜透析患者(Suttorp等人2013)中贫血和较高EPO剂量均相关的全因死亡率风险显著增加。结合本披露的人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段可以通过改善血红蛋白(Hgb)水平同时减少EPO和IV铁剂量需求而使患有铁限制性贫血的慢性肾病患者受益。较低EPO抗性指数(EPO剂量与Hgb水平的比)与较低的死亡率风险相关。

[0669] 总之,使用结合本披露的人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段进行治疗的目的是动员封存铁,这随后可以减少EPO和铁剂量需求并改善Hgb水平,所有这些均预期改善患者的结果。这是使用结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段的首次人体单剂量研究。该研究将评估慢性血液透析患者群体中的安全性、耐受性、药代动力学、药效动力学和功效。本研究的目的是评估使用结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段的疗法是否有必要在与慢性肾病相关的贫血中进一步开发。

[0670] 调查计划

[0671] 研究设计

[0672] 这是对结合BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段的首次人体、两部分、单剂量、非验证性研究以评估在慢性血液透析患者群体中的安全性、耐受性、PK、PD和功效。第1部分是首次人体、单剂量、开放标签剂量发现研究。第2部分是随机、双盲、安慰剂对照的单剂量研究,其将比较结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段的两个剂量水平。

[0673] 安全性评估将包括身体检查、ECG、生命体征、标准临床实验室评估(血液学、血液化学、血清铁指数)不良事件和严重不良事件监测。

[0674] 第1部分

[0675] 第1部分的目的是(a)评估单剂量安全性、PK、PD和耐受性,以及(b)确定结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段的最小PAD,其被定义为导致在给药后29天Hgb增加(从基线变化中值为约0.5g/dL)的在第1部分中测试的最低剂量。

[0676] 在第1部分期间,将进行筛选访视,其中将确定患者是否有资格参与研究(图6)。符合条件的患者将被许可进入研究地点,并在基线访视期间重新评估资格标准。在给药前必

须获得所有基线安全性评估结果并进行评审。

[0677] 图6提供了第1部分的研究设计的概述。在第1天,要求患者在他们的常规透析访视之后直接到达研究地点。然后患者将接受结合人BMP6的抗体或其抗原结合片段(精确剂量将取决于群组)。如果可能的话,给药应优选在透析之间两天之前的透析日(例如星期五或星期六)进行,并且将在该日的透析期之后进行。然而,如果不可能的话,则给药可以不在透析之间两天之前的透析日进行。给药后,第1部分中的前两名患者将在家中居住至少48小时以进行安全性和PK/PD评估。患者将在第4天和第6天返回研究地点进行PK/PD评估,然后每周进行PK评估共29天,且进行安全性评估共12周,并在大约85天研究结束时访视。研究访视包括透析后PK评估以外的所有实验室检查,其应在患者预定的透析访视之前进行。

[0678] 第1部分将以预计不具有药理活性的剂量开始。将基于单剂量的结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段之后每群组Hgb变化中值,以及如统计注意事项部分所讨论和图7中所示的转铁蛋白饱和度(TSAT)水平,调整对于每个后续第1部分群组的剂量。该决策树的目的是确定诱导铁动员(如在给药后一周时6名患者群组中有至少4名患者被观察到的转铁蛋白饱和度(TSAT)水平 $>50\%$ 所示)和增加Hgb的最小可行剂量。如果给药后29天铁被动员但Hgb没有增加至少 $0.5\text{g/dL}$ ,则将分析临床数据以评估潜在的混杂因素(例如由于过度的非研究静脉切开术导致的失血)。适用的研究人员和赞助商的一个或多个代表将审查每个群组的不良事件,并将在(a)与慢性肾衰竭相关的已知医学问题和(b)非临床毒理学发现的背景下评估这些事件。在研究人员和赞助商表明可以安全进行之前,不会向后续群组给药。

[0679] 图7提供了用于第1部分中的剂量调整的算法。在透析前将进行包括Hgb测量在内的血液工作。起始剂量将为 $0.01\text{mg/kg}$ 。在第1部分中,患者将被分配到最多6个开放标签剂量群组中的一个,每个群组最多6名患者。如上定义的结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段的最小PAD将是选择用于第2部分的较低剂量组。每个后续群组的剂量可以调高或调低,如图7所示。如果最低可行剂量( $0.001\text{mg/kg}$ )导致Hgb的增加中值 $\geq 0.5\text{g/dL}$ ,则它将是选择用于第2部分的最小PAD和较低剂量,且第1部分中评估的下一个最高剂量将是第2部分的较高剂量组。如果在第1部分中评估的最高剂量( $0.1\text{mg/kg}$ )是最小PAD,则第2部分仅进行2组:安慰剂和最小PAD。如果在第1部分中需要另外的剂量群组,则将如本文所述添加这些群组。

[0680] 每个第1部分群组将包含6名患者。第1部分的第一群组中的前2名患者将至少间隔7天给药。随后的第1部分群组患者剂量的时间将在各自地点的时间表和支持资源的可行时进行。所有第1部分患者在给药后将被随访12周。

[0681] 第2部分

[0682] 第2部分的目的是(a)评估安全性、PK、PD和耐受性,以及(b)基于响应单剂量的结合人BMP6的抗体与安慰剂而产生的Hgb变化来确定功效。第2部分将包括最多三组:最多两个Ab剂量组和一个安慰剂组(图8)。两个Ab剂量组将源自第1部分中生成的数据。第2部分将包含约60名患者,三组的随机分组为1:1:1。如果在第1部分中,最小PAD也是评估的最高剂量( $0.1\text{mg/kg}$ ),则第2部分将只有两组:最小PAD和安慰剂。在这种情况下,将40名患者随机分成两组,随机比例为1:1。第2部分的样本量可以根据第1部分中Hgb从基线变化的可变性进行调整。

[0683] 图8提供了第2部分的研究设计。在第2部分期间,将进行筛选访视,其中将确定患者是否有资格参与研究。在基线访视期间,将根据资格标准重新评估符合条件的患者。在给药前必须获得所有基线安全性评估结果并进行评审。

[0684] 在第1天,要求患者在他们的常规透析访视之后直接到达研究地点。随后患者将接受Ab或安慰剂的输注,如通过随机分配所确定的。如果可能的话,给药应优选在透析之间两天之前的透析日(例如星期五或星期六)进行,并且将在该日的透析期之后进行。然而,如果不可能的话,则给药可以不在透析之间两天之前的透析日进行。患者将在第4天和第6天返回研究地点,然后每周进行随访评估。在随访期间,患者将接受常规安全性评估,并且还将在85天内收集PK数据。研究访视可以在患者预定的透析访视之后进行,以便符合患者的透析时间表。在Ab(或安慰剂)剂量后,所有参加第2部分的患者将被随访12周。

[0685] EPO剂量管理(两部分)

[0686] 两部分中的单独EPO剂量调整将根据每个透析部位的护理标准方案进行管理。现场方案将作为现场评估的一部分进行审查,并将检查是否符合护理标准指南(2012年KDIGO慢性肾病贫血工作组贫血的临床实践指南)。在研究期间的任何时间Hgb水平达到 $\geq 13\text{g/dL}$ 的患者可以由研究人员自行决定采用治疗性静脉切开术,以及用于管理高于目标水平的Hgb值的位点特异性指南管理进行管理。

[0687] 静脉铁管理(两部分)

[0688] 本研究不包括接受负荷剂量的IV铁(100mg/周)的患者。本研究可包括接受每周维持IV铁( $< 100\text{mg/周}$ )的患者。每周维持IV铁剂量将在Ab给药开始1周时进行。在Ab给药后的第一周内将监测铁指数,并且根据管理血液透析单元的方案,拯救铁疗法和维持IV铁管理将遵循护理标准指南。现场方案将作为现场评估的一部分进行审查,并将检查是否符合护理标准指南(2012年KDIGO慢性肾病贫血工作组贫血的临床实践指南)。

[0689] 研究设计的原理

[0690] 两部分研究设计的原理

[0691] 在同一患者群体中两个部分的原理是安全有效地鉴定最小PAD,目的是最小化暴露于潜在亚治疗剂量的患者和群组的数量。与安慰剂组相比,第2部分将评估最小PAD的疗效,以及高于最小PAD的一个剂量水平(如第1部分中所确定的)。

[0692] 第1部分被设计为评估单剂量安全性、耐受性、PK/PD以及开放标签研究中Ab的最小PAD。最小PAD将基于每个剂量群组在Ab给药后29天时的Hgb变化中值来确定。PAD测定标准的原理是在EPO剂量改变后,对EPO的临床上有意义的反应可能需要长达4周。如果Ab在目标群体中动员铁,则可以使患者当前的EPO剂量发挥更稳健的红细胞生成作用。PAD测定标准中列出的29天Hgb范围基于响应EPO剂量的Hgb的临床显著且安全的增加速率(29天内约 $0.5\text{g/dL}$ )。寻求最小PAD而不是最大作用的原理是,过度稳健的Hgb反应是该患者群体中的安全风险,如当前护理标准指南(2012年肾病改善全球预后(KDIGO)贫血工作组)中的目标Hgb范围所反映的。第1部分中安全性和耐受性评估的目标是(a)确定安全信号,和(b)告知剂量调整决策,从而确保第2部分选择的剂量(最小PAD+1个更高剂量)适合进一步评估相对于安慰剂的安全性和有效性。虽然第1部分没有足够的动力来提供公正的安全性评估,但第2部分中的安慰剂组和较大的样本量将能够在最小PAD和一个更高剂量下进行公正的安全性评估。除安全性、耐受性和PK/PD外,第2部分被设计为在双盲研究中评估相对于安慰剂的

功效。功效评估将主要基于Hgb,其中EPO抗性指数(ERI=每周体重调整的EPO剂量除以Hgb)作为关键的次要终点。ERI提供了实现给定Hgb值所需的EPO量的定量测量,因此除了单独的Hgb之外还提供临床上重要的信息。

[0693] 透析患者中FIH的原理

[0694] 这项首次人体(FIH)研究将在慢性血液透析(HD)患者而非健康志愿者(HV)中进行。由于以下几个原因,对HV中抗人BMP6Ab的安全性、耐受性和PK/PD反应的评估可能无法转移至慢性HD患者:

[0695] 与HV不同,具有贫血、高血清铁蛋白和低TSAT的慢性HD患者长期积累细胞内铁储存。因此,在慢性HD患者中最适合评估响应于低剂量Ab的与铁动员相关的安全性、耐受性和药理学作用。在具有正常肾功能的HV中,铁调素(其中BMP6是关键调节因子)被肾过滤并在尿中有效排泄,从而导致低循环水平。相比之下,铁调素通过透析不太有效且短暂地过滤,导致慢性HD患者的循环水平更高(Zaritsky等人2010)。此外,正常的肾将动态调整内源性EPO水平,并且响应于Ab的Hgb变化可能不明显。因此,在慢性HD患者中最适合评估与通过BMP6途径调节铁调素有关的安全性和耐受性以及Ab对Hgb的影响。

[0696] 目标患者群体的原理

[0697] 本研究被设计为评估EPO低反应性、铁限制性贫血的抗人BMP6Ab。已建立的临床指南(2012年KDIGO慢性肾病贫血工作组贫血的临床实践指南)将EPO低反应性定义为需要两次EPO剂量增加,以高于稳定剂量50%,从而维持稳定的Hgb浓度。拟议的资格标准被设计为选择稳定的慢性HD患者,其具有贫血和铁限制的临床指标:铁蛋白增加和低TSAT(TSAT=血清铁/总铁结合能力;TSAT与血清铁非常密切相关)。此外,EPO和IV铁剂量的调整将遵循Hgb、TSAT和铁蛋白的严格护理目标标准。这种设计降低了过度命中期望的Hgb目标的风险,因为铁和血液学参数的变化将继续根据护理标准进行管理。此外,将排除在基线前在1周内接受负荷剂量的IV铁的患者。可以包括接受维持IV铁的患者(如果满足所有其他资格标准)。包括这些患者的理由是,美国目前的护理标准规定Hgb和TSAT应保持在狭窄范围内,因此,为了满足较低的TSAT资格标准而完全停用维持性铁疗法会使患者面临TSAT低于25%的风险,从而需要根据标准护理进行IV铁负荷剂量的过程。然而,维持IV铁的合格患者将在Ab给药这周开始进行每周IV铁剂量,并且仅根据监测的铁指数通过现场的护理标准方案所确定的,继续维持性IV铁疗法。

[0698] 剂量/方案的原理,治疗持续时间

[0699] 起始剂量原理

[0700] 基于在大鼠和食蟹猴中进行的13周(14剂量)GLP毒理学研究的无不良作用水平(NOEL)计算最大推荐起始剂量(MRSD)。动物每周接受0.1、1、10和100mg/kg的IV推注剂量。在最后一剂的结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段后,随后在大鼠中对1和100mg/kg剂量组(仅)进行16周的随访或在食蟹猴中进行24周的随访。通过首先从这些研究中计算NOEL的人体当量剂量(HED)(0.1mg/kg)来估算MRSD,一种被认为适用于分子量>100kDa的药物的方法,并随后利用安全系数10解释了非临床物种与患者之间的差异,如储存的铁量和红细胞生成的需求。从IND启用毒理学研究期间收集的毒代动力学(TK)数据推断出非临床物种的PK参数。然后使用异速生长定标估算患者中相应的PK参数,并且这些参数用于自由预测作为在患者中给定剂量的时间的函数的结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片

段的浓度。将来自毒理学研究的TK数据与患者中基于模型的Ab PK进行比较,表明预测比NOAEL/HED低10倍的剂量产生基于Ab浓度的(最小)10倍边缘。

[0701] 在动物研究中观察到的响应于Ab的血清铁的最大水平可能低估了预测的人类对Ab的铁反应,因为已经给予IV铁疗法的HD患者可能具有比健康动物更高的铁组织储存。然而,与健康的非贫血动物不同,预计HD患者会利用释放的血清铁进行红细胞生成;因此,动物模型可能会高估铁升高的持续时间。在为期4周的研究中未观察到在为期13周的研究中所观察到的肝脏病理学,表明毒性归因于血清铁的累积暴露,而不是对急性铁释放的反应。

[0702] 为了解释非临床物种与患者之间储存铁的预期差异,还根据基于模型的血清铁浓度分析来预测MRSD。将导致毒理学发现的血清铁的累积暴露表示为曲线下的铁面积(Fe AUC)。在该方法中,对NOAEL剂量(0.1mg/kg)计算的Fe AUC被认为是足够安全的。然后预测患者中建议的MRSD下的Fe AUC,并与NOAEL下的非临床物种中的Fe AUC进行比较。由于患者中MRSD下模型预测的血清铁暴露比非临床物种中NOAEL下的血清铁暴露低 $>10$ 倍,因此认为通过安全系数10降低NOAEL/HED足以估算MRSD。因此,建议的MRSD为0.01mg/kg。

[0703] 剂量调整原理

[0704] 对于该研究,最大测试剂量( $x_{max}$ )将是对应于2种IND启动毒理学研究中每一种中的NOAEL的HED:0.1mg/kg。基于相容性研究,最小可行测试剂量( $x_{min}$ )是技术上可行的最低剂量:0.001mg/kg。MRSD( $x_0$ )将根据安全性、TSAT和Hgb标准进行评估(图7)。如果 $x_0$ 导致Hgb相对于给药前的变化中值 $<0.5$ g/dL,则将通过 $x_0$ 与 $x_{max}$ 之间的自然碱基对数标度(预期为S形剂量响应关系)上线性外推来指导 $x_+$ 的选择(图7)。上文提供了该剂量递增的临时剂量。这些临时剂量可根据每个群组之间非正式中期分析期间的数据审查进行调整。这种方法将持续直至最小PAD被识别或达到 $x_{max}$ 。如果 $x_{max}$ 导致Hgb变化中值 $<0.5$ g/dL,将评估该剂量的安全性,并基于安全性、PK和PD数据做出决定是否修改方案以在超过 $x_{max}$ 的剂量下加入另外的群组。如果在第1部分中测试的最高剂量导致Hgb增加中值 $<0.5$ g/dL,TSAT增加不超过50%,并且该剂量低于 $x_{max}$ ,则可以修改方案以加入另外的群组。

[0705] 相反,如果 $x_0$ 导致相对于给药前Hgb变化中值 $\geq 0.5$ g/dL,则将下一群组的剂量调整为 $x_{min}$ 。如果 $x_{min}$ 也导致Hgb变化中值 $\geq 0.5$ g/dL,则 $x_{min}$ 将被视为最小PAD,且 $x_{min}$ 和 $x_0$ 将在第2部分中评估。如果 $x_{min}$ 导致Hgb变化中值 $<0.5$ g/dL且TSAT变化中值 $\leq 50\%$ (图7),则在天然碱基对数标度的区间( $x_{min}, x_0$ )内通过线性外推法增加剂量,直至确定最小PAD或直至6个剂量(群组)已被评估。上文提供了区间( $x_{min}, x_0$ )内的临时剂量。这些临时剂量可根据每个群组之间非正式中期分析期间的数据审查进行调整。最小PAD将被定义为测试的最低剂量,其导致相对于给药前Hgb变化中值 $\geq 0.5$ g/dL。

[0706] Ab将作为单剂量IV输注给予,以确保血清铁暴露(Fe AUC)低于与非临床毒理学研究中的不良发现相关的血清铁暴露。在第1天的血液透析期后立即输注Ab溶液,以最小化透析对PK或立即给药后铁生物利用度的潜在影响。透析后(仅在给药日)另外约30分钟的给药输注预计不会对患者造成任何显著的风险或不适。

[0707] 选择比较物的原理

[0708] 安慰剂在第2部分中用作比较物,以实现临床结果的公正评估。

[0709] 中期分析/设计调整的目的和时间安排

[0710] 在第1部分中,在每个群组6名患者完成第4周给药后评估之后,将进行非正式中期

分析以对下一群组做出剂量调整决策。安全性和PD标志物将由剂量调整团队的所有成员进行审查,包括适用的研究人员和赞助商的一个或多个代表。只有在确认了安全性和耐受性的情况下,以及如图7所示满足PD条件的情况下才会开始新的群组。第1部分将进行最多5次非正式中期分析。在第1部分的最后一个群组的全部患者完成第4周给药后评估后,计划进行正式中期分析以评估所调查剂量的临床效果,并且该正式中期分析可能引发另外的非临床研究,并可能告知随后的临床研究。在第1部分进行的最后一个群组的29天收集的体温、血压、脉搏率、ECG评估、血液化学、血液学铁指数、EPO抗性指数和不良事件将包括在内。

[0711] 第2部分将选择最小PAD和比最小PAD高一级的剂量。如果最低的可能测试剂量导致Hgb增加 $\geq 0.5\text{g/dL}$ ,则测试的两个最低剂量将被选择用于第2部分。

[0712] 风险和益处

[0713] 参与本研究的患者的潜在益处可能包括减少EPO和IV铁需求,以及在治疗时间期间和超过一段时间后改善的Hgb水平。

[0714] 通过遵循资格标准,以及在给予Ab后的前48小时内对所有患者(以及第1部分中的前两名患者的住院)进行密切的临床监测,将使该试验中患者的风险最小化。

[0715] 与铁动员相关的潜在风险包括(a)铁重新分布到组织和器官如脾、肝、心脏、胰腺和垂体,和(b)对于细菌感染的易感性少量增加,特别是具有留置血管导管的患者。一些资格标准降低了并发症的风险。可以观察到肝功能测试水平的增加与铁再分布有关。肝功能将与血液学和铁参数同时进行监测。超过护理标准Hgb目标可能导致红细胞增多。可以进行Hgb、EPO疗法和铁疗法的管理。

[0716] 已经给予IV铁疗法的HD患者可能比健康动物具有更高的铁组织储存;因此,在用结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段治疗的患者中观察到的血清铁的最大水平可能超过动物研究中所见的水平。然而,与健康的动物不同,预计HD患者会利用释放的血清铁进行红细胞生成;因此,动物模型可能会高估铁升高的持续时间。在非临床研究中,模型预测的暴露于MRSD下的Ab(例如,C<sub>max</sub>,AUC)预期比在NOAEL下观察到的暴露低10倍。在临床前研究中观察到,这种暴露预计不会导致与肝转氨酶升高和肝中单细胞坏死相关的血清铁暴露(AUC)水平。在描述的安全性评估之后,将Ab剂量逐步上升至NOAEL。关于患有慢性铁超负荷的患者以及接受肠胃外铁的患者临床经验可能不一定预测由Ab诱导的细胞内铁的急剧增加可能产生的影响。因此,Ab诱导的急性铁毒性的潜在风险可能很低。急性铁毒性可能影响心脏、肝和/或胰腺。急性铁毒性的临床表现可能包括心脏传导缺陷、肝转氨酶升高和葡萄糖耐受不良/高血糖。严重的急性铁毒性还可能包括代谢性酸中毒、电解质异常和神经系统临床表现。在发生急性铁毒性的情况下,可以用铁螯合疗法(如去铁胺)与血液透析组合对患者进行紧急治疗。计划在115天的时间内从每位患者收集最多134mL(第1部分)和172mL(第2部分)血液作为研究的一部分。除此之外,还将提供用于监测任何安全性发现的其他样品。这不被视为针对该群体的风险。

[0717] 迄今为止,尚未对抗人BMP6抗体进行生殖毒性研究。在食蟹猴的13周毒性研究中,已经通过对卵巢和睾丸及辅助生殖器官的仔细标准组织病理学检查评估了对雄性或雌性生殖器官的潜在影响。没有观察到与治疗相关的影响。BMP6敲除小鼠显示出延迟的胸骨骨化和铁超负荷(Meynard等人2009)。

[0718] 显著的胎儿和孕产妇发病率和死亡率与慢性血液透析有关。在一项回顾性群组研

究中,将慢性血液透析女性(267名分娩)与接受肾移植的女性(264名分娩)进行比较,血液透析女性显示出高比率的胎盘早剥、输血、小于胎龄儿、胎儿死亡和孕产妇死亡(Saliem等人2015)。因此,具有生育潜力的女性应该使用高效避孕措施,以防止在结合人BMP6的分离的抗体或其抗原结合片段给予期间以及最后一次给药后125天内的怀孕。

[0719] 群体

[0720] 研究群体将由终末期肾病患者组成,这些患者需要每周至少两次慢性血液透析治疗,并且具有临床证据表明存在功能性缺铁性贫血,其在存在明显足够的铁储存(如通过铁蛋白和转铁蛋白饱和水平所确定的)的情况下定义为贫血。第1部分包括最初在6个群组中评估多达36名患者的计划(6名患者/群组)。如果在6个群组之后,没有观察到对TSAT和Hgb的影响,并且不存在安全性问题(如由适用的研究人员和赞助商的一个或多个代表所确定的),可以加入多达2个另外的6名患者群组(在第1部分中总计48名患者)。第2部分由多达3组组成(从第1部分选择2个剂量水平进行进一步评估,以及安慰剂组),其中每组多达约20名患者(第2部分共计60名患者)。因此,计划招募总计约96名患者(最多108名),其中约60名将随机分组在第2部分中。预计约60名患者(第1部分中12名,第2部分中48名)完成该研究。研究人员必须确保所有考虑进行研究的患者符合以下资格标准。研究人员不应采用另外的标准,以使研究群体能够代表所有符合条件的患者。

[0721] 经由检查通过筛选时的所有资格标准和第一基线来建立患者选择。资格标准的相关记录(例如清单)必须与研究现场的源文件一起存储。

[0722] 偏离任何参与标准都将患者排除参加该研究。

[0723] 入选标准(两部分)

[0724] 有资格入选本研究的患者必须满足以下所有标准:

[0725] 在进行任何评估之前,必须获得书面知情同意书。如果不能以书面形式表达同意,则必须正式记录并见证,最好通过独立的受信任的证人筛选时年龄 $\geq 18$ 岁。

[0726] 筛选前依赖血液透析至少2个月。

[0727] 每周接受至少2次针对终末期肾病的充分血液透析;在筛选前的最近一次月度评估中,充分被定义为 $Kt/V \geq 1.2$ 。

[0728] 根据透析部位的贫血管理方案,接受慢性红细胞生成素(EPO)治疗。在基线前在14天内EPO剂量没有增加50%或更多。EPO疗法必须是单独短效制剂(不是达贝泊汀)并且IV(不是SC)给予。

[0729]  $Hgb \geq 8.5$ ,包括 $Hgb \geq 8.5$ 且 $< 11.5$ g/dL,并且在基线时与之前的14天相比没有增加 $\geq 0.5$ g/dL。

[0730] 基线前持续至少28天的铁蛋白 $< 1500$ ng/mL(含端点)(可包括筛选)。可替代地,筛选时铁蛋白 $> 500$ ng/mL且 $\leq 1000$ ng/mL。

[0731] 在基线前在90天内的至少一个时间点处 $TSAT \leq 30\%$ ,且在基线处 $TSAT \leq 30\%$ 。

[0732] 排除标准(两部分)

[0733] 符合任何以下标准的患者不具有入选本研究的资格。研究人员不可采用另外的排除标准,以确保研究群体能够代表所有符合条件的患者。

[0734] 1. 在登记的5个半衰期内或在预期的药效动力学作用恢复到基线以前使用其他研究药物,以较长者为准。

- [0735] 2. 对研究药物或治疗性抗体有过敏史。
- [0736] 3. 已知诊断为血色病。
- [0737] 4. 已知骨髓恶性肿瘤、淋巴恶性肿瘤或骨髓增生异常综合征。
- [0738] 5. 在筛选前2个月内AV瘘血栓形成病史,或在筛选前6个月内发生2次或更多次AV瘘血栓形成。
- [0739] 6. 严重的共病肝病/功能障碍 (Child-Pugh得分 $\geq 6$ ) 或先前的肝移植7. 心力衰竭 (纽约心脏协会 (NYHA) 功能性III级或IV级)
- [0740] 8. 在过去2个月内出现需要干预的消化道出血。如果符合所有其他肝功能资格标准,则可包括患有丙型肝炎病毒 (HCV) 感染的患者。
- [0741] 9. 在基线前在4周内ALT、AST或胆红素 $\geq 1.5 \times$  ULN。
- [0742] 10. 在筛选时确定为完整PTH $\geq 750$ pg/mL的不受控制的肾性骨营养不良。
- [0743] 11. 易于使严重感染风险增加的病况,如留置血管导管 (中心静脉管或血液透析导管) 或在筛选前2周内任何时间需要抗生素治疗的活动性感染。
- [0744] 12. 在基线前在4周内进行输血。
- [0745] 13. 在基线前在1周内接受负荷剂量 (100mg/周) IV铁。
- [0746] 14. 在给药前在12个月内药物或酒精滥用史,或通过筛选期间进行的实验室检测所表明的这种滥用的证据。
- [0747] 15. 阳性乙型肝炎表面抗原检测结果。
- [0748] 16. 免疫缺陷病史,包括HIV阳性 (ELISA和蛋白质印迹) 检测结果。
- [0749] 17. 如果使用高效避孕措施,育龄女性可以在使用结合人BMP6的抗体或抗原结合片段给药后至少125天内参加本研究。高效避孕措施被定义为以下之一:a. 完全禁欲 (当这符合患者的优选和通常的生活方式时。周期性禁欲 (例如,日历、排卵、症状、排卵后方法) 和戒断是不可接受的避孕方法) b. 男/女绝育 c. 使用口服、注射或植入的激素避孕方法或放置宫内节育器 (IUD) 或宫内节育系统 (IUS) 或具有类似功效的其他形式的激素避孕措施 (失败率 $< 1\%$ ), 例如激素阴道环或透皮激素避孕措施。
- [0750] 治疗
- [0751] 研究性治疗
- [0752] 该研究中的研究性治疗是结合人BMP6的抗体或抗原结合片段,例如抗BMP6IgG1、完全人抗体。抗体以液体溶液提供。根据待给予的剂量,将原液浓度在现场稀释。在约30分钟时,输注时间将在群组之间保持相对恒定。与匹配的安慰剂 (媒介对照) 相比,第1部分是开放标签单剂量且第2部分是双盲、单剂量。抗人BMP6Ab活性物质和安慰剂将作为液体提供在小瓶中。活性物质和安慰剂中的赋形剂是相同的。
- [0753] 治疗组
- [0754] 在第1部分中,患者将被分配到最多6个剂量群组中的一个,每个群组由6名患者组成。第1部分是开放标签治疗。起始剂量、最高剂量和剂量调整原理如上所述。第1部分的临时剂量在表12 (MRSD下Hgb $< 0.5$ g/dL) 和表13 (MRSD下Hgb $\geq 0.5$ g/dL) 中给出。
- [0755] 表12: 第1部分的临时剂量水平

**对于在 MRSD 剂量 临时剂量  
水平下 Hgb 小于  
0.5 g/dL**

**与先前剂量相比的  
增量**

	临时剂量	与先前剂量相比的增量
	1 (MRSD)	起始剂量
[0756]	2	60% ↑
	3	60% ↑
	4	60% ↑
	5	60% ↑
	6 (NOAEL)	60% ↑

[0757] 该表旨在作为第1部分剂量调整的实例,仅供参考。可以使用中等或更高剂量水平,并且可以基于每个群组之间的非正式中期分析期间的数据评估来跳过一些剂量水平。实际剂量水平将由诺华公司 (Novartis) 以书面形式确认,并在新群组中的患者治疗前提供给所有参与的研究地点。

[0758] 表13:第1部分的临时剂量水平

**对于在 MRSD 剂量 临时剂量  
水平下 Hgb 大于或  
等于 0.5 g/dL**

**与先前剂量相比的  
增量**

	临时剂量	与先前剂量相比的增量
	1 (MRSD)	起始剂量
[0759]	2	90% ↓
	3	60% ↑
	4	60% ↑
	5	60% ↑
	6	60% ↑

[0760] 该表旨在作为第1部分剂量调整的实例,仅供参考。可以使用中等或更高剂量水平,并且可以基于每个群组之间的非正式中期分析期间的数据评估来跳过一些剂量水平。

[0761] 研究治疗被定义为:

[0762] • A: 单剂量安慰剂。

[0763] • B: 最小PAD下单剂量的抗人BMP6Ab,如第1部分所确定。

[0764] • C: 高于最小PAD一个剂量水平的单剂量的抗人BMP6抗体,如第1部分所确定。

[0765] 伴随治疗

[0766] 在研究开始前和研究期间在入选标准中规定的时间范围内给予或服用的所有处方药、非处方药和重要的非药物治疗法 (包括物理疗法和输血) 必须记录在CRF的伴随药物/重

要的非药物治疗部分中。药物条目应仅限于商品名、单剂量和单位、给予频率和途径、开始和停药日期以及治疗原因。

[0767] 功效/药效动力学

[0768] 功效评估如下所述。将在不同时间点收集用于功效评估的样品。将评估血液学实验室。Hgb和Fe指数将在每个群组间非正式中期分析中作为研究第1部分期间剂量调整评估的一部分进行审查。如果最初设置的样品收集时间对于理解铁与PK之间的关系而言被认为是次优的,则样品收集时间可以在第1部分的后续群组中进行更改。

[0769] 铁指数组

[0770] 预计抗人BMP6Ab会从体内储存动员Fe,导致血清Fe参数发生变化,包括:血清铁、转铁蛋白饱和度(TSAT)、未结合铁结合能力(UIBC)、总铁结合能力(TIBC)、铁蛋白和网织红细胞血红蛋白含量(ChR)。这些将使用经验证的测定在血清中测量。

[0771] 安全性

[0772] 安全性评估如下所述。

[0773] 体检

[0774] 完整的体检包括检查一般外貌、皮肤、颈部(包括甲状腺)、眼睛、耳朵、鼻子、喉咙、肺、心脏、腹部、背部、淋巴结、四肢、血管和神经系统。如果根据病史和/或症状指示,可以进行直肠、外生殖器、乳房和/或骨盆检查。

[0775] 在开始研究药物之前存在的重要发现必须包括在患者eCRF的相关病史/当前医疗条件屏幕中。在研究药物开始后符合不良事件定义的重要发现必须记录在患者eCRF的不良事件屏幕上。

[0776] 生命体征

[0777] • 体温

[0778] • 血压(BP)

[0779] • 脉搏

[0780] 身高和体重

[0781] • 身高

[0782] • 体重

[0783] • 计算体重指数(BMI) (体重(kg) / [身高(m)]<sup>2</sup>)

[0784] 实验室评估

[0785] 将评估实验室测试结果的临床相关偏差以确定不良事件的标准,并且如果符合标准则进行报告。重复评估是强制性的,直到结果标准化或直到变化不再具有临床相关性。

[0786] 血液学

[0787] 将测量血红蛋白、血细胞比容、红细胞计数、具有不同血小板计数的白细胞计数。将监测铁指数。

[0788] 临床化学

[0789] 将监测钠、钾、肌酸酐、尿素、氯化物、白蛋白、钙、碱性磷酸酶、总胆红素、LDH、GGT、AST和ALT。如果总胆红素浓度增加到正常上限的1.5倍以上,则应区分直接和间接反应胆红素。

[0790] 心电图(ECG)

- [0791] PR间隔、QRS持续时间、心率、RR、QT、QTc
- [0792] 应使用Fridericia QT校正公式(QTcF)进行临床决策。
- [0793] 怀孕和生育能力评估
- [0794] 无论报告的生殖/绝经状态如何,所有女性患者都需要进行妊娠试验。
- [0795] 本研究将进行血清妊娠试验。如果呈阳性,则患者必须停止试验。
- [0796] 当在筛选和基线处进行时,患者在给药之前必须接收该测试的结果。
- [0797] 药代动力学
- [0798] 将收集PK样品。PK数据将在每个群组间非正式中期分析中作为研究第1部分期间剂量调整评估的一部分进行审查。如果最初设定的样品采集时间被认为不足以或不适合表征PK谱,则样品收集时间可能在随后的群组中更改。抽血次数和收集的总血量不会超过方案中规定的数量。
- [0799] 将在所有剂量水平下的所有患者中收集和评估PK样品。
- [0800] 使用ELISA测定法测定游离抗人BMP6Ab的浓度。预期的定量下限(LLoQ)为10pg/mL。
- [0801] 未治疗(安慰剂)样品将不会被分析。
- [0802] 游离的抗人BMP6Ab浓度将以 $\mu\text{g/mL}$ 表示。低于LLoQ的所有浓度或缺失的数据将在浓度数据列表中如此标记。低于LLoQ的浓度将仅在浓度数据的汇总统计中被视为零。在计算PK参数时不会考虑它们。
- [0803] 在测定游离抗人BMP6Ab后剩余的PK样品可用于探索性评估或其他生物分析目的(例如,不同位点之间的交叉检查、稳定性评估)。
- [0804] 使用Phoenix WinNonlin(6.2版或更高版本)的一种或多种非隔室方法确定以下药代动力学参数(如果可行的话): $C_{\text{max}}$ 、 $t_{\text{max}}$ 、 $\text{AUC}(0-t)$ 、 $\text{AUC}(0-t_{\text{last}})$ 、 $C_{\text{max}}/D$ 和基于血清浓度-时间数据的 $\text{AUC}/D$ 。线性梯形法则将用于 $\text{AUC}$ 计算。如果可行的话,还将基于所述数据估计结合人BMP6的抗体或抗原结合片段的终末半衰期( $t_{1/2}$ )。
- [0805] 其他评估
- [0806] 免疫原性
- [0807] ELISA测定将用于检测抗人BMP6抗体。免疫原性分析后剩余的IG样品可用于探索性评估或其他生物分析目的(例如,不同部位之间的交叉检查)。
- [0808] 探索性评估
- [0809] 生物标志物是客观测量和评估的正常生物过程、致病过程或对治疗干预的药理学反应的指标(生物标志物定义工作组2001)。
- [0810] BMP6铁调素途径如下:肝细胞中的BMP6信号传导是诱导铁调素表达、抑制肠细胞铁吸收和巨噬细胞铁输出所必需的。BMP6中和抗体作为铁调素降低疗法应通过降低EPO需求和增加达到目标Hgb水平的患者数量而使铁限制性贫血患者受益。
- [0811] 基于上述生物学,探索性生物标志物评估包括但不限于铁调素(使用LC-MS测定法测量)。
- [0812] 另外的探索性评估可以研究骨吸收标志物的潜在作用,以及将炎症作为促成作用机制的因素。
- [0813] 探索目标如下:

- [0814] • 评估铁调素水平与ERI和铁指数等几项关键指标之间的关系;
- [0815] • 纵向研究主要和次要终点与探索性生物标志物之间的动力学;
- [0816] • 评估药物遗传学;
- [0817] • 评估免疫原性
- [0818] 将在不同时间点收集一种或多种样品。
- [0819] 有关样品采集、编号、处理和装运的更多详细信息将在中央实验室手册中提供。
- [0820] DNA
- [0821] 探索性DNA研究计划作为本研究的一部分,旨在确定遗传因素,所述遗传因素可能(1)与患有功能性缺铁性贫血的红细胞生成素治疗的慢性血液透析患者相关,(2)预测对抗人BMP6Ab治疗的反应,或(3)预测副作用的遗传易感性。
- [0822] 此外,基因分型技术的最新进展使得全基因组方法成为可能。如上所述,也可以在这些研究的限制范围内进行全基因组方法。
- [0823] 可溶性生物标志物
- [0824] 铁调素将在血浆中定量为潜在的PD/生物标志物。
- [0825] 生物分析数据报告中将包括测定的详细描述。
- [0826] 其他生物标志物
- [0827] 无假设平台可用于理解疾病异质性、作用模式和/或分层标志物的潜在识别。将在不同时间点收集免疫原性(IG)样品。通过测量识别抗人BMP6抗体的抗体来评估抗人BMP6Ab的免疫原性。
- [0828] 参考文献
- [0829] Fukuma S,Yamaguchi T,Hashimoto S et al(2012)Erythropoiesis-stimulating agent responsiveness and mortality in hemodialysis patients: results from a cohort study from the dialysis registry in Japan.Am J Kidney Dis;59(1):p.108-16.
- [0830] Kilpatrick RD,Critchlow CW,Fishbane S et al(2008)Greater epoetin alfa responsiveness is associated with improved survival in hemodialysis patients.Clin J Am Soc Nephrol;2008.3(4):1077-83.
- [0831] Lopez-Gomez JM,Portoles JM,and Aljama P(2008),Factors that condition the response to erythropoietin in patients on hemodialysis and their relation to mortality.Kidney Int Suppl;(111):S75-81.
- [0832] Meynard D,Kautz L,Darnaud V et al(2009)Lack of the bone morphogenetic protein BMP6induces massive iron overload.Nat Genet;41(4):478-81.
- [0833] Saliem S,Patenaude V,Abenhaim HA(2015)Pregnancy outcomes among renal transplant recipients and patients with end-stage renal disease on dialysis.J Perinat Med(Epub ahead of print)<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25719292>.
- [0834] Suttorp MM,Hoekstra T,Rotmans JI et al(2013)Erythropoiesis-stimulating agent resistance and mortality in hemodialysis and peritoneal dialysis patients.BMC Nephrol;14(1):200.
- [0835] Zaritsky J,Young B,Gales B,et al(2010)Reduction of serum hepcidin by

hemodialysis in pediatric and adult patients. Clin J Am Soc Nephrol;5(6):1010-14.

[0836] 实例3:用0.01mg/kg抗体7治疗的患者的TSAT水平

[0837] 根据实例2中描述的临床方案评估治疗的前10名患者的数据,包括TSAT(铁饱和度,%)水平,其中每名患者接受0.01mg/kg抗体7的单次输注。这些患者均未显示出任何肝脏安全性信号,所述肝脏安全性信号定义了未观察到的不良反应水平(NOAEL)为0.1mg/kg/周。群组1包括5名低铁蛋白水平低于或等于500ng/mL的贫血血液透析患者,而群组2包括更高铁蛋白水平(500至1000ng/mL)的5名贫血血液透析患者。

[0838] 在接受0.01mg/kg抗体7的五个群组1(低铁蛋白)患者中,给药后TSAT水平平均仅增加9.8%(给药后平均38.6%对给药前24.8%)。相比之下,在接受0.01mg/kg抗体7的五个群组2(高铁蛋白)患者中,给药后TSAT水平平均增加17.6%(给药后平均48.4%对给药前30.8%)。数据示于图14中,其显示了抗体7给予前的TSAT水平峰值与2个群组中抗体7给予后72小时内的TSAT水平峰值。令人惊讶的是,与群组1患者相比,群组2贫血患者显示出与基线相比明显的TSAT增加。这些数据表明,铁蛋白水平大于或等于500ng/mL的患者是对抗BMP6疗法有反应的良好候选者,并且该铁蛋白水平例如铁蛋白水平大于或等于500ng/mL可能是反应的指示。

[0839] 除非另外定义,在此使用的技术和科学术语具有与熟悉本披露所属领域的技术人员通常理解的相同含义。

[0840] 除非另外指明,没有详细地具体描述的所有方法、步骤、技术和操作可以并且已经按照本身已知的方式进行,这应是技术人员所清楚的。再次对例如在此提及的标准手册和普通背景技术和其中引用的另外的参考文献进行引用。除非另外指明,在此引用的每个参考文献都通过引用以其全文而结合。

[0841] 本发明的权利要求是非限制性的并且提供于下文中。

[0842] 尽管在此已经详细披露了具体方面和权利要求,但是这仅是出于说明的目的以举例方式来进行的,并且这并不旨在对所附权利要求的范围或任何相应的未来申请的权利要求主题的范围加以限制。具体而言,诸位发明人考虑到,在不脱离如由权利要求定义的本披露的精神和范围的情况下,可以对本披露进行多种替代、改变和修饰。核酸起始材料、感兴趣的克隆或文库类型的选择被认为对于具有在此所述方面的知识的本领域普通技术人员而言是常规的。其他方面、优点和修饰被认为落入下列权利要求的范围内。使用不超过常规的实验,本领域的普通技术人员应认识到或能够确认在此所述的本发明的具体方面的很多等效物。此类等效物旨在为下列权利要求所涵盖。在今后提交的相应申请中重写权利要求的范围可能是由于不同国家专利法的限制,而不应当被理解为放弃权利要求的主题。

## 序列表

<110> 诺华股份有限公司 (NOVARTIS AG)  
 <120> 使用骨形态发生蛋白 6 (BMP6) 的抑制剂治疗疾病的方法  
 <130> PAT057354-WO-PCT  
 <140>  
 <141>  
 <150> 62/350,257  
 <151> 2016-06-15  
 <160> 99  
 <170> PatentIn 3.5 版  
 <210> 1  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 1  
 Arg Ser Ser Glu Asn Ile Tyr Arg Asn Leu Ala  
 1                    5                    10  
 <210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 2  
 Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp  
 1                    5  
 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 3  
 Gln Gly Ile Trp Gly Thr Pro Leu Thr  
 1                    5  
 <210> 4

[0001]

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 4  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Asn Ile Tyr Arg Asn  
                   20                   25                   30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                   40                   45  
 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                   55                   60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Ile Trp Gly Thr Pro Leu  
                   85                   90                   95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                   105

[0002]

<210> 5  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 5  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Asn Ile Tyr Arg Asn  
                   20                   25                   30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                   40                   45  
 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                   55                   60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Ile Trp Gly Thr Pro Leu  
                   85                   90                   95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

[0003]

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala Met His

1 5 10

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 7

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys

1 5 10 15

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 8  
 Arg Pro Phe Gly Asn Ala Met Asp Ile  
 1                   5  
 <210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 9  
 Ser Tyr Val Val His  
 1                   5  
 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 [0004] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 10  
 Arg Ile Lys Asp His Lys Gln Gly Tyr Thr Thr Ala Tyr Ala Ala Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Val Lys Gly  
 <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 11  
 Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn  
 1                   5                   10  
 <210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 12  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 1                   5  
 <210> 13  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 13  
 Lys Asp His Lys Gln Gly Tyr Thr  
 1                   5  
 <210> 14  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 [0005] <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 14  
 Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn  
 1                   5                   10  
 <210> 15  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 15  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35	40	45	
	Gly Arg Ile Lys Asp His Lys Gln Gly Tyr Thr Thr Ala Tyr Ala Ala			
	50	55	60	
	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr			
	65	70	75	80
	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
		85	90	95
	Tyr Cys Ala Arg Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn Trp Gly			
	100	105	110	
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		
	<210> 16			
	<211> 363			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<221> 来源			
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成多核苷酸"			
	<400> 16			
[0006]	caggtgcaat tgggtgaaag cggcgggtggc ctggtgaaac caggcggcag cctgcgcctg			60
	agctgcgcgcg cctccggatt caccttttct tcttacgttg ttcattgggt gcgccaggcc			120
	ccgggcaaag gtctcgagtg ggtgggccgt atcaaagacc acaaacaggg ctacactact			180
	gcttatgceg cctctgtgaa aggccgcttt accattagcc gcgatgattc gaaaaacacc			240
	ctgtatctgc aatgaacag cctgaaaacc gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt			300
	gttgaacgtt ctaaattcgg tttcgataac tggggccaag gcaccctggt gactgttagc			360
	tca			363
	<210> 17			
	<211> 451			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<221> 来源			
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"			
	<400> 17			
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
	1 5 10 15			
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
	20 25 30			
	Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35 40 45			
	Gly Arg Ile Lys Asp His Lys Gln Gly Tyr Thr Thr Ala Tyr Ala Ala			



	405	410	415	
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	420	425	430	
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	435	440	445	
	Pro Gly Lys			
	450			
	<210> 18			
	<211> 1353			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<221> 来源			
	<223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"			
	<400> 18			
	caggtgcaat tgggtgaaag cggcgggtggc ctggtgaaac caggcggcag cctgcgcctg			60
	agctgcgccg cctccgatt caccttttct tcttacgttg ttcattgggt gcgccaggcc			120
	ccgggcaaag gtctcgagtg ggtgggcccgt atcaaagacc acaaacaggg ctacactact			180
	gcttatgccg cctctgtgaa aggccgcttt accattagcc gcgatgatc gaaaaacacc			240
[0008]	ctgtatctgc aatgaacag cctgaaaacc gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt			300
	gttgaacgtt ctaaatectgg tttcgataac tggggccaag gcacctgggt gactgttagc			360
	tcagctcca ccaagggtcc atcggttctt cccctggcac cctctccaa gagcacctct			420
	gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg			480
	tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc			540
	tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag			600
	acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag			660
	cccaaattct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg			720
	ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc			780
	cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac			840
	tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac			900
	aacagcacgt accgggtggt cagcgtctct accgtcctgc accaggactg gctgaatggc			960
	aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc			1020
	tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag			1080
	gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac			1140
	atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc			1200
	gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg			1260
	tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgc caaccactac			1320
	acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa			1353
	<210> 19			
	<211> 14			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			

[0009]

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 19  
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Ser Val His  
 1                   5                   10  
 <210> 20  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 20  
 Gly Ser Ser Glu Arg Pro Ser  
 1                   5  
 <210> 21  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 21  
 Gln Ser Trp Asp Ser Ser Gln Thr Leu Val Val  
 1                   5                   10  
 <210> 22  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 22  
 Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 23  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列



<213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"  
 <400> 26  
 cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgtg agcgggtgcac cgggccagcg cgtgaccatt 60  
 agctgtaccg gcagcagcag caacattggt gctggttact ctgtgcattg gtaccagcag 120  
 ctgccgggca cggcgccgaa actgctgac tatggtagct ctgaacgcc gagcggcgtg 180  
 ccggatcgct ttagcggatc caaaagcggc accagcgcga gcctggcgat taccggcctg 240  
 caagcagaag acgaagcggg ttattactgc cagtcttggg actcttctca gactctggtt 300  
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc cta 333

<210> 27  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 27

[0011]

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
 20 25 30  
 Tyr Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Gly Ser Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Ser Ser  
 85 90 95  
 Gln Thr Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 165 170 175  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

```

                180                185                190
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
                195                200                205
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
                210                215
<210> 28
<211> 651
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成
        多核苷酸"
<400> 28
cagagcgtgc tgacccagcc gccgagcgtg agcgggtgcac cgggccagcg cgtgaccatt      60
agctgtaccg gcagcagcag caacattggt gctggttact ctgtgcattg gtaccagcag      120
ctgccgggca cggcgccgaa actgctgacg tatggtagct ctgaacgccc gagcggcgtg      180
ccggatcgct ttagcggatc caaaagcggc accagcgcca gcctggcgat taccggcctg      240
caagcagaag acgaagcggg ttattactgc cagtcttggg actcttctca gactctggtt      300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc      360
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      420
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc      480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc      540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc      600
acgcatgaag ggagcacctg ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a      651
<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成
        肽"
<400> 29
Ser Tyr Val Val His
1                5
<210> 30
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成
        肽"

```

<400> 30  
 Arg Ile Lys Arg Glu Ser Ser Ser Tyr Thr Thr Met Tyr Ala Ala Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Val Lys Gly

<210> 31  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 肽"

<400> 31  
 Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn  
 1                   5                   10

<210> 32  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 肽"

[0013]

<400> 32  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 1                   5  
 <210> 33  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 肽"

<400> 33  
 Lys Arg Glu Ser Ser Ser Tyr Thr  
 1                   5  
 <210> 34  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源

[0014]

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 34

Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn  
1                    5                    10

<210> 35

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 35

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Arg Glu Ser Ser Ser Tyr Thr Thr Met Tyr Ala Ala  
                  50                    55                    60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn Trp Gly  
                  100                    105                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                  115                    120

<210> 36

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"

<400> 36

caggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtcaagc ctggcggtag cctgagactg            60  
agctgcgctg ctagtggtctt caccttctct agctacgtgg tgcactgggt cagacaggcc            120  
cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacgg attaagagag agtcctctag ctacactact            180  
atgtacgccg ctcccgtgaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc            240  
ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg ccgctacta ctgcgctaga            300

gtggaacggt ctaagtcagg cttcgataac tggggtcagg gcaccctggt caccgtgtct 360  
 agc 363  
 <210> 37  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成  
 肽"  
 <400> 37  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Lys Arg Glu Ser Ser Ser Tyr Thr Thr Met Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 [0015] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

[0016]

Pro Gly Lys  
450

<210> 38

<211> 1353

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"

<400> 38

caggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtcaagc ctggcggtag cctgagactg	60
agctgcgctg ctagtggcct cacccttctct agctacgtgg tgcaactgggt cagacaggcc	120
cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacgg attaagagag agtctcttag ctacactact	180
atgtacgccg ctcccgtgaa gggcccgttc actatctcta gggacgactc taagaacacc	240
ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg cegtctacta ctgcgctaga	300
gtggaacggt ctaagtcagg cttcgataac tggggtcagg gcaccctgggt caccgtgtct	360
agcgctagca ctaagggcc aagtgtgttt cccttgccc ccagcagcaa gtctacttcc	420
ggcggaactg ctgcctggg ttgcctgggt aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg	480
tcctggaact ctggggctct gacttccggc gtgcacacct tccccccgt gctgcagagc	540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgcctt ccagctctct gggaaccag	600

acctatatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660  
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagctccaga actgctggga 720  
 gggccttccg tgttctctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 780  
 cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg acccagaggt gaagttcaac 840  
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac 900  
 aacagcacct acaggggtgtt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960  
 aaagaataca agtgcaaagt ctccaacaag gccctgccag cccaatcga aaagacaatc 1020  
 agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag 1080  
 gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgat 1140  
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac ccccccca 1200  
 gtgtcggaca gcgacggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg 1260  
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcage gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320  
 acccagaagt ccctgagcct gagccccggc aag 1353

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 39

[0017]

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Ser Val His

1 5 10

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 40

Gly Gln Ser Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 41





Leu Ile Tyr Gly Gln Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Ser Ser  
 85 90 95  
 Gln Thr Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125  
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 165 170 175  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 180 185 190  
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 195 200 205  
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

[0020]

210 215

- <210> 48
- <211> 651
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> 来源
- <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"

<400> 48  
 cagtcagtcc tgactcagcc ccctagcgtc agcggcgctc ccggtcagag agtgactatt 60  
 agctgcaccg gctctagctc taatateggc gctggctata gcgtgcaactg gtatcagcag 120  
 ctgcccggca ccgccctaa gctgctgac tacggtcagt cagagcggcc tagcggcgtg 180  
 cccgataggt ttagcggctc taagttaggc actagcgtc gtctggetat caccggcctg 240  
 caggctgagg acgaggccga ctactactgt cagtctggg actctagtca gaccctgggtg 300  
 gtgttcggcg gaggcactaa gctgaccgtg ctgggtcagc ctaaggetgc cccagcgtg 360  
 accctgttcc cccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccacct ggtgtgcctg 420  
 atcagcgact tctaccagc gcgctgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg 480  
 aaggccggcg tggagaccac caccgccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc 540  
 agctacctga gcctgacccc cgagcagtg aagagccaca ggtcctacag ctgccaggtg 600  
 acccagcagg gcagcaccgt ggaaaagacc gtggcccca cagagtcag c 651

<210> 49

<211> 5

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 49  
 Ser Tyr Val Val His  
 1                   5  
 <210> 50  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 50  
 Arg Thr Arg His Ser Asp Met Gly Tyr Ala Thr Ser Tyr Ala Ala Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Val Lys Gly

[0021]

<210> 51  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 51  
 Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn  
 1                   5                   10  
 <210> 52  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 52  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 1                   5

<210> 53  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 53  
 Arg His Ser Asp Met Gly Tyr Ala  
 1                   5  
 <210> 54  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 54  
 Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn  
 1                   5                   10  
 [0022]  
 <210> 55  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 55  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
           35                   40                   45  
 Gly Arg Thr Arg His Ser Asp Met Gly Tyr Ala Thr Ser Tyr Ala Ala  
   50                   55                   60  
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                   90                   95  
 Tyr Cys Ala Arg Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn Trp Gly

	100	105	110	
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		
	<210> 56			
	<211> 363			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<221> 来源			
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成多核苷酸"			
	<400> 56			
	cagggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggccaagc ctggcggtag cctgagactg		60	
	agctgcgctg ctagtggctt caccttctct agctacgtgg tgcactgggt cagacaggcc		120	
	cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacgg actagacact cagatatggg ctacgctact		180	
	agctacgccg ctcccgtgaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc		240	
	ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg cegtctacta ctgcgctaga		300	
	gtggaacggt ctaagtcagg cttcgataac tggggtcagg gcaccctggt caccgtgtct		360	
	agc		363	
	<210> 57			
	<211> 451			
	<212> PRT			
[0023]	<213> 人工序列			
	<220>			
	<221> 来源			
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"			
	<400> 57			
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
	1 5 10 15			
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
	20 25 30			
	Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35 40 45			
	Gly Arg Thr Arg His Ser Asp Met Gly Tyr Ala Thr Ser Tyr Ala Ala			
	50 55 60			
	Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr			
	65 70 75 80			
	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
	85 90 95			
	Tyr Cys Ala Arg Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn Trp Gly			
	100 105 110			
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
	115 120 125			

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 58  
 <211> 1353

<212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成多核苷酸"  
 <400> 58  
 caggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtcaagc ctggcggtag cctgagactg 60  
 agctgcgctg ctagtggctt caccttctct agctacgtgg tgcaactgggt cagacaggcc 120  
 cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacgg actagacact cagatatggg ctacgtact 180  
 agctacgccg ctcccgtgaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240  
 ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg cegtctacta ctgcgctaga 300  
 gtggaacggg ctaagtcagg ctctgataac tggggtcagg gcaccctggg caccgtgtct 360  
 agcgctagca ctaagggccc aagtgtgttt ccctggccc ccagcagcaa gtctacttcc 420  
 ggcggaactg ctgccctggg ttgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg 480  
 tcttggaaact ctggggctct gacttccggc gtgcacacct tccccccgt gctgcagagc 540  
 agcgccctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccct ccagctctct gggaaccag 600  
 acctatatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660  
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc cagctccaga actgctggga 720  
 gggccttccg tgttctctgt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 780  
 cccgaggtga cctgcgtggg ggtggacgtg tcccacgagg acccagaggt gaagttcaac 840  
 [0025] tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggagcagtac 900  
 aacagcacct acaggtgtgt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960  
 aaagaataca agtgcaaagt ctccaacaag gccctgccag ccccaatcga aaagacaatc 1020  
 agcaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag 1080  
 gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta ccccagcagat 1140  
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca 1200  
 gtgtgggaca gcgacggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg 1260  
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320  
 acccagaagt ccctgagcct gagccccggc aag 1353  
 <210> 59  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 59  
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Ser Val His  
 1 5 10  
 <210> 60  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> 人工序列  
<220>  
<221> 来源  
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
<400> 60  
Gly Gln Ser Glu Arg Pro Ser  
1                   5  
<210> 61  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<221> 来源  
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
<400> 61  
Gln Ser Trp Asp Ser Ser Gln Thr Leu Val Val  
1                   5                   10  
<210> 62  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<221> 来源  
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
<400> 62  
Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Ser  
1                   5                   10  
<210> 63  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<221> 来源  
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
<400> 63  
Gly Gln Ser  
1  
<210> 64  
<211> 8  
<212> PRT

[0026]

<213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 64  
 Trp Asp Ser Ser Gln Thr Leu Val  
 1 5  
 <210> 65  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 65  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
 20 25 30  
 Tyr Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Gly Gln Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Ser Ser  
 85 90 95  
 Gln Thr Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110  
 <210> 66  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成多核苷酸"  
 <400> 66  
 cagtcagtcc tgactcagcc ccctagcgtc agcggcgcctc ccggtcagag agtgactatt 60  
 agctgcaccg gctctagctc taatatcggc gctggctata gcgtgcactg gtatcagcag 120  
 ctgcccggca ccgccctaa gctgctgac tacggtcagt cagagcggcc tagcggcgtg 180  
 cccgataggt ttagcggctc taagtcaggc actagcgccta gtctggctat caccggcctg 240



<221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"  
 <400> 68  
 cagtcagtcc tgactcagcc ccctagcgtc agcggcgctc ccggtcagag agtgactatt 60  
 agctgcaccg gctctagctc taatateggc gctggctata gcgtgcactg gtatcagcag 120  
 ctgcccggca cgcgccctaa gctgctgac tacggctcagt cagagcggcc tagcggcgtg 180  
 cccgataggt ttagcggctc taagtcaggc actagcgtc gtctggetat caccggcctg 240  
 caggctgagg acgaggccga ctactactgt cagtctctggg actctagtca gaccctgggtg 300  
 gtgttcggcg gaggcaactaa gctgaccgtg ctgggtcagc ctaaggetgc ccccgagctg 360  
 accctgttcc cccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg 420  
 atcagegact tctaccagc cgcctgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg 480  
 aaggccggcg tggagaccac cacccccagc aagcagagca acaacaagta cgcggccagc 540  
 agctacctga gcctgacccc cgagcagtg aagagccaca ggtcctacag ctgccaggtg 600  
 acccagcagg gcagcaccgt ggaaaagacc gtggcccca ccgagtgcag c 651  
 <210> 69  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 69  
 Ser Tyr Val Val His  
 1 5  
 <210> 70  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 70  
 Arg Ile Arg Leu Glu Thr His Gly Tyr Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Val Lys Gly  
 <210> 71  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>

[0029]

<221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 71  
 Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn  
 1                    5                    10  
 <210> 72  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 72  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 1                    5  
 <210> 73  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 [0030] <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 73  
 Arg Leu Glu Thr His Gly Tyr Ala  
 1                    5  
 <210> 74  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"  
 <400> 74  
 Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn  
 1                    5                    10  
 <210> 75  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>



<400> 77  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Gly Arg Ile Arg Leu Glu Thr His Gly Tyr Ala Ala Glu Tyr Ala Ala  
                   50                   55                   60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                   90                   95  
 Tyr Cys Ala Arg Val Glu Arg Ser Lys Ser Gly Phe Asp Asn Trp Gly  
                   100                   105                   110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                   115                   120                   125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
                   130                   135                   140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145                   150                   155                   160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 [0032]                   165                   170                   175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
                   180                   185                   190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
                   195                   200                   205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
                   210                   215                   220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                   245                   250                   255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                   260                   265                   270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                   275                   280                   285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
                   290                   295                   300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305                   310                   315                   320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
                   325                   330                   335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val



gtgctggaca gcgacggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagtccagg 1260  
 tggcagcagg gcaacgtggt cagctgcagc gtgatgcaagc aggccctgca caaccactac 1320  
 acccagaagt ccctgagcct gagccccggc aag 1353  
 <210> 79  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 肽"  
 <400> 79  
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Ser Val His  
 1 5 10  
 <210> 80  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 肽"  
 [0034] <400> 80  
 Gly Gln Ser Glu Arg Pro Ser  
 1 5  
 <210> 81  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 肽"  
 <400> 81  
 Gln Ser Trp Asp Ser Ser Gln Thr Leu Val Val  
 1 5 10  
 <210> 82  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 肽"

<400> 82  
 Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Ser  
 1                    5                    10  
 <210> 83  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
       肽"  
 <400> 83  
 Gly Gln Ser  
 1  
 <210> 84  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
       肽"  
 [0035] <400> 84  
 Trp Asp Ser Ser Gln Thr Leu Val  
 1                    5  
 <210> 85  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
       肽"  
 <400> 85  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
                   20                    25                    30  
 Tyr Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
                   35                    40                    45  
 Leu Ile Tyr Gly Gln Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
                   50                    55                    60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu  
 65                    70                    75                    80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Ser Ser  
 85 90 95  
 Gln Thr Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 86  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 多核苷酸"  
 <400> 86

cagtcagtc tgactcagcc ccctagcgtc agcggcgtc ccggtcagag agtgactatt 60  
 agctgcaccg gctctagctc taatatcggc gctggctata gcgtgcactg gtatcagcag 120  
 ctgcccggca ccgccctaa getgctgac tacggtcagt cagagcggcc tagcggcgtg 180  
 cccgataggt ttagcggctc taagtcaggc actagcgtc gtctggctat caccggcctg 240  
 caggctgagg acgaggccga ctactactgt cagtctctggg actctagtca gaccctggtg 300  
 gtgttcggcg gaggcactaa gctgaccgtg ctg 333

<210> 87  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 肽"  
 <400> 87

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
 20 25 30  
 Tyr Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Gly Gln Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Ser Ser  
 85 90 95  
 Gln Thr Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125

[0036]

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 130 135 140  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 165 170 175  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 180 185 190  
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 195 200 205  
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 210 215

<210> 88  
 <211> 651  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"

[0037]

<400> 88  
 cagtcagtc tgactcagcc ccctagcgtc agcggcgctc ccggtcagag agtgactatt 60  
 agctgcaccg gctctagctc taatatcggc gctggctata gcgtgactg gtatcagcag 120  
 ctgcccggca ccgcccctaa gctgctgac tacggctcagt cagagcggcc tagcggcgtg 180  
 cccgataggt ttagcggctc taagtcaggc actagcgtc gtctggctat caccggcctg 240  
 caggctgagg acgaggccga ctactactgt cagtctctggg actctagtca gaccctgggtg 300  
 gtgttcggcg gaggcactaa gctgaccgtg ctgggtcagc ctaaggctgc cccagcgtg 360  
 accctgttcc cccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg 420  
 atcagcgact tctaccagc gcgctgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg 480  
 aaggccggcg tggagaccac cccccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc 540  
 agctacctga gcctgacccc cgagcagtg aagagccaca ggtcctacag ctgccaggtg 600  
 acccagcagg gcagcaccgt ggaaaagacc gtggcccca ccgagtgcag c 651

<210> 89  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 89

Ser Ala Ser Ser Arg Arg Arg Gln Gln Ser Arg Asn Arg Ser Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Asp Val Ala Arg Val Ser Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Ser Ser  
 20 25 30  
 Glu Leu Lys Thr Ala Cys Arg Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln  
 35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Asn Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn  
 65 70 75 80  
 Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro  
 85 90 95  
 Glu Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile  
 100 105 110  
 Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr  
 115 120 125  
 Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His  
 130 135

<210> 90

<211> 139

<212> PRT

<213> 智人

<400> 90

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys  
 1 5 10 15  
 Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg  
 35 40 45  
 Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn  
 65 70 75 80  
 Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro  
 85 90 95  
 Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile  
 100 105 110  
 Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr  
 115 120 125  
 Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His  
 130 135

[0038]

<210> 91

<211> 138

<212> PRT

<213> 智人

<400> 91

Ala Ala Asn Lys Arg Lys Asn Gln Asn Arg Asn Lys Ser Ser Ser His  
 1 5 10 15  
 Gln Asp Ser Ser Arg Met Ser Ser Val Gly Asp Tyr Asn Thr Ser Glu  
 20 25 30

Gln Lys Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp  
 35 40 45  
 Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Phe  
 50 55 60  
 Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Phe Pro Asp  
 85 90 95  
 His Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser  
 100 105 110

Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg  
 115 120 125  
 Asn Met Val Val Arg Ser Cys Gly Cys His  
 130 135

<210> 92

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

[0039]

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Arg Pro Phe Gly Asn Ala Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 93

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 93  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                   40                   45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Arg Pro Phe Gly Asn Ala Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                   105                   110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
                   115                   120                   125  
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 [0040]                   130                   135                   140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145                   150                   155                   160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
                   165                   170                   175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
                   180                   185                   190  
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
                   195                   200                   205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
                   210                   215                   220  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225                   230                   235                   240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
                   245                   250                   255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
                   260                   265                   270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
                   275                   280                   285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
                   290                   295                   300  
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305                    310                    315                    320  
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
                          325                    330                    335  
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
                          340                    345                    350  
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
                          355                    360                    365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
                          370                    375                    380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385                    390                    395                    400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
                          405                    410                    415  
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
                          420                    425                    430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
                          435                    440

[0041]

<210> 94  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 94  
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Arg Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 95  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"  
 <400> 95  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
                          20                    25                    30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                          35                    40                    45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Arg Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Arg Pro Phe Gly Asn Ala Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 96  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成  
 肽"  
 <400> 96  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Arg Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Arg Pro Phe Gly Asn Ala Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

[0042]

	195		200		205
	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys				
	210		215		220
	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu				
	225		230		235
	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu				
		245		250	255
	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln				
		260		265	270
	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys				
	275		280		285
	Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu				
	290		295		300
	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys				
	305		310		315
	Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys				
		325		330	335
	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser				
		340		345	350
	Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys				
	355		360		365
[0043]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln				
	370		375		380
	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly				
	385		390		395
	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln				
		405		410	415
	Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn				
		420		425	430
	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly				
	435		440		
	<210> 97				
	<211> 6				
	<212> PRT				
	<213> 人工序列				
	<220>				
	<221> 来源				
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成				
	6xHis 标记"				
	<400> 97				
	His His His His His His				
	1		5		
	<210> 98				
	<211> 15				

<212> PRT  
<213> 智人  
<400> 98  
Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys Pro  
1                    5                    10                    15  
[0044] <210> 99  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 智人  
<400> 99  
Val Ser Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Ser Ser Glu Leu Lys  
1                    5                    10

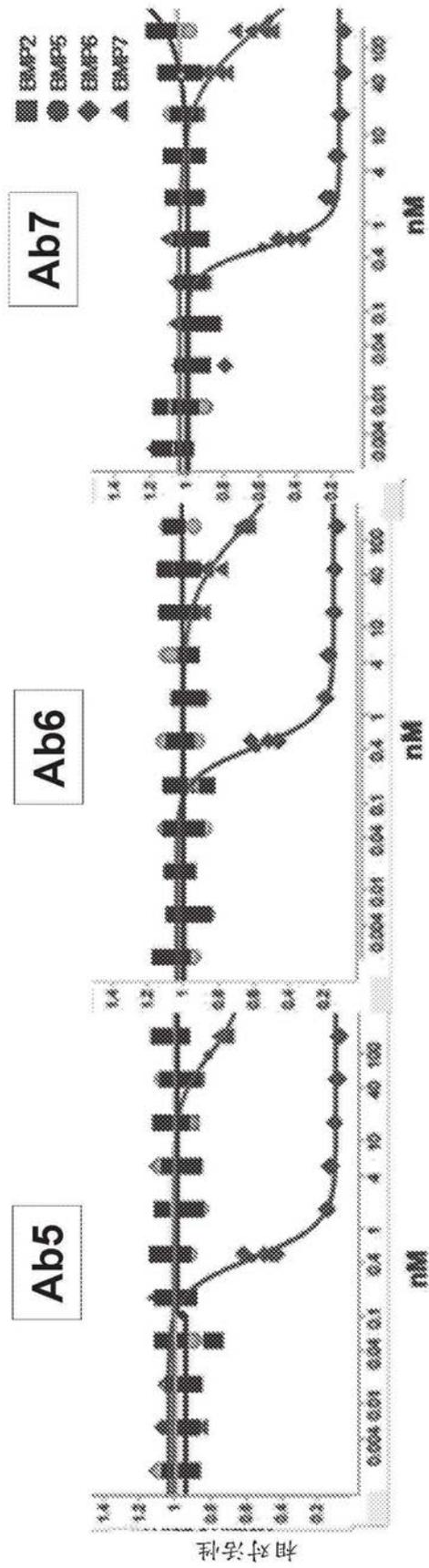


图1A

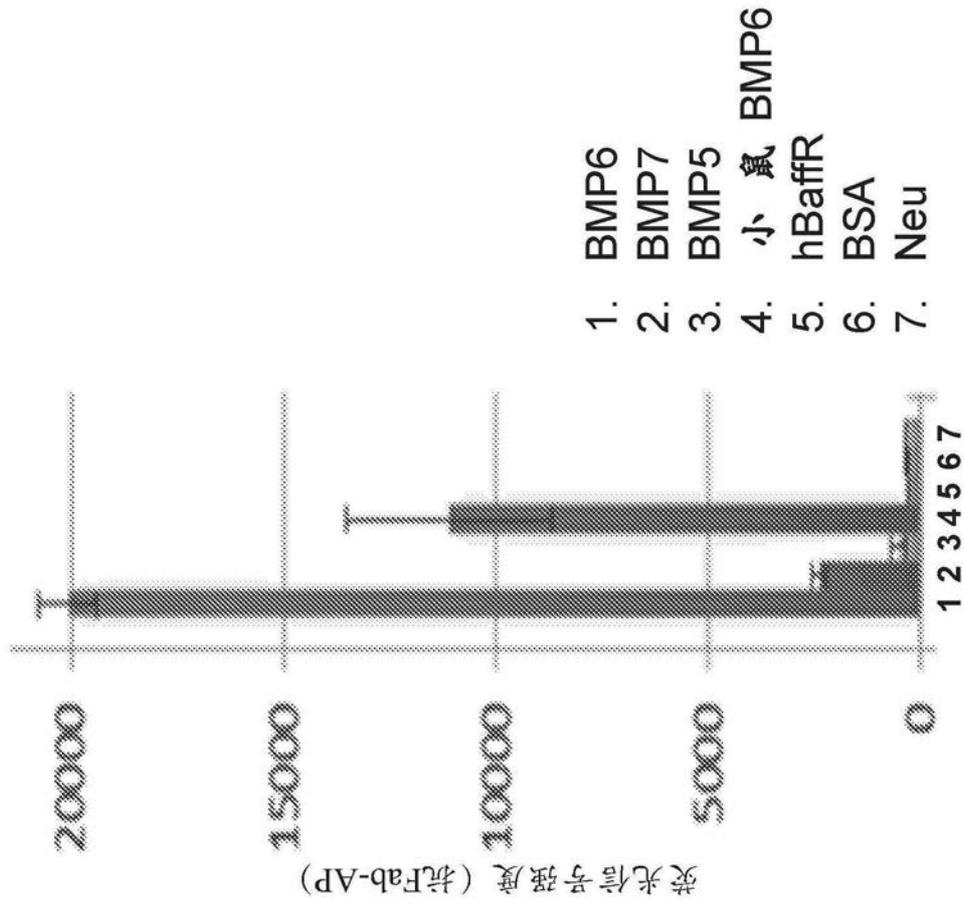
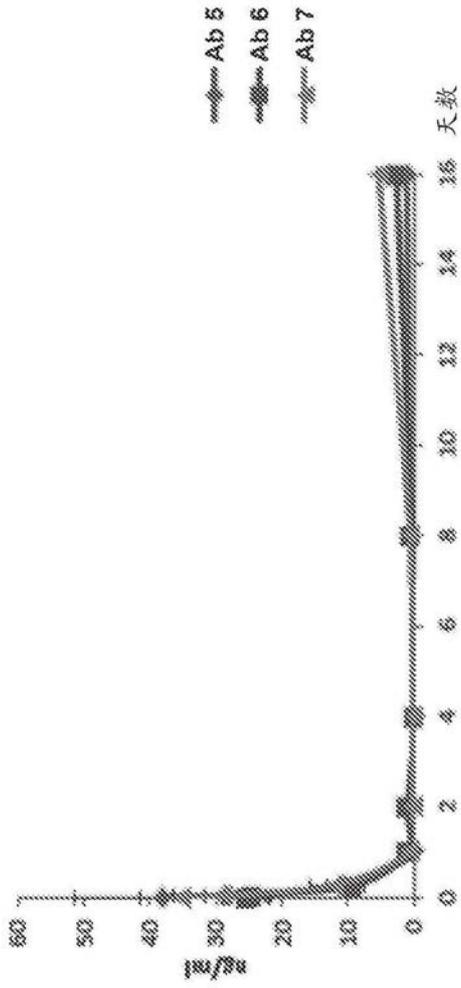


图1B

血清铁调素



血清铁

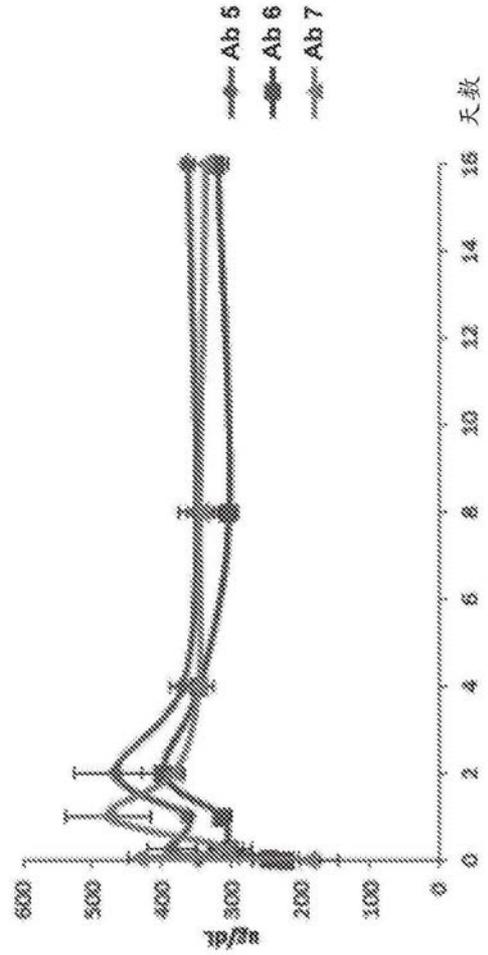


图2

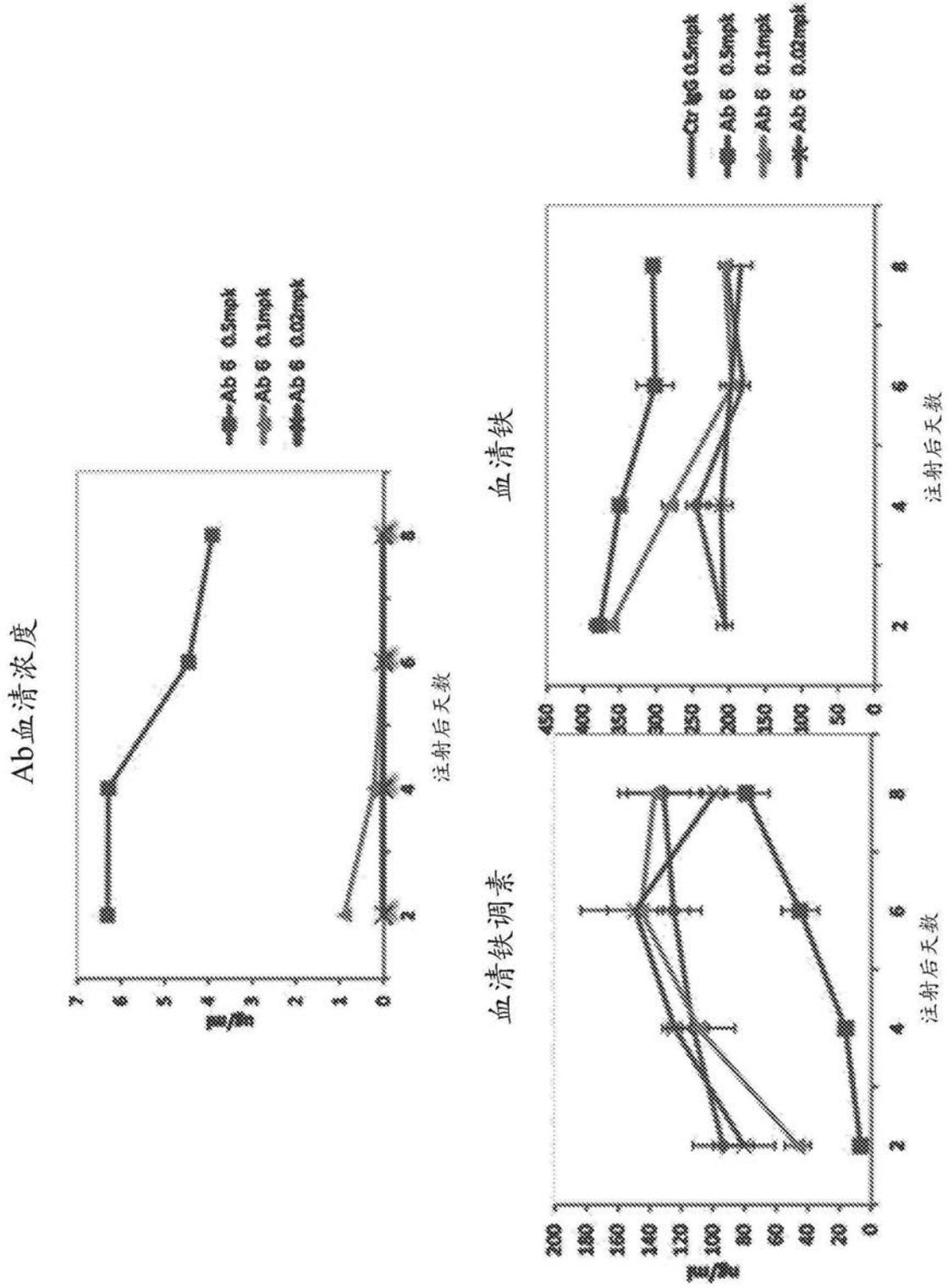


图3

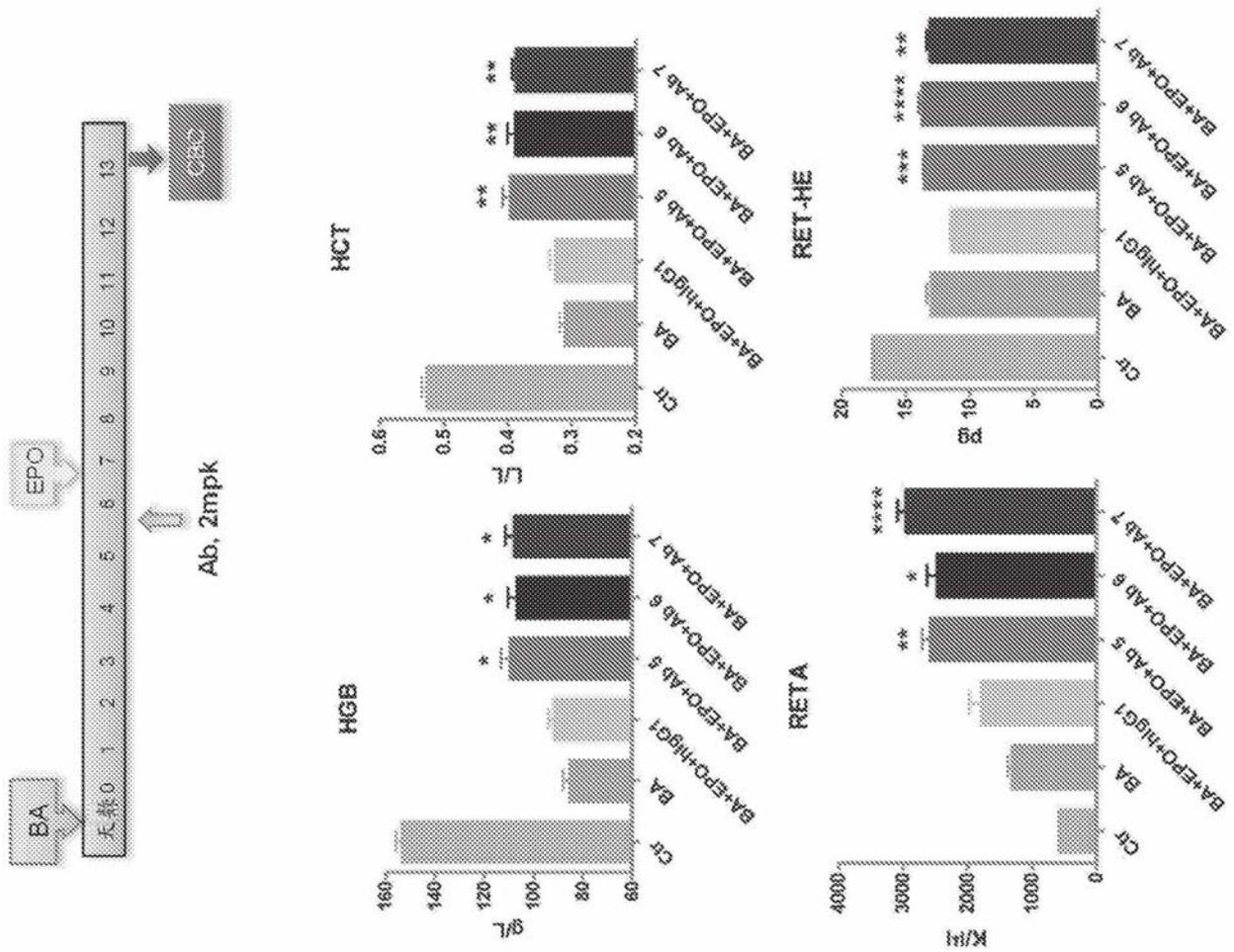
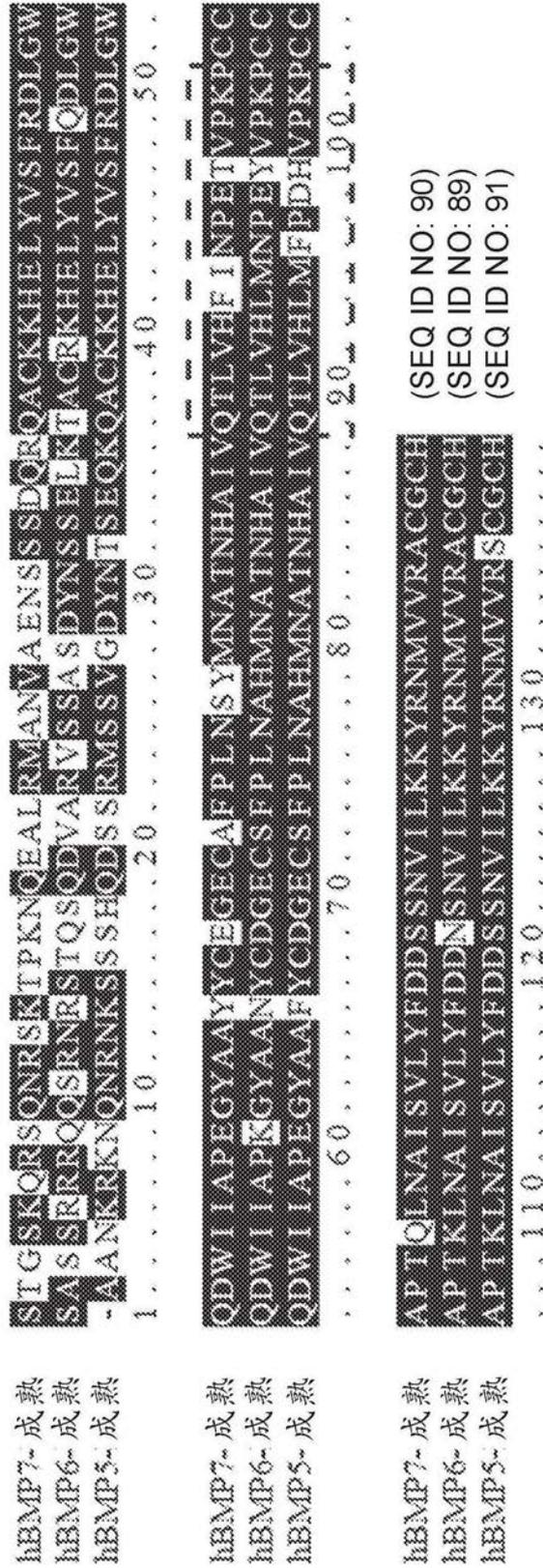


图4



阴影中的氨基酸表示成熟BMP5、6和7之间的序列一致性

加框的区域指示被NOV0442（亲本IgG）和抗体7识别的BMP6的肽

图5

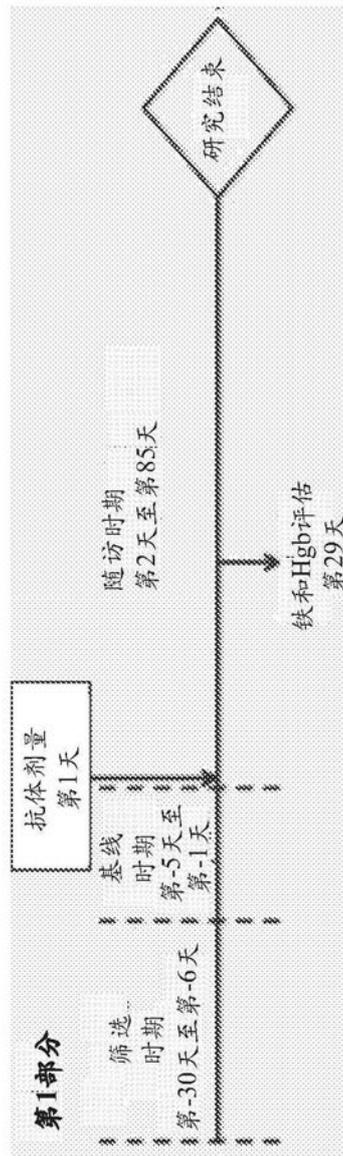
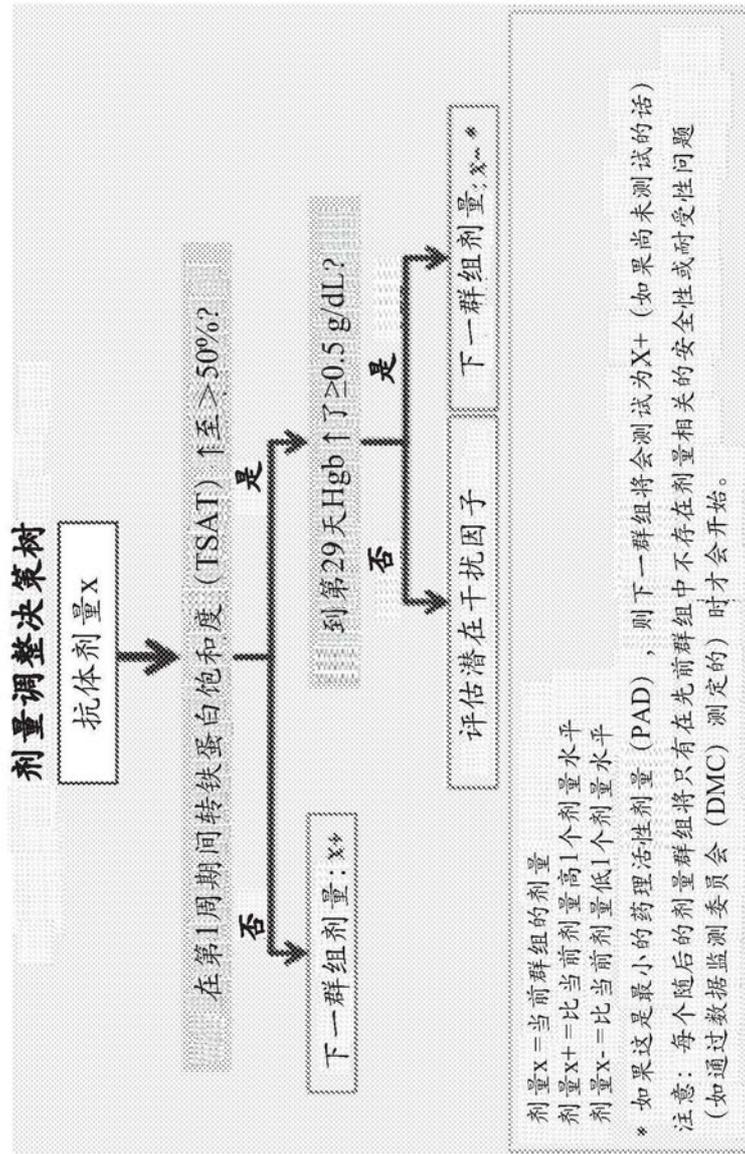


图6



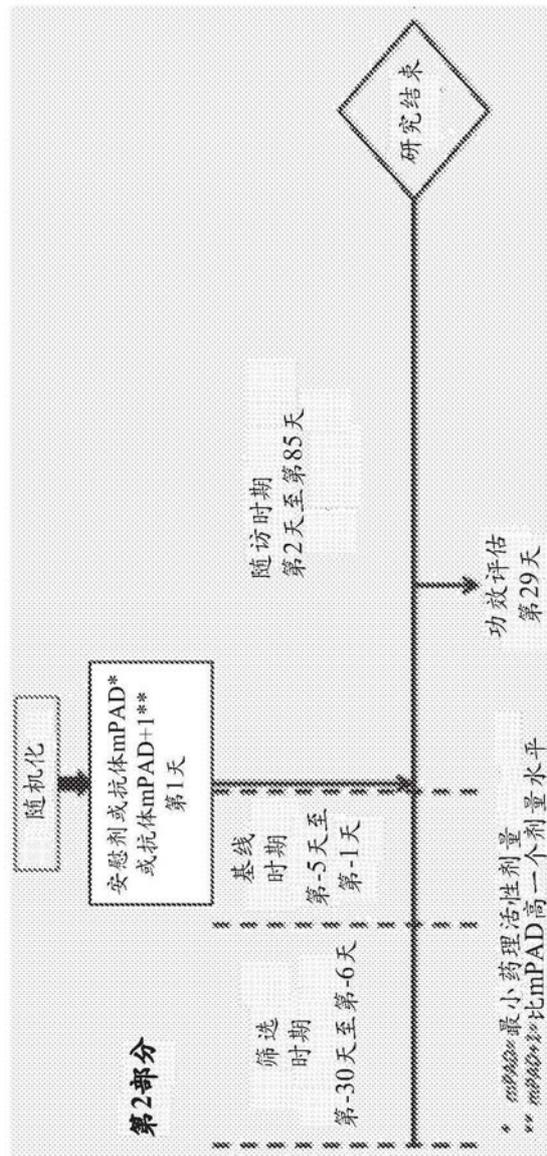


图8

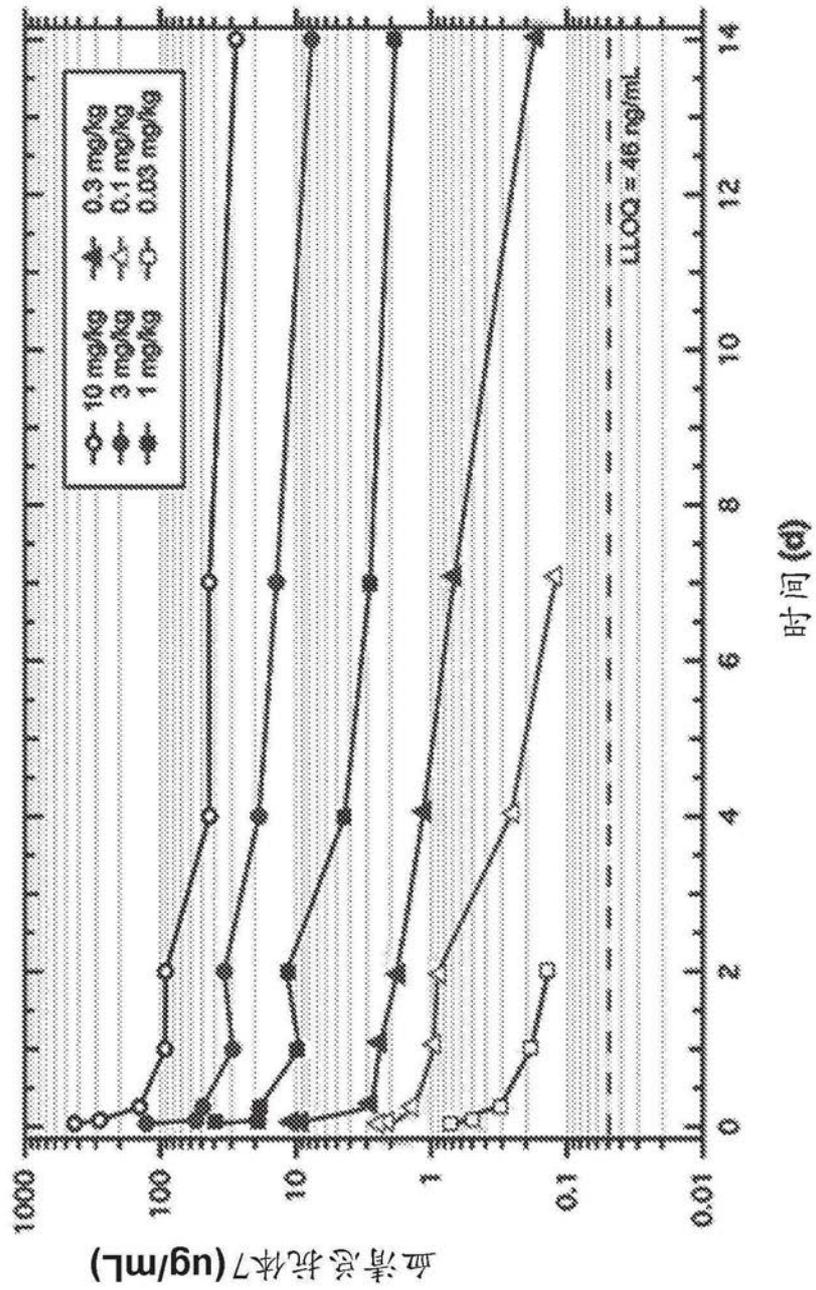


图9

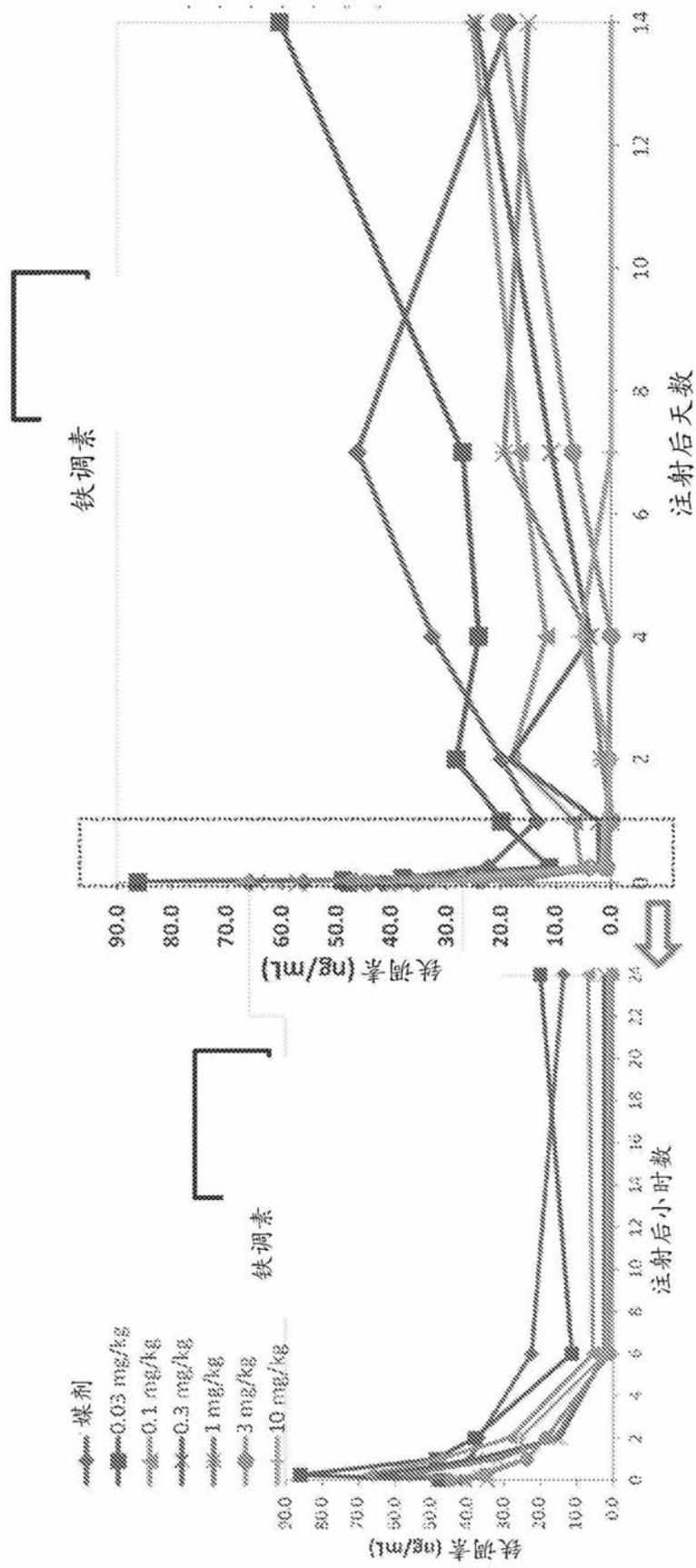


图10

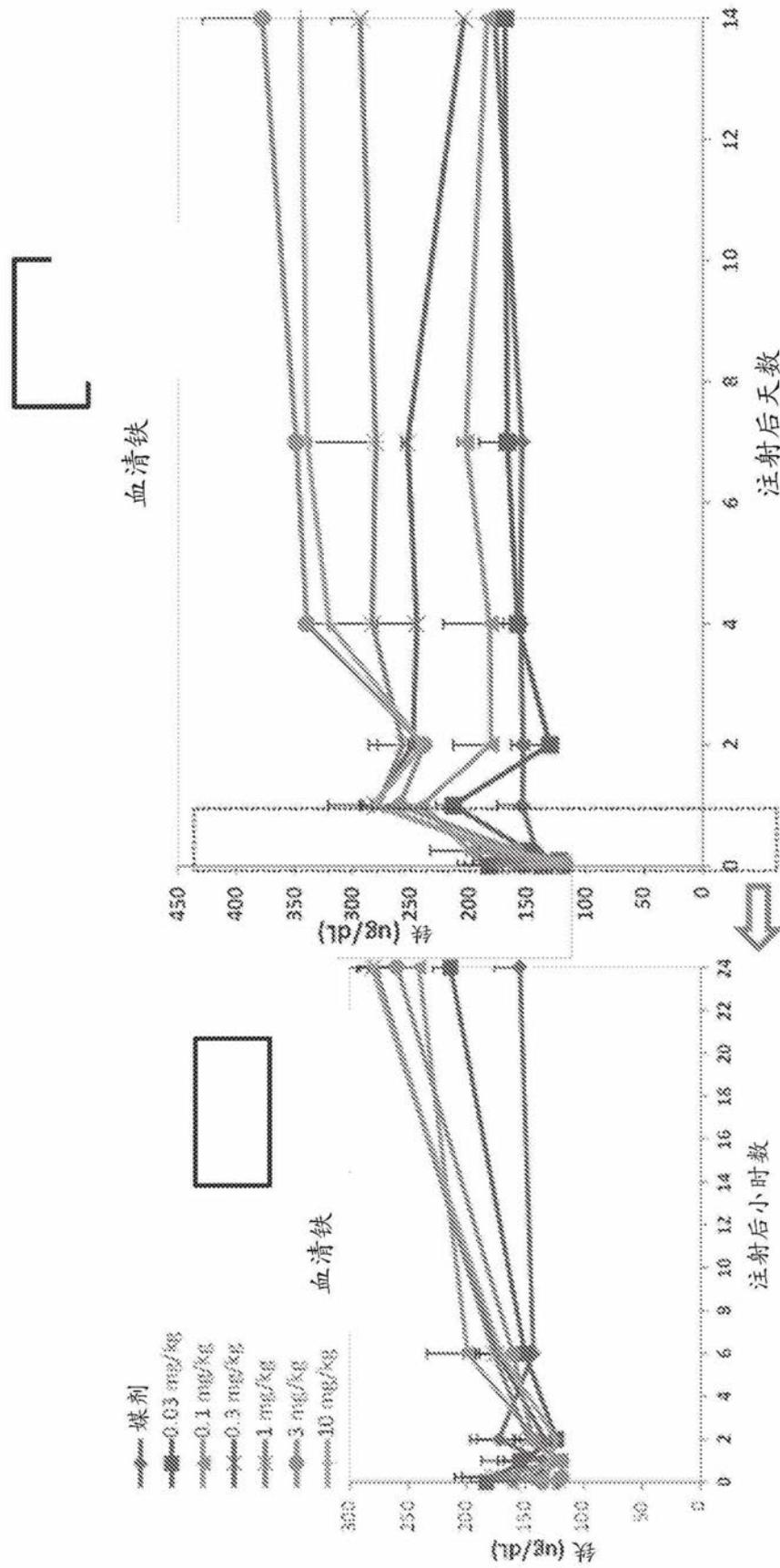


图11

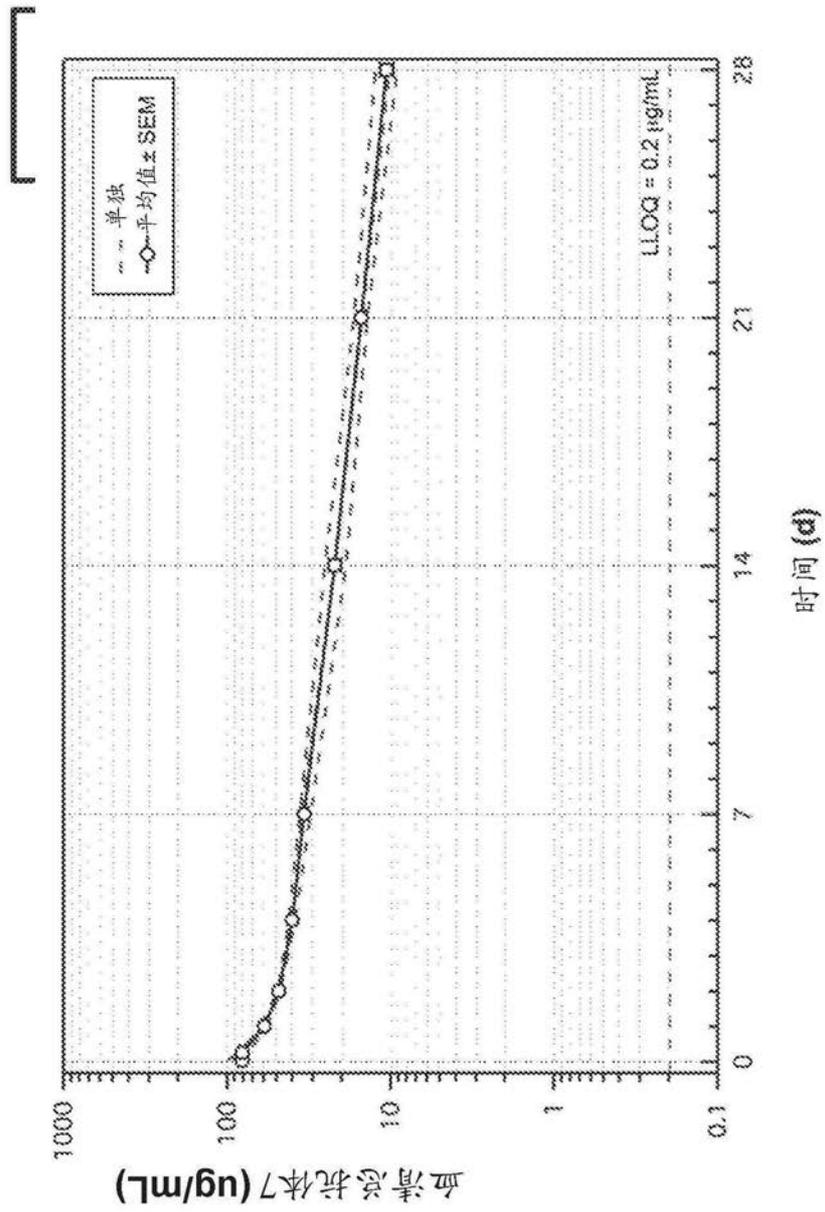


图12

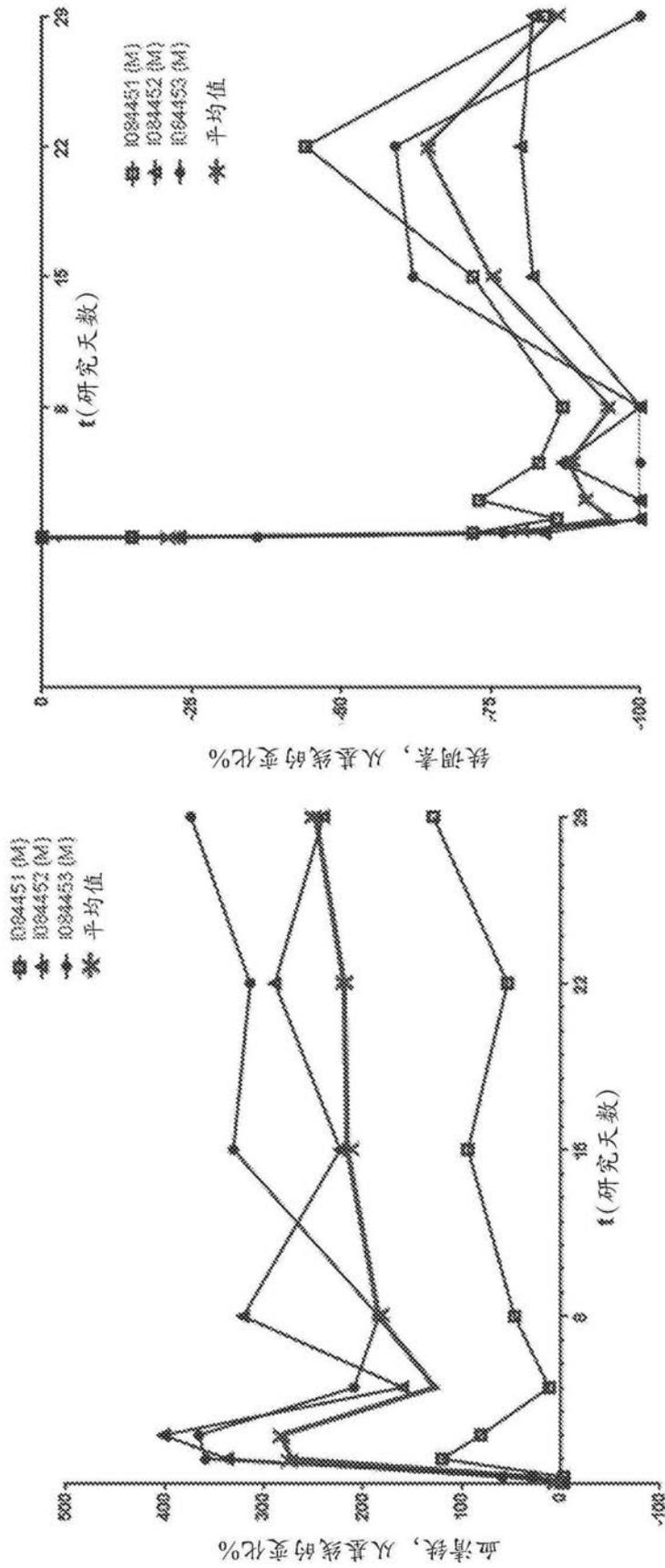


图13

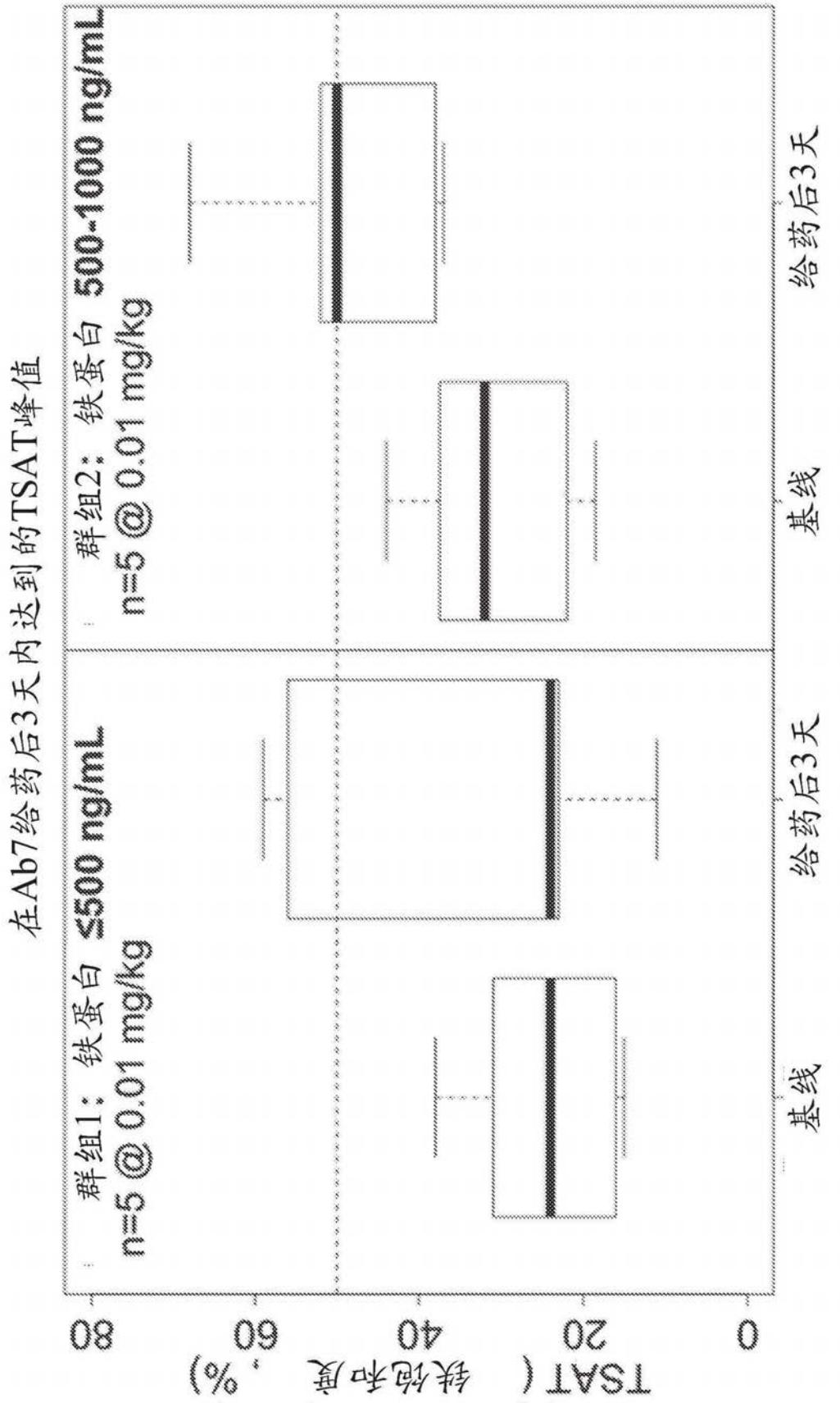


图14