



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113683698 B

(45) 授权公告日 2023.03.31

(21) 申请号 202110986587.8

G01N 33/574 (2006.01)

(22) 申请日 2017.06.22

(56) 对比文件

CN 103959065 A, 2014.07.30

WO 2016127220 A1, 2016.08.18

Juhasz A等.Expression of NADPH

oxidase homologues and accessory genes in
human cancer cell lines, tumours and
adjacent normal tissues.《Free Radic Res》
.2010, 第43卷(第06期), 第523-532页.

Juhasz A等.Expression of NADPH

oxidase homologues and accessory genes in
human cancer cell lines, tumours and
adjacent normal tissues.《Free Radic Res》
.2010, 第43卷(第06期), 第523-532页.

韩晓燕等.NOX家族蛋白的研究进展.《生命
科学》.2012, 第24卷(第06期), 第568-577页.

审查员 张华

(73) 专利权人 北海康成(北京)医药科技有限公司

地址 100102 北京市朝阳区利泽中园106号
楼303A

(72) 发明人 薛群 胡怀忠 王静

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

专利代理人 孟凡宏 谢燕军

(51) Int.Cl.

C07K 16/32 (2006.01)

权利要求书3页 说明书18页

G01N 33/68 (2006.01)

序列表47页 附图12页

(54) 发明名称

预测食管癌对抗ERBB3抗体治疗的应答的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明公开一种用于预测食管癌对使用ERBB3抑制剂(例如抗ERBB3抗体)的治疗是敏感或抗性的方法。具体地,该方法通过测量至少一种选自SDC、PTGES、NCF2、NOXA1、CARD6、GNAZ的标志物在肿瘤样品中的RNA水平或蛋白质水平的表达进行预测。

1. 测量生物标志物在食管癌样品中的表达水平的试剂在制备用于预测食管癌对抗ERBB3抗体处理是敏感或抗性的试剂盒中的用途，其中所述生物标志物包括NOXA1。

2. 权利要求1所述的用途，其中所述试剂盒通过以下方法来预测食管癌对抗ERBB3抗体处理是敏感或抗性的：

(a) 使用所述试剂测量食管癌样品中所述NOXA1的表达水平；以及

(b) 将所述表达水平与所述NOXA1的阈值表达水平进行比较，

其中所述NOXA1的表达水平等于或高于所述阈值表达水平表明所述食管癌对抗ERBB3抗体处理是敏感的。

3. 权利要求1所述的用途，其中所述生物标志物还包括NRG1，并且NRG1的表达水平等于或高于所述阈值表达水平，则预测所述食管癌对抗ERBB3抗体处理是敏感的。

4. 权利要求1-3任一项所述的用途，其中所述抗ERBB3抗体是选自包含以下免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区的抗体：

(a) (i) 免疫球蛋白重链可变区，其包括：SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示的CDR_{H1}，SEQ ID NO:2的氨基酸序列所示的CDR_{H2}，以及SEQ ID NO:3的氨基酸序列所示的CDR_{H3}；以及

(ii) 免疫球蛋白轻链可变区，其包括：SEQ ID NO:4的氨基酸序列所示的CDR_{L1}，SEQ ID NO:5的氨基酸序列所示的CDR_{L2}，以及SEQ ID NO:6的氨基酸序列所示的CDR_{L3}；

(b) (i) 免疫球蛋白重链可变区，其包括：SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的CDR_{H1}，SEQ ID NO:12的氨基酸序列所示的CDR_{H2}，以及SEQ ID NO:13的氨基酸序列所示的CDR_{H3}；以及

(ii) 免疫球蛋白轻链可变区，其包括：SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的CDR_{L1}，SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的CDR_{L2}，以及SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的CDR_{L3}；

(c) (i) 免疫球蛋白重链可变区，其包括：SEQ ID NO:21的氨基酸序列所示的CDR_{H1}，SEQ ID NO:22的氨基酸序列所示的CDR_{H2}，以及SEQ ID NO:23的氨基酸序列所示的CDR_{H3}；以及

(ii) 免疫球蛋白轻链可变区，其包括：SEQ ID NO:24的氨基酸序列所示的CDR_{L1}，SEQ ID NO:25的氨基酸序列所示的CDR_{L2}，以及SEQ ID NO:26的氨基酸序列所示的CDR_{L3}；

(d) (i) 免疫球蛋白重链可变区，其包括：SEQ ID NO:31的氨基酸序列所示的CDR_{H1}，SEQ ID NO:32的氨基酸序列所示的CDR_{H2}，以及SEQ ID NO:33的氨基酸序列所示的CDR_{H3}；以及

(ii) 免疫球蛋白轻链可变区，其包括：SEQ ID NO:34的氨基酸序列所示的CDR_{L1}，SEQ ID NO:35的氨基酸序列所示的CDR_{L2}，以及SEQ ID NO:36的氨基酸序列所示的CDR_{L3}；

(e) (i) 免疫球蛋白重链可变区，其包括：SEQ ID NO:40的氨基酸序列所示的CDR_{H1}，SEQ ID NO:41的氨基酸序列所示的CDR_{H2}，以及SEQ ID NO:42的氨基酸序列所示的CDR_{H3}；以及

(ii) 免疫球蛋白轻链可变区，其包括：SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的CDR_{L1}，SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的CDR_{L2}，以及SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的CDR_{L3}；

(f) (i) 免疫球蛋白重链可变区，其包括：SEQ ID NO:47的氨基酸序列所示的CDR_{H1}，SEQ ID NO:48的氨基酸序列所示的CDR_{H2}，以及SEQ ID NO:49的氨基酸序列所示的CDR_{H3}；以及

(ii) 免疫球蛋白轻链可变区，其包括：SEQ ID NO:50的氨基酸序列所示的CDR_{L1}，SEQ ID NO:51的氨基酸序列所示的CDR_{L2}，以及SEQ ID NO:52的氨基酸序列所示的CDR_{L3}；或

(g) (i) 免疫球蛋白重链可变区，其包括：SEQ ID NO:57的氨基酸序列所示的CDR_{H1}，SEQ ID NO:58的氨基酸序列所示的CDR_{H2}，以及SEQ ID NO:42的氨基酸序列所示的CDR_{H3}；以及

(ii) 免疫球蛋白轻链可变区，其包括：SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的CDR_{L1}，SEQ ID

NO:15的氨基酸序列所示的CDR_{L2},以及SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的CDR_{L3}。

5. 权利要求1-3任一项所述的用途,其中所述抗ERBB3抗体是选自包含以下免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区的抗体:

(a) SEQ ID NO:7的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链可变区,以及SEQ ID NO:8的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链可变区;

(b) SEQ ID NO:17的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链可变区,以及SEQ ID NO:18的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链可变区;

(c) SEQ ID NO:27的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链可变区,以及SEQ ID NO:28的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链可变区;

(d) SEQ ID NO:36的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链可变区,以及SEQ ID NO:37的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链可变区;

(e) SEQ ID NO:43的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链可变区,以及SEQ ID NO:44的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链可变区;

(f) SEQ ID NO:53的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链可变区,以及SEQ ID NO:54的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链可变区;或

(g) SEQ ID NO:59的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链可变区,以及SEQ ID NO:60的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链可变区。

6. 权利要求1-3任一项所述的用途,其中所述抗ERBB3抗体是选自包含以下免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体:

(a) SEQ ID NO:9的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链,以及SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链;

(b) SEQ ID NO:19的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链,以及SEQ ID NO:20的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链;

(c) SEQ ID NO:29的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链,以及SEQ ID NO:30的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链;

(d) SEQ ID NO:38的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链,以及SEQ ID NO:39的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链;

(e) SEQ ID NO:45的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链,以及SEQ ID NO:46的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链;

(f) SEQ ID NO:55的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链,以及SEQ ID NO:56的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链;或

(g) SEQ ID NO:61的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链,以及SEQ ID NO:62的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链。

7. 权利要求2所述的用途,其中所述抗ERBB3抗体包括:

(i) 免疫球蛋白重链可变区,其包括:SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR_{H1},SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR_{H2},以及SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR_{H3};以及

(ii) 免疫球蛋白轻链可变区,其包括:SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR_{L1},SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR_{L2},以及SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR_{L3}。

8. 权利要求2所述的用途,其中所述的抗ERBB3抗体包括:SEQ ID NO:7的氨基酸序列所

示的免疫球蛋白重链可变区,以及SEQ ID NO:8的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链可变区。

9. 权利要求2所述的用途,其中所述的抗ERBB3抗体包括:SEQ ID NO:9的氨基酸序列所示的免疫球蛋白重链,以及SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示的免疫球蛋白轻链。

10. 权利要求2所述的用途,其中所述NOXA1的表达水平是NOXA1的蛋白质表达水平。

11. 权利要求2所述的用途,其中所述NOXA1的表达水平是NOXA1的mRNA表达水平。

预测食管癌对抗ERBB3抗体治疗的应答的方法和试剂盒

[0001] 本申请是申请日为2017年6月22日、申请号为201710485107.3、发明名称为“预测食管癌对抗ERBB3抗体治疗的应答的方法和试剂盒”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明的领域涉及肿瘤的临床分子诊断。

背景技术

[0003] 大多数抗肿瘤药物对一些肿瘤患者有效的,但是在其他患者中则是无效的。这是因为肿瘤之间存在基因变化,甚至在同一患者的不同肿瘤中也能观察到。就靶向治疗而言,患者的应答更是各不相同。因此,当没有合适的方法来预测哪些患者将受益于哪种药品时,不能实现靶向治疗的全部潜力。根据the National Institutes of Health (NIH),术语“生物标志物”定义为“可客观测量的特征,并且该特征被评价为正常的生物对致病过程、或者对治疗干预的药理学应答的指示剂”(Biomarkers Definitions Working Group, 2001, Clin.Pharmacol.Ther.69:89-95)。

[0004] 事先鉴定哪些患者最可能对给定药品显示临床应答能够加速新药品的研发。同时,这也会显著减小临床试验的规模、持续时间和成本。目前,诸如基因组学、蛋白质组学和分子影像学之类的技术能够快速、敏感且可信赖地检测特定的基因突变、具体基因的表达水平以及其他分子生物标志物。尽管有多种技术可以用来表征肿瘤的分子,但由于已知的癌症生物标志物很少,所以很大程度上癌症生物标志物的临床应用仍未实现。例如,近来的综述文章表明:非常需要加速研发生物标志物及它们的用途,以改善癌症的诊断和治疗(Cho, 2007, Molecular Cancer6:25)。

[0005] 另一篇近来关于癌症生物标志物的综述文章则指出:目前的挑战是发现癌症生物标志物。尽管在临幊上已经成功在多种类型肿瘤(例如慢性粒细胞白血病、胃肠道间质瘤、肺癌和多形性胶质母细胞瘤)中使用分子靶向试剂,但由于缺乏有效的策略来评价患者对靶向试剂的应答,这些分子靶向试剂的广泛应用受到限制。问题主要在于不能使用分子定义的癌症来选择进行临床试验的患者以评估新药品。因此需要生物标志物,其可信赖地鉴定最可能受益于特定试剂的那些患者(Sawyers, 2008, Nature452:548-552, at548)。

[0006] 诸如上述的文献表明,需要发现临幊用途的生物标志物和基于此类生物标志物的诊断方法。

[0007] 已知三种不同类型的癌症生物标志物:(1)预后性生物标志物;(2)预测性生物标志物;以及(3)药效动力学(PD)生物标志物。预后性生物标志物用于根据侵袭性(即,生长和/或转移的速率、以及对治疗的不反应)将癌症分类,例如实体肿瘤。这有时被称为“好效果”肿瘤,以区别“坏效果”肿瘤。预测性生物标志物用于评估特定患者将受益于使用特定药品治疗的可能性。例如,患有乳癌的患者,其ERBB2(HER2)基因被扩增,可能受益于使用曲妥单抗的治疗,然而不具有ERBB2基因扩增的患者可能不受益于使用曲妥单抗的治疗。在患者服用药品时,PD生物标志物表明药品对其分子靶标的作用。因此,PD生物标志物通常在新药

品临床研发的早期阶段用于指导剂量水平和给药频率。就癌症生物标志物的讨论而言,可以参见Sawyers, 2008, Nature452:548-552。

[0008] 由EGFR或HER2驱动的肿瘤通常响应于使用EGFR或HER2的抑制剂的处理,但是这些肿瘤总是产生对这些抑制剂的抗性。产生对抗EGFR或抗HER2治疗的抗性的机制之一是ERBB3(也称为HER3)信号传递的活化。例如参见Engelman等,2006,Clin.Cancer Res.12:4372;Ritter等,2007,Clin.Cancer Res.13:4909;Sergina等,2007,Nature445:437。此外,NRG1诱导的HER2-ERBB3异源二聚体的活化还与对EGFR抑制剂的抗性有关(Zhou等,2006,Cancer Cell110:39)。因此,ERBB3在药品抗性的研发中起到重要作用,并通过与EGFR和HER2形成的异源二聚体而涉及肿瘤的抑制和保持。由于ERBB3缺乏激酶活性,所以ERBB3抑制剂的研发已经受到关注,特别是抗ERBB3抗体。

[0009] 与其他类型的靶向治疗相同,一些但不是全部的肿瘤都响应于抗ERBB3的治疗。因此,需要基于预测性生物标志物的方法,其中所述生物标志物可以用于鉴定其中肿瘤可能(或可能不)对使用ERBB3抑制剂(例如抗ERBB3抗体)的治疗产生应答的患者。

[0010] 近来,已经发现神经调节蛋白-1(NRG1)的表达与肿瘤对使用ERBB3抑制剂(例如抗ERBB3抗体)治疗的敏感性相关。作为ERBB3的一个主要配体,NRG1能够促进ERBB3与其他ERBB家族成员的异二聚体化,从而激活多种细胞内信号通路。Meetze等报道,抗ERBB3抗体引起的肿瘤生长抑制(TGI)与ERBB3的表达水平并不相关,而是与NRG1的表达水平显著相关,即当肿瘤样品中的NRG1表达水平等于或高于某一阈值时,所述肿瘤可能对使用抗ERBB3抗体的处理产生应答。因此NRG1有望作为预测肿瘤对使用ERBB3抑制剂(例如抗ERBB3抗体)治疗是否产生应答的有效生物标志物(参见CN103959065A和Sergina等,2015,Clin Cancer Res;21(5),1106-1113)。

[0011] 然而,本发明人发现,在食管癌异种移植模型中,尽管NRG1表达水平低的模型总是对抗ERBB3抗体不敏感,但NRG1表达水平高的模型却可能对抗ERBB3抗体处理产生应答或不产生应答(参见实施例2),表明单独使用NRG1作为生物标志物来预测食管癌是否对使用ERBB3抗体的处理产生应答不是非常有效。

[0012] 因此,需要提供其他生物标志物,当单独使用或与NRG1一起使用时,其能够准确预测食管癌是否对使用ERBB3抗体的处理产生应答。

[0013] 发明简述

[0014] 本发明部分基于这样的发现:在由食管癌得到的组织样品中,SDC2、PTGES、NCF2、NOXA1、CARD6、GNZ的表达水平与食管癌对使用ERBB3抗体处理的敏感性相关。令人惊讶地,本发明人发现,这种相关性非常强,使得上述六个生物标志物SDC2、PTGES、NCF2、NOXA1、CARD6和GNZ中的每一个单独的表达水平均足以用于预测食管癌对使用ERBB3抗体的处理是敏感的或是抗性的。本发明人进一步发现,上述生物标志物的组合使用(即,使用两个或更多个生物标志物)将进一步提高预测食管癌对使用ERBB3抗体的处理的敏感性的有效性。因此,本发明提供了用于预测食管癌对ERBB3抑制剂(例如抗ERBB3抗体)处理是敏感或抗性的方法。所述方法包括:(a)测量食管癌样品中选自SDC2、PTGES、NCF2、NOXA1、CARD6和GNZ的一个或多个生物标志物的表达水平;以及(b)将所述表达水平与对应生物标志物的阈值表达水平进行比较,其中所述SDC2和/或GNZ的表达水平等于或低于所述阈值表达水平,和/或一个或多个选自PTGES、NCF2、NOXA1或CARD6的生物标志物的表达水平等于或高于所

述阈值表达水平表明所述食管癌对ERBB3抑制剂(例如抗ERBB3抗体)处理是敏感的。相反地,所述SDC2和/或GNAZ的表达水平高于所述阈值表达水平,和/或一个或多个选自PTGES、NCF2、NOXA1或CARD6的生物标志物的表达水平低于所述阈值表达水平表明所述食管癌对ERBB3抑制剂(例如抗ERBB3抗体)处理具有抗性。

[0015] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括测量NRG1基因的表达水平,其中NRG1表达水平等于或高于其阈值表达水平表明该食管癌对ERBB3抑制剂(例如抗ERBB3抗体)处理是敏感的。

[0016] 在一个实施方案中,本发明的方法包括:(a)测量食管癌样品中选自SDC2、PTGES、NCF2、NOXA1、CARD6和GNAZ的一个或多个生物标志物的表达水平;以及(b)将所述表达水平与对应生物标志物的阈值表达水平进行比较,其中所述SDC2和/或GNAZ的表达水平等于或低于所述阈值表达水平,且一个或多个选自PTGES、NCF2、NOXA1或CARD6的生物标志物的表达水平等于或高于所述阈值表达水平表明所述食管癌对ERBB3抑制剂(例如抗ERBB3抗体)处理是敏感的。

[0017] 本发明的生物标志物(即SDC2、PTGES、NCF2、NOXA1、CARD6和GNAZ以及NRG1)的表达水平是指蛋白质的表达水平或mRNA的表达水平。蛋白质的表达可以通过本领域技术人员熟知的各种方法来测量,例如免疫组织化学(IHC)分析、酶联免疫吸附测试(ELISA)、蛋白质免疫印迹法、免疫荧光法等。mRNA的表达水平也可以通过本领域技术人员熟知的各种方法来测量,例如荧光定量PCR、微阵列、数字PCR、转录组测序技术(RNAseq)等。

[0018] 本发明的另一个方面提供测量一个或多个选自SDC2、PTGES、NCF2、NOXA1、CARD6和GNAZ的生物标志物在食管癌样品中的表达水平的试剂在制备用于鉴别食管癌对抗ERBB3抗体处理是敏感或抗性的诊断测试试剂盒中的用途。在一个实施方案中,上述生物标志物还包括NRG1。

[0019] 本发明的另一个方面提供用于预测食管癌对抗ERBB3抗体处理是敏感的或抗性的诊断测试试剂盒,所述试剂盒包括用于测量一个或多个选自SDC2、PTGES、NCF2、NOXA1、CARD6和GNAZ的生物标志物在食管癌样品中的表达水平的试剂。在一个实施方案中,本发明的试剂盒还包括用于测量NRG1表达水平的试剂。所述试剂是本领域技术人员已知的用于测量基因的mRNA或蛋白表达水平的试剂。例如,当用荧光实时定量PCR测量mRNA表达水平时,所述试剂包括用于特异性扩增本发明生物标志物的引物、DNA聚合酶和用于测量其表达水平的缓冲剂、反应物等。当用IHC分析测量蛋白表达水平时,所述试剂包括针对本发明生物标志物的抗体(一级抗体)和与一级抗体结合的检测抗体(二级抗体)等。在一个实施方案中,本发明的试剂盒还包括用于测量一种或多种用作对照的其他基因的表达水平的试剂。

附图说明

[0020] 图1为显示抗ERBB3抗体的免疫球蛋白重链可变区序列的CDR_{H1}、CDR_{H2}和CDR_{H3}序列(Kabat定义)的示意图,所述抗体表示为CAN017、04D01、09D03、11G01、12A07、18H02和22A02(其对应于图2中方框所示的区域)。

[0021] 图2为显示抗ERBB3抗体的完整免疫球蛋白重链可变区的氨基酸序列的示意图,所述抗体表示为CAN017、04D01、09D03、11G01、12A07、18H02和22A02。比对各抗体的氨基酸序列,互补决定序列(CDR)(Kabat定义)、CDR_{H1}、CDR_{H2}和CDR_{H3}用方框标示。方框之外的序列表示

构架(FR)序列。

[0022] 图3为显示抗ERBB3抗体的免疫球蛋白轻链可变区序列的CDR_{L1}、CDR_{L2}和CDR_{L3}序列(Kabat定义)的示意图,所述抗体表示为CAN017、04D01、09D03、11G01、12A07、18H02和22A02(其对应于图4中方框所示的区域)。

[0023] 图4为显示抗ERBB3抗体的完整的免疫球蛋白轻链可变区的氨基酸序列的示意图,所述抗体表示为CAN017、04D01、09D03、11G01、12A07、18H02和22A02。比对各抗体的氨基酸序列彼此,互补决定序列(CDR)(Kabat定义)、CDR_{L1}、CDR_{L2}和CDR_{L3}用方框标示。方框之外的序列表示构架(FR)序列。

[0024] 图5提供了定义(A)全长CAN017免疫球蛋白重链和(B)全长CAN017免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。

[0025] 图6提供了定义(A)全长04D01免疫球蛋白重链和(B)全长04D01免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。

[0026] 图7提供了定义(A)全长09D03免疫球蛋白重链和(B)全长09D03免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。

[0027] 图8提供了定义(A)全长11G01免疫球蛋白重链和(B)全长11G01免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。

[0028] 图9提供了定义(A)全长12A07免疫球蛋白重链和(B)全长12A07免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。

[0029] 图10提供了定义(A)全长18H02免疫球蛋白重链和(B)全长18H02免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。

[0030] 图11提供了定义(A)全长22A02免疫球蛋白重链和(B)全长22A02免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。

[0031] 图12总结了在食管癌异种移植模型中,测量hIgG(20mg/kg)和抗ERBB3抗体CAN017(20mg/kg)的肿瘤抑制活性的实验结果。

[0032] 图13的上图是散点图,其显示出CAN017在20个异种移植植物模型中的体内效力(其表示为肿瘤生长抑制的百分率(TGI))与SDC2的mRNA表达水平之间的关系。20个数据点以(●)表示,其中实线表示SDC2的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性。图13的下图是SDC2的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性的显著性分析。

[0033] 图14的上图是散点图,其显示出CAN017在20个异种移植植物模型中的体内效力(其表示为肿瘤生长抑制的百分率(TGI))与GNAZ的mRNA表达水平之间的关系。20个数据点以(●)表示,其中实线表示GNAZ的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性。图14的下图是GNAZ的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性的显著性分析。

[0034] 图15的上图是散点图,其显示出CAN017在20个异种移植植物模型中的体内效力(其表示为肿瘤生长抑制的百分率(TGI))与NCF2的mRNA表达水平之间的关系。20个数据点以(●)表示,其中实线表示NCF2的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性。图15的下图是NCF2的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性的显著性分析。

[0035] 图16的上图是散点图,其显示出CAN017在20个异种移植植物模型中的体内效力(其表示为肿瘤生长抑制的百分率(TGI))与NOXA1的mRNA表达水平之间的关系。20个数据点以(●)表示,其中实线表示NOXA1的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性。图16的下图是

NOXA1的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性的显著性分析。

[0036] 图17的上图是散点图,其显示出CAN017在20个异种移植物模型中的体内效力(其表示为肿瘤生长抑制的百分率(TGI))与PTGES的mRNA表达水平之间的关系。20个数据点以(●)表示,其中实线表示PTGES的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性。图17的下图是PTGES的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性的显著性分析。

[0037] 图18的上图是散点图,其显示出CAN017在20个异种移植物模型中的体内效力(其表示为肿瘤生长抑制的百分率(TGI))与CARD6的mRNA表达水平之间的关系。20个数据点以(●)表示,其中实线表示CARD6的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性。图18的下图是CARD6的mRNA表达水平与肿瘤生长抑制的相关性的显著性分析。

[0038] 图19显示GNAZ和NRG1的表达水平与肿瘤生长抑制(TGI)百分比的关系的示意图。其中与Y轴平行的实线表示NRG1的阈值表达水平2.05,与X轴平行的实线表示GNAZ的阈值表达水平1.1。◆表示TGI<70%;△表示TGI>70%。

[0039] 发明详述

[0040] 定义

[0041] 如本文所用,“CAN017”是指人源化的抗人类ERBB3单克隆抗体,其全长重链氨基酸序列为SEQ ID NO:9,而其全长轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:10。

[0042] 如本文所用,“ERBB3”(也称为HER3)是指通过如下基因及其等位基因变体编码的人类蛋白质,其中所述的基因鉴别为Entrez Gene ID No.2065。

[0043] 如本文所用,“ERBB3抑制剂”是指与ERBB3结合,并抑制、中和、防止或消除ERBB3在肿瘤细胞中的生物学活性的分子(小分子或高分子,例如抗体或其抗原结合片段)。

[0044] 如本文所用,“NRG1”(也称为神经调节蛋白-1、hereregulin、HRG或HRG1)是指由Entrez Gene ID No.3084及其等位基因变体编码的人类蛋白质。

[0045] 如本文所用,“SDC2”(也称为多配体蛋白聚糖2)是指由Entrez Gene ID No.6383及其等位基因变体编码的人类蛋白质。

[0046] 如本文所用,“NCF2”(也称为中性粒细胞胞质因子2)是指由Entrez Gene ID No.4688及其等位基因变体编码的人类蛋白质。

[0047] 如本文所用,“NOXA1”(也称为NADPH氧化酶活化剂1)是指由Entrez Gene ID No.10811及其等位基因变体编码的人类蛋白质。

[0048] 如本文所用,“GNAZ”(也称为G蛋白亚单元 αZ)是指由Entrez Gene ID No.2781及其等位基因变体编码的人类蛋白质。

[0049] 如本文所用,“PTGES”(也称为前列腺素E合酶)是指由Entrez Gene ID No.9536及其等位基因变体编码的人类蛋白质。

[0050] 如本文所用,“CARD6”(也称为半胱天冬酶募集结构域家族成员6)是指由Entrez Gene ID No.84674及其等位基因变体编码的人类蛋白质。

[0051] 如本文所用,对处理产生的“反应”或“应答”是指就所处理的肿瘤而言,肿瘤显示出:(a)生长减慢,(b)生长停止,或(c)衰退。

[0052] 如本文所用,“表达水平”是指本发明的生物标志物在食管癌样品中的表达水平。例如,表达水平可以表示为(1)由RNAseq测量得到的mRNA表达水平(用FPKM进行标准化),或(2)在IHC测试中的染色强度。可以用阈值表达水平来解释本发明的生物标志物的表达水

平,其可以在阈值测定分析中凭经验测定,例如使用ROC曲线分析。

[0053] 如本文所用,“阈值测定分析”是指对食管癌的数据组进行分析,从而测定该生物标志物在食管癌样品中的阈值表达水平。

[0054] 如本文所用,“阈值表达水平”指这样的表达水平:等于或高于该表达水平(对于NRG1、NCF2、NOXA1、PTGES和CARD6),或等于或低于该表达水平(对于SDC2和GNZB),食管癌肿瘤将被分类为对使用的ERBB3抑制剂处理是敏感的。

[0055] ERBB3抗体

[0056] 本文所公开的方法可以用于预测食管癌对使用ERBB3抑制剂的处理的应答,其中所述的抑制剂例如为抗ERBB3抗体或抗ERBB3抗体的抗原结合片段。在一些实施方案中,将食管癌分为对ERBB3抗体(或其抗原结合片段)敏感的或抗性的,其中所述的抗体抑制或防止NRG1(例如NRG1-β1)与ERBB3结合,由此间接抑制或防止ERBB3的配体诱导的二聚化(例如抗ERBB3抗体CAN017、04D01、12A07、18H02和22A02)。在其他实施方案中,肿瘤被分类为对抗体(或其抗原结合片段)敏感的或抗性的,其中所述的抗体在不防止NRG1与ERBB3结合(例如抗ERBB3抗体09D03和11G01)的条件下抑制或防止ERBB3的二聚化。

[0057] 在示例性的实施方案中,ERBB3抑制剂为以下抗体之一:CAN017、04D01、12A07、18H02、22A02、11G01和09D03。

[0058] 抗ERBB3抗体CAN017包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括:SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示的CDR_{H1},SEQ ID NO:2的氨基酸序列所示的CDR_{H2},以及SEQ ID NO:3的氨基酸序列所示的CDR_{H3},如图1所示;其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括:SEQ ID NO:4的氨基酸序列所示的CDR_{L1},SEQ ID NO:5的氨基酸序列所示的CDR_{L2},以及SEQ ID NO:6的氨基酸序列所示的CDR_{L3},如图3所示。在示例性的实施方案中,抗体CAN017包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列,如图2所示;其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列,如图4所示。在另一个示例性的实施方案中,抗体CAN017包括SEQ ID NO:9的免疫球蛋白重链氨基酸序列,以及SEQ ID NO:10的免疫球蛋白轻链氨基酸序列,如图5所示。

[0059] 抗ERBB3抗体04D01包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括:SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的CDR_{H1},SEQ ID NO:12的氨基酸序列所示的CDR_{H2},以及SEQ ID NO:13的氨基酸序列所示的CDR_{H3},如图1所示;其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括:SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的CDR_{L1},SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的CDR_{L2},以及SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的CDR_{L3},如图3所示。在示例性的实施方案中,抗体04D01包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列,如图2所示;其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,如图4所示。在另一个示例性的实施方案中,抗体04D01包括SEQ ID NO:19的免疫球蛋白重链氨基酸序列,以及SEQ ID NO:20的免疫球蛋白轻链氨基酸序列,如图6所示。

[0060] 抗ERBB3抗体09D03包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括:SEQ ID NO:21的氨基酸序列所示的CDR_{H1},SEQ ID NO:22的氨基酸序列所示的CDR_{H2},以及SEQ ID NO:23的氨基酸序列所示的CDR_{H3},如图1所示;其中

所述的免疫球蛋白轻链可变区包括：SEQ ID NO:24的氨基酸序列所示的CDR_{L1}, SEQ ID NO:25的氨基酸序列所示的CDR_{L2}, 以及SEQ ID NO:26的氨基酸序列所示的CDR_{L3}, 如图3所示。在示例性的实施方案中，抗体09D03包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括SEQ ID NO:27的氨基酸序列，如图2所示；其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括SEQ ID NO:28的氨基酸序列，如图4所示。在另一个示例性的实施方案中，抗体09D03包括SEQ ID NO:29的免疫球蛋白重链氨基酸序列，以及SEQ ID NO:30的免疫球蛋白轻链氨基酸序列，如图7所示。

[0061] 抗ERBB3抗体11G01包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括：SEQ ID NO:31的氨基酸序列所示的CDR_{H1}, SEQ ID NO:32的氨基酸序列所示的CDR_{H2}, 以及SEQ ID NO:33的氨基酸序列所示的CDR_{H3}, 如图1所示；其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括：SEQ ID NO:34的氨基酸序列所示的CDR_{L1}, SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的CDR_{L2}, 以及SEQ ID NO:35的氨基酸序列所示的CDR_{L3}, 如图3所示。在示例性的实施方案中，抗体11G01包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列，如图2所示；其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列，如图4所示。在另一个示例性的实施方案中，抗体11G01包括SEQ ID NO:38的免疫球蛋白重链氨基酸序列，以及SEQ ID NO:39的免疫球蛋白轻链氨基酸序列，如图8所示。

[0062] 抗ERBB3抗体12A07包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括：SEQ ID NO:40的氨基酸序列所示的CDR_{H1}, SEQ ID NO:41的氨基酸序列所示的CDR_{H2}, 以及SEQ ID NO:42的氨基酸序列所示的CDR_{H3}, 如图1所示；其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括：SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的CDR_{L1}, SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的CDR_{L2}, 以及SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的CDR_{L3}, 如图3所示。在示例性的实施方案中，抗体12A07包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括SEQ ID NO:43的氨基酸序列，如图2所示；其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括SEQ ID NO:44的氨基酸序列，如图4所示。在另一个示例性的实施方案中，抗体12A07包括SEQ ID NO:45的免疫球蛋白重链氨基酸序列，以及SEQ ID NO:46的免疫球蛋白轻链氨基酸序列，如图9所示。

[0063] 抗ERBB3抗体18H02包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括：SEQ ID NO:47的氨基酸序列所示的CDR_{H1}, SEQ ID NO:48的氨基酸序列所示的CDR_{H2}, 以及SEQ ID NO:49的氨基酸序列所示的CDR_{H3}, 如图1所示；其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括：SEQ ID NO:50的氨基酸序列所示的CDR_{L1}, SEQ ID NO:51的氨基酸序列所示的CDR_{L2}, 以及SEQ ID NO:52的氨基酸序列所示的CDR_{L3}, 如图3所示。在示例性的实施方案中，抗体18H02包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括SEQ ID NO:53的氨基酸序列，如图2所示；其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括SEQ ID NO:54的氨基酸序列，如图4所示。在另一个示例性的实施方案中，抗体18H02包括SEQ ID NO:55的免疫球蛋白重链氨基酸序列，以及SEQ ID NO:56的免疫球蛋白轻链氨基酸序列，如图10所示。

[0064] 抗ERBB3抗体22A02包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括：SEQ ID NO:57的氨基酸序列所示的CDR_{H1}, SEQ ID NO:58

的氨基酸序列所示的 CDR_{H_2} ,以及SEQ ID NO:42的氨基酸序列所示的 CDR_{H_3} ,如图1所示;其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括:SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的 CDR_{L_1} ,SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的 CDR_{L_2} ,以及SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的 CDR_{L_3} ,如图3所示。在示例性的实施方案中,抗体22A02包括免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区,其中所述的免疫球蛋白重链可变区包括SEQ ID NO:59的氨基酸序列,如图2所示;其中所述的免疫球蛋白轻链可变区包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列,如图4所示。在另一个示例性的实施方案中,抗体22A02包括SEQ ID NO:61的免疫球蛋白重链氨基酸序列,以及SEQ ID NO:62的免疫球蛋白轻链氨基酸序列,如图11所示。

[0065] 可以考虑到技术人员能够理解的是,可以通过将上述可变区与各恒定区序列连接来创建完整的重链或kappa轻链抗体序列,从而形成活性的全长免疫球蛋白重链和轻链。例如,完整的重链包括重链可变区,及其后面的鼠或人IgG1或IgG2b重链恒定序列(在本领域是已知的),并且完整的kappa链包括kappa可变序列,及其后面的鼠或人kappa轻链恒定序列(在本领域是已知的)。进一步考虑到可以将由免疫球蛋白重链和轻链得到的CDR1、CDR2和CDR3序列置于人或人源化的免疫球蛋白构架区中。

[0066] 样品

[0067] 由食管癌得到的组织样品(例如由人类患者获得的人食管癌组织样品,其中所述的人类患者例如为考虑使用ERBB3抑制剂处理的人类患者)可以用作RNA来源、蛋白质来源或用于免疫组织化学(IHC)的薄切片来源,这样可以在实施所公开的方法中测定样品中的本发明的生物标志物的水平。可以通过使用传统的肿瘤组织活检仪器和过程来获得组织样品。内镜组织活检、切除组织活检、切取组织活检、细针穿刺活检、咬切组织活检、刮取组织活检和皮肤组织活检为本领域任一技术人员为了获得肿瘤样品可以使用的公认的医学过程的实例。肿瘤组织样品应该足够大,从而提供足够的RNA、蛋白质或薄切片,以用于测量生物标志物的基因表达。

[0068] 肿瘤组织样品可以为允许测量生物标志物的表达或含量的任何形式。总之,组织样品必须足够用于RNA提取、蛋白质提取或薄切片的制备。因此,组织样品可以是新鲜的、通过合适的低温学技术保藏的或通过非低温学技术保藏的。用于处理临床组织活检样本的标准方法是将组织样品固定于福尔马林中,然后将其包埋在石蜡中。这种形式的样品通常称为福尔马林固定-石蜡包埋(FFPE)的组织。用于随后分析的组织制备的合适技术是本领域的技术人员所公知的。

[0069] 生物标志物的表达

[0070] 如本文所述,可以通过任何合适的方法来测定或测量由肿瘤得到的组织样品中生物标志物的表达水平。多种此类方法是本领域已知的。例如,可以通过测量样品中生物标志物的蛋白质的水平或量,或者测量样品中生物标志物的RNA的水平或量来测定生物标志物的表达水平。

[0071] 在一些实施方案中,将食管癌对使用ERBB3抑制剂的处理分类为敏感的或抗性的,完全基于生物标志物在由食管癌得到的组织样品中的表达情况。在另一个实施方案中,除了本发明的生物标志物的表达以外,还测量一种或多种其他基因的表达,从而将肿瘤分类为对使用ERBB3抑制剂的处理是敏感的或抗性的。在本发明中考虑了在一些实施方案中,当除了本发明的生物标志物以外还测量了一种或多种其他基因的表达时,一种或多种其他基

因不包括ErbB1、ErbB2和ErbB3(例如ErbB1、ErbB2和ErbB3的任何的单体、异源二聚体和/或同源二聚体,和/或单体或二聚体形式的磷酸化的ErbB1、ErbB2和ErbB3)。本发明中进一步考虑了除了本发明生物标志物以外,测量一种或多种其他基因的表达可以包括起到对照或标准品作用的基因,例如用于数据的标准化。

[0072] RNA分析

[0073] 用于测定本发明生物标志物的mRNA表达水平的方法包括但不限于传统的微阵列分析、数字PCR、RNAseq和定量聚合酶链式反应(PCR)。在一些实施方案中,使用标准方案由目标细胞、肿瘤或组织提取RNA。在其他的实施方案中,使用不需要分离RNA的技术进行RNA分析。

[0074] 由组织样品快速且有效地提取真核生物mRNA的方法是本领域的那些技术人员所公知的。例如参见Ausubel et al., 1997, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley&Sons。组织样品可以是新鲜的、冷冻的或固定的石蜡包埋(FFPE)的样品,例如临床研究的食管癌患者样本。通常,由新鲜或冷冻的组织样品分离得到的RNA往往比由FFPE样品得到的RNA形成的碎片少。但是,肿瘤材料的FFPE样品更容易获得,并且FFPE样品是在本发明的方法中使用的合适的RNA来源。就对FFPE样品作为RNA来源以便通过RT-PCR进行基因表达谱的讨论而言,例如参见Clark-Langone等, 2007, BMC Genomics 8:279。此外,参见De Andrés等, 1995, Biotechniques 18:42044; 和Baker等, 美国专利申请公开号2005/0095634。可使用商购的试剂盒(具有供应商提供的用于RNA提取和制备的说明书)。多种RNA分离产物和完整试剂盒的销售供应商包括Qiagen (Valencia, CA)、Invitrogen (Carlsbad, CA)、Ambion (Austin, TX) 和Exiqon (Woburn, MA)。

[0075] 通常,RNA的分离以组织/细胞破碎开始。在组织/细胞破碎过程中,理想的是减少Rnase对RNA的降解。在RNA分离过程中限制Rnase活性的一种方法是确保一旦细胞被破碎,便将变性剂与细胞内容物接触。另一种惯例是在RNA分离过程中包括一种或多种蛋白酶。可任选地,一旦收集到新鲜的组织样品,便将其在室温下浸渍在RNA稳定溶液中。稳定溶液快速地渗透细胞,从而稳定RNA以便在4℃下储存,以备随后的分离。一种此类的稳定溶液为市售可得的RNAlater® (Ambion, Austin, TX)。

[0076] 在一些方案中,总RNA通过氯化铯密度梯度离心由破碎的肿瘤材料分离得到。通常,mRNA占细胞总RNA的大约1%至5%。固定化的Oligo (dT) (例如Oligo (dT) 纤维素)通常用于将mRNA与核糖体RNA和转移RNA分离。如果在分离后储存,则必须将RNA储存在不含Rnase的条件下。用于稳定储存所分离的RNA的方法是本领域已知的。用于稳定储存RNA的多种市售产品是可得的。

[0077] 微阵列

[0078] 可以使用传统的DNA微阵列表达谱技术来测量生物标志物的mRNA表达水平。DNA微阵列是特定的DNA节段或探针的集合,其固定在固体表面或基底上,例如玻璃、塑料或硅;并且各特定的DNA节段占据阵列中已知的位置。与标记的RNA样品的杂交通常在严谨的杂交条件下进行,其允许对相应于阵列中各探针的RNA分子进行检测和定量。在严谨洗涤以除去非特异性结合的样品材料之后,通过共聚焦激光显微镜或其他合适的检测方法扫描微阵列。当今市售的DNA微阵列(也称为DNA芯片)通常包括数以万计的探针,并由此可以同时测量数以万计的基因的表达。此类阵列可以用于实施本发明。备选地,包括测量NRG1所必须的少

数几种探针、加上必须的对照或标准品(例如用于数据的标准化)的定制芯片可以用于实施所公开的方法。

[0079] 为了有利于数据的标准化,可以使用双色微阵列读取器。在双色(双通道)系统中,使用发射第一波长的第一荧光团来标记样品,同时使用发射不同波长的第二荧光团标记RNA或cDNA标准品。例如,Cy3(570nm)和Cy5(670nm)通常在双色微阵列系统中一起使用。

[0080] DNA微阵列技术是良好发展的、市售可得的且广泛使用的。因此,在实施所公开的方法时,本领域的普通技术人员可以使用微阵列技术测量编码生物标志物蛋白质的基因的表达水平,而无需过度的实验。DNA微阵列芯片、试剂(例如用于RNA或cDNA制备、RNA或cDNA标记、杂交和洗涤溶液的那些)、仪器(例如微阵列读取器)以及方案是本领域公知的,并可得自多种市售来源。微阵列系统的市售供应商包括Agilent Technologies(Santa Clara, CA)和Affymetrix(Santa Clara, CA),但是可以使用其他的PCR系统。

[0081] 定量PCR

[0082] 可以使用传统的定量逆转录酶聚合物链式反应(qRT-PCR)技术来测量本发明生物标志物的mRNA水平。qRT-PCR的优点包括敏感性、灵活性、定量精确性以及能够分辨密切相关的mRNA的能力。关于处理用于定量PCR的组织样品的指导可得自多种来源,包括用于qRT-PCR的市售的仪器和试剂的制造商和供应商(例如Qiagen(Valencia, CA)和Ambion(Austin, TX))。用于自动化实施qRT-PCR的仪器和系统是市售可得的,并且在许多实验室中是常规使用的。公知的市售系统的实例为the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems,Foster City,CA)。

[0083] 一旦分离出mRNA,通过RT-PCR进行基因表达测量中的第一步是将mRNA模板逆转录为cDNA,其接着在PCR反应中呈指数扩增。两种常用的逆转录酶为禽成髓细胞性白血病病毒逆转录酶(AMV-RT)和莫罗尼氏鼠白血病病毒逆转录酶(MMLV-RT)。逆转录反应通常使用特定的引物、随机的六聚体或oligo(dT)引物来作为引物。合适的引物是市售可得的,例如GeneAmp® RNA PCR kit(Perkin Elmer,Waltham,MA)。所得的cDNA产物在随后的聚合酶链式反应中用作模板。

[0084] 使用热稳定的DNA依赖的DNA聚合酶实施PCR步骤。大部分在PCR系统中常用的聚合酶为水生栖热菌(*Thermus aquaticus*,Taq)聚合酶。PCR的选择性源自引物的使用,所述的引物与扩增所靶向的DNA区域互补,即,由编码目标蛋白质的基因所逆转录的cDNA的区域。因此,当本发明使用qRT-PCR时,对各标记物基因特异性的引物是基于该基因的cDNA序列。可以根据供应商提供的说明书来使用诸如SYBR® green或TaqMan®(Applied Biosystems,Foster City,CA)之类的市售的技术。可以通过比较管家基因(例如β肌动蛋白或GAPDH)的水平,针对加载样品中的差异将信使RNA的水平标准化。可以将mRNA的表达水平表示为相对于任何单一对照样品,例如得自正常的非肿瘤组织或细胞的mRNA。备选地,其可以表示为相对于由一套肿瘤样品或肿瘤细胞系得到的mRNA、或由市售可得的一组对照mRNA得到的mRNA。

[0085] 可以设计用于PCR分析NRG1和/或本发明生物标志物的表达情况的多组合适的引物组,并且由本领域的任一技术人员合成,而无需过度的实验。备选地,用于实施本发明的多组PCR引物组可以购自多个市售的来源,例如Applied Biosystems。PCR引物优选地长度

为大约17至25个核苷酸。可以使用用于估计解链温度(T_m)的常规算法将引物设计为具有特定的 T_m 。用于设计引物和估计 T_m 的软件是市售可得的,例如Primer ExpressTM(Applied Biosystems),并且还可以在互联网上获得,例如Primer3(Massachusetts Institute of Technology)。通过应用所建立的PCR引物设计的原理,可以使用大量不同的引物来测量任何给定基因的表达水平,包括NRG1和本发明的生物标志物。

[0086] RNAseq

[0087] 还可以使用RNAseq技术来测量本发明生物标志物的mRNA表达水平。RNAseq可进行全基因组水平的基因表达差异研究,具有以下优势:(1)直接测定每个转录本片段序列,单核苷酸分辨率的精确度,同时不存在传统微阵列杂交的荧光模拟信号带来的交叉反应和背景噪音问题(即,具有数字化信号);(2)能够检测到细胞中少至几个拷贝的稀有转录本(即,灵敏度非常高);(3)能够进行全基因组分析;(4)高于6个数量级的动态检测范围,能够同时鉴定和定量稀有转录本和正常转录本(即,检测范围广泛)。基于以上优势,RNAseq已经成为精确测量RNA表达水平的强有力的工具。

[0088] RNAseq的原理是:提取RNA后纯化,逆转录成cDNA,然后测序得到短读段(short reads);将短读段比对到基因组相应的位置,然后对比对结果进行基因水平、外显子水平以及转录水平的拼接,最后对拼接结果进行数据统计,标准化之后得到基因在mRNA水平上的表达水平。其中,比对步骤、拼接和统计步骤以及标准化步骤均可以使用本领域技术人员已知的各种软件来进行。例如比对步骤可以通过BFAST、BOWTIE、GNUmap、CloudBurst、GMAP/GSNAP、RzaerS、SpliceMap、TopHat、MIRA、Soap等软件来进行;拼接和统计步骤可以通过Cufflinks、ALEXA-seq等软件来进行;标准化步骤可以通过ERANGE、Myrna等软件来进行。比较常用的对RNAseq数据进行标准化的方法包括:RPKM(reads per kilobase of exon model per million mapped reads)、FPKM(fragments per kilobase of exon model per million mapped reads)和TPM(tag per million)。

[0089] 常用的RNAseq平台包括Illumina GA/HiSeq, SOLiD和Roche454。

[0090] qNPATM

[0091] 在一些实施方案中,使用不涉及RNA提取或分离的技术来进行RNA分析。一种此类技术为定量核酸酶保护测定,其是市售可得的,商品名为qNPATM(High Throughput Genomics, Inc., Tucson, AZ)。当待分析的肿瘤组织样品为FFPE材料的形式时,所述的技术是有利的。例如参见Roberts et al., 2007, Laboratory Investigation 87:979-997。

[0092] 蛋白质分析

[0093] 在其他的实施方案中,可以以蛋白质水平检测本发明生物标志物的表达。用来测量本发明生物标志物的蛋白质表达水平的方法包括酶联免疫吸附测试(ELISA)、IHC分析、蛋白质免疫印迹、免疫荧光等。

[0094] ELISA

[0095] 实施ELISA需要至少一种针对本发明生物标志物的抗体,即,检测抗体。以下以NRG1为例进行说明。将从待分析样品得到的NRG1蛋白质固定于固体支持物上,例如聚苯乙烯微量滴定板。这种固定是非特异性的结合,即,通过吸附在表面上。或者,可以通过特异性的结合来固定,即,在“夹心”ELISA中,由样品得到的NRG1与捕获抗体(不同于检测抗体的抗NRG1抗体)结合。在NRG1固定后,加入检测抗体,并且检测抗体与结合的NRG1形成络合物。检

测抗体以直接或间接的方式(例如通过特异性识别检测抗体的第二抗体)与酶连接。通常,在各步骤之间,使用温和的洗涤剂溶液洗涤具有结合的NRG1的微量滴定板。典型的ELISA方案还包括一个或多个封闭步骤,其涉及使用诸如牛血清白蛋白之类的非特异性结合蛋白质来封闭所不需要的与所述的滴定板非特异性结合的蛋白质试剂。在最终的洗涤步骤之后,通过加入合适的酶底物使滴定板显色,从而产生可视信号,其指示了样品中的NRG1的数量。所述的底物可以为例如发色底物或荧光底物。ELISA方法、试剂和设备是本领域公知的并且是市售可得的。

[0096] 免疫组织化学(IHC)

[0097] 可以通过免疫组织化学(IHC)或免疫荧光检验法(IF)测定(例如可视化)肿瘤组织样品或临床样本中的NRG1的存在和水平。由于临床样本通常以福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)块的形式保存,所以IHC和IF特别用于测量临床样本中的NRG1蛋白质。通过IHC或IF测定NRG1需要至少一种针对NRG1的抗体。适用于IHC和IF的抗NRG1抗体是市售可得的。例如,合适的抗体可以购自R&D Systems (Minneapolis, MN)、abcam (Cambridge, MA)、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) 或Novus Biologicals (Littleton, CO)。使用标准的技术,抗NRG1抗体可以用于检测由肿瘤得到的薄切片(例如5微米切片,包括FFPE切片和冷冻肿瘤切片)中NRG1蛋白质的存在情况。通常以这样的方式对肿瘤切片进行最初的处理,所述的方式能够恢复在收集和保存肿瘤材料的初始过程中所固定的蛋白质的抗原结构。然后封闭玻片,以防止抗NRG1检测抗体的非特异性结合。接着,通过抗NRG1抗体(一级抗体)与NRG1蛋白质的结合来检测NRG1蛋白质的存在情况。识别一级抗体并与一级抗体结合的检测抗体(二级抗体)与可检测的酶或荧光团连接。通常,在步骤之间使用非特异性的蛋白(例如牛血清白蛋白)洗涤和封闭肿瘤切片。如果检测抗体与可检测的酶连接,则使用合适的酶底物使玻片显色,从而产生可视的信号。如果检测抗体与荧光团连接,则通过使用荧光显微镜来观看玻片。样品可以使用苏木精复染。

[0098] 数据解释

[0099] 阈值表达水平可以用于解释本发明的生物标志物的表达水平。例如,在食管癌样品中,SDC2和/或GNZ的表达水平等于或低于其相应的阈值表达水平,则该食管癌对使用ERBB3抑制剂(例如ERBB3抗体)的处理是敏感的(响应的)。或者,当SDC2和/或GNZ的表达水平高于其相应的阈值表达水平时,则表明该食管癌对使用ERBB3抑制剂(例如ERBB3抗体)的处理是抗性的(不响应的)。对于NRG1、NCF2、NOXA1、PTGES和CARD6而言,如果它们中一个或多个的表达水平等于或高于其相应的阈值表达水平,则该食管癌对使用ERBB3抑制剂(例如ERBB3抗体)的处理是敏感的(响应的);相反,当它们中一个或多个的表达水平低于其相应的阈值表达水平时,则表明该食管癌对使用ERBB3抑制剂(例如ERBB3抗体)的处理是抗性的(不响应的)。

[0100] 阈值测定分析

[0101] 各个生物标志物的阈值表达水平可以通过阈值测定分析来确定。优选地,阈值测定分析包括受试者工作特征(ROC)曲线分析。ROC曲线分析是已经建立的统计学技术,该技术的应用在本领域的普通技术人员的知识范围内。对于ROC曲线分析的讨论,通常参见 Zweig等,1993,“Receiver operating characteristic (ROC) plots:a fundamental evaluation tool in clinical medicine,”Clin.Chem.39:561-577;和Pepe,2003,The

statistical evaluation of medical tests for classification and prediction, Oxford Press, New York.

[0102] 用于阈值测定分析的数据组包括：(a) 急性应答数据(应答的或非应答的)，和(b)由一组肿瘤得到的各肿瘤样品的本发明生物标志物的表达水平。在某些实施方案中，通过测量肿瘤的组织样品中生物标志物的表达水平来测定阈值表达水平，其中所述肿瘤得自以下人类患者：之前使用抗ERBB3抑制剂处理过并且显示出对抗ERBB3抑制剂是敏感的食管癌患者；以及之前使用抗ERBB3抑制剂处理过并且显示出对抗ERBB3抑制剂是抗性的食管癌患者。

[0103] 可以按照以下方式进行ROC曲线分析(以NRG1为例)。NRG1表达水平大于或等于阈值的任何样品都被分类为应答者(敏感的)，NRG1表达水平低于阈值的任何样品都被分类为非应答者(抗性的)。就由测试组样品得到的每一个NRG1表达水平而言，使用该表达水平作为阈值而将样品分类为“应答者”和“非应答者”(假设调用)。该方法通过将假设调用与用于数据组的实际应答数据相比较而能够计算各潜在阈值的TPR(y值)和FPR(x值)。然后通过使用TPR和FPR制作圆点图来构建ROC曲线。如果ROC曲线高于由(0,0)点至(1.0,0.5)点的斜线，则其显示NRG1测试结果与随机相比，是较好的测试结果。

[0104] ROC曲线可以用于鉴别最佳的阈值点。最佳的阈值点为这样的点：其在假阳性成本权衡假阴性成本之间产生最佳平衡。这些成本不必是相等的。在ROC空间中，在点x,y处的分类的平均预期成本(C)通过下式测定：

$$[0105] C = (1-p)\alpha*x + p*\beta*(1-y)$$

[0106] 其中： α =假阳性成本， β =错过阳性(假阴性)成本，以及p=阳性情况的比率。

[0107] 可以通过对 α 和 β 指定不同的值来不同地权衡假阳性和假阴性。例如，如果决定在应答组中包括更多的患者(代价是治疗更多非应答者的患者)，则可以赋予 α 更高的权重。在这种情况下，假设假阳性成本和假阴性成本是相同的(α 等于 β)。因此，在ROC空间中，在点x,y处的分类的平均预期成本为：

$$[0108] C' = (1-p)*x + p*(1-y)。$$

[0109] 在使用所有成对的假阳性和假阴性(x,y)后可以计算最小的C'。最佳阈值计算为在C'下(x,y)的值。

[0110] 通常，NRG1表达水平越高，则肿瘤越可能对ERBB3抑制剂是敏感的；而NRG1表达水平越低，则肿瘤越可能对ERBB3抑制剂是抗性的。上述阈值测定分析也可用于测定本发明的其他生物标志物的阈值表达水平。

[0111] 测试试剂盒

[0112] 此外，本发明还提供包括特定组分的诊断测试试剂盒，其用于实施本发明的方法。在实施诊断测定中，诊断测试试剂盒增加了方便、速度和可重复性。例如，在示例性基于qRT-PCR的实施方案中，基本的诊断测试试剂盒包括用于分析本发明生物标志物的表达的PCR引物。在其他的实施方案中，更复杂的测试试剂盒不仅包括PCR引物，而且还包括用于使用PCR技术来测量生物标志物表达水平的缓冲剂、反应物和详细的说明书。在一些实施方案中，所述的试剂盒除了RNA样品以外，还包括测试方案和测试所必须的所有消耗组分。

[0113] 在示例性的基于DNA微阵列的实施方案中，测试试剂盒包括被设计与特定的仪器一起使用的微流卡(阵列)。任选地，微流卡为定制装置，其特定设计用于测量本发明的生物

标志物。此类定制微流卡是市售可得的。例如，TaqMan为384孔微流卡(阵列)，其被设计与the Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA)一起使用。应该理解的是微流卡上可以可任选地包括其他的探针，以测量一种或多种其他基因的表达。可以包括此类其他的基因以起到对照或标准品的作用(例如用于数据的标准化)，或者除了上述以外，还可以是提供信息的。

[0114] 在一些实施方案中，测试试剂盒包括通过IHC测定本发明生物标志物含量的材料。例如，IHC试剂盒可以包括针对本发明生物标志物的一级抗体、以及与报告酶(例如辣根过氧化物酶)缀合的二级抗体。在一些实施方案中，使用缀合的聚合物替代二级抗体，其中所述的聚合物特异性地识别一级抗体。

具体实施方式

[0115] 通过以下实例进一步说明本发明。提供以下实例仅为了说明，不应该被解释为以任何方式限定了本发明的范围或内容。

[0116] 实施例1：食管癌异种移植生长对CAN017的应答

[0117] 按照以下方式评估食管癌对CAN017的应答。

[0118] 将从食管癌患者手术后取得的新鲜肿瘤组织分成小的肿瘤块，接种于免疫缺陷小鼠(BALB/c裸鼠)皮下，定期观察肿瘤生长状态。待肿瘤达到一定体积后，以人道主义方式处死小鼠，并将肿瘤接种至新的BALB/c裸鼠皮下。根据肿瘤生长状态绘制生长曲线，同时收集肿瘤样品、冻存并观察肿瘤组织、然后在需要用于下一代接种时将其复苏。经过数代优化后，成功建立食管癌异种移植模型。将该模型通过皮下接种至9-11周龄的雌性BALB/c裸鼠的右侧，接种模型的直径为2-3mm。

[0119] 每周两次使用游标卡尺对肿瘤进行测量。用下式对肿瘤体积进行计算：宽 \times 宽 \times 长/2。当肿瘤达到大约 158mm^3 时，将这些小鼠随机分为3组，每组10只小鼠。一组接受生理盐水，一组接受hIgG对照(20mg/kg体重)，另一组接受CAN017(20mg/kg体重)。每三天给药一次，通过腹膜内注射3周。记录肿瘤体积以及小鼠体重，每周两次。肿瘤生长表示为与生理盐水对照相比的抑制百分比。

[0120] 总之，使用CAN017处理20个食管癌异种移植模型(每个模型10只小鼠)，其统计结果如图12所示。CAN017对全部20个异种移植模型的平均抑制百分比为43.6%左右，而对照hIgG对全部20个异种移植模型的平均抑制百分比为-5.5%。统计学分析结果表示，与hIgG相比，CAN017对食管癌异种移植模型的抑制百分比达到显著水平($P<0.01$)。这些结果表明，CAN017能有效抑制食管癌肿瘤的生长。

[0121] 进一步分析单个食管癌异种移植模型对CAN017的应答，发现所述应答是变化的，其范围为-40%的肿瘤生长抑制(TGI)至肿瘤消退。“肿瘤消退”是指与在处理前、在评价期开始时肿瘤的尺寸相比，在评价期结束时，肿瘤更小。基于所达到的肿瘤生长抑制，鉴别应答者(定义为 $TGI>70\%$ 的那些)和非应答者(定义为 $TGI<70\%$ 的那些)。在所评价的20个模型中，发现9个为应答者，11个是非应答者(表1)。这些组能够鉴别CAN017应答的分子标志物。

[0122] 表1.CAN017对20个食管癌异种移植模型的肿瘤生长抑制的结果及其中NRG1的平均mRNA表达水平

模型编号	平均 TGI (%)	平均 NRG1	模型编号	平均 TGI (%)	平均 NRG1
[0123]	ES0026	7	3.0	ES0199	106
	ES0190	78	3.6	ES0191	116.6
	ES0136	-40	0.4	ES6824	15
	ES0141	74	2.9	ES0214	135
[0124]	ES0147	101	3.0	ES0215	-2
	ES0148	13	0.3	ES0218	25
	ES0184	72.5	4.0	ES0219	24
	ES0176	80	3.3	ES0630	-6
	ES2356	31	3.7	ES2263	1
	ES0042	109.4	3.8	ES2267	16

[0125] 实施例2:生物标志物NRG1的表达水平和阈值测定

[0126] 根据以下方案通过RNAseq来测定NRG1的表达水平:将肿瘤组织速冻后,用RNeasy Mini Kit (Qiagen, 编号74106) 提取并纯化RNA, 然后根据TruSeq™ RNA Sample Preparation Guide (Illumina, 编号RS-930-2001) 对纯化后的RNA进行预处理,之后根据制造商的说明在HiSeq X System (Illumina) 上进行测序,所得数据用FPKM进行标准化(以 $\log_2(FPKM+1)$ 值表示),获得NRG1的表达水平。

[0127] 在用CAN017处理之前测定20个食管癌异种移植模型(平均每个模型10只小鼠)中的NRG1表达水平值,每个模型的平均NRG1表达水平如表1所示。根据所得的NRG1表达水平值生成受试者工作特征(ROC)曲线,并测定用于预测CAN017肿瘤应答的NRG1的阈值表达水平。ROC分析结果表明,NRG1的阈值表达水平为2.05。即,高于该阈值表达水平则预测CAN017的肿瘤应答。实际上,NRG1的表达水平在测试的大多数异种移植模型中与CAN017的应答结果一致(即,等于或高于阈值表达水平2.05表示对CAN017产生应答;低于阈值表达水平2.05表示对CAN017不产生应答)。但在食管癌异种移植模型ES0026、ES2356和ES0215中,虽然NRG1的表达水平均高于阈值表达水平,但这三个异种移植模型实际上对CAN017不应答。由此可见,尽管NRG1作为生物标志物可以在一定程度上预测食管癌是否对使用ERBB3抗体的处理产生应答,但单独使用NRG1进行预测的有效性是有限的。

[0128] 实施例3:本发明的生物标志物的表达水平与CAN017应答之间的关系

[0129] 根据实施例2所述的RNAseq方法,分别测定20个食管癌异种移植模型(平均每个模型10只小鼠)中SDC2、GNZB、PTGES、NCF2、NOX1和CARD6的表达水平,并通过ROC曲线测定各生物标志物的阈值表达水平。各生物标志物的阈值表达水平结果如下: SDC2的阈值表达水平为4.9,GNZB的阈值表达水平为1.1,PTGES的阈值表达水平为2.75,NCF2的阈值表达水平为2.6,NOX1的阈值表达水平为2.7,CARD6的阈值表达水平为1.0。

[0130] 根据各模型中各生物标志物的平均表达水平来绘制在这些模型中的CAN017肿瘤生长抑制,并通过回归分析检测各生物标志物的表达水平与肿瘤生长抑制之间的相关性的显著性。结果如图13-18所示。

[0131] 具体地,如图13所示,在肿瘤生长抑制和SDC2表达之间观察到负相关。更具体而言,在使用CAN017处理后肿瘤生长抑制的增加与SDC2表达的降低相关。回归分析发现这种相关具有高度的统计学意义(显著性F<0.05)。图14表明,肿瘤生长抑制和GNAZ表达之间呈现负相关,即肿瘤生长抑制随GNAZ表达水平的增高而降低,并且这种相关性在统计学上也是显著的(显著性F<0.05)。

[0132] 图15-18则分别表明,肿瘤生长抑制和NCF2、NOXA1、PTGES、CARD6表达之间均呈现正相关,即肿瘤生长抑制随这些生物标志物表达水平的增高而增高,并且这种相关性在统计学上也是显著的(显著性F<0.05)。

[0133] 以上结果表明,本发明的生物标志物SDC2、GNAZ、PTGES、NCF2、NOX1和CARD6中每一个的表达水平与肿瘤生长抑制均显著相关。因此,这些生物标志物均可以用于预测肿瘤对CAN017处理是否应答。

[0134] 实施例4:食管癌异种移植模型对抗ERBB3的抗体CAN017的应答

[0135] 根据实施例3中所得的各生物标志物的阈值表达水平,选择预测会对CAN017产生应答的异种移植模型,同时选择预测对CAN017不产生应答的异种移植模型。具体地,对于阈值表达水平为4.9的SDC2,选择高表达的异种移植模型ES0195和ES0204(SDC2表达水平分别为5.8和5.2),并预测所述模型对CAN017不产生应答;同时选择低表达的异种移植模型ES0042和ES0190(SDC2表达水平分别为0.6和4.3),并预测所述模型对CAN017产生应答。类似地,对于阈值表达水平为1.1的GNAZ,选择高表达的异种移植模型ES0201和ES2411(GNAZ表达水平分别为1.3和1.9),并预测所述模型对CAN017不产生应答;同时选择低表达的异种移植模型ES0184和ES0199(GNAZ表达水平分别为0.2和0.5),并预测所述模型对CAN017产生应答。对于阈值表达水平为2.6的NCF2,选择高表达的异种移植模型ES0191和ES0176(NCF2表达水平分别为5.1和3.2),并预测所述模型对CAN017产生应答;同时选择低表达的异种移植模型ES0204和ES0026(NCF2表达水平分别为0.1和0.9),并预测所述模型对CAN017不产生应答。对于阈值表达水平为2.7的NOXA1,选择高表达的异种移植模型ES2311和ES0214(NOXA1表达水平分别为2.98和3.9),并预测所述模型对CAN017产生应答;同时选择低表达的异种移植模型ES11087和ES0148(NOXA1表达水平分别为2.14和1.6),并预测所述模型对CAN017不产生应答。对于阈值表达水平为2.75的PTGES,选择高表达的异种移植模型ES0159和ES0141(PTGES表达水平分别为5.69和3.9),并预测所述模型对CAN017产生应答;同时选择低表达的异种移植模型ES10084和ES0172(PTGES表达水平分别为0.55和1.7),并预测所述模型对CAN017不产生应答。对于阈值表达水平为1.0的CARD6,选择高表达的异种移植模型ES11069和ES0147(CARD6表达水平分别为4.01和1.1),并预测所述模型对CAN017产生应答;同时选择低表达的异种移植模型ES0212和ES0136(CARD6表达水平分别为0.09和0.1),并预测所述模型对CAN017不产生应答。

[0136] 按照实施例1所述的方法,用20mg/kg抗体CAN017处理上述选择的异种移植模型(每个模型5只小鼠),在3周后统计各模型的肿瘤生长抑制情况,结果如表3所示。

[0137] 表3. 使用抗体CAN017处理的异种移植模型的结果统计。

生物标志物	阈值	模型编号(表达水平)	TGI (%)
[0138]	SDC2	4.9	ES0195 (5.8) ES0204 (5.2)
			44.9 -16.5
[0139]	GNAZ	1.1	ES0042 (0.6) ES0190 (4.3)
			109.4 78.4
			ES0201 (1.3) ES2411 (1.9)
			72.5 ES0184 (0.2)
			105.9 ES0199 (0.5)
[0139]	NCF2	2.6	ES0191 (5.1) ES0176 (3.2)
			116.6 79.6
			-16.5 ES0204 (0.1)
			6.8 ES0026 (0.9)
			ES2311 (2.98) ES0214 (3.9)
[0139]	NOXA1	2.7	135.1 ES11087 (2.14)
			23.6 ES0148 (1.6)
			13.1
			ES0159 (5.69) ES0141 (3.9)
			95.3 74.4
[0139]	PTGES	2.75	46.4 ES10084 (0.55)
			44.6 ES0172 (1.7)
			77.8 ES11069 (4.01)
			110.6 ES0147 (1.1)
			32.6 ES0212 (0.09)
[0139]	CARD6	1.0	-40.5 ES0136 (0.1)

[0140] 以上数据表明,可以通过测量SDC2、GNAZ、PTGES、NCF2、NOX1和CARD6的表达水平来有效预测肿瘤对使用CAN017的处理的应答。

[0141] 实施例5:本发明的生物标志物与NRG1的组合使用

[0142] 本发明人还发现,将本发明的生物标志物和NRG1组合使用将能够进一步提高预测

肿瘤对CAN017处理是否应答的准确性。如上所述,单独的NRG1作为标志物不能准确预测食管癌异种移植模型ES0026、ES2356和ES0215的应答(即,虽然NRG1的表达水平高于阈值,但用CAN017处理后却不应答(TGI<70%))。本发明人测定了这三个模型中本发明的生物标志物的表达水平,结果如下表4所示。

[0143] 表4. 异种移植模型ES0026、ES2356和ES0215中生物标志物的表达水平。

[0144]

模型编号	SDC2	GNAZ	NCF2	NOXA1	PTGES	CARD6
ES0026	6.1	1.7	0.9	1.9	2.3	0.8
ES2356	7.7	1.4	2.4	1.8	3.1	3.3
ES0215	8.1	2.4	2.5	0.4	1.8	2.1

[0145] 以上数据显示,这三个模型中,SDC2和GNAZ的表达水平均高于其相应的阈值表达水平,NCF2和NOXA1的表达水平均低于其相应的阈值表达水平,表明当用这些生物标志物来预测时,异种移植模型ES0026、ES2356和ES0215将被预测为对CAN017处理不产生应答。换言之,当NRG1高于其阈值表达水平时,测量本发明的生物标志物的表达水平可以进一步提高预测肿瘤对CAN017处理是否应答的准确性(例如,在异种移植模型ES0026、ES2356和ES0215的情况下,考虑本发明的生物标志物可以准确地预测其对CAN017处理不产生应答)。

[0146] 本发明人还发现,当同时使用至少一个与TGI正相关的生物标志物和一个与TGI负相关的生物标志物时,预测准确率将进一步提高。在20个食管癌异种移植模型中,单独用NRG1作为标志物预测的准确率为85%,单独用GNAZ作为标志物预测的准确率为90%。但同时使用NRG1和GNAZ作为标志物进行预测,准确率达到95%(图19)。

[0147] 实施例6:食管癌异种移植模型对抗ERBB3的抗体11G01的应答

[0148] 为了证实对其他抗ERBB3抗体的应答的预测方法,使用作用机制不同于CAN017的抗ERBB3抗体(抗体11G01)处理实施例4中所选择的12个食管癌异种移植模型。具体地,使用20mg/kg抗体11G01按照实施例1所述的方式处理选择的12个食管癌异种移植模型,并在3周后统计各模型的肿瘤生长抑制百分比,结果与实施例4类似(即根据各生物标志物预测的肿瘤对抗体的应答情况与实际观察到的肿瘤对抗体的应答情况一致,数据未显示)。这表明本发明的生物标志物可以有效预测食管癌对使用作用机制不同于CAN017的其他抗ERBB3抗体的处理的应答。

[0149] 通过引用进行结合

[0150] 出于所有的目的,在此所提到的专利文件和科学论文中的每一篇的完整披露内容均通过引用结合在此。

[0151] 等效物

[0152] 可以用其他的具体形式实施本发明而不背离本发明的精神或本质特征。因此,上述的实施方案必须被认为在所有方面是用作说明的而不是对在此所说明的本发明进行限制。因此,本发明的范围是由所附的权利要求书而不是通过上述的说明来指明的,并且在该权利要求书的等效性的含义和范围内的所有变化均旨在涵盖于其中。

<110> 北海康成（北京）医药科技有限公司

<120> 预测食管癌对抗 ERBB3 抗体治疗的应答的方法和试剂盒

<130> CAN-002

<160> 62

<170> PatentInversion 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 1

[0001] Asp Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 2

Thr Ile Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 3

Glu Trp Gly Asp Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

[0002] <400> 4

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 5

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 6

Leu Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 7

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

[0003] 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Trp Gly Asp Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0004]

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 9
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp

1	5	10	15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly			
20	25	30	
Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly			
35	40	45	
Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly			
50	55	60	
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Thr			
65	70	75	80
Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn			
85	90	95	
Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
100	105	110	
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Trp Gly Asp Tyr Asp Gly Phe			
[0005]	115	120	125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr			
130	135	140	
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser			
145	150	155	160
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu			
165	170	175	
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			
180	185	190	
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			
195	200	205	
?			
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
210	215	220	
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu			
225	230	235	240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
245	250	255
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
260	265	270
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
275	280	285
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
290	295	300
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
305	310	315
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
325	330	335
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
340	345	350
[0006] Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
355	360	365
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
370	375	380
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
385	390	395
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
405	410	415
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
420	425	430
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
435	440	445
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
450	455	460
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
465	470	

<210> 10
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 10

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

[0007] 50 55 60

Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val

65 65 70 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln

100 105 110

Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 11
Ser His Trp Leu His
1 5

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 12
Val Leu Asp Pro Ser Asp Phe Tyr Ser Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 13

Gly Leu Leu Ser Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

[0009] <223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 14

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 15

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 16

Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 17

[0010] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His

20 25 30

Trp Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Leu Asp Pro Ser Asp Phe Tyr Ser Asn Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

?

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Leu Ser Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 18
 Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

[0011]

Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser Tyr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 19

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Val Leu Leu Val Ser Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg

20 25 30

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

[0012] Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Ser Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro
130 135 140Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser
145 150 155 160Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Val Thr
195 200 205Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala
210 215 220

His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp

225	230	235	240
Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val			
245	250	255	
Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr			
260	265	270	
Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu			
275	280	285	
Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln			
290	295	300	
Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser			
305	310	315	320
Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys			
325	330	335	
Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
[0013]	340	345	350
Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro			
355	360	365	
Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met			
370	375	380	
Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn			
385	390	395	400
Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr			
405	410	415	
Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn			
420	425	430	
Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu			
435	440	445	
His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys			
450	455	460	

<210> 20

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 20

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1

5

10

15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val

20

25

30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile

35

40

45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

[0014]

50

55

60

Gly Gln Ser Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

65

70

75

80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85

90

95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

100

105

110

Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu

115

120

125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

130

135

140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu

145

150

155

160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly

165

170

175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190

 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205

 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220

 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

[0015] <400> 21
 Thr Phe Gly Leu Ser Val Gly
 1 5

<210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 22
 His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 23

Ile Gly Ala Asp Ala Leu Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 24

[0016] Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 25

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 26

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 27

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Arg Pro Ser Gln

[0017] 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe

20 25 30

Gly Leu Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gly Ala Asp Ala Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 28

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

[0018]

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 29

<211> 475

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 29

Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr

1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Arg			
20	25	30	
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu			
35	40	45	
Ser Thr Phe Gly Leu Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys			
50	55	60	
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr			
65	70	75	80
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys			
85	90	95	
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala			
100	105	110	
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Ala Asp Ala Leu Pro Phe Asp Tyr			
115	120	125	
[0019] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro			
130	135	140	
Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser			
145	150	155	160
Ser Val Thr Ser Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val			
165	170	175	
Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe			
180	185	190	
Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Val Thr			
195	200	205	
Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala			
210	215	220	
His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly			
225	230	235	240
Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys			

245	250	255
-----	-----	-----

Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

260	265	270
-----	-----	-----

Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr

275	280	285
-----	-----	-----

Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser

290	295	300
-----	-----	-----

Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile

325	330	335
-----	-----	-----

Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn

340	345	350
-----	-----	-----

Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys

[0020]	355	360	365
--------	-----	-----	-----

Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu

370	375	380
-----	-----	-----

Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu

405	410	415
-----	-----	-----

Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr

420	425	430
-----	-----	-----

Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr

435	440	445
-----	-----	-----

Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr

450	455	460
-----	-----	-----

Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys

465	470	475
-----	-----	-----

<210> 30

<211> 239

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 30

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro

1

5

10

15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Ala Pro Ser Val Pro

20

25

30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser

35

40

45

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg

[0021]

50

55

60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala

65

70

75

80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe

85

90

95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

100

105

110

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys

115

120

125

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro

130

135

140

Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe

145

150

155

160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp

165

170

175

Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp

180 185

190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys

195 200

205

Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys

210 215

220

Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

225 230

235

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

[0022]

<400> 31

Asp His Ile Ile His

1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 32

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

1 5

10

15

Gly

<210> 33

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 33
Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

[0023]
<400> 34
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 35
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 36
<211> 117
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

20	25	30
----	----	----

Ile Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

[0024]

Met Gln Val Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100	105	110
-----	-----	-----

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 37

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Gln Ala Ser	Ile Ser	Cys Arg	Ser Ser	Gln Ser	Ile Val	His Ser
20			25		30	

Ile Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38

<211> 460

[0025] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 38

Met Glu Trp Ser Trp Val Ser Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys

20	25	30
----	----	----

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe

35	40	45
----	----	----

Thr Asp His Ile Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu

50	55	60
----	----	----

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Tyr Ile Lys Tyr Asn

65	70	75	80
----	----	----	----

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 85 90 95

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 100 105 110

Thr Ala Tyr Met Gln Val Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
 130 135 140

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

[0026] Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 210 215 220

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 225 230 235 240

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 275 280 285

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 290 295 300

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro

305	310	315	320
Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val			
325	330	335	
Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr			
340	345	350	
Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys			
355	360	365	
Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp			
370	375	380	
Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro			
385	390	395	400
Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser			
405	410	415	
Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala			
420	425	430	
[0027]			
Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His			
435	440	445	
His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys			
450	455	460	
<210> 39			
<211> 238			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"			
<400> 39			
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala			
1	5	10	15
Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val			

20

25

30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile

35

40

45

Val His Ser Ile Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50

55

60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

65

70

75

80

Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85

90

95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

100

105

110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu

115

120

125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

130

135

140

[0028]

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu

145

150

155

160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly

165

170

175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser

180

185

190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp

195

200

205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr

210

215

220

Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

225

230

235

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 40

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

[0029] <400> 41

Met Ile Asp Pro Ser Asp Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 42

Asn Tyr Ser Gly Asp Tyr

1 5

<210> 43

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 43

Gln Val Gln Leu Leu Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

[0030] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Tyr Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

Val Ser Ser

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 44

Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser	Ile Ser	Cys Arg	Ser Ser	Gln Ser	Ile Val	His Ser
20			25		30	
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser						
35	40		45			
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro						
50	55		60			
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile						
65	70	75		80		
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly						
85	90		95			
Ser Tyr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys						
100	105		110			
<210> 45						
<211> 458						
[0031] <212> PRT						
<213> 人工序列						
<220>						
<221> 来源						
<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"						
<400> 45						
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Val Leu Leu Val Ser Thr Ala Thr Cys						
1	5	10		15		
Val His Ser Gln Val Gln Leu Leu Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg						
20	25		30			
Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe						
35	40	45				
Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu						
50	55	60				
Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Val Tyr Thr Asn Tyr Asn						
65	70	75		80		

Pro Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser			
85	90	95	
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
115	120	125	
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro			
130	135	140	
Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly			
145	150	155	160
Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn			
165	170	175	
Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
180	185	190	
[0032] Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr			
195	200	205	
Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser			
210	215	220	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro			
225	230	235	240
Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro			
245	250	255	
Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys			
260	265	270	
Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp			
275	280	285	
Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu			
290	295	300	
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met			

305	310	315	320
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser			
325	330		335
Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly			
340	345		350
Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln			
355	360		365
Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe			
370	375		380
Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu			
385	390	395	400
Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe			
405	410		415
Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn			
420	425		430
[0033] Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr			
435	440		445
Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys			
450	455		
<210> 46			
<211> 238			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"			
<400> 46			
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala			
1	5	10	15
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val			

20	25	30
----	----	----

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile

35	40	45
----	----	----

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50	55	60
----	----	----

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85	90	95
----	----	----

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

100	105	110
-----	-----	-----

Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

115	120	125
-----	-----	-----

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

130	135	140
-----	-----	-----

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly

165	170	175
-----	-----	-----

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser

180	185	190
-----	-----	-----

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp

195	200	205
-----	-----	-----

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr

210	215	220
-----	-----	-----

Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

225	230	235
-----	-----	-----

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 47

Thr Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

[0035] <400> 48

Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 49

Gly Arg Asp Gly Tyr Gln Val Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 50

Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn

1 5 10

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

[0036] <400> 51

Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 52

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 53

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 53

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ala Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Arg Ala Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Arg Asp Gly Tyr Gln Val Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 54

Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly

1 5 10 15

Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 55

<211> 464

[0038] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 55

Met Gly Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys

20 25 30

Pro Gly Glu Ala Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Arg Ala Leu

50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala

65 70 75 80

	Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser		
	85	90	95
	Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr		
	100	105	110
	Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Arg Asp Gly Tyr Gln Val Ala Trp Phe Ala		
	115	120	125
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr		
	130	135	140
	Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn		
	145	150	155
	Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro		
	165	170	175
	Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr		
	180	185	190
[0039]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val		
	195	200	205
	Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val		
	210	215	220
	Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg		
	225	230	235
	Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser		
	245	250	255
	Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu		
	260	265	270
	Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro		
	275	280	285
	Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala		
	290	295	300
	Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val		
	305	310	315
			320

Met Ala Ile Gly Asp Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp
 35 40 45

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ile Phe Thr Ile Glu
 85 90 95

Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp
 100 105 110

Asn Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140

[0041] Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 57

Asn Tyr Trp Met His

1 5

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 58

[0042] Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 59

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 59

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

85

90

95

Ser Tyr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 61

<211> 458

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 61

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Val Leu Leu Val Ser Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg

20 25 30

[0044]

Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asn Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Pro Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro

130 135 140

Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly

145	150	155	160
Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn			
165	170	175	
Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
180	185	190	
Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr			
195	200	205	
Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser			
210	215	220	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro			
225	230	235	240
Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro			
245	250	255	
Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys			
[0045]	260	265	270
Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp			
275	280	285	
Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu			
290	295	300	
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met			
305	310	315	320
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser			
325	330	335	
Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly			
340	345	350	
Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln			
355	360	365	
Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe			
370	375	380	

Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
 385 390 395 400

Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe
 405 410 415

Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
 420 425 430

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 435 440 445

Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 62
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

[0046] <220>
<221> 来源
<223> /备注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 62
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
145 150 155 160

[0047] Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
195 200 205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
210 215 220

Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

重链CDR氨基酸比对

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
CAN017	DY--AMS (SEQ ID NO: 1)	TISDGGTYYYPDSVKG (SEQ ID NO: 3)	EWG--DYDGFDFY (SEQ ID NO: 2)
04D01	SH--WLH (SEQ ID NO: 11)	VLDPSDFYSNNQNQNFKG (SEQ ID NO: 12)	GLL-SGDIAMDY (SEQ ID NO: 13)
09D03	TFGLSVG (SEQ ID NO: 21)	HIWWDDD-KYNNPALKS (SEQ ID NO: 22)	IG--ADALPFDY (SEQ ID NO: 23)
11G01	DH--I1H (SEQ ID NO: 31)	YIYPRDGYIKYNEKFKG (SEQ ID NO: 32)	G---YYIAMDY (SEQ ID NO: 33)
12A07	SY--WMH (SEQ ID NO: 40)	MIDPSDVYTNYNPKFKG (SEQ ID NO: 41)	-----NYSGDY (SEQ ID NO: 42)
18H02	TY--GMS (SEQ ID NO: 47)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO: 48)	GRDGYQVAVFAY (SEQ ID NO: 49)
22A02	NY--WMH (SEQ ID NO: 57)	MIDPSDSYTNYNPKFKG (SEQ ID NO: 58)	-----NYSGDY (SEQ ID NO: 42)

图1

完整的重链可变区氨基酸比对

抗体	CDR1		CDR2		CDR3	
	氨基酸	序列	氨基酸	序列	氨基酸	序列
CAN017	(1)	QVQLVESGGGLVKPGGLSLRLSCAASGFTFS	CDR1	(1)	WIRQAPGKCLEWVSTISDGGTYYTYPDSVKGRF	
04D01	(1)	QVQLQQPGAEELVRPGTSVKLSCASKASGYTFT	CDR2	(1)	SH--WLHWWVKQRPGQGLEWIGULPDSDFYNNQNFKGKA	
09D03	(1)	QVTIKESGPGILRPSQTLSLTCSFGSFLSTFG		(1)	LAHIWWDDDK-YYNPALKSRL	
11G01	(1)	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKVSGYTFIDH		(1)	IIHWWMKRPEEQGLEWIGYIYPRDGYIYKNEKFKGKA	
12A07	(1)	QVQLLQQPGAEELVRPGTSVKLSCAKTSGYTFSSY		(1)	WIGHWWVKQRPGQGLEWIGMIDPSDVYTYNNPKEFKGKA	
18H02	(1)	QIQLVQSGPEIJKPGEAVKISCKSSGYTFITY		(1)	GMSWWVKQAPGRALKWMGWINTYSGVPTYADDFFKGRF	
22A02	(1)	QVQLQQPGAEELVRPGTSVKLSCASKASGYTFINY		(1)	WMEWWVKQRPGQGLEWIGMIDPSDSYTNYNNPKEFKGKA	

图2

轻 (Kappa) 链CDR氨基酸比对

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
CAN017	RASQEISG----YLS (SEQ ID NO: 4)	AASTLDS (SEQ ID NO: 5)	LQYDSYPYT (SEQ ID NO: 6)
04D01	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 14)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 15)	FQGSYVPWT (SEQ ID NO: 16)
09D03	RSSKSLLHNSNGNTLY (SEQ ID NO: 24)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 25)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 26)
11G01	RSSQSIVHSIGNTYLE (SEQ ID NO: 34)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 15)	FQGSHVPFT (SEQ ID NO: 35)
12A07	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 14)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 15)	FQGSYVPWT (SEQ ID NO: 16)
18H02	ITSTDIDDD----MN (SEQ ID NO: 50)	EGNTLRP (SEQ ID NO: 51)	LQSDNLPYT (SEQ ID NO: 52)
22A02	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 14)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 15)	FQGSYVPWT (SEQ ID NO: 16)

图3

完整的轻 (Kappa) 链可变区氨基酸比对

抗体	CDR1		CDR2	
	SEQ	ID NO:	SEQ	ID NO:
CAN017	(1) DIQMTQSPSSLISASVGDRVTITCRASQEISG-----YL	WYQQKPGKAPKRLIYRASTILDGVPSRFSGS		
04D01	(1) DVLMQTQIPLSLPVSLGDQASIICRSQSIVHNSNGNTYLEWY	LQKPGQSPKSLIYKVSNRFSGVPDFSGS		
09D03	(1) DIVLTOTAPSVPVTPGESVSICRSKSLLHNSNGNTYLEWY	LQKPGQSPKLLIYKVSNRLASGVPDFSGS		
11G01	(1) DVLMQTQPLSLPVSLGDQASIICRSQSIVHNSNGNTYLEWY	LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPERFSGS		
12A07	(1) DVLMQTQIPLSLPVSLGDQASIICRSQSIVHNSNGNTYLEWY	LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFSGS		
18H02	(1) ETTVTOQSPASLSMAIGDRVTIRCLISTDDDD-----M	NWFQOKPGEPKLLISEGNTLRFGVPSRFSGS		
22A02	(1) DVLMQTQPLSLPVSLGDQASIICRSQSIVHNSNGNTYLEWY	LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFSGS		
CAN017	CDR3			
	SEQ	ID NO:	SEQ	ID NO:
04D01	(66) GSGTEFTLTISSLOPEDATYCYCLOYDSYPYTFEGQGTKLEIK	(SEQ ID NO: 8)		
09D03	(71) GSGTDFTLKISRVEAEGLGVYYCFQGSYYVPWTFGGGTKEIK	(SEQ ID NO: 18)		
11G01	(71) GSGTAFTLRIISRVEAEVGVYYCMQHLEYPTFGSGTKLEIK	(SEQ ID NO: 28)		
12A07	(71) GSGTDFTLKISRVEAEGLGVYYCFQGSYYVPWTFGGGTKEIK	(SEQ ID NO: 37)		
18H02	(66) GYGTDFIFTIENMLSEDVADYCLQSDNLPYTFGGGTKEIK	(SEQ ID NO: 44)		
22A02	(71) GSGTDFTLKISRVEAEGLGVYYCFQGSYYVPWTFGGGTKEIK	(SEQ ID NO: 54)		
			(SEQ ID NO: 60)	

图4

(A)

```

1 mdmrvpaqll gllllwirlga rcqvqlvesg gglvkgpggs1 rlscaasgft fsdyamswir
61 qapgkleww stisdggtt yypdsvkgrf tisrdnakns lylqmnslra edtavyycar
121 ewgdydgfdy wgggtlvts sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv kdyfpepvttv
181 swnsgaltsq vhtfpavlqs sglyalssvv tvpssslgtq tyicvnvhkp snkvdkrve
241 pkscdkthtc ppcpapelg gpsvflfppk pkdtlmisrt pevtcvvdv shedpevkfn
301 wyvvdgvevhn aktkpreeq nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk alpapietki
361 skakggprep qvylpppsre emtknqvslt clvkgfypsd iavewesnq pennykttpp
421 vldsdgsffl yskltvdksr wgggnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg k
(SEQ ID NO: 9)

```

(B)

```

1 mdmrvpaqll gllllwirlga rcdiqmtqsp ssasasvgdr vtitcrasqe isgylswyqq
61 kpgkapkrli yaastldsgv psrfsgsgsg teftltissl qpedfatyycc lqydsypytf
121 gqgtkleikr tvaapsvfif ppsdeqlksq tasvvclnn fypreakvgw kvdnalqsgn
181 sqesvteqds kdstysslst ltlskadyek hkvyacevth qglsspvtks fnrgec
(SEQ ID NO: 10)

```

图5

(A)

```

1 mgwsciivil1 vstatgvhsq vqlqqpgael vrpgtavkls ckasgytfts hwlhwvkqrp
61 ggglewigvl dpsdfysyn qnfkgkatlt vdtssstaym qlsalseds avyycargll
121 sgdyamdywg qgtsvtvssa ktpavlypl apgsaaqtns mvtlgclvkg yfpepvtvtw
181 nsgslssgvh tfpavqlqsd1 ytlassvtp sstwpsqtv cnvahpasst kvdkkivprd
241 cgckpcictv pevssvfifp pkpkdvltit ltpkvtcvvv diskddpevq fswfvddvev
301 htaqtqpree qfnstfrsrs elpimhgwdl ngkefkcrvn saafpapiek tisktkgrpk
361 apqvytippp keqmakdkvs ltcmitdffp editvewqwn gqpaenyknt qpimtdgsy
421 fyvsklnvqk snweagntft csvlheqlhn httekslshs pgk
(SEQ ID NO: 19)

```

(B)

```

1 mklpvrl1l1 mfwipasssd vlmtpiplsl pvsldqgasi scrssqsivh sngntylewly
61 lqkpgqspks liykvsnrfv gvpdrfsgsg sgtdftlkis rveaedlgvy ycfqgsyvpw
121 tfgggtklei kradaaptvs ifppsseqlt sggasvvcfl nnfyprdinr kwkidgserq
181 ngvlinswtdq dskdstyams stltlkdey erhnsytcea thktstspiv ksfnrnec
(SEQ ID NO: 20)

```

图6

(A)

```

1   mgrltssfl1 livpayvlsq vt1kespgi 1rpsqtlslt csfsqfslst fglsgwirq
61  psgkglewla hiwwddkyy npalksrlti skdtksnqvf lkianvtdad tatyycarig
121 adalpfidywg qggtltvssa ktppsvypl apgcgdttg svtsgclvkg yfpepvttw
181 nsgslsssvh tfpallqsgl ytmissvtp sstwpsqtv csvahpasst tvdklepsg
241 pistinpcpp ckechkcrap nleggpsvfi fppnikdvlm isltpkvtcv vvdvseddpd
301 vqiswfvnnv evhtaqtqh redynstirv vstlpighqd wmsgkefkck vnnkdipsp
361 ertiskikgl vrappqvtlp ppaeqlsrkd vsltclvvgf npgdisvewt snghteeny
421 dtapvldsdg syifiysklnm ktskwektds fscnvrhegl knyyylktis rpgk
(SEQ ID NO: 29)

```

(B)

```

1   mrclaeflgl lvlwipgaig divltqtaaps vpvtptgesvs iscrssksll hengntlylw
61  flqrpgqspq lliyrmnla sgvpdrfsgs gsgtaftlri srveaedvgv yycmqhleyp
121 tfqsgtktle ikradaaptv sifppsseql tsoggasvvcf lnnfyprdin vkwkidgser
181 qngvlnswtd qdsdkdstysm sttlitkde yerhnsytcea athktstspiv vksfnrnec
(SEQ ID NO: 30)

```

图7

(A)

```

1   mewswvalff lsvttgvhsq vqlqqsdal vkgasvkis ckvsgytftd hiihwmkqrp
61  eqglewigyi yprdgyikyn ekfkgkatlt adkssstaym qvnsltseeds avyfcargyy
121 yamdywgqqt svtvssaktt ppsvyplapg saaqtnsmvt lgclvkgyp epvtvtnsg
181 slssgvhtfp avlqsdlytl sssvtpsst wpsqtvtcnv ahpastkvd kkivprdcqc
241 kpcictvpev ssvfifppkp kdvltitltp kvtcvvvdis kddpevqfsw fvdddevhta
301 qtqpreeqfn stfrsveelp imhqdwlnk efkcrvnsaa fpapiektis ktkgrpkapq
361 vytippkqeq makdkvsllc mitdffpedi tveqwngqp aenykntqpi mdtdgsyfvy
421 sklnvqksnw eagntftcsv lheglhnht ekslshspgk
(SEQ ID NO: 38)

```

(B)

```

1   mklpvzllvl mfwipasrsd vlmqtpls1 pvsldqasi scrssqsivh signtylewy
61  lqkpgqspkl liykvsnrfs gvperfsgsg sgtdftlkis rveaedlgvy ycfqgshvpf
121 tfgsgtktlei kradaaptv ifppsseqlt sggasvvcf1 nnfyprdin vkwkidgserq
181 ngvlnswtdq dskdstysms stlitkdey erhnsytcea thktstspiv ksfnrnec
(SEQ ID NO: 39)

```

图8

(A)

```

1 mgwsciivil1 vstatcvhsq vqlipgael vrpgrtsvkls cktsgytss ywmhwvkqrp
61 ggglewigmi dpscovytnyn pkfkkgatlt vdtssastaym qlsslseeds avyycarnys
121 gdywgqgttl tvssakttpp svyplapgsa aqtnsmvtig clvkgyppep vtvtwnsgsl
181 ssgvhtfpav lqsdlytlss svtpssstwp sqtvtnvah passtkvdkk ivprdcgckp
241 cictvpevss vfifppkpkd vltitltpkv tcvvvdiskd opevqfswfv ddvevhtaqt
301 qpreeqfnat frsvselpm hqdwlngkef kcrvnsaafp apiektiskt kgrpkapqvy
361 tipppkeqma kdkvsltcmi tdfppedity ewqwngqpae nykntqplmd tdgsyfvysk
421 lnvqksnwea gntftcsvlh eglhnhtek slshspgk
(SEQ ID NO: 45)

```

(B)

```

1 mklpvrl1vl mfwipasssd vlmtqipsls1 pvsldqasaki scrssqsivh sngntylewy
61 lqkpgqspkl liykvsnrfs qvpdrfsgsg sgtdftlkis rveaedlgvy ycfqgssyvpw
121 tfgggtklei kradaaptvs ifppsseqlt sggasvvcfl nnfyprdinr kwkidgserq
181 ngvlvnswtdq dskdstsysms stlttkdey erhnsytcea thktstspiv ksfnrnec
(SEQ ID NO: 46)

```

图9

(A)

```

1 mgwlwnllf1 maaaqsaqaq iqlvqsgpel kkpgeavkis ckasgytf1t ygmswvkqap
61 gralkwmqwi ntysgvptya ddfkgrfaf1 lessastayl qinnlknedt atyfcargrd
121 gyqvawfayw gggtlvtvsa akttppsvyp lapgsaaqtn smvtlgclvk gyfpepvtvt
181 whnsgslssgv htfpav1qsd lytlsssvtv psstwpsqtv tcnvahpass tkvdkkivpr
241 dcqckpcict vpevssavfif ppkpkd1viti tltpkvtcvv vdiskddpev qfswfvddve
301 vhtaqtqpre eqfnstfre1v selpmhbqdw lmgkefkcrv nsaaafapie ktisktkgrp
361 kapqvytipp pkeqmakdkv sltcmitdff peditvewqw ngqpaenykn tqplimtdgs
421 yfvysklnvq ksnweagntf tcs1vheglh nhhtekslsh spgk
(SEQ ID NO: 55)

```

(B)

```

1 m1slall1l1 llcvdsra ettvtqspas lsmaigdkvt ircitstdid ddmnwfqqk
61 geppkllise gntlrpgvps rfsgsgygt1d fiftienmls edvadyyclq sdnlpytf1gg
121 g1kleikrad aaptvs1fpp sseq1tsgga svvcflnnfy prdinvkwi dgserqngv1
181 nswtdqdskd stysmsstlt ltkdeyerhn sytceathkt stspivksfn rnec
(SEQ ID NO: 56)

```

图10

(A)

```

1 mgwscivill vstatgvhsq vqlqqpgael vrpgrtsvkls ckasgytftn ywmhwvkqrp
61 gqglewigmi dpsdsytnyn pkfkkgatlt vdtssstaym qlssltseeds avyyccarnys
121 gdywgggttl tvssakttpp svyplapgsa aqtnsmvtlg clvkgyfpep vtvtnsgsl
181 ssgvhtfpav lqsdlytiis svtpasstwp sqvtcnvah passtkvdkk ivprdgcckp
241 cictvpevss vfifppkpkd vltitltpkv tcvvvdiskd dpevqfsfwv ddvevhtaqt
301 qpreeqfnst frsvselpim hqdwlngkef kcrvnsaafp apiektiskt kgrpkapqvy
361 tipppkeqma kdkvsltcmi tdfppeditv ewqwnqgpae nykntqpimd tdgsyfvysk
421 lnvqkanwea gntftcsvlh eglhnhhtek slshspgk
(SEQ ID NO: 61)

```

(B)

```

1 mklpvvrlvl mfwipasssd vlmtqtplsl pvsldqasi scrssqsivh sngntylewy
61 lqkpgqspkl liykvsnrfs gvpdrfsgsg sgtdftlkis rveaedlgvy ycfqggsyvpw
121 tfgggtklei kradaaptvs ifppsseqlt sggasvvcfl nnfyprdinr kwkidgserq
181 ngvlnswtdq dskdstysms stltlkdey erhnsytcea thktstspiv ksfnrnec
(SEQ ID NO: 62)

```

图11

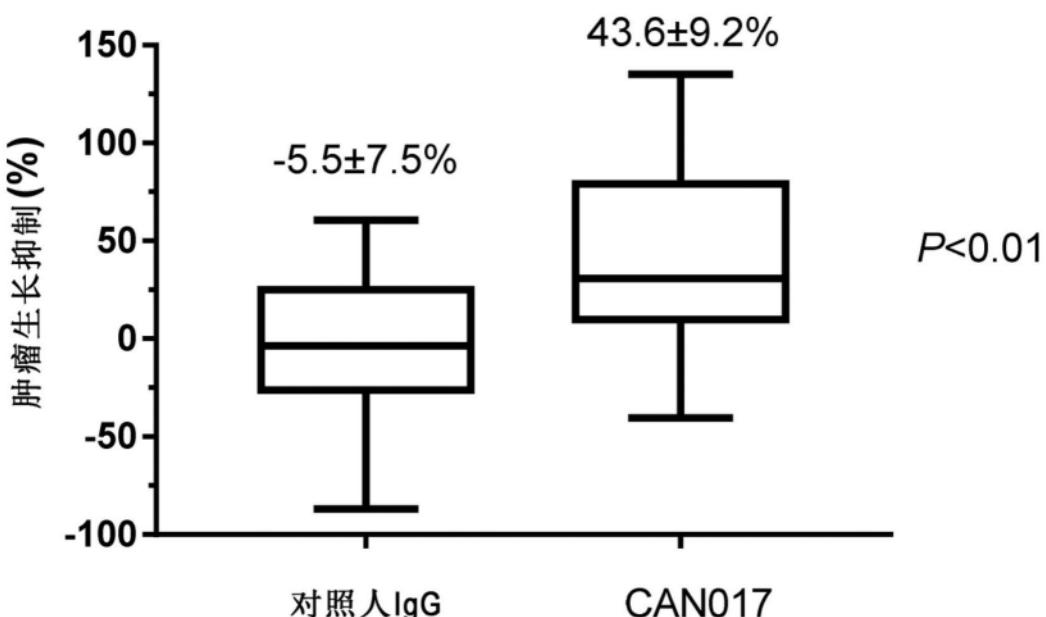
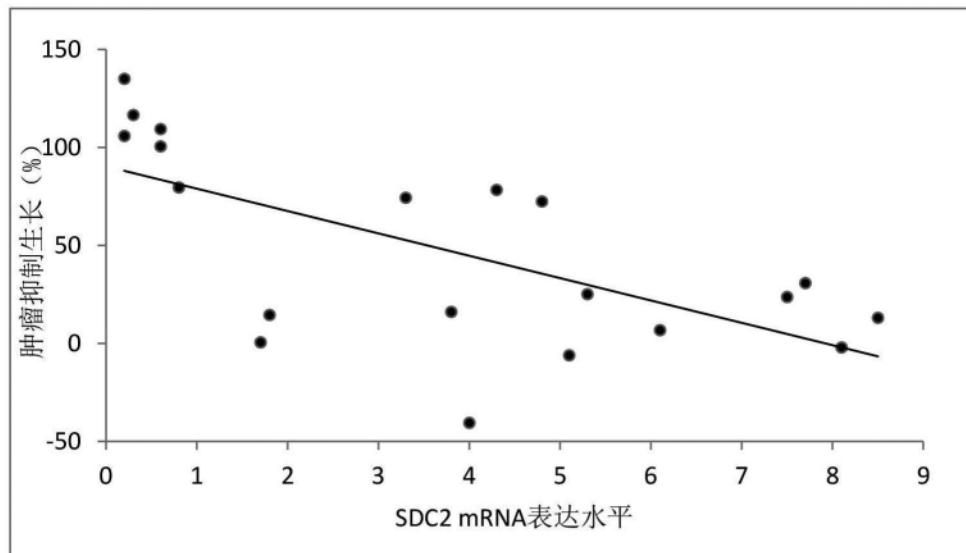
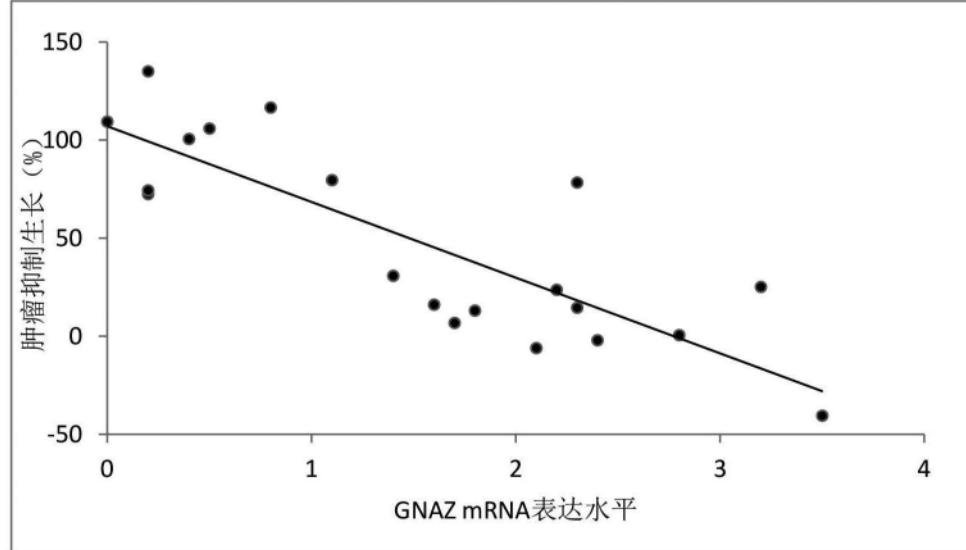


图12



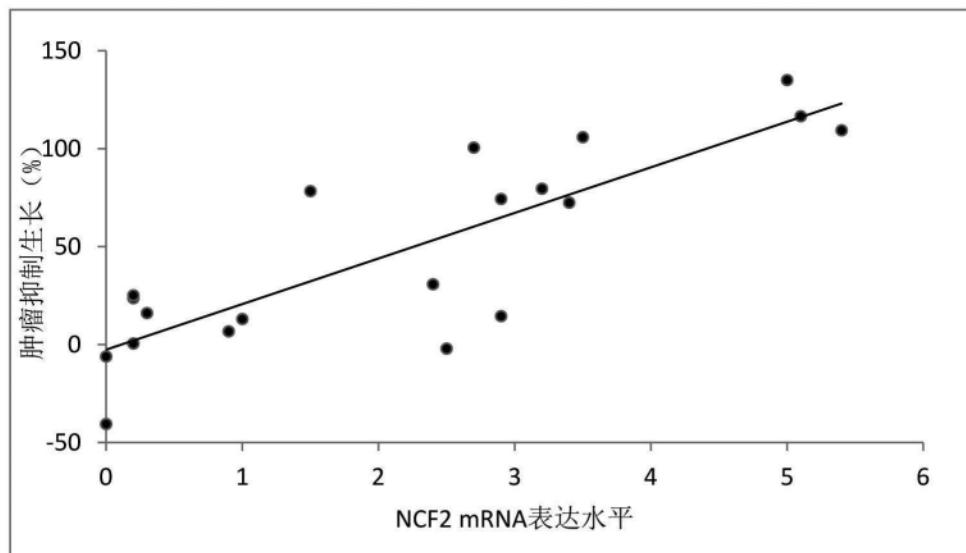
方差分析					
	df	SS	MS	F	显著性F
回归分析	1	20328.17	20328.17	13.5412	0.001714
残差	18	27021.76	1501.209		
总计	19	47349.93			

图13



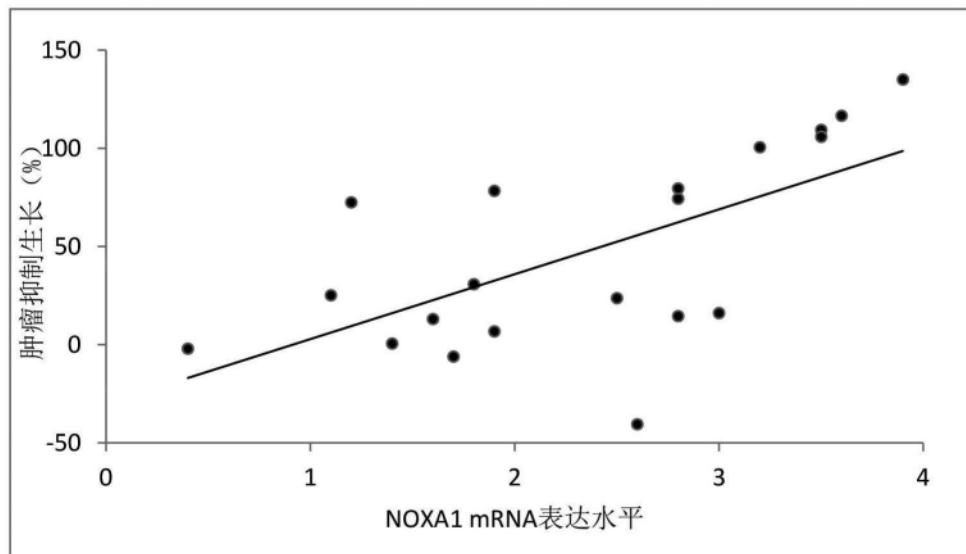
方差分析					
	df	SS	MS	F	显著性F
回归分析	1	32491.89	32491.89	39.3628	6.46E-06
残差	18	14858.04	825.4466		
总计	19	47349.93			

图14



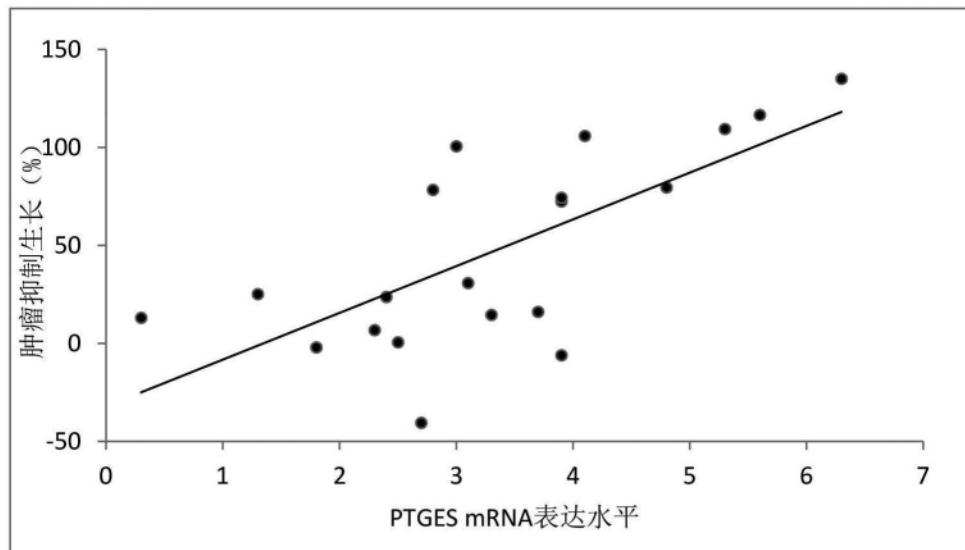
方差分析					
	df	SS	MS	F	显著性F
回归分析	1	32924.8	32924.8	41.08429	4.92E-06
残差	18	14425.13	801.3963		
总计	19	47349.93			

图15



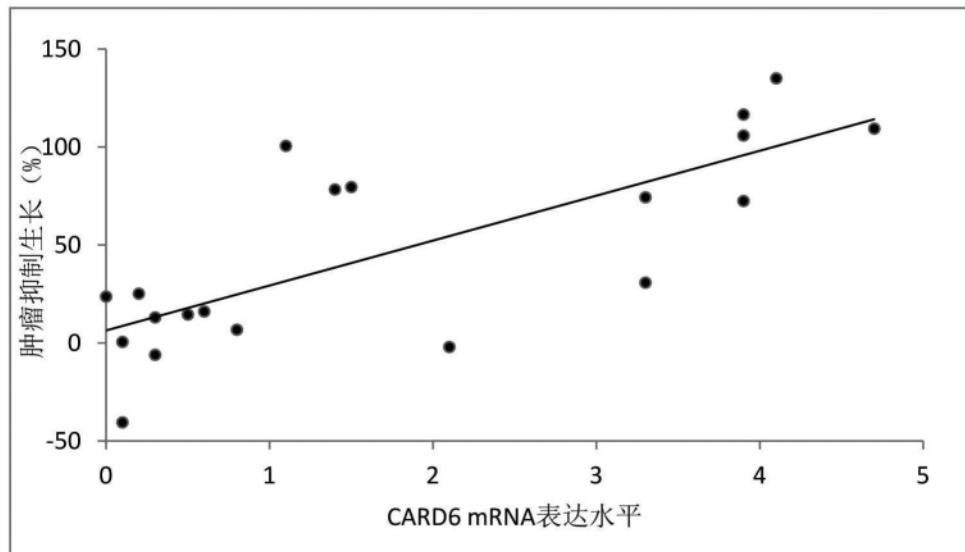
方差分析					
	df	SS	MS	F	显著性F
回归分析	1	19352.15	19352.15	12.44166	0.002406
残差	18	27997.78	1555.432		
总计	19	47349.93			

图16



方差分析					
	df	SS	MS	F	显著性F
回归分析	1	23202.51	23202.51	17.29564	0.00059
残差	18	24147.42	1341.523		
总计	19	47349.93			

图17



方差分析					
	df	SS	MS	F	显著性F
回归分析	1	27598.21	27598.21	25.15062	8.99E-05
残差	18	19751.72	1097.318		
总计	19	47349.93			

图18

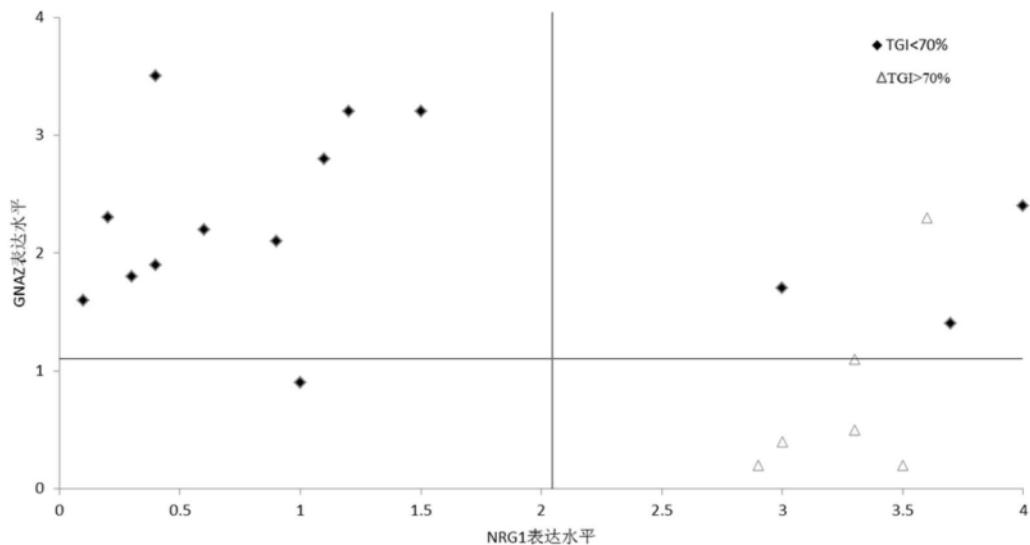


图19