



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102791735 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 18

(21) 申请号 201080057237. 3

(22) 申请日 2010. 10. 15

(30) 优先权数据

61/252, 625 2009. 10. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 06. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/006329 2010. 10. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/045080 EN 2011. 04. 21

(83) 生物保藏信息

CNCM I-4371 2010. 10. 06

CNCM I-4372 2010. 10. 06

CNCM I-4373 2010. 10. 06

CNCM I-4374 2010. 10. 06

CNCM I-4375 2010. 10. 06

CNCM I-4376 2010. 10. 06

(73) 专利权人 瑟维尔实验室

地址 法国苏雷斯内

专利权人 健康和医学国家研究院

科学研究国家中心

(72) 发明人 J·帕内坎 L·布迪尔 D·朱伯特
F·霍兰德

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 凌立 黄革生

(51) Int. Cl.

C07K 16/26(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101460196 A, 2009. 06. 17,

审查员 吴永庆

权利要求书1页 说明书55页

序列表43页 附图31页

(54) 发明名称

抗前胃泌素的单克隆抗体及其用途

(57) 摘要

本公开涉及前胃泌素单克隆抗体、其片段、包含前胃泌素单克隆抗体的组合物, 以及产生和使用前胃泌素单克隆抗体及其组合物的方法。本公开涉及用前胃泌素单克隆抗体和包含前胃泌素单克隆抗体或其片段的组合物治疗结肠直肠癌的方法。本公开还涉及包括前胃泌素的检测的方法, 其包括诊断结肠直肠癌的方法和在患有结肠直肠癌的受试者中监测抗癌疗法的功效的方法。

1. 抗-hPG单克隆抗体,其特异性结合人前胃泌素的C端区域,所述单克隆抗体包含具有选自以下V_H和V_L CDR序列组之一的序列的V_H和V_L CDR:

如SEQ ID NO:37所示的V_H CDR 1.8、如SEQ ID NO:41所示的V_H CDR 2.8、如SEQ ID NO:45所示的V_H CDR 3.8、如SEQ ID NO:49所示的V_L CDR 1.8、如SEQ ID NO:52所示的V_L CDR 2.8和如SEQ ID NO:55所示的V_L CDR 3.8。

2. 权利要求1的单克隆抗体,其是人源化的。

3. 权利要求2的单克隆抗体,其包含具有选自以下V_H和V_L序列组之一的序列的V_H和V_L链:

(i)如SEQ ID NO:75所示的hV_H 8a和如SEQ ID NO:76所示的hV_L 8a;

(ii)如SEQ ID NO:77所示的hV_H 8b和如SEQ ID NO:78所示的hV_L 8b;和

(iii)如SEQ ID NO:79所示的hV_H 8c和如SEQ ID NO:76所示的hV_L 8c。

4. 权利要求1-3任一项的单克隆抗体,其具有1pM至7nM的范围内的亲和力。

5. 权利要求1-3中任一项的单克隆抗体,其与包含对应于选自SEQ ID NO:33、34、35和36的序列的氨基酸序列的表位结合。

6. 权利要求1-3中任一项的单克隆抗体,其与从一种杂交瘤获得的参考抗-hPG单克隆抗体竞争结合hPG,所述杂交瘤选自以保藏号CNCM I-4371保藏的1B4A11D11,以保藏号CNCM I-4372保藏的1B6A11F2,以保藏号CNCM I-4373保藏的1B11E4B11,以保藏号CNCM I-4374保藏的2B4C8C8,和以保藏号CNCM I-4375保藏的2B11E6G4。

7. 权利要求1的单克隆抗体,其在使用LS174T细胞进行的体外测定中中和hPG活性。

8. 组合物,其包含权利要求1-7中任一项的单克隆抗体及赋形剂、载体和/或稀释剂。

9. 权利要求8的组合物,其配制用于药用用途。

10. 宿主细胞,其用适合用于表达权利要求1-7中任一项的抗-hPG单克隆抗体的多核苷酸对转化。

11. 权利要求1-7中任一项的抗-hPG单克隆抗体在制备用于治疗结肠直肠癌的药物中的用途。

12. 抑制结肠直肠肿瘤细胞增殖的离体方法,其包括使结肠直肠肿瘤细胞暴露于权利要求1-7中任一项的抗-hPG单克隆抗体。

13. 用于检测hPG的试剂盒,其包含权利要求1-7中任一项的C端抗-hPG单克隆抗体和特异性结合hPG的N端区域的抗体。

14. 权利要求13的试剂盒,其中所述特异性结合hPG的N端区域的抗体是多克隆抗体。

15. 权利要求1-7中任一项的单克隆抗体在制备用于在受试者中诊断结肠直肠癌的药物中的用途,其中20至400pM的范围内的前胃泌素的量是结肠直肠癌的指示。

16. 权利要求1-7中任一项的单克隆抗体在制备用于选择适于进行抗-hPG疗法的患者的药物中的用途,其中20至400pM的范围内的前胃泌素的量是进行抗-hPG疗法的适合性的指示。

17. 权利要求1-7中任一项的单克隆抗体在制备用于监测结肠直肠癌治疗的有效性的药物中的用途,其中所述受试者血清前胃泌素水平依赖时间的降低指示所述治疗有效。

18. 权利要求1-7中任一项的单克隆抗体在制备用于抑制细胞中依赖前胃泌素的信号转导级联系统的药物中的用途。

抗前胃泌素的单克隆抗体及其用途

[0001] 1. 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请在35U.S.C. §119(e)下要求2009年10月16日提交的临时申请61/252,625号的权益,该临时申请的所有内容在此以其整体引入作为参考。

[0003] 2. 关于联邦资助研究的声明

[0004] 无

[0005] 3. 联合研究协议的参与方

[0006] 无

[0007] 4. 序列表、表格或计算机程序的引用

[0008] 本文包含序列表。

[0009] 5. 技术领域

[0010] 本公开涉及抗前胃泌素的单克隆抗体、用于产生这类抗体的组合物和方法,以及在例如结肠直肠癌的诊断和/或治疗中使用这类抗体的方法等。

[0011] 6. 背景技术

[0012] 结肠直肠癌(CRC)是主要的公共健康问题,其每年影响超过1,000,000人,且每年造成超过500,000例死亡。CRC是癌症引起的死亡中的第二位原因。仅在美国,2009年报道了约147,000例新病例和超过49,900例CRC引起的死亡。存在三种形式的CRC:散发性CRC;由DNA错配修复基因中的种系突变引起的遗传性非息肉性结肠癌(HNPCC);及由APC基因中的种系突变引起的家族性腺瘤性息肉病(FAP)。散发性CRC占病例的近85%,而HNPCC占约5%,FAP占约1%(Heyer等,1999,Oncogene 18:5325-5333)。

[0013] CRC的临床治疗通常涉及常伴随化学疗法的肿瘤手术切除。目前,约50%的CRC患者在诊断五年内死亡。可靠的筛选测试的缺乏和目前可得的疗法的无效性是高死亡率的主要原因。存在对用于诊断CRC的新的临床方法,以及对其他健康组织具有最小副作用的对结肠直肠癌肿瘤有效的治疗的迫切需要。

[0014] 7. 发明概述

[0015] 本申请提供用于在包括人类的动物中诊断和/或治疗结肠直肠癌(CRC)的组合物和方法。本申请中所述的多种发明部分基于申请人的单克隆抗体发现,该单克隆抗体特异性结合前胃泌素(PG),例如人前胃泌素(hPG)(由CRC肿瘤细胞产生的多肽),并在CRC的体外模型中显示抗增殖特性。

[0016] 前胃泌素由结肠直肠肿瘤细胞产生,认为它通过触发阻断细胞正常分化过程(包括导致细胞死亡的那些过程)的信号转导途径来刺激这些细胞的增殖。在体内和体外CRC模型中,编码前胃泌素的胃泌素基因转录物的排除(depletion)诱导肿瘤细胞的细胞分化和程序性细胞死亡,减少肿瘤细胞增殖。虽然并非旨在受限于任何操作理论,但认为抗-hPG抗体通过结合PG来阻断或抑制其与它的一个或多个信号发放配偶体相互作用的能力。这转而抑制结肠直肠肿瘤细胞中否则将导致增殖的信号转导途径。

[0017] 因此,一方面,本公开提供特异性结合PG(例如hPG)但不结合胃泌素基因的其他产物的单克隆抗体。参照图1,胃泌素基因翻译为101个氨基酸的多肽(称为前胃泌素原(pre-

progastrin)),其包含信号序列(下划线),切割该信号序列产生前胃泌素(80个氨基酸的多肽)。转而切割前胃泌素来产生对应于前胃泌素的残基38至71的34个氨基酸的产物,然后用甘氨酸残基在其羧基端延长,产生甘氨酸延长的G34(“G34-Gly”)。此切割的副产物是5个氨基酸的肽(称为C端侧翼肽或CTFP),其包含前胃泌素的残基75至80。然后进一步切割G34-Gly产生17个残基的多肽,该多肽在序列上对应于前胃泌素的残基55至71,称为G17-Gly。去除G34-Gly和G17-Gly的C端甘氨酸,然后C端酰胺化,分别产生G34和G17,二者都是C端酰胺化的。因此,前胃泌素的前37个残基是它特有的(即不存在于它的加工产物,如G34、G34-Gly、G17、G17-Gly或CTFP中),而残基38至80还存在于胃泌素基因的翻译后产物中。

[0018] 申请人已发现,虽然可以用技术人员已知的方法产生抗-PG单克隆抗体,但抗原的选择很重要。并非所有衍生自hPG的抗原都在生理条件下刺激特异性结合hPG的单克隆抗体的产生。如下文所述,用来产生抗hPG的多克隆抗体的多种抗原(如全长重组人前胃泌素(见例如Singh WO 08/076454)和对应于hPG的C端最后十个氨基酸的肽(见例如Hollande WO 07/135542))未能产生抗-hPG单克隆抗体。但是,申请人在hPG序列内发现了可以用来产生特异性结合hPG的单克隆抗体的抗原性N端和C端序列。非常令人惊奇,申请人发现,不必将抗原序列限制于PG序列特有的一段序列来获得特异性结合PG而不结合其他胃泌素基因生产物的单克隆抗体。与胃泌素基因的其他产物(例如G17、G34和CTFP)具有共同序列的肽抗原产生了不但结合hPG,而且特异性结合hPG的单克隆抗体。

[0019] 申请人用衍生自hPG分子不同区域的抗原产生了单克隆抗体。可用具有对应于hPG N端区域的序列的肽抗原获得和/或与hPG N端区域结合的单克隆抗-PG抗体在本文中称为“N端抗-hPG单克隆抗体”。可以用来构建用于获得N端抗-PG单克隆抗体的免疫原的具体示例性抗原区对应于hPG的残基1至14:SWKPRSQPDAPLG(SEQ ID NO:25)。用于获得N端抗-PG单克隆抗体的包含此抗原的示例性免疫原描述于表1A和实施例部分中。

[0020] 可用具有对应于hPG C端区域的序列的肽抗原获得和/或结合hPG C端区域的单克隆抗-PG抗体在本文中称为“C端抗-hPG单克隆抗体”。可以用来构建用于获得C端抗-PG单克隆抗体的免疫原的具体示例性抗原区对应于hPG的残基55至80:QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN(SEQ ID NO:27)。用于获得C端抗-PG单克隆抗体的包含此抗原的示例性免疫原描述于表1B和实施例部分中。

[0021] 对于一些用途,希望得到对hPG具有高亲和力的抗-hPG单克隆抗体。对于某些用途,如治疗用途,希望得到至少约100nM的亲和力,虽然可以希望得到具有更高亲和力的抗体,例如至少约90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM或甚至更高的亲和力。本文公开的多种具体的示例性抗-PG单克隆抗体显示从 10^{-6} 至 10^{-12} M的范围内的亲和力(见表6)。具有尤其适合于所希望的具体应用的亲和力的抗-PG单克隆抗体可以容易地从这些中选择,或者用多种免疫原、互补决定区(CDR)序列、可变重链 V_H 和可变轻链 V_L 序列及本文所述方法来产生或设计。可以用本领域公知或本文所述的技术测定任意具体的抗-PG单克隆抗体的亲和力,例如ELISA、等温滴定量热法(ITC)、BIAcore或荧光偏振测定。

[0022] hPG是相对小的多肽,长度仅为80个氨基酸。预期以相对高的亲和力(例如至少约10nM)特异性结合hPG的任意单克隆抗体都将干扰PG与它的一个或多个信号发放配偶体相互作用的能力,从而抑制CRC细胞的增殖。但是,申请人发现,并非所有抗-PG单克隆抗体都

是中和性的(即,并非所有结合PG的单克隆抗体都干扰或抑制其生物信号发放活性)。实际上,如将在实施例部分中更详细地讨论,申请人发现,一些抗-PG单克隆抗体虽然对PG显示高特异性和高亲和力,但不中和PG。例如,如下文实施例部分中详述,抗-hPG MAB14以约6pM的K_d结合hPG,但不抑制体外CRC细胞的生长。特异性结合hPG的非中和性单克隆抗体用于诊断目的,而中和PG的那些抗-hPG单克隆抗体尤其适合于治疗CRC的治疗应用。

[0023] 本文所用的“中和性抗-hPG单克隆抗体”是这样的单克隆抗体,与用非特异性单克隆抗体处理的对照样品相比,其产生抗-hPG单克隆抗体处理的测试样品中存活CRC细胞数目的统计上显著的减少。用于评估任意具体的抗-hPG单克隆抗体中和hPG的能力的具体测定描述于下文发明详述部分中。虽然预期在此测定中显示中和活性(例如活细胞数目统计上显著地减少40%、30%、20%、15%或甚至10%)的抗-hPG单克隆抗体也提供治疗益处,但认为在此测定中显示使活细胞数目减少至少约50%的那些抗-hPG单克隆抗体在治疗CRC中尤其有用。

[0024] 因此,在一些实施方案中,抗-PG单克隆抗体是中和性抗-PG单克隆抗体。已发现,抗-PG单克隆抗体中和PG的能力不是表位依赖性的。如实施例部分中所示例,N端和C端抗-PG抗体都具有中和活性。因此,在一些实施方案中,中和性抗-PG单克隆抗体是N端中和性抗体,在其他实施方案中,抗-PG单克隆抗体是C端中和性抗体。

[0025] 表位定位显示,即使在针对同一免疫原产生时,N端抗-PG单克隆抗体也并非全都结合相同的表位。C端抗-hPG单克隆抗体的情况也是这样。实施例部分中的表8和9中提供了通过丙氨酸扫描和SPOT技术鉴定的示例性N端和C端抗-hPG单克隆抗体结合的表位。

[0026] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体结合包含对应于hPG N端部分的氨基酸序列的表位。在具体实施方案中,N端抗-hPG单克隆抗体结合包含hPG的残基10至14(SEQ ID NO:28)、hPG的残基9至14(SEQ ID NO:29)、hPG的残基4至10(SEQ ID NO:30)、hPG的残基2至10(SEQ ID NO:31)或hPG的残基2至14(SEQ ID NO:32)的表位。

[0027] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体结合包含对应于hPG C端区域部分的氨基酸序列的表位。在具体实施方案中,C端抗-hPG单克隆抗体结合包含hPG的残基71至74(SEQ ID NO:33)、hPG的残基69至73(SEQ ID NO:34)、hPG的残基76至80(SEQ ID NO:35)或hPG的残基67至74(SEQ ID NO:36)的表位。

[0028] 预期可以互换结合大致相同的表位的抗-hPG单克隆抗体的对应的CDR和/或V_H和V_L链来产生新的抗-hPG单克隆抗体。例如,如表9中所指出,示例性抗-hPG单克隆抗体MAb 5和MAb 6结合相同的表位。可以设计在其V_L链中包含这两种抗体的V_L CDR的多种组合和/或在其V_H链中包含这两种抗体的V_H CDR的多种组合的抗-hPG单克隆抗体。作为说明多种可能的组合的具体实例,这种抗体可以在其V_L链中包含MAb 5的CDR 1和2(分别为V_LCDR1.5和V_LCDR2.5)及MAb 6的CDR 3(V_LCDR3.6),在其V_H链中包含MAb 6的CDR 1(V_HCDR1.6)及MAb 5的CDR 2和3(分别为V_HCDR2.5和V_HCDR3.5)。

[0029] 已鉴定了几种对hPG具有高特异性和亲和力并在体外测定中显示良好的抗肿瘤活性的抗-hPG单克隆抗体,且在一些情况下测定了它们的CDR的序列,它们的V_H和V_L链的序列,和/或提出用于人源化形式的V_H和V_L链的序列。还保藏了几种杂交瘤。发明详述部分中更详细地描述了所有这些示例性抗-hPG单克隆抗体,以及用于本文所述多种试剂盒和方法中的抗-hPG单克隆抗体(例如与参考抗体竞争结合PG的单克隆抗体)的其他具体实施方案。

[0030] 本公开的抗-hPG单克隆抗体包括与参考抗-hPG单克隆抗体竞争结合hPG的抗体。参考抗-hPG单克隆抗体可以是本文所述抗-hPG单克隆抗体中的任一种。非限制性实例包括：包含本文所述的三个V_L CDR和三个V_H CDR的抗体；包含具有本文所示氨基酸序列的V_H链和V_L链的抗体；包含本文所示的人源化重链和轻链多肽的抗体；由本文所公开的杂交瘤中的任一种产生的抗体；与本文所公开的hPG内的表位结合的抗体。

[0031] 本文所述抗-PG单克隆抗体可以是全长抗体、多链或单链抗体、这类抗体的选择性结合PG的片段(包括但不限于Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv和scFv)、替代体(surrobody)(包括替代轻链构建体)、单结构域抗体、人源化抗体、骆驼源化(camelized)抗体等形式。它们还可以属于或衍生自任何同种型,包括例如IgA(例如IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)或IgM。在一些实施方案中,抗-PG抗体是IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。

[0032] 抗-PG单克隆抗体可以具有人或非人来源。非人来源的抗-PG抗体的实例包括但不限于哺乳动物来源(例如猿猴、啮齿动物、山羊和兔)的那些。优选人源化在人类中用于治疗用途的抗-PG单克隆抗体。

[0033] 另一方面,本公开提供能够用来产生抗-PG单克隆抗体的核酸。提供编码本文所述抗-hPG单克隆抗体的免疫球蛋白轻链和重链多肽的核酸及包含该核酸的载体。此外,本文提供用这类载体转化的原核和真核宿主细胞,以及提供改造来表达抗-hPG单克隆抗体的轻链和重链多肽的真核(例如哺乳动物)宿主细胞。还提供能够表达轻链和重链二者,并将本文所述单克隆抗体分泌入培养该宿主细胞的培养基中的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是杂交瘤。还提供通过培养宿主细胞来产生抗-hPG单克隆抗体的方法。

[0034] 中和性抗-PG单克隆抗体(如抗-hPG单克隆抗体)结合PG并阻断依赖PG的信号发放,导致CRC肿瘤细胞中PG诱导的应答的抑制。因此,还提供抑制CRC细胞的PG诱导的应答的方法,其包括抑制细胞分化、抑制细胞死亡和/或刺激细胞增殖。通常,该方法包括以对抑制CRC细胞的一种或多种PG诱导的应答有效的量使CRC细胞与中和性抗-PG单克隆抗体接触,或使细胞群体暴露于中和性抗-PG单克隆抗体。可以通过对含有CRC细胞的环境(其可以是细胞培养物或肿瘤中)施用中和性抗-hPG单克隆抗体来在体外或体内进行该方法。

[0035] 本文所述中和性抗-PG单克隆抗体抑制CRC肿瘤细胞的依赖PG的增殖,这使它们成为用于治疗结肠直肠癌的有用治疗剂。因此,还提供包含中和性抗-PG单克隆抗体的药物组合物,及用中和性抗-PG单克隆抗体和/或药物组合物来治疗CRC的方法。药物组合物可以配制用于任意方便的给药途径(包括例如肠胃外、皮下或静脉内注射),且通常将包含中和性抗-hPG单克隆抗体和适合用于希望的施用方式的一种或多种可用载体、赋形剂和/或稀释剂,且可以包含将在发明详述部分中进一步描述的其他可选成分。对于治疗用途,可以以便于使用的单位剂量形式包装组合物。

[0036] 治疗方法通常包括对需要治疗的受试者(例如诊断为患有CRC的受试者)施用对提供治疗益处有效的量的中和性抗-PG单克隆抗体和/或其药物组合物。下文更详细地描述的治疗益处包括CRC的任意改善,例如减慢或停止CRC的进展、降低CRC的严重度、抑制CRC肿瘤的生长或CRC细胞的增殖、减小CRC肿瘤的大小和/或降低CRC患者中的PG血清水平。受试者可以是人或非人,包括家养动物(例如猫、狗、牛、猪、马)或非家养动物。优选地,抗-PG单克隆抗体对所治疗的物种的PG特异。例如,对人患者施用抗-hPG抗体,对犬患者施用抗-狗PG

抗体等。使用抗-hPG单克隆抗体疗法的受试者可以是：处于疾病进展的任意阶段的患者（例如CRC阶段0、I、II、III或IV）、接受了CRC疗法（例如化学疗法、放射疗法、手术切除）的患者或正在接受其他CRC疗法的患者。

[0037] 本文所述抗-PG单克隆抗体治疗可以与其他疗法组合或辅助其他疗法。其他CRC疗法的非限制性实例包括本文所述化学疗法治疗、放射疗法、手术切除和抗体疗法。在具体实例中，抗-hPG单克隆抗体与化疗剂组合施用。在另一具体实例中，抗-hPG单克隆抗体辅助手术切除施用。抗-PG单克隆抗体还可以彼此组合使用。

[0038] 患有CRC肿瘤的个体通常具有提高的循环PG水平（例如在血清或血浆中）。因此，为了诊断CRC，可以用抗-hPG单克隆抗体来检测PG水平。因此，在已经诊断为患有CRC的患者中，可以用抗-hPG单克隆抗体来选择适于接受抗-PG疗法的受试者或监测治疗功效。如本文所公开，在受试者中诊断结肠直肠癌的方法包括确定用本公开的抗-hPG单克隆抗体测量的来自受试者的样品（例如血液样品或血清样品）中的前胃泌素的量是否高于阈值水平。在具体实施方案中，该阈值水平是50pM。在一些实施方案中，使用两种抗-PG抗体，一种识别PG的C端区域，另一种识别PG的N端区域。在此实施方案中，N端或C端抗体中的一种或二者都是本文所述抗-PG单克隆抗体。优选地，使用N端和C端抗-PG单克隆抗体。抗体可以是（但无需是）中和性的。

[0039] 为了监测治疗功效，可以通过比较在不同时间采集的样品中PG的量，用抗-PG单克隆抗体来测定来自已接受或正在接受CRC治疗的受试者的样品中前胃泌素的水平是否随时间降低。前一段中所述抗-PG抗体的具体实施方案也可以用于此测定。

[0040] 还提供适合用于进行本文所述多种诊断方法、监测方法和其他方法的试剂盒。这类试剂盒通常将包含本文所述抗-PG单克隆抗体，且可选地包含适合用于进行具体测定的其他抗-PG抗体和/或试剂。在一些实施方案中，用可检测标记（如荧光团）标记包含于试剂盒中的一种或多种抗-PG抗体。在具体实施方案中，试剂盒包含特异性结合PG的N端区域的抗-PG抗体、特异性结合PG的C端区域的抗-PG抗体，且可选地包含适合用于进行诊断测定的试剂，其中N端特异性抗体是本文所述N端抗-PG单克隆抗体和/或C端特异性抗体是本文所述C端抗-PG单克隆抗体。

[0041] 本文所述多种发明的特征和优势将从其示例性实施方案的以下详细描述变得更为显而易见。

[0042] 8.附图简述

[0043] 图1提供前胃泌素原、前胃泌素及包括G34、G34-Gly、G17、G17-Gly和C端侧翼肽CTFP的前胃泌素加工产物的氨基酸序列。

[0044] 图2提供以下示例性鼠抗-hPG单克隆抗体的V_H和V_L链的多肽序列和对应的多核苷酸序列：抗-hPG MA b 3 (SEQ ID NO 16、12、17和13，按出现的顺序) (图2A、2B)、抗-hPG MA b 4 (SEQ ID NO 18、14、19和15，按出现的顺序) (图2C、2D)、抗-hPG MA b 8 (SEQ ID NO 67、59、71和63，按出现的顺序) (图2E、2F)、抗-hPG MA b 13 (SEQ ID NO 68、60、72和64，按出现的顺序) (图2G、2H)、抗-hPG MA b 16 (SEQ ID NO 69、61、73和65，按出现的顺序) (图2I、2J)和抗-hPG MA b 19 (SEQ ID NO 70、62、74和66，按出现的顺序) (图2K、2L)，其中每条链的三个CDR下划线。

[0045] 图3A-C提供图表，显示示例性鼠抗-hPG单克隆抗体MA b 1-4 (图3A)、MA b 5-14和

20-23(图3B)及MAb 3和15-19(图3C)在渐增的抗体浓度下的相对结合亲和力(测量为492nm吸光度)。

[0046] 图4提供图表,显示四种不同的示例性鼠抗-hPG单克隆抗体在280nm和330nm下的吸光度(光密度)之比,与牛血清白蛋白对照样品相比较(随意单位)。

[0047] 图5A-C提供图表,显示23种不同的示例性鼠抗-hPG单克隆抗体与25或50ng hPG的结合,与所示缓冲液单独(阴性对照)、250ng KLH(阴性对照)和衍生自胃泌素基因的肽(50和250ng的CTFP、G17或G17-Gly(在图中称为“G-Gly”))相比较。图5A显示抗-hPG MAb 1-4的结合,图5B显示抗-hPG MAb 5-14和21-23的结合,图5C显示抗-hPG MAb 3A和15-20的结合。

[0048] 图6提供图表,显示多克隆N端抗-hPG抗体在渐增的抗-hPG MAb3浓度下与hPG的结合。

[0049] 图7提供图表,显示如下用抗-hPG单克隆抗体处理的代表性CRC细胞系的增殖:用示例性抗-hPG单克隆抗体MAb 3和MAb 4(分别为图7A、7B、7C,显示处理结束时的活细胞数目相对于抗体处理起始时(T0)的变化)或抗-hPG多克隆抗体(分别为图7D、7E、7F,显示处理结束时的活细胞数目相对于抗体处理起始时(T0)的变化)处理的所示SW480、HCT-116、LS174T;用抗-hPG MAb 5至MAb 23处理的CRC细胞系SW620的增殖(图7G,作为对照抗体处理的细胞的数目的百分比显示处理结束时相对于处理起始时(T0)的活的抗-hPG处理的细胞);用抗-hPGMAb 8、13、14、16和19处理的LS174T细胞的增殖(图7H,作为对照抗体处理的细胞的数目的百分比显示处理结束时相对于处理起始时(T0)的活的抗-hPG处理的细胞);及用抗-hPG单克隆抗体MAb 8、13、14、16、19处理的HCT-116细胞的增殖(图7I,作为对照抗体处理的细胞的数目的百分比显示处理结束时相对于处理起始时(T0)的活的抗-hPG处理的细胞)。

[0050] 图8提供图表,显示对照单克隆抗体、抗-hPG MAb 8(5μg/mL)、hPG预孵育的抗-hPG MAb 8、hPG预孵育的对照抗体或hPG单独4种处理后48小时的LS174T活细胞数目。

[0051] 图9提供图表,显示与对照多克隆抗体相比,用抗-hPG抗体处理的小鼠中每只小鼠的肿瘤数目(图9A)及平均肿瘤长度和高度(图9B)。

[0052] 9. 示例性实施方案详述

[0053] 9.1 发明详述

[0054] 最初将前胃泌素(PG)鉴定为胃泌素(刺激胃酸分泌的肠肽激素)的前体。胃泌素以衍生自前胃泌素的许多不同分子形式(G17、G34、甘氨酸延长的G17、甘氨酸延长的G34)存在。见图1。胃泌素基因编码101个氨基酸的产物前胃泌素原。第一切割去除21个氨基酸残基的信号肽(图1中下划线),产生80个氨基酸的肽PG。SEQ ID NO:20中提供人PG(hPG)的了解、已知的多肽序列。如图1中所示,从1至80编号hPG的氨基酸残基,最靠近氨基端的残基为1位。前胃泌素的前40个氨基酸内的序列称为“N端”,而落在残基41至80内的序列称为“C端”。

[0055] 最近的研究显示,CRC患者中前胃泌素水平升高。正常生理条件下,前胃泌素占人类总分泌肽的不到10%。在结肠直肠癌中,血浆和肿瘤组织中的前胃泌素水平都升高,可能是由于胃泌素基因的增加的表达偶联基因产物的不完全加工。一项研究显示CRC患者与对照患者相比显著更高的血清前胃泌素水平,但胃泌素更多的加工形式无这种差异(Siddheshwar等,2001,Gut 48:47-52)。在所测试的CRC肿瘤样品中,80-100%的样品显示提高的PG水平。见例如Ciccotosto等,1995,Gastroenterology 109:1142-1153;Baldwin

等,1998,Gut 42:581-584;Van Solinge,1993,Gastroenterology 104:1099-1107。通过实验进一步证实了PG在CRC中的作用,该实验显示,与野生型小鼠或表达酰胺化胃泌素的小鼠相比,用致癌剂氧化偶氮甲烷处理的表达重组人PG的小鼠在结肠中具有显著更多数目的异常隐窝灶、腺瘤和腺癌(Singh等2000,Gastroenterology 119:162-171)。

[0056] 最近,Hollande等显示,前胃泌素通过抑制ICAT(β -联蛋白/Tcf4信号发放的负调节物)来刺激 β -联蛋白/Tcf4途径,且阻断前胃泌素导致ICAT的从头表达。见WO 2007/135542。虽然并非旨在受限于任何操作理论,但认为,由于增加的ICAT表达,阻断前胃泌素信号发放导致 β -联蛋白/Tcf4诱导的增殖的抑制。在缺乏持续的依赖PG的信号发放的情况下,细胞增殖受抑制,并触发细胞分化和/或细胞死亡(包括凋亡)。

[0057] 虽然存在对治疗和诊断CRC的新的临床途径、PG刺激CRC肿瘤细胞增殖的证据的需要,虽然癌症的治疗越来越集中于单克隆抗体疗法,但迄今为止,没有任何报道显示任何单克隆抗体能够阻断依赖PG的肿瘤细胞增殖,或甚至结合PG。已证明这类抗体(本文首次呈现)难以制备。作为第一个挑战,申请人发现,重组人前胃泌素(其可以用来产生多克隆抗-hPG抗体)未能在测试小鼠中诱导单克隆免疫原性应答。因此,有必要设计仅使用PG的肽片段的免疫原来产生对前胃泌素而不是对其他胃泌素基因产物特异的抗体。甚至在杂交瘤克隆产生结合抗原肽的抗体时,也发现与该肽的结合不能明确预测或完全不能预测结合PG的能力。如下文实施例中更详细地显示,许多杂交瘤产生抗体,该抗体结合用于免疫原中的PG抗原肽,但未能结合PG。本公开提供抗-hPG单克隆抗体,该单克隆抗体不仅结合针对其产生它们的抗原肽,还特异性结合hPG。非常令人惊奇地,用抗原获得了相对于它的加工形式(例如G34、G34-Gly、G17、G17-Gly、CTFP)对hPG高度特异的单克隆抗体,该抗原在一些情况下并非hPG特有,而是包含一种或多种前胃泌素加工产物共有的氨基酸序列区域。此外,还令人惊奇地发现,虽然hPG的尺寸相对小(80个氨基酸),但并非所有抗-hPG单克隆抗体(甚至对hPG显示高度的亲和力和特异性的那些)都中和它的生物学活性。

[0058] 抗-hPG单克隆抗体

[0059] 申请人发现了用于产生抗-hPG单克隆抗体的肽抗原。用于产生本公开的抗-hPG抗体的肽包含不见于多肽的加工更多的形式(如甘氨酸延长或酰胺化的胃泌素或CTFP)中的前胃泌素特有序列,但也可以包含见于hPG的加工形式中的序列。在一些实施方案中,针对具有对应于hPG N端区域的氨基酸序列的肽抗原产生抗-hPG单克隆抗体,并命名为N端抗-hPG单克隆抗体。可以用来构建用于获得N端抗-hPG单克隆抗体的免疫原的具体示例性抗原区对应于与接头序列偶联的hPG的残基1至14(SWKPRSQPDAPLG(SEQ ID NO:25))。在其他实施方案中,针对具有对应于hPG C端区域的氨基酸序列的肽抗原产生抗-hPG单克隆抗体,并命名为C端抗-hPG单克隆抗体。可以用来构建用于获得C端抗-hPG单克隆抗体的免疫原的具体示例性抗原区对应于与接头序列偶联的hPG的残基55至80(SEQ ID NO:27)。见表1。

[0060] 本公开的抗-PG单克隆抗体结合PG,且用于检测和从复杂混合物分离PG。此外,本公开的抗-PG单克隆抗体独特地适合于结肠直肠癌的治疗和/或诊断应用。在多种实施方案中,抗-hPG单克隆抗体:(1)特异性结合PG而不是其他胃泌素基因产物;(2)对hPG具有高亲和力;(3)在体外和体内抑制结肠直肠癌细胞增殖;(4)在体内减小肿瘤尺寸和肿瘤数目;(5)在包含其他胃泌素基因衍生肽的复杂混合物中检测PG。

[0061] 表达胃泌素基因,并广泛加工,以产生在正常稳态中具有作用的几种蛋白质产物。

另一方面,健康受试者的循环中通常检测不到前胃泌素。本公开的单克隆抗体旨在靶向前胃泌素而不是衍生自胃泌素基因的其他肽。因此,抗-hPG单克隆抗体特异性结合来自人类和其他动物的前胃泌素,而不结合其他胃泌素基因产物,如但不限于甘氨酸延长的胃泌素或酰胺化胃泌素或C端侧翼肽(CTFP)。

[0062] 可以按以下用ELISA测定抗-hPG单克隆抗体的特异性。用含有一个或多个适当浓度的测试肽(例如25和50ng重组人PG,及50和250ngCTFP或其他胃泌素衍生的基因产物)的磷酸缓冲盐溶液(PBS)在4℃过夜孵育96孔板,然后用洗涤溶液(PBS和0.1% Tween-20)洗涤孔三次,然后每孔用100μL封闭溶液(PBS、0.1% Tween-20、0.1%牛血清白蛋白或酪蛋白水解物)在22℃孵育2小时。封闭后,洗涤孔三次,加入待测定的抗体(测试抗体)。向每个孔中加入100μL含测试抗体(0.3至1ng/mL)的PBS和0.1% Tween-20。然后在22℃孵育平板2小时,然后弃除测试抗体溶液,并在洗涤步骤(3×100μL洗涤溶液,如上文指出)后替换为含有第二抗体(与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗-小鼠IgG(Fc)抗体)的封闭溶液。用第二抗体孵育1小时后,向每个孔中加入100μL底物溶液(例如Fast OPD或邻苯二胺二盐酸,可从Sigma-Aldrich Co.获得,按厂家的说明配制),并在22℃避光孵育20分钟。通过加入50μL 4N硫酸来终止反应,并通过在492nm测量光密度(O.D.)来测定所催化的底物量。底物转化与结合抗原的第一(测试)抗体的量成比例。实验一式两份地进行,将OD测量结果作为抗原浓度的函数作图。如果对hPG的测量O.D.在0.2和1.5之间,且用CTFP或任意其他胃泌素基因衍生肽不存在高于背景的统计上显著的信号,则将测试抗体评分为对PG特异,其中背景是来自仅包含PBS的对照孔的平均信号。

[0063] 发现本公开的几种抗-hPG单克隆抗体高度特异。在一些实施方案中,与其他胃泌素基因产物相比,抗-hPG单克隆抗体对前胃泌素显示高100倍的特异性。在这类实施方案中,需要多100倍的抗原(例如甘氨酸延长的胃泌素或酰胺化胃泌素)来产生与在抗原是前胃泌素时观察到的结合相同的结合。

[0064] 用于测定结合的其他方法包括但不限于免疫荧光法、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性物质标记的免疫测定(RIA)、夹心法ELISA(Monoclonal Antibody Experiment Manual(Kodansha Scientific出版,1987);Second Series Biochemical Experiment Course,第5卷,Immunobiochemistry Research Method,Tokyo Kagaku Dojin出版(1986))。

[0065] 治疗用途和诊断用途都希望得到对PG具有高亲和力的抗-hPG单克隆抗体。对于某些用途,如治疗用途,虽然希望得到至少约100nM的亲合力,但可以希望得到具有更高亲和力的抗体,例如至少约90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM、10pM、1pM或甚至更高的亲合力。在一些实施方案中,单克隆抗体以约1pM至约100nM的范围内的亲合力或任意前述值之间的亲合力特异性结合hPG。

[0066] 可以用本领域公知或本文所述的技术测定抗-hPG单克隆抗体对hPG的亲合力,例如但不限于ELISA、等温滴定量热法(ITC)、BIAcore、Proteon或荧光偏振测定。

[0067] 使用来自hPG N端或C端区域的抗原,可以产生识别hPG的不同表位的抗体。单克隆抗体识别的表位将取决于用来产生抗体的具体抗原,且可以用技术人员已知的技术定位,如丙氨酸扫描和SPOT分析(见下文实施例部分)。例如,表位定位显示,抗-hPG MA b 2和MA b

4结合相同的表位;抗-hPG MA b 1和MA b 2结合大致相同的表位;MA b 17、MA b 18、MA b 19和MA b 20结合大致相同的表位;MA b 15和MA b 16结合大致相同的表位;抗-hPG MA b 5、MA b 6、MA b 7、MA b 9和MA b 12结合相同的表位,且与抗-hPG MA b 10结合大致相同的表位;抗-hPG MA b 11和MA b 14结合大致相同的表位。

[0068] 可以用本文所述竞争性测定来测定抗-hPG单克隆抗体是否识别特定表位,其中参考抗体结合的表位是已知的。在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体与参考抗体竞争,该参考抗体结合具有对应于hPG N端区域的氨基酸序列的表位。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体与参考抗体竞争,该参考抗体结合包含hPG的残基10至14(SEQ ID NO:28)、hPG的残基9至14(SEQ ID NO:29)、hPG的残基4至10(SEQ ID NO:30)、hPG的残基2至10(SEQ ID NO:31)或hPG的残基2至14(SEQ ID NO:32)的表位。在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体与参考抗体竞争,该参考抗体结合具有对应于hPG C端区域的氨基酸序列的表位。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体与参考抗体竞争,该参考抗体结合包含hPG的残基71至74(SEQ ID NO:33)、hPG的残基69至73(SEQ ID NO:34)、hPG的残基76至80(SEQ ID NO:35)或hPG的残基67至74(SEQ ID NO:36)的表位。

[0069] 抗-PG单克隆抗体可以是中和性的。虽然并非旨在受限于任何操作理论,但认为中和性抗-hPG单克隆抗体通过结合PG来阻断或抑制其与它的一个或多个信号发放配偶体相互作用的能力。这转而抑制结肠直肠癌肿瘤细胞中否则将导致增殖、减少的细胞分化和细胞死亡的信号转导途径。在一些实施方案中,中和性抗-PG单克隆抗体结合hPG的N端区域。在具体实施方案中,中和性抗-PG单克隆抗体与抗-hPG MA b 1、MA b 2、MA b 3、MA b 4、MA b 15、MA b 16、MA b 17、MA b 18、MA b 19或MA b 20竞争结合PG。在其他实施方案中,中和性抗-PG单克隆抗体结合hPG的C端区域。在具体实施方案中,中和性抗-PG单克隆抗体与抗-hPG MA b 5、MA b 6、MA b 7、MA b 8、MA b 9、MA b 10、MA b 11、MA b 12、MA b 13、MA b 21、MA b 22或MA b 23竞争结合PG。

[0070] 确定抗-PG单克隆抗体是否是中和性抗体的具体测试可以按以下进行。按下文实施例7中所述,将CRC LS174T细胞按约50,000细胞/孔接种在6孔板中。然后按实施例7中所述用测试抗-PG单克隆抗体或对照单克隆抗体以12小时的间隔处理细胞48小时,抗体浓度为约5 μ g/mL。使用双尾Mann-Whitney检验($p < 0.05$ 时认为差异显著),与用对照非特异性抗体处理的细胞的数目相比,如果用测试抗体处理的CRC癌细胞的数目显示存活细胞数目统计上显著地减少至少10%,则将测试抗体定义为在此测定中是中和性的。准对处理期开始时(称为T0)的细胞数目校正总细胞数。

[0071] 如本文所使用,抗体(Ab)指特异性结合具体抗原或与具体抗原免疫反应的免疫球蛋白分子,且包括多克隆、单克隆、遗传改造和以其他方式修饰的抗体形式,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体和抗体的抗原结合片段,包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG和scFv片段。在多种实施方案中,抗-hPG单克隆抗体包含抗体恒定区的全部或部分。在一些实施方案中,恒定区是选自IgA(例如IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)和IgM的同种型。

[0072] 本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。通过本领域可得或已知的任意手段从单个克隆(包括任意真核、原核或噬菌体克隆)衍生单克隆抗体。可以用本领域已知的多种技术(包括使用杂交瘤技术、重组技术和噬菌体展示技术或其组合)

制备用于本公开的单克隆抗体。在本公开的许多用途(包括抗-hPG单克隆抗体在人类中的体内用途和体外检测测定)中,可以适宜地使用嵌合抗体、灵长类源化(primatized)抗体、人源化抗体或人抗体。

[0073] 术语“scFv”指单链Fv抗体,其中将来自传统抗体的重链和轻链的可变结构域连接形成一条链。

[0074] 提到“V_H”指抗体的免疫球蛋白重链(包括Fv、scFv或Fab的重链)的可变区。提到“V_L”指免疫球蛋白轻链(包括Fv、scFv、dsFv或Fab的轻链)的可变区。抗体(Ab)和免疫球蛋白(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。抗体对具体靶标显示结合特异性,而免疫球蛋白包括抗体和缺乏靶标特异性的其他抗体样分子二者。天然抗体和免疫球蛋白通常是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条重链在一端具有可变结构(V_H),随后是多个恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L),在其另一端具有恒定结构域。

[0075] 本公开的抗-hPG单克隆抗体包含互补决定区(CDR)。CDR也称为轻链和重链可变结构域二者中的高变区。可变结构域的更高度保守的部分称为构架区(FR)。如本领域已知,取决于背景和本领域已知的多种定义,描述抗体高变区的氨基酸位置/边界可以不同。可变结构域内的一些位置可以视为杂种高变位置,因为可以在一组标准下认为这些位置在高变区内,而在不同的一组标准下认为这些位置在高变区外。这些位置中的一个或多个也可以见于延长的高变区中。本公开提供在这些杂种高变位置中包含修饰的抗体。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR区,该FR区主要采用β-折叠构象,通过三个CDR连接,该CDR形成环连接,且在一些情况下形成β-折叠结构的部分。每条链中的CDR通过FR区近距离保持在一起,并与来自其他链的CDR一起促成抗体靶结合部位的形成(见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health,Bethesda,Md.1987))。

[0076] 鉴定了几种对hPG具有高特异性和亲和力且具有良好的抗肿瘤活性的抗-hPG单克隆抗体,并对它们的CDR及可变重链和轻链进行了测序。鼠重链和轻链可变结构域在本文中称为mV_H和mV_L,随后是对应的单克隆抗体的编号,例如抗-hPG MAb 3的mV_H.3和mV_L.3。抗-hPG单克隆抗体具有三个可变轻链CDR和三个可变重链CDR,分别称为V_H CDR1、2或3和V_L CDR1、2或3,随后是示例性抗-hPG单克隆抗体的编号。例如MAb 3的V_L CDR1表示为V_L CDR1.3,MAb 3的V_H CDR1表示为V_H CDR1.3。类似地,人重链和轻链可变结构域在本文中称为hV_H和hV_L,随后是对应的单克隆抗体的编号。

[0077] 在一些实施方案中,针对hPG的N端部分产生的抗-hPG单克隆抗体具有三个可变轻链CDR和三个可变重链CDR,其中V_L CDR1选自QSIVHSNGNTY(“V_L CDR 1.3”;SEQ ID NO:4)、QSLVHSSGVITY(“V_L CDR 1.4”;SEQ ID NO:10)、QSLLDSDGKTY(“V_L CDR 1.16”;SEQ ID NO:50)和SQHRTYT(“V_L CDR 1.19”;SEQ ID NO:51);V_L CDR2选自KVS(“V_L CDR 2.3”和“V_L CDR 2.4”;SEQ ID NO:5)、LVS(“V_L CDR 2.16”;SEQ ID NO:53)和VKKDGSH(“V_L CDR 2.19”;SEQ ID NO:54);V_L CDR3选自FQGSHVPFT(“V_L CDR 3.3”;SEQ ID NO:6)、SQSTHVPPT(“V_L CDR 3.4”;SEQ ID NO:11)、WQGTHSPYT(“V_L CDR 3.16”;SEQ ID NO:57)和GVGDAIKGQSVFV(“V_L CDR 3.19”;SEQ ID NO:58);V_H CDR1选自GYIFTSYW(“V_H CDR 1.3”;SEQ ID NO:1)、GYTFSSSW(“V_H CDR 1.4”;SEQ ID NO:7)、GYTFTSY(“V_H CDR 1.16”;SEQ ID NO:39)和GYSITSDYA(“V_H

CDR 1.19”;SEQ ID NO:40);V_H CDR2选自FYPGNSDS(“V_H CDR 2.3”;SEQ ID NO:2)、FLPGSGST(“V_H CDR 2.4”;SEQ ID NO:8)、INPSNGGT(“V_H CDR 2.16”;SEQ ID NO:43)和ISFSGYT(“V_H CDR 2.19”;SEQ ID NO:44);V_H CDR3选自TRRDSPQY(“V_H CDR 3.3”;SEQ ID NO:3)、ATDGNYDWFAY(“V_H CDR 3.4”;SEQ ID NO:9)、TRGGYYPFDY(“V_H CDR 3.16”;SEQ ID NO:47)和AREVNYGDSYHFDY(“V_H CDR 3.19”;SEQ ID NO:48)。见表1A。

[0078] 在一些实施方案中,针对hPG的C端部分产生的抗-hPG单克隆抗体具有三个可变轻链CDR和三个可变重链CDR,其中,V_L CDR1选自KSLRHTKGITF(“V_L CDR 1.8”;SEQ ID NO:49)和QSLLDSDGKTY(“V_L CDR 1.13”;SEQ ID NO:50);V_L CDR2选自QMS(“V_L CDR 2.8”;SEQ ID NO:52)和LVS(“V_L CDR 2.13”;SEQ ID NO:53);V_L CDR3选自AQNLELPIT(“V_L CDR 3.8”;SEQ ID NO:55)和WQGTHFPQT(“V_L CDR 3.13”;SEQ ID NO:56);V_H CDR1选自GFTFTTYA(“V_H CDR 1.8”;SEQ ID NO:37)和GFIFSSYG(“V_H CDR 1.13”;SEQ ID NO:38);V_H CDR2选自ISSGGTYT(“V_H CDR 2.8”;SEQ ID NO:41)和INTFGDRT(“V_H CDR 2.13”;SEQ ID NO:42);V_H CDR3选自ATQGNYSLDF(“V_H CDR 3.8”;SEQ ID NO:45)和ARGTGTY(“V_H CDR 3.13”;SEQ ID NO:46)。见表1B。

[0079]

表 1A
N 端抗-hPG 单克隆抗体

免疫原	杂交瘤 (保藏#)	MAb	鼠 CDR 序列	鼠 V _H 和 V _L 序列	人源化 V _H 和 V _L 序列 (设计的)
N1	43B9G11	MAb1			
N1	WESH2G7	MAB2			
N2	6B5B11C10	MAB3	V _H CDR 1.3 GYFTSYW (SEQ ID NO:1)	mV _H 3 (SEQ ID NO:12)	hV _H 3 (SEQ ID NO:21)
			V _H CDR 2.3 FYPGNSDS (SEQ ID NO:2)		
			V _H CDR 3.3 TRRDSPQY (SEQ ID NO:3)		
			V _L CDR 1.3 QSIHSHNGNTY (SEQ ID NO:4)		
			V _L CDR 2.3 KVS (SEQ ID NO:5)		
N2	20D2C3G2	MAB4	V _L CDR 3.3 FQGSHPPT (SEQ ID NO:6)	mV _L 3 (SEQ ID NO:13)	hV _L 3 (SEQ ID NO:22)
			V _H CDR 1.4 GYTFSSW (SEQ ID NO:7)		
			V _H CDR 2.4 FLPGSGST (SEQ ID NO:8)		
			V _H CDR 3.4 ATDGNVDWEAY (SEQ ID NO:9)		
			V _L CDR 1.4 QSLVHSSGVITY (SEQ ID NO:10)		
N2	1E9A4A4 (1-4376)	MAB15	V _L CDR 2.4 KVS (SEQ ID NO:5)	mV _L 4 (SEQ ID NO:15)	hV _L 4 (SEQ ID NO:24)
			V _L CDR 3.4 SQSTHVPPT (SEQ ID NO:11)		
N2	1E9D9B6	MAB16	V _H CDR 1.16 GYFTSYV (SEQ ID NO:39)	mV _H 16 (SEQ ID NO:61)	hV _H 16a (SEQ ID NO:84)
			V _H CDR 2.16 INPSNGGT (SEQ ID NO:43)		
			V _H CDR 3.16 TRGGYYPFDY (SEQ ID NO:47)		
			V _L CDR 1.16 QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:50)		
			V _L CDR 2.16 LVS (SEQ ID NO:53)		
N2			V _L CDR 3.16 WQGTSPYT (SEQ ID NO:57)	mV _L 16 (SEQ ID NO:65)	hV _L 16b (SEQ ID NO:87)

[0080]

表 1A N 端抗-hPG 单克隆抗体					
免疫原	杂交瘤 (保藏#)	MAb	鼠 CDR 序列	鼠 V _H 和 V _L 序列	人源化 V _H 和 V _L 序列 (设计的)
N2	1C8D10F5	MAb17			
N2	1A7C3F11	MAb18			
N2		MAB19	V _H CDR 1.19 GYSITSDYA (SEQ ID NO:40)	mV _H 19 (SEQ ID NO:62)	hV _H 19a (SEQ ID NO:90)
			V _H CDR 2.19 ISFSGYT (SEQ ID NO:44)		hV _H 19b (SEQ ID NO:92)
			V _H CDR 3.19 AREVNYGDSYHFDY (SEQ ID NO:48)		hV _H 19c (SEQ ID NO:94)
			V _L CDR 1.19 SQHRTYT (SEQ ID NO:51)	mV _L 19 (SEQ ID NO:66)	hV _L 19a (SEQ ID NO:91)
			V _L CDR 2.19 VKKDGSH (SEQ ID NO:54)		hV _L 19b (SEQ ID NO:93)
			V _L CDR 3.19 GVGDAIKGQSVFV (SEQ ID NO:58)		hV _L 19c (SEQ ID NO:95)
N2	1C11F5E8	MAB20			
免疫原 N1=SWKPRSQPDAPLG Ahx Cys BSA, 也表示为(SEQ ID NO:25) Ahx Cys BSA 免疫原 N2=SWKPRSQPDAPLG Ahx Cys KLH, 也表示为(SEQ ID NO:25) Ahx Cys KLH					

在表 1A 中, 用常规 N→C 取向表示所有氨基酸序列。对于各免疫原, 用一个氨基己酸 (Ahx) 残基后跟随半胱氨酸的接头合成前胃泌素肽, 然后将其与牛血清白蛋白 (“BSA”) 或匙孔棘血蓝蛋白 (“KLH”) 载体缀合。

表 1B C 端抗-hPG 单克隆抗体				
免疫原	杂交瘤 (保藏#)	MAb	鼠 CDR 序列	鼠 V _H 和 V _L 序列
C1	1B4A11D11 (I-4371)	Mab5		人源化 V _H 和 V _L 序列 (设计的)
C1	1B6A11F2 (I-4372)	Mab6		
C1	1B11E4B11 (I-4373)	Mab7		

表 1B
C 端抗-hPG 单克隆抗体

免疫原	杂交瘤 (保藏#)	MAb	鼠 CDR 序列	鼠 V _H 和 V _L 序列	人源化 V _H 和 V _L 序列(设计的)
C1	1C10D3B9	MAb8	V _H CDR 1.8 GFTFTTYA (SEQ ID NO:37)	mV _H .8 (SEQ ID NO:59)	hV _H 8a (SEQ ID NO:75)
			V _H CDR 2.8 ISSGGTYT (SEQ ID NO:41)		hV _H 8b (SEQ ID NO:77)
			V _H CDR 3.8 ATQGNYSLDF (SEQ ID NO:45)		hV _H 8c (SEQ ID NO:79)
			V _L CDR 1.8 KSLRHTKGITF (SEQ ID NO:49)		hV _L 8a (SEQ ID NO:76)
			V _L CDR 2.8 QMS (SEQ ID NO:52)		hV _L 8b (SEQ ID NO:78)
			V _L CDR 3.8 AQNLEPLT (SEQ ID NO:55)		hV _L 8c (SEQ ID NO:76)
C1	1D8F5B3	MAb9			
C1	1E1C7B4	MAb10			
C1	2B4C8C8 (I-4374)	MAb11			
C1	2B11E6G4 (I-4375)	MAb12			
C1	2C6C3C7	MAb13	V _H CDR 1.13 GFIFSSYG (SEQ ID NO:38)	mV _H .13 (SEQ ID NO:60)	hV _H .13a (SEQ ID NO:80)
			V _H CDR 2.13 INTFGDRT (SEQ ID NO:42)		hV _H .13b (SEQ ID NO:82)
			V _H CDR 3.13 ARGTGTY (SEQ ID NO:46)		
			V _L CDR 1.13 QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:50)		hV _L 13a (SEQ ID NO:81)
			V _L CDR 2.13 LVS (SEQ ID NO:53)		hV _L 13b (SEQ ID NO:83)
			V _L CDR 3.13 WQGTFFPQT (SEQ ID NO:56)		
C1	2H9F4B7	MAb14			
C2	1F11F5E10	MAb21			
C2	1F11F5G9	MAb22			
C2	1A11F2C9	MAb23			
免疫原 C1=KLH Cys Ahx Ahx QGPWLEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, 也表示为 KLH Cys Ahx Ahx (SEQ ID NO:27)					
免疫原 C2=DT Cys Ahx Ahx QGPWLEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, 也表示为 DT Cys Ahx Ahx (SEQ ID NO:27)					

[0082] 在表1B中,用常规N→C取向表示所有氨基酸序列。对于各免疫原,用两个氨基己酸(Ahx)残基后跟随半胱氨酸的接头合成前胃泌素肽,然后将其与匙孔槭血蓝蛋白(“KLH”)或白喉毒素(“DT”)载体缀合。

[0083] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.3、V_HCDR2.3和V_HCDR3.3。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链具有对应于mV_H.3(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。见图2A。

[0084] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链的CDR是V_LCDR1.3、V_LCDR2.3和V_LCDR3.3。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链具有对应于mV_L.3(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列。见图2B。

[0085] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.4、V_HCDR2.4和V_HCDR3.4。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链具有对应于mV_H.4(SEQ ID NO:14)的序列。见图2C。

[0086] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链的CDR是V_LCDR1.4、V_LCDR2.4和V_LCDR3.4。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链具有对应于mV_L.4(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列。见图2D。

[0087] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.8、V_HCDR2.8和V_HCDR3.8。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链具有对应于mV_H.8(SEQ ID NO:59)的序列。见图2E。

[0088] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链的CDR是V_LCDR1.8、V_LCDR2.8和V_LCDR3.8。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链具有对应于mV_L.8(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列。见图2F。

[0089] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.13、V_HCDR2.13和V_HCDR3.13。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链具有对应于mV_H.13(SEQ ID NO:60)的序列。见图2G。

[0090] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链的CDR是V_LCDR1.13、V_LCDR2.13和V_LCDR3.13。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链具有对应于mV_L.13(SEQ ID NO:64)的氨基酸序列。见图2H。

[0091] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.16、V_HCDR2.16和V_HCDR3.16。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链具有对应于mV_H.16(SEQ ID NO:61)的序列。见图2I。

[0092] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链的CDR是V_LCDR1.16、V_LCDR2.16和V_LCDR3.16。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链具有对应于mV_L.16(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列。见图2J。

[0093] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.19、V_HCDR2.19和V_HCDR3.19。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链具有对应于mV_H.19(SEQ ID NO:62)的序列。见图2K。

[0094] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链的CDR是V_LCDR1.19、V_LCDR2.19和V_LCDR3.19。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_L链具有对应于mV_L.19(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列。见图2L。

[0095] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.3、V_HCDR2.3和V_HCDR3.3,V_L链的CDR是V_LCDR1.3、V_LCDR2.3和V_LCDR3.3。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链具有对应于mV_H.3(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,V_L链具有对应于mV_L.3(SEQ ID NO:13)的序列。

[0096] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.4、V_HCDR2.4和V_HCDR3.4,V_L链的CDR是V_LCDR1.4、V_LCDR2.4和V_LCDR3.4。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链具有对应于mV_H.4(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列,V_L链具有对应于mV_L.4(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列。

[0097] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.8、V_HCDR2.8和V_HCDR3.8,V_L链的CDR是V_LCDR1.8、V_LCDR2.8和V_LCDR3.8。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体是本文所述抗-hPG Mab 8,且包含对应于mV_H.8(SEQ ID NO:59)的氨基酸序列和对应于mV_L.8(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列。

[0098] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.3、V_HCDR2.13和V_HCDR3.13,V_L链的CDR是V_LCDR1.13、V_LCDR2.13和V_LCDR3.13。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体是本文所述抗-hPG Mab 13,且包含对应于mV_H.13(SEQ ID NO:60)的氨基酸序列和对应于mV_L.13(SEQ ID NO:64)的氨基酸序列。

[0099] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.16、V_HCDR2.16和V_HCDR3.16,V_L链的CDR是V_LCDR1.16、V_LCDR2.16和V_LCDR3.16。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体是本文所述抗-hPG Mab 16,且包含对应于mV_H.16(SEQ ID NO:61)的氨基酸序列和对应于mV_L.16(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列。

[0100] 在一些实施方案中,抗-hPG单克隆抗体的V_H链的CDR是V_HCDR1.19、V_HCDR2.19和V_HCDR3.19,V_L链的CDR是V_LCDR1.19、V_LCDR2.19和V_LCDR3.19。在具体实施方案中,抗-hPG单克隆抗体是本文所述抗-hPG Mab 19,且包含对应于mV_H.19(SEQ ID NO:62)的氨基酸序列和对应于mV_L.19(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列。

[0101] 本公开的抗-hPG单克隆抗体包括完整分子和能够特异性结合hPG的抗体片段(例如Fab和F(ab')₂片段)二者。Fab和F(ab')₂片段缺乏完整抗体的Fc片段,更快地从动物或植物的循环清除,且可以具有比完整抗体少的非特异性组织结合(Wahl等,1983,J.Nucl.Med.24:316)。因此,抗体片段用于治疗应用等应用。

[0102] 术语“抗体片段”指全长抗体的部分,通常是靶结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。“Fv”片段是包含完整的靶识别和结合部位的最小抗体片段。此区域由紧密非共价结合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体(V_H-V_L二聚体)组成。每个可变结构域的三个CDR正是在此构型中相互作用来限定V_H-V_L二聚体表面上的靶结合部位。通常,六个CDR赋予抗体靶结合特异性。但是,在一些情况下,虽然亲和力比整个结合部位低,但甚至单个可变结构域(或Fv的一半,其仅包含三个对靶标特异的CDR)也具有识别和结合靶标的能力。“单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。通常,Fv多肽进一步在V_H和V_L结构域之间包含多肽接头,该接头使得scFv能够形成希望的结构用于靶标结合。“单结构域抗体”由对hPG显示足够亲和力的单个V_H或V_L结构域组成。在具体实施方案中,单结构域抗体是骆驼源化抗体(见例如Riechmann,1999,Journal of Immunological Methods 231:25-38)。

[0103] Fab片段包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH₁)。Fab'片段与Fab片段的相同之处在于在重链CH₁结构域的羧基端加入了包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸的一些残基。通过切割F(ab')₂胃蛋白酶消化产物铰合部半胱氨酸处的二硫键来产生F(ab')片段。抗体片段的其他化学偶联为本领域普通技术人员已知。

[0104] 本公开的抗-hPG单克隆抗体可以是嵌合抗体。本文所用的术语“嵌合”抗体指具有衍生自非人免疫球蛋白(如大鼠或小鼠抗体)的可变序列和人免疫球蛋白恒定区(通常选自人免疫球蛋白模板)的抗体。用于产生嵌合抗体的方法为本领域已知。见例如Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7; Oi等, 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies等, 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202; 美国专利号5,807,715、4,816,567和4,816,397; 这些文献在此以其整体引入作为参考。

[0105] 本公开的抗-hPG单克隆抗体可以是人源化的。非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是包含衍生自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他结合靶标的子序列)。一般而言,人源化抗体将包含至少一个(且通常为两个)可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,全部或基本上全部FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些,且可以称为“CDR移植”。人源化抗体还可以包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白共有序列的恒定区。抗体人源化的方法(包括设计人源化抗体的方法)为本领域已知。见例如Lefranc等, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77; Lefranc等, 2009, Nucl. Acids Res. 37:D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40:101-111; Riechmann等, 1988, Nature 332:323-7; Queen等的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,180,370; EP239400; PCT公开WO 91/09967; 美国专利号5,225,539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498; Studnicka等, 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973; 和美国专利号5,565,332; 所有文献在此以其整体引入作为参考。

[0106] 按下文实施例中所述从本公开的鼠抗-hPG单克隆抗体设计人源化抗-hPG单克隆抗体的序列。人源化抗体的具体实施方案包括含有以下的抗体:(1)本文公开的任意三个VL CDR和任意三个VH CDR;(2)包含对应于SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和包含对应于SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区;(3)包含对应于SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和包含对应于SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区;(4)包含选自SEQ ID NO:75、77和79的氨基酸序列的重链可变区及包含选自SEQ ID NO:76和78的氨基酸序列的轻链可变区;(5)包含选自SEQ ID NO:80和82的氨基酸序列的重链可变区及包含选自SEQ ID NO:81和83的氨基酸序列的轻链可变区;(6)包含选自SEQ ID NO:84、86和88的氨基酸序列的重链可变区及包含选自SEQ ID NO:85、87和89的氨基酸序列的轻链可变区;(7)包含选自SEQ ID NO:90、92和94的氨基酸序列的重链可变区及包含选自SEQ ID NO:91、93和95的氨基酸序列的轻链可变区。

[0107] 本公开的抗-hPG单克隆抗体可以是灵长类源化的。术语“灵长类源化抗体”指包含猴可变区和人恒定区的抗体。用于产生灵长类源化抗体的方法为本领域已知。见例如美国专利号5,658,570、5,681,722和5,693,780,这些专利在此以其整体引入作为参考。

[0108] 抗-hPG单克隆抗体包括与参考抗体(例如多克隆抗-hPG抗体或本文公开的任意

抗-hPG单克隆抗体)竞争的抗体。与本公开的抗-hPG单克隆抗体竞争的抗体用于多种诊断和治疗应用。适宜的参考抗-hPG单克隆抗体的具体实施方案包括本文所述抗体,例如,但不限于:包含本文公开的任意三个VL CDR和任意三个VH CDR的抗体;其中VH链具有对应于SEQ ID NO:12(mVH.3)的氨基酸序列,VL链具有对应于SEQ ID NO:13(mVL.3)的氨基酸序列的抗体;其中VH链具有对应于SEQ ID NO:14(mVH.4)的氨基酸序列,VL链具有对应于SEQ ID NO:15(mVL.4)的氨基酸序列的抗体;其中VH链具有对应于SEQ ID NO:59(mVH.8)的氨基酸序列,VL链具有对应于SEQ ID NO:63(mVL.8)的氨基酸序列的抗体;其中VH链具有对应于SEQ ID NO:60(mVH.13)的氨基酸序列,VL链具有对应于SEQ ID NO:64(mVL.13)的氨基酸序列的抗体;其中VH链具有对应于SEQ ID NO:61(mVH.16)的氨基酸序列,VL链具有对应于SEQ ID NO:65(mVL.16)的氨基酸序列的抗体;其中VH链具有对应于SEQ ID NO:62(mVH.19)的氨基酸序列,VL链具有对应于SEQ ID NO:66(mVL.19)的氨基酸序列的抗体;或本文公开的VH和VL链的任意组合。

[0109] 适宜的参考抗体还包括:由选自43B9G11、WE5H2G7、6B5B11C10、20D2C3G2、1B4A11D11、1B6A11F2、1B11E4B11、1C10D3B9、1D8F5B3、1E1C7B4、2B4C8C8、2B11E6G4、2C6C3C7、2H9F4B7、1E9A4A4、1E9D9B6、1C8D10F5、1A7C3F11、1B3B4F11、1C11F5E8、1F11F5E10、1F11F5G9和1A11F2C9的杂交瘤产生的抗体;结合包含hPG的残基10至14(SEQ ID NO:28)、hPG的残基9至14(SEQ ID NO:29)、hPG的残基4至10(SEQ ID NO:30)、hPG的残基2至10(SEQ ID NO:31)或hPG的残基2至14(SEQ ID NO:32)的表位的抗体;结合包含hPG的残基71至74(SEQ ID NO:33)、hPG的残基69至73(SEQ ID NO:34)、hPG的残基76至80(SEQ ID NO:35)或hPG的残基67至74(SEQ ID NO:36)的表位的抗体。

[0110] 可以用如下竞争性测定来测试与本公开的单克隆抗体竞争结合PG(例如hPG)的能力。按在1-10 μ g/ml的范围内选择的浓度用捕获抗体(识别前胃泌素的N端或C端区域的多克隆或单克隆抗体,该区域不同于参考单克隆抗体识别的表位)在4 $^{\circ}$ C过夜包被96孔板(0.1-1 μ g/孔)。用含0.1%Tween-20/0.1%BSA的PBS(封闭缓冲液)在22 $^{\circ}$ C封闭2小时后,按10pM至1nM(10至1000pg/孔)的浓度加入重组人前胃泌素,并在22 $^{\circ}$ C孵育2小时。然后,连同渐增浓度的未标记测试抗体一起加入生物素化的参考抗-hPG单克隆抗体或含有参考单克隆抗体的混合物,并在22 $^{\circ}$ C孵育1小时。洗涤后,通过用辣根过氧化物酶的荧光底物在22 $^{\circ}$ C孵育1小时,然后在发光计中定量相对光单位(RLU)来进行检测。测定一式两份地进行。与本公开的参考抗-hPG单克隆抗体竞争的抗体抑制参考抗体与hPG的结合。如结合标记的减少所证明,与对照抗体结合相同的表位的抗体将能够有效地竞争结合,因此将显著减少(例如减少至少50%)参考抗体结合。(标记的)参考抗体在缺乏完全不相关的抗体的情况下的反应性将是对照高值。通过用表达前胃泌素的细胞孵育未标记的测试抗体,然后用精确相同的类型的标记对照抗体孵育细胞/抗体混合物(此时发生竞争并减少标记抗体的结合)来获得对照低值。在测试测定中,标记抗体反应性在测试抗体的存在下显著降低是识别基本上相同的表位的测试抗体的指示。

[0111] 结合抑制可以表示为根据以下公式计算的抑制常数或 K_i :

[0112] $K_i = IC_{50} / (1 + [\text{参考Ab浓度}] / K_d)$

[0113] 其中测试抗体的 IC_{50} 是产生参考抗体的结合减少50%的测试抗体浓度, K_d 是参考抗体的解离常数(其对前胃泌素的亲和力的测量)。与本文公开的抗-hPG单克隆抗体竞争的

抗体在本文所述测定条件下可以具有从10pM至10nM的 K_i 。

[0114] 在多种实施方案中,在按0.01 μ g/ml、0.08 μ g/ml、0.4 μ g/ml、2 μ g/ml、10 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml的浓度或按任意前述值之间的浓度(例如,按2 μ g/ml至10 μ g/ml范围内的浓度)使用时,本公开的未标记的抗-hPG单克隆抗体使标记参考抗体的结合减少至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、100%、或任意前述值之间的百分比(例如,本公开的抗-hPG单克隆抗体使标记参考抗体的结合减少50%至70%)

[0115] 在进行参考抗体和任意测试抗体(不考虑物种或同种型)之间的抗体竞争研究时,可以先用可检测标记(如生物素或酶(或甚至放射性)标记)标记参考,使得能够进行随后的鉴定。在这种情况下,用已知量的前胃泌素孵育标记的参考抗体(固定浓度或渐增浓度)。然后向前胃泌素和标记抗体的预结合复合体中加入未标记的测试抗体。测量结合的标记的强度。如果测试抗体通过结合重叠表位来与标记抗体竞争,则强度相对于对照标记抗体在缺乏测试抗体的情况下的结合将降低。

[0116] 已知用于竞争的测定,且可以对其进行修改,以产生与上述测定可比的结果。该测定可以是基于抗体竞争的一系列免疫学测定中的任一种,且可以通过检测它们的标记的手段来检测参考抗体,例如在生物素化抗体的情况下通过使用链霉抗生物素蛋白,或者通过使用与酶标记关联的显色底物(如过氧化物酶的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物),或通过简单地检测放射性标记或荧光标记。

[0117] 本文还包括衍生、共价修饰或与其他分子缀合的用于诊断和治疗应用的抗-hPG单克隆抗体。例如,但不作为限制,衍生抗体包括已例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化(pegylation)、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团衍生化、蛋白酶剪切、与细胞配体或其他蛋白质连接等修饰的抗体。可以通过已知的技术(包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等)来进行许多化学修饰中的任一种。此外,衍生物可以包含一个或多个非经典氨基酸。

[0118] 在另一实例中,本公开的抗体可以与聚乙二醇(PEG)部分连接。在具体实施方案中,该抗体是抗体片段,PEG部分通过定位在抗体片段中的任意可得的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团(例如任意自由氨基、亚胺基、巯基、羟基或羧基)连接。这类氨基酸可以天然存在于抗体片段中,或者用重组DNA法改造在片段中。见例如美国专利号5,219,996。可以用多个位点来连接两个或多个PEG分子。可以通过定位在抗体片段中的至少一个半胱氨酸的巯基共价连接PEG部分。用巯基作为连接点时,可以使用适当活化的效应部分,例如巯基选择性衍生物(如马来酰亚胺)和半胱氨酸衍生物。

[0119] 在具体实例中,抗-hPG单克隆抗体缀合物是例如按照EP0948544中公开的方法聚乙二醇化(即具有与之共价连接的PEG(聚乙二醇))的修饰的Fab'片段。还见Poly(ethyleneglycol)Chemistry,Biotechnical and Biomedical Applications,(J.Milton Harris(编辑),Plenum Press,New York,1992);Poly(ethyleneglycol)Chemistry and Biological Applications,(J.Milton Harris和S.Zalipsky编辑,American Chemical Society,Washington D.C.,1997);和Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences,(M.Aslam和A.Dent编辑,Grove Publishers,New York,1998);和Chapman,2002,Advanced Drug Delivery Reviews 54:531-545。PEG可以与铰链区中的半胱氨酸连接。在一个实例中,PEG修饰的Fab'片段具有与修饰的铰链区中的单个硫

基共价连接的马来酰亚胺基。赖氨酸残基可以与马来酰亚胺基共价连接,赖氨酸残基上的每个氨基可以连接具有约20,000Da的分子量的甲氧基聚(乙二醇)聚合物。因此,与Fab'片段连接的PEG的总分子量可以是约40,000Da。

[0120] 抗-hPG单克隆抗体包括用于诊断应用的标记抗体。可以在诊断上使用抗体,例如以检测目的靶标在具体细胞、组织或血清中的表达;或作为临床测试方法的部分监测免疫应答的发展或进展来例如确定给定的治疗方案的功效。可以通过使抗体与可检测物质或“标记”偶联来便于检测。标记可以直接或间接与本公开的抗-hPG单克隆抗体缀合。标记可以自身是可检测的(例如放射性同位素标记、同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可以催化底物化合物或组合物的可检测的化学变化。可检测物质的实例包括多种酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质、放射性物质、使用多种正电子成像术的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。可以用本领域已知的技术直接或通过中间体(例如本领域已知的接头)间接地将可检测物质与抗体(或其片段)偶联或缀合。酶标记的实例包括萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;美国专利号4,737,456)、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶(如辣根过氧化物酶(HRPO))、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。适宜的辅基复合体的实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素;适宜的荧光物质的实例包括伞形酮、萤光素、异硫氰酸萤光素、罗丹明、二氯三嗪基萤光素、丹磺酰氯、二甲胺-1-萘磺酰氯或藻红蛋白等;发光物质的实例包括鲁米诺;生物发光物质的实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;适宜的同位素物质的实例包括 ^{13}C 、 ^{15}N 和氩;适宜的放射性物质的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc 。

[0121] 本发明包含所有物种来源的抗-hPG单克隆抗体。非限制性示例性天然抗体包括衍生自人类、猿猴、鸡、山羊、兔和啮齿动物(例如大鼠、小鼠和仓鼠)的抗体(见例如Lonberg等,W093/12227;美国专利号5,545,806;和Kucherlapati等,W091/10741;美国专利号6,150,584;这些专利在此以其整体引入作为参考)。天然抗体是用抗原(如多肽)免疫后由宿主动物产生的抗体。

[0122] 核酸和表达系统

[0123] 本公开涵盖编码抗-hPG单克隆抗体的免疫球蛋白轻链和重链基因的核酸分子、包含这类核酸的载体及能够产生本公开的抗-hPG单克隆抗体的宿主细胞。

[0124] 可以通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备本公开的抗-hPG单克隆抗体。为了重组表达抗体,用携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的DNA片段的一个或多个重组表达载体转染宿主细胞,使得轻链和重链在宿主细胞中表达并可选地分泌进入培养该宿主细胞的培养基中,可以从该培养基回收抗体。用标准重组DNA方法来获得抗体重链和轻链基因、将这些基因掺入重组表达载体并将该载体引入宿主细胞,如Molecular Cloning;A Laboratory Manual,第二版(Sambrook,Fritsch 和Maniatis(编辑),Cold Spring Harbor,N.Y.,1989);Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel,F.M.等编辑,Green Publishing Associates,1989);和美国专利号4,816,397中所述的那些。

[0125] 为了产生编码这类抗-hPG单克隆抗体的核酸,首先获得编码轻链和重链可变区的

DNA片段。可以例如使用聚合酶链反应(PCR),通过扩增和修饰编码轻链和重链可变序列的种系DNA或cDNA来获得这些DNA。人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列为本领域已知(见例如Lefranc等,2003,Dev.Comp.Immunol.27:55-77;Lefranc等,2009,Nucl.Acids Res.37:D1006-1012;Lefranc,2008,Mol.Biotechnol.40:101-111;“VBASE”人种系序列数据库;还见Kabat,E.A.等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;Tomlinson等,1992,J.Mol.Biol.22T:116-198;和Cox等,1994,Eur.J.Immunol.24:827-836;每篇文献的内容在此引入作为参考)。

[0126] 一旦获得编码抗-hPG单克隆抗体相关V_H和V_L区段的DNA片段,即可以通过标准重组DNA技术进一步操作这些DNA片段,例如以将可变区基因转化为全长抗体基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,使编码V_L或V_H的DNA片段与编码另一蛋白质(例如抗体恒定区或柔性接头)的另一DNA片段有效连接。此背景中所用的术语“有效连接”指两个DNA片段这样连接,使得两个DNA片段编码的氨基酸序列仍然符合读框。

[0127] 可以通过将编码V_H的DNA与编码重链恒定区(CH₁、CH₂、CH₃和可选的CH₄)的另一DNA分子有效连接来将分离的编码V_H区的DNA转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列为本领域已知(见例如Kabat,E.A.等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242),且可以通过标准PCR扩增来获得涵盖这些区域的DNA片段。重链恒定区可以是IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但在一些实施方案中是IgG₁或IgG₄恒定区。对于Fab片段重链基因,可以将编码V_H的DNA与仅编码重链CH₁恒定区的另一DNA分子有效连接。

[0128] 可以通过将编码V_L的DNA与编码轻链恒定区CL的另一DNA分子有效连接来将分离的编码V_L区的DNA转化为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列为本领域已知(见例如Kabat,E.A.等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版(U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)),且可以通过标准PCR扩增来获得涵盖这些区域的DNA片段。轻链恒定区可以是κ或λ恒定区,但在一些实施方案中是κ恒定区。为了产生scFv基因,将编码V_H和V_L的DNA片段与编码柔性接头(例如编码氨基酸序列(Gly₄~Ser)₃(SEQ ID NO:99))的另一片段有效连接,使得V_H和V_L序列可以表达为连续的单链蛋白质,V_H和V_L区通过柔性接头连接(见例如Bird等,1988,Science 242:423-426;Huston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty等,1990,Nature 348:552-554)。

[0129] 为了表达本公开的抗-hPG单克隆抗体,将按照上文所述获得的编码部分或全长轻链和重链的DNA插入表达载体,使得基因与转录和翻译控制序列有效连接。在此背景中,术语“有效连接”指将抗体基因连接入载体,使得载体内的转录和翻译控制序列执行其调节抗体基因的转录和翻译的预期功能。选择与所用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入分开的载体,或者通常将两个基因插入同一表达载体。

[0130] 通过标准方法将抗体基因插入表达载体(例如抗体基因片段和载体上的互补限制位点的连接,或不存在限制位点时的平端连接)。在插入抗-hPG单克隆抗体相关轻链或重链

序列之前,表达载体可以已经携带抗体恒定区序列。例如,将抗-hPG单克隆抗体相关V_H和V_L序列转化为全长抗体基因的一种途径是分别将它们插入已经编码重链恒定区和轻链恒定区的表达载体,使得V_H区段与载体内的一个或多个CH区段有效连接,V_L区段与载体内的CL区段有效连接。此外或备选地,重组表达载体可以编码便于抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可以将抗体链基因克隆入载体,使得信号肽与抗体链基因的氨基酸符合读框地连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0131] 除抗体链基因外,本公开的重组表达载体还携带控制抗体链基因在宿主细胞中的表达的调节序列。术语“调节序列”旨在包括控制抗体链基因的转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如多腺苷酸化信号)。这类调节序列描述于例如Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185(Academic Press, San Diego, CA, 1990)中。本领域技术人员将理解,表达载体的设计(包括调节序列的选择)可以取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、希望的蛋白质表达水平等的因素。适合用于哺乳动物宿主细胞表达的调节序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平蛋白质表达的病毒元件,如衍生自巨细胞病毒(CMV)(如CMV启动子/增强子)、猿猴病毒40(SV40)(如SV40启动子/增强子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。病毒调节元件及其序列的进一步描述见例如Stinski的美国专利号5,168,062、Bell等的美国专利号4,510,245和Schaffner等的美国专利号4,968,615。

[0132] 除抗体链基因和调节序列外,本公开的重组表达载体还可以携带其他序列,如调节载体在宿主细胞中的复制的序列(例如复制起点)和选择标记基因。选择标记基因便于选择已将载体引入其中的宿主细胞(见例如美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017,全都属于Axel等)。例如,通常,选择标记基因赋予已将载体引入其中的宿主细胞对药物(如G418、潮霉素或氨甲喋呤)的抗性。适宜的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于DHFR⁻宿主细胞中进行氨甲喋呤选择/扩增)和neo基因(用于G418选择)。为了表达轻链和重链,通过标准技术将编码重链和轻链的一个或多个表达载体转染入宿主细胞。术语“转染”的多种形式旨在涵盖通常用来将外源DNA引入原核或真核宿主细胞的多种技术,例如电穿孔、脂转染、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。

[0133] 可能在原核或真核宿主细胞中表达本公开的抗体。在某些实施方案中,在最佳分泌正确折叠且具有免疫学活性的抗体的真核细胞(例如哺乳动物宿主细胞)中进行抗体的表达。用于表达本公开的重组抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220中所述的DHFR⁻CHO细胞,其与例如Kaufman和Sharp, 1982, *Mol. Biol.* 159:601-621中所述的DHFR选择标记一起使用)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。在将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞足以允许抗体在宿主细胞中表达或允许抗体分泌进入培养宿主细胞的培养基中的一段时间。可以用标准蛋白质纯化方法从培养基回收抗体。还可以用宿主细胞来产生完整抗体的部分,如Fab片段或scFv分子。应理解,以上方法的变更也在本公开的范围之内。例如,可以希望用编码本公开的抗-hPG单克隆抗体的轻链或重链(但不是二者)的DNA转染宿主细胞。

[0134] 还可以用重组DNA技术来去除编码重链和轻链之一或二者的DNA的并非结合hPG所必需的一些或全部。本公开的抗体还涵盖从这类截短DNA分子表达的分子。

[0135] 为了重组表达本公开的抗-hPG单克隆抗体,可以用本公开的两个表达载体共转染宿主细胞,第一载体编码重链衍生的多肽,第二载体编码轻链衍生的多肽。两个载体可以包含相同的选择标记,或者它们可以各包含分开的选择标记。备选地,可以使用编码重链和轻链多肽二者的单个载体。

[0136] 一旦获得编码抗-hPG单克隆抗体的一个或多个部分的核酸,即可以进一步在编码序列中引入改变或突变,例如以产生编码具有不同CDR的抗体、对Fc受体具有降低的亲力的抗体或不同亚类的抗体的核酸。

[0137] 还可以通过化学合成(例如通过Solid Phase Peptide Synthesis,第2版,1984 The Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.中所述的方法)产生本公开的抗-hPG单克隆抗体。还可以用无细胞平台产生变体抗体(见例如Chu等,Biochemia No.2,2001(Roche Molecular Biologicals))。

[0138] 一旦通过重组表达产生了本公开的抗-hPG单克隆抗体,即可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的方法来纯化它,例如通过层析(例如离子交换层析、亲和层析和筛分柱层析(sizing column chromatography))、离心、差别溶解度,或通过任意其他用于纯化蛋白质的标准技术。此外,还可以将本公开的抗-hPG单克隆抗体或其片段与本文所述或本领域已知的异源多肽序列融合,以便于纯化。

[0139] 一旦分离,即可以根据需要例如通过高效液相层析(见例如Fisher,Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology(Work和Burdon编辑,Elsevier,1980))或通过Superdex™ 75柱(Pharmacia Biotech AB,Uppsala,瑞典)上的凝胶过滤层析进一步纯化抗-hPG单克隆抗体。

[0140] 本公开提供能够产生抗-hPG单克隆抗体的宿主细胞。宿主细胞可能是用重组DNA技术改造为表达编码重链和轻链基因的细胞,或衍生自适宜生物并针对产生希望的抗体的能力选择的杂交瘤。

[0141] 能够产生抗-hPG单克隆抗体的宿主细胞可以是杂交瘤。用于产生杂交瘤的方法为本领域已知(见例如Kohler和Milstein,1975,Nature 256:495),下文提供实例。通常,用免疫原(如目的肽)免疫宿主动物(如小鼠)来引出产生能够特异性结合该免疫原的抗体的淋巴细胞(例如脾细胞)的发育。备选地,可以在体外免疫分离的淋巴细胞(包括脾细胞、淋巴结细胞或外周血淋巴细胞)。然后用适宜的融合剂(例如聚乙二醇)使淋巴细胞与无限增殖化细胞系(如骨髓瘤细胞系)融合来形成杂交瘤细胞系。适宜的无限增殖化细胞系可以是哺乳动物来源的,如鼠、牛或人。然后在任意适宜的培养基中培养杂交瘤细胞,该培养基包含一种或多种抑制未融合的无限增殖化细胞的生长或存活物质。例如,在使用缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT)的亲本细胞时,可以在抑制亲本未融合细胞生长的包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基(“HAT”培养基)中培养融合体(fusion)。

[0142] 在一些实施方案中,N端抗-hPG单克隆抗体具有对应于可从杂交瘤43B9G11(产生抗-hPG MAbs 1)、WE5H2G7(产生抗-hPG MAbs 2)、6B5B11C10(产生抗-hPG MAbs 3)、20D2C3G2(产生抗-hPG MAbs 4)、1E9A4A4(产生抗-hPG MAbs 15)、1E9D9B6(产生抗-hPG MAbs 16)、1C8D10F5(产生抗-hPG MAbs 17)、1A7C3F11(产生抗-hPG MAbs 18)、1B3B4F11(产生抗-hPG MAbs 19)和1C11F5E8(产生抗-hPG MAbs 20)获得的单克隆抗体的V_L的可变轻链(V_L)CDR。

[0143] 在一些实施方案中,N端抗-hPG单克隆抗体具有对应于可从以上杂交瘤获得的单

克隆抗体的V_L和V_H CDR的V_L和V_H CDR。

[0144] 在一些实施方案中,C端抗-hPG单克隆抗体具有对应于可从杂交瘤1B4A11D11(产生抗-hPG MA b 5)、1B6A11F2(产生抗-hPG MA b 6)、1B11E4B11(产生抗-hPG MA b 7)、1C10D3B9(产生抗-hPG MA b 8)、1D8F5B3(产生抗-hPG MA b 9)、1E1C7B4(产生抗-hPG MA b 10)、2B4C8C8(产生抗-hPG MA b 11)、2B11E6G4(产生抗-hPG MA b 12)、2C6C3C7(产生抗-hPG MA b 13)、2H9F4B7(产生抗-hPG MA b 14)、1F11F5E10(产生抗-hPG MA b 21)、1F11F5G9(产生抗-hPG MA b 22)和1A11F2C9(产生抗-hPG MA b 23)获得的单克隆抗体的V_L的V_L CDR。

[0145] 在一些实施方案中,C端抗-hPG单克隆抗体具有对应于可从以上杂交瘤获得的单克隆抗体的V_L和V_H CDR的V_L和V_H CDR。

[0146] 在一个实施方案中,提供能够产生包含含有SEQ ID NO:12的重链可变区和含有SEQ ID NO:13的轻链可变区的抗-hPG抗体的宿主细胞。在一个实施方案中,提供能够产生包含含有SEQ ID NO:14的重链可变区和含有SEQ ID NO:15的轻链可变区的抗-hPG抗体的宿主细胞。在一个实施方案中,提供能够产生包含含有SEQ ID NO:59的重链可变区和含有SEQ ID NO:63的轻链可变区的抗-hPG抗体的宿主细胞。在一个实施方案中,提供能够产生包含含有SEQ ID NO:60的重链可变区和含有SEQ ID NO:64的轻链可变区的抗-hPG抗体的宿主细胞。在一个实施方案中,提供能够产生包含含有SEQ ID NO:61的重链可变区和含有SEQ ID NO:65的轻链可变区的抗-hPG抗体的宿主细胞。在一个实施方案中,提供能够产生包含含有SEQ ID NO:62的重链可变区和含有SEQ ID NO:66的轻链可变区的抗-hPG抗体的宿主细胞。

[0147] 在一些实施方案中,本公开的宿主细胞包含选自编码SEQ ID NO:12、14、59、60、61和62的重链可变区多肽的核苷酸序列的核酸;选自编码SEQ ID NO:13、15、63、64、65和66的轻链可变区多肽的核苷酸序列的核酸。在一些实施方案中,重链可变区由选自SEQ ID NO:16、18、67、68、69和70的核酸序列编码。在一些实施方案中,轻链可变区由选自SEQ ID NO:17、19、71、72、73和74的核酸序列编码。

[0148] 在一些实施方案中,提供编码人源化抗-hPG单克隆抗体的重链可变区的多核苷酸序列。具体实施方案包括编码具有选自SEQ ID NO:21、23、75、77、79、80、82、84、86、88、90、92和94的氨基酸序列的多肽的多核苷酸。在一些实施方案中,提供编码人源化抗-hPG单克隆抗体的轻链可变区的多核苷酸序列。具体实施方案包括编码具有选自SEQ ID NO:22、24、76、78、81、83、85、87、89、91、93和95的氨基酸序列的多肽的多核苷酸。

[0149] 抗-hPG单克隆抗体的生物学活性

[0150] PG涉及CRC肿瘤细胞存活和/或增殖。虽然并非旨在受限于任何操作理论,但认为中和性抗-PG单克隆抗体通过结合PG来阻断或抑制PG与它的一个或多个信号发放配偶体相互作用的能力。这转而阻断或抑制对前胃泌素的细胞应答,如细胞增殖、减少的细胞分化和/或减少的细胞死亡、和/或肿瘤生长。由于这些活性的结果,可以在多种体外、体内和离体背景中用本公开的中和性抗-hPG单克隆抗体来结合PG和阻断依赖PG的信号发放。

[0151] 因此,本公开提供抑制CRC细胞中依赖PG的应答的方法。通常,该方法包括以对抑制CRC细胞的一种或多种PG诱导的应答(例如CRC细胞的增殖和/或存活)有效的量使CRC细胞与中和性抗-PG单克隆抗体接触或使细胞群体暴露于中和性抗-PG单克隆抗体。可以按照用于测量细胞数目、肿瘤数目或肿瘤大小随时间增加的测定来测定体外和体内增殖或其抑

制。细胞增殖和肿瘤的抑制的测定为本领域公知。

[0152] 阻断依赖PG的信号发放可以通过增加细胞死亡来抑制CRC细胞的存活。可以通过测量活的癌细胞数目随时间(例如24或48小时)的减少来测定体外或体内CRC细胞存活的抑制。细胞死亡的测定为本领域公知。此外,本文提供细胞存活测定的实例。

[0153] 研究进一步表明,抑制CRC肿瘤细胞中依赖PG的信号发放可以通过触发程序性细胞死亡或凋亡来抑制CRC细胞的存活。可以通过本领域已知的任意手段来测定凋亡的诱导,其包括但不限于测量具有促凋亡或抗凋亡活性的基因的表达变化。例如,促凋亡基因(例如Bax)的表达随时间(例如48小时)增加指示凋亡的增加。类似地,抗凋亡基因(例如但不限于Bcl-2)的表达随时间(例如72或96小时)减少指示凋亡的增加。用于测量基因表达变化的技术(如实时定量PCR)为本领域公知。见例如Hollande等,WO 2007/135542。

[0154] 依赖前胃泌素的信号发放的抑制还刺激细胞分化。因此,抑制CRC细胞的增殖和/或存活的方法包括施用对在体外或体内诱导CRC细胞的分化有效的量的中和性抗-PG单克隆抗体。可以通过测量细胞分化的遗传标记(例如但不限于Muc-2)或分化的肠细胞(例如杯形细胞)的其他标记的表达随时间(例如24或48小时)的增加来测定CRC细胞的分化。可以通过本领域已知的任意手段来测量基因表达的变化。见例如Hollande等,WO 2007/135542。还可以用标准方法测定其表达或阻抑依赖于PG的其他基因(如ICAT)。见同一专利。

[0155] 药物组合物

[0156] 抗-PG单克隆抗体可以配制在组合物中。可选地,组合物可以包含一种或多种其他治疗剂,如下文所述第二治疗剂。组合物通常将作为无菌药物组合物的部分提供,该无菌药物组合物通常将包含可药用载体。此组合物可以是任意适宜的形式(取决于希望的对患者施用它的方法)。

[0157] 可以通过多种途径对患者施用本公开的抗-hPG单克隆抗体,如口服、经皮、皮下、鼻内、静脉内、肌内、眼内、局部、鞘内和脑室内。在任意给定的情况下最适宜的给药途径将取决于具体抗体、受试者、疾病的性质和严重度及受试者的身体状态。抗体可以配制为水溶液,并通过皮下注射施用。

[0158] 可以以每个剂量包含预定量的本公开的抗-hPG单克隆抗体的单位剂量形式方便地提供药物组合物。这种单位可以包含例如但不限于5mg至5g,例如10mg至1g或20至50mg。取决于例如待治疗的病症或给药途径,用于本公开的可药用载体可以采用多种形式。

[0159] 可以通过将具有希望的纯度的抗体与可选的本领域中通常利用的可药用载体、赋形剂或稳定剂(在本文中全都称为“载体”)(即缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂(isotonifier)、非离子型去垢剂、抗氧化剂和其他多种添加剂)混合,将本公开的药物组合物制备为冻干制剂或水溶液进行保存。见Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版(0sol编辑1980)。这类添加剂必须在所利用的剂量和浓度下对受体无毒性。

[0160] 缓冲剂帮助维持pH在接近生理条件的范围内。它们可以按约2mM至约50mM的范围内的浓度存在。适合用于本公开的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐二者,如柠檬酸缓冲液(例如柠檬酸一钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸一钠混合物等)、琥珀酸缓冲液(例如琥珀酸-琥珀酸一钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等)、酒石酸缓冲液(例如酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等)、延胡索酸缓冲液(例如延胡索酸-延胡索酸一钠混合

物、延胡索酸-延胡索酸二钠混合物、延胡索酸一钠-延胡索酸二钠混合物等)、葡糖酸缓冲液(例如葡糖酸-葡糖酸钠混合物、葡糖酸-氢氧化钠混合物、葡糖酸-葡糖酸钾混合物等)、草酸缓冲液(例如草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等)、乳酸缓冲液(例如乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)和乙酸缓冲液(例如乙酸-乙酸钠混合物、乙酸-氢氧化钠混合物等)。此外,可以使用磷酸缓冲液、组氨酸缓冲液和三甲胺盐(如Tris)。

[0161] 可以加入防腐剂来延缓微生物生长,且可以按0.2%-1%(w/v)的范围内的量加入。适合用于本公开的防腐剂包括酚、苄醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、苄烷铵卤化物(例如氯化物、溴化物和碘化物)、氯己双铵和对羟基苯甲酸烷基酯(如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯)、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。可以加入等渗剂(有时称为“稳定剂”)来确保本公开的液体组合物的等渗性,其包括多元糖醇,例如三元糖醇或高级糖醇,如丙三醇、赤藓醇、阿糖醇、木糖醇、山梨醇和甘露醇。稳定剂指一大类赋形剂,其功能可以从填充剂至稳定治疗剂或帮助防止变性或黏附于容器壁的添加剂。典型的稳定剂可以是多元糖醇(上文所列);氨基酸,如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等;有机糖或糖醇,如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、核糖醇、肌醇(myoinisitol)、半乳糖醇、丙三醇等,包括环多醇,如肌醇(inositol);聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫还原剂,如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 α -硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(例如10个残基或更少残基的肽);蛋白质,如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;单糖,如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖,如乳糖、麦芽糖、蔗糖;三糖,如蜜三糖;多糖,如葡聚糖。稳定剂可以以每份重量的活性蛋白质0.1至10,000份重量存在。

[0162] 可以加入非离子型表面活性剂或去垢剂(也称为“湿润剂”)来帮助溶解治疗剂,以及保护治疗性蛋白质免受搅拌诱导的聚集,其还允许制剂暴露于应力剪切表面而不导致蛋白质变性。适宜的非离子型表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80等)、polyoxamer(184、188等)、多聚醇、聚氧乙烯山梨糖醇酐单醚(**TWEEN®**-20、**TWEEN®**-80等)。非离子型表面活性剂可以以约0.05mg/ml至约1.0mg/ml,例如约0.07mg/ml至约0.2mg/ml的范围存在。

[0163] 其他多种赋形剂包括填充剂(例如淀粉)、螯合剂(例如EDTA)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E)和共溶剂。

[0164] 抗-PG单克隆抗体可以单独、作为一种或多种抗-PG单克隆抗体的混合物、与用于治疗CRC的其他药剂混合或组合、或辅助其他CRC疗法施用。下文提供适宜的组合和辅助疗法的实例。

[0165] 本公开涵盖包含本公开的抗-hPG单克隆抗体(包括抗体缀合物)的药物试剂盒。药物试剂盒是包含中和性抗-hPG单克隆抗体(例如以冻干的形式或作为水溶液)和以下中的一种或多种的包装:

[0166] ●例如下文所述的第二治疗剂;

[0167] ●用于施用抗-hPG单克隆抗体的装置,例如注射笔(pen)、针头和/或注射器;和

[0168] ●用于重悬抗体(如果抗体是冻干的形式)的药用级水或缓冲液。

[0169] 可以分开包装每个单位剂量的抗-hPG单克隆抗体,且试剂盒可以包含一个或多个单位剂量(例如两个单位剂量、三个单位剂量、四个单位剂量、五个单位剂量、八个单位剂量、十个单位剂量或更多)。在具体实施方案中,该一个或多个单位剂量各装在注射器或注射笔中。

[0170] 有效剂量

[0171] 通常将对达到预期结果有效的量,例如对在有需要的受试者中治疗CRC有效的量使用中和性抗-PG单克隆抗体或其组合物。可以按治疗有效剂量对患者(例如人受试者)施用包含中和性抗-PG单克隆抗体的药物组合物。本文所用的“治疗有效”剂量是赋予治疗益处的量。在CRC疗法的背景中,治疗益处指CRC的任意改善,包括以下中的任一种或其组合:停止或减慢CRC的进展(例如从结肠直肠癌的一个阶段至下一个阶段)、停止或延迟CRC症状或病征的加重或恶化、降低CRC的严重度(包括CRC的缓解)、抑制CRC肿瘤细胞增殖、CRC肿瘤大小或CRC肿瘤数目、或降低PG血清水平。

[0172] 所施用的中和性抗-PG单克隆抗体的量将取决于多种因素,包括所治疗的CRC的性质和阶段,施用的形式、途径和部位,治疗方案(例如是否使用第二治疗剂),所治疗的具体受试者的年龄和病症,所治疗的患者对抗-PG单克隆抗体的敏感性。本领域技术人员可以容易地测定适当剂量。最后,医生将决定待使用的适当剂量。可以根据需要重复此剂量。如果出现副作用,可以按照正常临床实践改变或降低剂量的量和/或频率。可以通过用本领域技术人员已知的常规技术监测治疗进展来建立适当的剂量和治疗方案。

[0173] 最初可以从体外测定估计有效剂量。例如,可以配制用于动物的起始剂量来达到抗-PG单克隆抗体的循环血液或血清浓度,该浓度处于或高于体外测量的前胃泌素抗体的结合亲和力。考虑具体抗体的生物利用率来计算达到这类血液或血清浓度的剂量良好地处于技术人员的能力范围之内。读者可参考Goodman和Gilman的The Pharmaceutical Basis of Therapeutics,第1章,最新版,Pagammon Press中的Fingl & Woodbury,“General Principles”及其中引用的参考文献来获得指导。

[0174] 可以从体内数据(如动物模型)估计起始剂量。用于测试化合物对治疗CRC的功效益的动物模型为本领域公知。此外,下文实施例中描述了CRC的动物模型。普通技术人员可以常规地改编这类信息来测定适合用于人施用的剂量。

[0175] 取决于所治疗的病症、给药途径及受试者的年龄、体重和状态,本公开的中和性抗-hPG单克隆抗体的有效剂量可以在每个单次施用(例如快速注射)、多次施用或连续施用约0.001至约75mg/kg,或每个单次(例如快速注射)施用、多次施用或连续施用达到0.01-5000µg/ml的血清浓度的范围内,或其中任意有效范围或值。在某实施方案中,每个剂量可以在每千克体重约0.5µg至约50µg的范围内,例如每千克体重约3µg至约30µg。

[0176] 施用的量、频率和持续时间将取决于多种因素,如患者年龄、体重和疾病状态。治疗性施用方案可以持续2周至无限期、2周至6个月、3个月至5年、6个月至1年或2年、8个月至18个月等。可选地,治疗方案提供反复施用,例如每天一次、每天两次、每两天、三天、五天、一周、两周或一个月。可以按相同的剂量或按不同的剂量反复施用。可以反复施用一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或更多次。可以作为单次剂量或在治疗方案的过程内(例如在一周、两周、三周、一个月、三个月、六个月、一年或更长的过程内)施用治疗有效量的抗-hPG单克隆抗体。

[0177] 治疗方法

[0178] 本公开的中和性抗-hPG单克隆抗体阻断依赖PG的应答(包括细胞增殖)的能力使得它们可用于治疗结肠直肠癌。因此,在另一方面,本公开提供在有需要的患者中治疗CRC的方法。通常,该方法包括对患者施用治疗有效量的本公开的中和性抗-hPG单克隆抗体。

[0179] 对其施用本公开的抗-hPG单克隆抗体的“受试者”或“患者”优选是哺乳动物,如非灵长类(例如牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类(例如猴或人)。受试者或患者可以是人,如成人患者或儿科患者。

[0180] 适合于抗-hPG单克隆抗体疗法的患者是诊断为患有CRC的患者。CRC可以属于任意类型和处于任意临床阶段或表现。适宜的受试者包括患有CRC肿瘤(可手术治疗或不能手术治疗)的患者、已手术去除或切除肿瘤的患者、患有包含癌基因(例如RAS或APC)中携带突变的细胞的CRC肿瘤的患者、已接受或正接受与抗-hPG单克隆抗体疗法组合或辅助抗-hPG单克隆抗体疗法的其他CRC疗法的患者。其他CRC疗法包括但不限于下文详述的化学疗法治疗、放射疗法、手术切除和用一种或多种其他治疗性抗体治疗。

[0181] 抗-hPG抗体疗法可以与一种或多种其他治疗组合或辅助一种或多种其他治疗。其他治疗非限制性地包括本文所述化学疗法治疗、放射疗法、手术切除和抗体疗法。

[0182] 抗-hPG单克隆抗体疗法可以辅助其他治疗,包括手术切除。

[0183] 本文提供的联合治疗涉及对患者施用至少两种药剂,其中第一种是本公开的中和性抗-hPG单克隆抗体,其中第二种是第二治疗剂。中和性抗-hPG单克隆抗体和第二治疗剂可以同时、连续或分开施用。

[0184] 如本文所使用,如果在同一天(例如在同一次患者就诊期间)对患者施用它们,则称中和性抗-hPG单克隆抗体和第二治疗剂连续施用。连续施用可以间隔1、2、3、4、5、6、7或8小时发生。相反,如果在不同天对患者施用它们,则称本公开的抗-hPG单克隆抗体和第二治疗剂分开施用,例如可以按1天、2天或3天、1周、2周或1个月的间隔施用本公开的抗-hPG单克隆抗体和第二治疗剂。在本公开的方法中,本公开的抗-hPG单克隆抗体的施用可以先于或晚于第二治疗剂的施用。

[0185] 作为非限制性实例,可以同时施用中和性抗-hPG单克隆抗体和第二治疗剂一段时间,然后在第二段时间中交替施用本公开的抗-hPG单克隆抗体和第二治疗剂。

[0186] 本公开的联合治疗可以产生更大的叠加或协同效应,提供治疗益处,其中中和性抗-hPG单克隆抗体和第二治疗剂都不以单独的治疗有效量施用。因此,这类药剂可以以更低的量施用,降低副作用的可能性和/或严重程度。

[0187] 第二治疗剂可以是化疗剂。化疗剂包括但不限于放射性分子、毒素(也称为细胞毒素或细胞毒剂,其包括对细胞生存力有害的任意药剂)、药剂和包含其他化疗化合物的脂质体或其他载体。适宜的化疗剂的实例包括但不限于1-去氢睾酮、5-氟尿嘧啶氮烯咪胺(5-fluorouracil decarbazine)、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、放线菌素D、阿霉素、阿地白介素(aldesleukin)、烷化剂、别嘌呤醇钠、六甲蜜胺(alretamine)、氨磷汀(amifostine)、阿那司唑(anastrozole)、氨曲霉素(AMC)、抗有丝分裂剂、顺式-二氯二胺铂(II)(DDP)(顺铂)、二氨基二氯铂、蒽环类、抗生素、抗代谢物、天冬酰胺酶、BCG活体(膀胱内)、倍他米松磷酸酯钠(betamethasone sodium phosphate)和醋酸倍他米松(betamethasone acetate)、比卡鲁胺(bicalutamide)、硫酸博来霉素、白消安(busulfan)、calcium leucovorin、加利车霉

素、卡西他滨(capecitabine)、脱羧铂氨、洛莫司汀(lomustine, CCNU)、卡莫司汀(carmustine, BSNU)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、顺铂、克拉屈滨(Cladribine)、秋水仙素、缀合雌激素、环磷酰胺、Cyclophosphamide、阿糖胞苷、阿糖胞苷、松胞菌素B、环磷酰胺(Cytosan)、氮烯咪胺(Dacarbazine)、更生霉素、更生霉素(之前的放线菌素)、盐酸柔红霉素、柠檬酸柔红霉素、地尼白介素地氟托司(denileukin diftitox)、右雷佐生(Dexrazoxane)、二溴甘露醇(Dibromomannitol)、二羟炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、多西他索(Docetaxel)、甲磺多拉司琼(dolasetron mesylate)、盐酸多柔比星(doxorubicin HCL)、屈大麻酚(dronabinol)、大肠杆菌(E.coli)L-天冬酰胺酶、吐根碱、红细胞生成素- α 、欧文氏菌属(Erwinia)L-天冬酰胺酶、酯化雌激素、雌二醇、雌氮芥磷酸钠(estramustine phosphate sodium)、溴化乙锭、炔雌醇、依替膦酸(etidronate)、etoposide citrororum factor、磷酸依托泊苷(etoposide phosphate)、非格司亭(filgrastim)、5-氟脱氧尿苷(floxuridine)、氟康唑(fluconazole)、磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate)、氟尿嘧啶(flourouracil)、氟他胺(flutamide)、甲酰四氢叶酸、盐酸吉西他滨(gemcitabine HCL)、糖皮质激素、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、短杆菌肽D、盐酸格拉司琼(granisetron HCL)、羟基脲、盐酸伊达比星(idarubicin HCL)、异环磷酰胺(ifosfamide)、干扰素 α -2b、盐酸伊立替康(irinotecan HCL)、来曲唑(letrozole)、亚叶酸钙(leucovorin calcium)、醋酸亮丙利特(leuprolide acetate)、盐酸左旋咪唑(levamisole HCL)、利多卡因(lidocaine)、洛莫司汀(lomustine)、美登木素生物碱、盐酸氮芥(mechlorethamine HCL)、醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、盐酸美法仑(melphalan HCL)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、美司钠(mesna)、氨甲喋呤、甲基睾酮、光神霉素、丝裂霉素C、米托坦(mitotane)、米托蒽醌(mitoxantrone)、尼鲁米特(nilutamide)、醋酸奥曲肽(octreotide acetate)、盐酸昂丹司琼(ondansetron HCL)、奥沙利铂(oxaliplatin)、紫杉醇、帕米膦酸二钠(pamidronate disodium)、喷司他丁(pentostatin)、盐酸毛果芸香碱、plimycin、具有卡莫司汀植入物的聚苯丙生20(polifeprosan 20)、卟吩姆钠(porfimer sodium)、普鲁卡因(procaine)、盐酸丙卡巴肼(procarbazine HCL)、心得安(propranolol)、利妥昔单抗(rituximab)、沙格司亭(sargramostim)、链脲佐霉素、三苯氧胺(tamoxifen)、紫杉醇(taxol)、替加氟(tegafur)、表鬼臼毒噻吩糖苷、tenoposide、罂内酯、丁卡因(tetracaine)、thioepa chlorambucil、硫代鸟嘌呤、硫替哌(thiotepa)、盐酸拓扑替康(topotecan HCL)、枸橼酸托瑞米芬(toremifene citrate)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、维A酸(tretinoin)、戊柔比星(valrubicin)、硫酸长春碱(vinblastine sulfate)、硫酸长春新碱(vincristine sulfate)和酒石酸长春瑞滨(vinorelbine tartrate)。

[0188] 可以对接受化疗剂组合的需要进行结肠直肠癌治疗的患者施用本文所公开的中性和抗-hPG单克隆抗体。示例性化疗剂组合包括:5-氟尿嘧啶(5FU)与亚叶酸(甲酰四氢叶酸或LV)组合;卡西他滨与尿嘧啶(UFT)和亚叶酸组合;替加氟与尿嘧啶(UFT)和亚叶酸组合;奥沙利铂与5FU组合或与卡西他滨组合;伊立替康与卡西他滨组合;丝裂霉素C与5FU、伊立替康或卡西他滨组合。还可能使用本文所公开的化疗剂的其他组合。

[0189] 如相关领域已知,已在临床试验中对使用不同化疗剂组合的结肠直肠癌化疗方案进行了标准化。这类方案通常以首字母缩略词表示,且包括5FU Mayo、5FU Roswell Park、

LVFU2、FOLFOX、FOLFOX4、FOLFOX6、bFOL、FUFOX、FOLFIRI、IFL、XELOX、CAPOX、XELIRI、CAPIRI、FOLFOXIRI。见例如Chau, I. 等, 2009, Br. J. Cancer 100:1704-19和Field, K. 等, 2007, World J. Gastroenterol. 13:3806-15, 这两篇文献都引用作为参考。

[0190] 中和性抗-hPG单克隆抗体还可以与其他治疗性抗体组合。因此, 抗-hPG单克隆抗体疗法可以与不同单克隆抗体组合, 或辅助不同单克隆抗体施用, 例如但不限于抗-EGFR (EGF受体) 单克隆抗体或抗-VEGF单克隆抗体。抗-EGFR抗体的具体实例包括西妥昔单抗 (cetuximab) 和panitumumab。抗-VEGF抗体的具体实例是bevacizumab。

[0191] 用抗-hPG抗体检测前胃泌素

[0192] 抗-PG单克隆抗体(中和性或非中和性)还用于依赖PG检测的应用, 如诊断CRC或监测治疗对受试者CRC的作用。因此, 一方面, 本公开提供在患者中诊断结肠直肠癌的方法, 其包括用本公开的抗-hPG单克隆抗体测定来自患者的样品中的前胃泌素的量。通常, 在患者中诊断结肠直肠癌的方法包括用本公开的抗-hPG单克隆抗体测量来自患者的样品中的前胃泌素, 其中, 样品中20pM至400pM前胃泌素的测量结果指示结肠直肠癌。可以在例如血液、血清、血浆、组织和/或细胞的样品中测量前胃泌素。可以用本领域已知和/或本文所述的测定进行hPG检测, 如ELISA、夹心法ELISA、免疫印迹(Western印迹)、免疫沉淀、BIACORE技术等。

[0193] 如本文所指出, 前胃泌素是产生自胃泌素基因产物的翻译后加工的许多不同多肽之一。本文所述诊断、监测和其他方法特异性检测不同于其他胃泌素基因产物(包括降解产物)的hPG。因此, 在具体实施方案中, 用本文所述ELISA检测hPG, 其中使用分别靶向hPG的N端和C端的两种抗hPG的抗体。在一些实施方案中, 用于检测的两种抗体之一是本文所述抗-hPG单克隆抗体。20pM至400pM范围内的hPG水平指示结肠直肠癌。

[0194] 一般而言, 用抗-hPG单克隆抗体测定hPG水平的方法如下。制备结合了已知量的抗hPG的第一“捕获”抗体的表面(如96孔板中的孔)。捕获抗体可以是例如结合hPG的C端或N端的抗-hPG抗体。封闭后, 将测试样品加至表面, 随后孵育一段时间。然后洗涤表面来去除未结合的抗原, 并加入含有抗hPG的第二“检测”抗体的溶液。检测抗体可以是本文所述抗-hPG单克隆抗体中的任一种, 只要该检测抗体结合不同于捕获抗体的表位。例如, 如果捕获抗体结合hPG的C端肽区域, 则适宜的检测抗体可以是结合hPG的N端肽区域的抗体。然后可以直接(如果例如将检测抗体与可检测标记缀合)或间接(通过结合检测抗-hPG抗体的标记二抗)检测前胃泌素水平。

[0195] 在具体实施方案中, 按如下从测试样品测量hPG水平。用0.5和10 μ g/mL之间的兔C端抗-hPG多克隆抗体包被96孔微量滴定板并过夜孵育。然后在PBS-Tween(0.05%)中洗涤平板三次, 并用含2%(w/v)脱脂奶粉的PBS-Tween(0.05%)封闭。分别在适当的稀释液(例如PBS-Tween 0.05%)中制备测试样品、对照样品(空白或PG阴性血浆或血清样品)及约5pM (0.5×10^{-11} M)和约0.1nM (1×10^{-10} M)之间的hPG参考标准(稀释在PG阴性血浆或血清中的冻干hPG)。在包被的平板上37 $^{\circ}$ C孵育样品2至4小时, 或者备选地, 在21 $^{\circ}$ C孵育12至16小时。孵育后, 用PBS-Tween(0.05%)洗涤平板三次, 并用0.001和0.1 μ g/mL之间的与辣根过氧化物酶(HRP)(Nakane等, 1974, J. Histochem. Cytochem. 22(12):1084-1091)偶联的本文所述N端抗-hPG单克隆抗体在21 $^{\circ}$ C孵育30分钟。然后在PBS-Tween(0.05%)中洗涤平板三次, 并在21 $^{\circ}$ C加入HRP底物15分钟。通过加入100 μ L 0.5M硫酸来终止反应, 并在405nm获取光密度测量

结果。通过与从衍生自hPG参考标准的测量结果构建的标准曲线比较来测定测试样品hPG水平。

[0196] 通常,基于侵入性方法诊断患者,如活检组织的组织学评估,以及诸如结肠镜检查的其他侵入性方法。CRC划分为5个阶段:阶段0(限于结肠或直肠的最内层的癌症)、阶段1(结肠或直肠的内壁中的癌症)、阶段2(扩展通过结肠壁但未见于邻近淋巴结的癌症)、阶段3(见于结肠或直肠周围的淋巴结和组织的癌症)和阶段4(已扩散至身体其他部分的癌症)。从组织学观点看,结肠直肠肿瘤存在从良性生长至侵入性癌症的广泛赘生物,且主要是内皮衍生的肿瘤(即腺瘤或腺癌)。病变可以分为三组:非赘生性息肉、赘生性息肉(腺瘤性息肉、腺瘤)和癌症。腺瘤性息肉是可以经历恶性转化的良性肿瘤,按转化潜能的增加将其分类为三种组织学类型:管状(tubular)、管状绒毛状(tubulovillous)和绒毛状(villous)。还按照其组织学将腺癌分类为黏蛋白(胶质)腺癌、环状体腺癌(signet ring adenocarcinoma)、硬性肿瘤和神经内分泌腺癌。

[0197] 与目前诊断CRC的手段不同,本公开提供在缺乏任何组织学分析或疾病分类的情况下根据可从血液样品测定的hPG水平的测量结果来诊断CRC受试者的方法。此外,本公开的方法还用于选择适合于抗-hPG单克隆抗体疗法的CRC患者,而不考虑患者是如何被诊断的。

[0198] 血清PG水平还用于评估CRC治疗的功效。因此,本公开提供用于监测结肠直肠癌疗法的有效性的方法,其包括测定进行CRC治疗的患者中的PG水平。用于监测结肠直肠癌疗法的有效性的方法包括用本公开的抗-PG单克隆抗体反复测定进行结肠直肠癌治疗的结肠直肠癌患者中的hPG水平,其中,治疗过程中患者循环hPG水平的降低指示治疗功效。例如,可以获取患者循环hPG水平的第一测量结果,然后在患者接受结肠直肠癌治疗的同时或之后获取第二测量结果。然后比较两个测量结果,hPG水平的降低指示治疗益处。

[0199] 一方面,本公开提供包含抗-hPG单克隆抗体(包括抗体缀合物)的诊断试剂盒。诊断试剂盒是包含至少一种本公开的抗-hPG单克隆抗体(例如以冻干形式或作为水溶液)和一种或多种用于进行诊断测定的试剂(例如稀释液、与抗-hPG单克隆抗体结合的标记抗体、标记抗体的适当底物、适合用作阳性对照和参考标准的形式的hPG、阴性对照)的包装。在具体实施方案中,试剂盒包含两种抗-hPG抗体,其中该抗体中的至少一种是抗-hPG单克隆抗体。可选地,第二抗体是多克隆抗-hPG抗体。在一些实施方案中,本公开的试剂盒包含本文所述N端抗-hPG单克隆抗体。

[0200] 可以按上文所述标记抗-hPG抗体。备选地,试剂盒可以包含标记抗体,该标记抗体结合抗-hPG单克隆抗体,且与酶缀合。抗-hPG单克隆抗体或其他抗体与用于检测的酶缀合时,试剂盒可以包含该酶所需的底物和辅因子(例如提供可检测的生色团或荧光团的底物前体)。此外,可以包含其他添加剂,如稳定剂、缓冲液(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。诊断试剂盒中所包含的抗-hPG单克隆抗体可以固定在固体表面上,或者备选地,试剂盒中包含可以将抗体固定在其上的固体表面(例如载玻片)。可以广泛改变多种试剂的相对量,以在试剂的溶液提供实质上优化测定灵敏性的浓度。抗体和其他试剂可以作为包含赋形剂的干粉(通常为冻干)提供(单个或组合),其溶解时将提供具有适当浓度的试剂溶液。

[0201] 试剂盒可以包括含有诊断方法的实施说明(例如流程)的指导材料。虽然指导材料通常包括书面或打印材料,但它们不限于这些。本发明考虑能够储存这类说明并将它们传

达给终端用户的媒介。这类媒介包括但不限于电子储存媒介(例如磁盘、磁带、胶卷、芯片)、光学媒介(例如CD ROM)等。这类媒介可以包括提供这类指导材料的互联网站点地址。

[0202] 10. 实施例

[0203] 以下实施例是说明性的,而非旨在限制。

[0204] 实施例1:抗前胃泌素的单克隆抗体的产生

[0205] 人前胃泌素的免疫原

[0206] 产生了几种免疫原来研发产生抗人前胃泌素单克隆抗体的杂交瘤。之前用来产生多克隆抗体的抗原(如全长人前胃泌素和基于hPG的残基70至80的免疫原)未能导致单克隆免疫应答或产生PG特异性单克隆抗体。如下文更详细地描述,14个氨基酸和更长的抗原(其在蛋白质的N端和C端的任一端包含hPG特有的序列)能够在动物中诱导充分的免疫应答,并用于产生产生超过20种不同的抗hPG的单克隆抗体的杂交瘤。令人惊奇地,用包含hPG的残基55至80(其中一些还见于其他胃泌素基因衍生肽中)的几种免疫原成功地产生了对hPG特异的单克隆抗体。下表总结了所测试的免疫原。

[0207]

表 2		
实验	免疫原	阳性克隆的数目
1	人前胃泌素(SEQ ID NO:20)	0*
1	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-BSA	2
2	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	2
3	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	8
1	BSA-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:97)	0
2	KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:97)	0
3	KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:96)	10
	DT-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:96)	3

[0208] *免疫的小鼠未显示任何免疫应答。

[0209] 使用肽序列和接头的化学合成,然后用适当的交联剂(例如MBS(间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、戊二醛或磺基-SMCC(4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯))与牛血清白蛋白(BSA)、匙孔梗血蓝蛋白(KLH)或白喉毒素(DT)载体交联,按照本领域已知的技术制备表2中所列的免疫原。(Coligan JE等,Current protocols in Immunology,第2卷,New York:John Wiley and Sons;1996,9.0.1-9.0.15页;Harlow DL.Antibodies:A Laboratory Manual.New York:Cold Spring Harbor Laboratory;1998,72-87页)。所使用的接头是与半胱氨酸残基偶联的两个氨基己酸(Ahx)残基。

[0210] 在三个实验的每一个中,用N端免疫原注射Ba1b/c小鼠4至5次,用C端免疫原注射2

至4次。每次注射用Ribi、Alun或弗氏佐剂施用10 μ g免疫原。

[0211] 细胞融合和杂交瘤筛选

[0212] 通过针对免疫原的ELISA测试了来自每只小鼠的血清,并从具有最强免疫应答的小鼠收集脾细胞。用聚乙二醇使脾细胞与Sp2骨髓瘤细胞融合,按每孔15,000至35,000个细胞的密度接种在96孔板中。用含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基(HAT培养基)选择融合的细胞。

[0213] 通过ELISA针对与免疫原和全长前胃泌素结合的能力筛选杂交瘤的上清。进行了三轮筛选,以确保仅选择稳定产生识别全长hPG和免疫原的杂交瘤。

[0214] 用下文所述ELISA技术进行了测定与不同PG肽结合的杂交瘤和单克隆抗体筛选。用此流程来筛选融合脾细胞、第一和第二轮亚克隆的PG结合,以及验证抗体对PG(与其他胃泌素基因衍生肽相比)的特异性。

[0215] 简言之,用含有一个或多个适当浓度的测试肽的磷酸缓冲盐溶液(PBS)在4 $^{\circ}$ C过夜孵育96孔板,然后用洗涤溶液(PBS和0.1% Tween-20)洗涤孔三次,每孔用100 μ L封闭溶液(PBS、0.1% Tween-20、0.1%牛血清白蛋白或酪蛋白水解物)在22 $^{\circ}$ C孵育2小时。封闭后,洗涤孔三次,加入第一抗体(待测定的抗体)。对于最初的融合脾细胞筛选,向平板中的每个孔加入来自待测定的各培养物的50 μ L培养物上清。在对单克隆抗体进行的测定中,向每个孔中加入100 μ L含有测试抗体的PBS和0.1% Tween-20。然后在22 $^{\circ}$ C孵育平板2小时,然后弃除第一抗体溶液,并在洗涤步骤(3 $\times$ 100 μ L洗涤溶液,如上文所指出)后替换为包含第二抗体的封闭溶液,该第二抗体结合第一抗体,且与酶偶联。第二抗体是与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗-小鼠IgG(Fc)抗体。用第二抗体孵育1小时后,向每个孔中加入100 μ L底物溶液(例如Fast OPD或邻苯二胺二盐酸,可从Sigma-Aldrich Co.获得,按厂家的说明配制),并在22 $^{\circ}$ C避光孵育20分钟。然后通过加入50 μ L 4N硫酸来终止反应,并通过在492nm测量光密度(O.D.)来测定催化的底物量。底物转化与结合抗原的第一(测试)抗体的量成比例。实验一式两份地进行,取决于实验的目的,将OD测量结果作为抗原或抗体浓度的函数作图。如果测量的O.D.在0.2和1.5之间,则将样品评分为抗-PG抗体阳性。用相同的O.D.等级(bracket)来鉴定结合用于接种测试动物的免疫原性肽的抗体。

[0216] 用于测定的示例性材料和试剂如下:

[0217]

物品	来源	参考
Greiner Microlon 96孔板	Dutscher	#655092
10 $\times$ DPBS	Dutscher	#P04-53500
Tween-20	Sigma	#63158
BSA(用于封闭)	Euromedex	#04-100-810-C
水解酪蛋白(用来代替BSA时)	Sigma	22090
杂交瘤上清,或N端或C端单克隆抗体	BioRéalités	如本文所述
过氧化物酶偶联的山羊抗-小鼠IgG(Fc)	Thermo	#31439
Fast OPD	Sigma	#P9187
95-97%硫酸	Sigma	#30743

[0218] 用于筛选杂交瘤和单克隆抗体的示例性肽如下:

[0219]

筛选肽	来源	参考
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
重组人前胃泌素	BioRéalités	McQueen 等, 2002, J. Protein Chem., 21(7):465-471.
人胃泌素 I (G-17)	Sigma	# 53673
甘氨酸延长的胃泌素 17 (G-Gly)	Auspep	# S10082
KLH	Pierce (Perbio)	# 77653
C 端侧翼肽 (CTFP)	Auspep	# R41345

[0220] 按McQueen等,2002,J.Protein Chem.21:465-471中所述进行少量修改来产生重组人前胃泌素。简言之,用在PGEX-GST-TEV主链(GE Healthcare)中包含全长人前胃泌素序列的载体转化BL21 DE3 Star细菌细胞(InVitrogen)。在含有0.5mM IPTG的LB培养基中37℃培养细菌3小时。用French Press破碎细菌沉淀,并通过离心分开可溶以及不可溶的级分。然后,用谷胱甘肽亲和柱分离带有GST标记的hPG,用烟草蚀纹病毒N1a(TEV)蛋白酶从GST切割PG。最后,针对最终的缓冲液(10mMHepes、0.5%BSA、pH 7.4)透析PG。

[0221] 先克隆杂交瘤,然后亚克隆并扩增。根据以下标准选择阳性杂交瘤:(1)PG和免疫原特异性;(2)抗体的相对亲和力;(3)杂交瘤细胞生长;(4)抗体分泌;和(5)杂交瘤的单克隆性。测定和选择标准如下。

[0222] 对于特异性,通过上文所述ELISA(50μL 1/2稀释在测定介质PBS中的上清)测定了测试杂交瘤的上清。如果在hPG或用来接种测试小鼠的免疫原的测定中O.D.测量结果在0.2和1.5之间,则将杂交瘤评分为阳性。作为特异性的另一标准,根据与其他胃泌素基因衍生肽的结合的缺乏来选择克隆。将结合的缺乏测量为来自测试孔的信号和来自仅包含PBS的对照孔的平均信号之间无统计上显著的差异。

[0223] 对于亲和力表征,通过上文所述与hPG结合的ELISA测定了抗体的系列稀释。用于N端抗体测定的标准稀释为0、0.1、0.3、1、3、10、30、100ng/ml。用于C端抗体测定的标准稀释为0、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30ng/ml。

[0224] 接种后两天通过显微镜观察来评估通过多轮系列培养的杂交瘤细胞生长。预期细胞将在接种后48小时增殖并填满孔。进行系列稀释(通常先按1:5稀释,然后按1:10进一步稀释至少2次),然后在48小时进行显微镜观察来确认充分生长。稀释来自满足此标准的杂交瘤的细胞并再次接种,48小时后在显微镜下观察。重复这类“稀释-接种-观察”的循环三次,然后将杂交瘤评分为满足“生长”标准。

[0225] 通过用上文所述hPG对无细胞上清的系列稀释(1/2、1/20、1/200、1/500、1/1000、1/2000)进行ELISA来测试抗体分泌。

[0226] 通过按0.6细胞/孔的密度将克隆或杂交瘤接种在96孔板中并孵育两周来测定单克隆性。两周时,通过ELISA针对hPG结合测定上清,根据至少90%含活细胞的孔具有一致的OD值来确定群体的克隆性质。

[0227] 抗全长前胃泌素的单克隆抗体

[0228] 用重组人前胃泌素(上文所述)接种三只小鼠中的每一只。免疫原未能在小鼠中引出任何可检测到的免疫应答:用上文所述ELISA检测不到与PG的结合。未进行融合。

[0229] 抗前胃泌素的N端单克隆抗体

[0230] 如上文所指出,针对抗原产生了N端单克隆抗体,该抗原包含hPG的残基1至14,其经由14残基抗原C端的Ahx-Cys接头(SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys(SEQ ID NO:26))与牛血清白蛋白(BSA)或匙孔藻血蓝蛋白(KLH)连接。

[0231] 在第一实验中,用连接BSA的N端肽接种了三只小鼠。在用来自三只小鼠中的两只的脾细胞进行的三个融合中,一个融合未产生显示与PG或免疫原结合的克隆。在接种于96孔板中的另外两个融合中,一个融合产生了4个结合PG且PG特异的杂交瘤,从其回收了单个稳定的产IgG亚克隆。第二个融合也产生了单个稳定的产IgG1的结合PG且PG特异的杂交瘤亚克隆。总体上,在三只小鼠中,17个第一轮杂交瘤(或所筛选的杂交瘤的0.74%)为PG和免疫原结合阳性,亚克隆了其中9个阳性细胞系,其中两个为阳性产IgG细胞系。因此,第一实验在几轮亚克隆后产生了保持针对免疫原和hPG的强阳性信号(“PG结合”阳性),且不结合其他胃泌素基因衍生肽(“PG特异”阳性)的两个克隆:分别产生抗-hPG MA b1和抗-hPG MA b2的杂交瘤43B9G11和WE5H2G7。

[0232] 在第二实验中,用连接KLH的N端肽接种小鼠。用Sp2骨髓瘤细胞进行了两个融合。在这两个融合中,只有一个融合产生了PG和免疫原阳性克隆,其也是PG特异的克隆。从此融合接种了1920个杂交瘤。许多杂交瘤用免疫肽测试为阳性,而用前胃泌素测试不为阳性,或者不是PG特异的。具体而言,297个杂交瘤对免疫肽显示强阳性信号(约为1920个杂交瘤的15.5%),其中124个还是前胃泌素结合阳性(6.5%)。存在对前胃泌素为阳性但对所使用的免疫原不为阳性的36个杂交瘤(或1.8%)。所接种的1920个杂交瘤中只有12个杂交瘤产生特异性结合前胃泌素但不结合其他胃泌素基因产物的抗体(总杂交瘤的0.6%,在第一筛选上对肽和/或前胃泌素为阳性的克隆的3.6%)。在所选择的12个克隆中,只有2个克隆足够稳定来建立永久克隆和冷冻进行长期保存。因此,在此第二实验中,在所接种的接近2000个杂交瘤中,仅回收了2个表达单克隆抗体的克隆(分别产生抗-hPG MA b3和MA b4的6B5B11C10(产生抗-hPG MA b3)和20D2C3G2(产生抗-hPG MA b4)),该单克隆抗体能够结合hPG和免疫肽,且具有超过其他胃泌素基因产物的对前胃泌素的特异性和对hPG的高亲和力。两种示例性抗体都属于IgG1同种型。

[0233] 在第三实验中,用与第二实验中相同的免疫原接种小鼠。用来自具有最强免疫应答的两只小鼠的脾细胞进行了与Sp2骨髓瘤细胞的融合。接种来自融合的杂交瘤(来自每只小鼠的一个融合的3840个杂交瘤),针对PG和免疫原结合以及PG特异性测试上清。在各融合中,6个杂交瘤显示PG特异性,从其选择了满足生长、单克隆性、抗体分泌、相对亲和力的进一步选择的3个亚克隆。因此,总计,接种后测试的杂交瘤的2.9%(220/7680)为PG和免疫原阳性,其中0.15%(12/7680)为阳性克隆,回收的最终亚克隆组成所接种的原始杂交瘤的0.15%(6/7680)。此实验产生了杂交瘤1E9A4A4(产生抗-hPG MA b15)、1E9D9B6(产生抗-hPG MA b16)、1C8D10F5(产生抗-hPG MA b17)、1A7C3F11(产生抗-hPG MA b18)、1B3B4F11(产生抗-hPG MA b19)和1C11F5E8(产生抗-hPG MA b20)。

[0234] 下表显示各实验接种的克隆数、所用免疫原及产生识别免疫原和全长前胃泌素二者的单克隆抗体的杂交瘤的数目和百分比。

[0235]

表 3					
实验	免疫原	接种的克隆	PG ⁺ 杂交瘤上清	PG 特异的克隆	PG 特异的产 IgG 亚克隆
1	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-BSA	2304	17 (0.74%)	9 (0.39%)	2 (0.087%)
2	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	1920	124 (6.5%)	12 (0.6%)	2 (0.1%)
3	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	7680	220 (2.9%)	12 (0.15%)	6 (0.1%)

[0236] 抗前胃泌素的C端单克隆抗体

[0237] 针对抗原产生了C端单克隆抗体,该抗原包含hPG的残基55至80,其经由26残基抗原的N端Cys-Ahx-Ahx接头(Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEA YGWMDFGRRSAEDEN(SEQ ID NO:96))与KLH或DT连接。用与BSA或KLH缀合的仅包含hPG的残基70至80的更小抗原(Cys-Ahx-Ahx-FGRRSAEDEN(SEQ ID NO:97))来产生杂交瘤的尝试未能产生任何克隆。

[0238] 进行了三个实验。在前两个实验(其中使用较短的肽)中,回收了0个亚克隆。具体而言,在第一实验中,用与BSA连接的对应于SEQ ID NO:97的C端肽注射了4只小鼠。没有一个融合产生任何产IgG杂交瘤。在第二实验中,注射了6只小鼠,用在其N端与KLH连接的对应于SEQ ID NO:97的肽或在其C端与KLH连接的对应于SEQ ID NO:97的肽各注射了3只。对于第一免疫原,进行了融合,并回收了杂交瘤,但未分离到PG结合和PG特异性为阳性的亚克隆。对于第二免疫原,没有一只小鼠产生免疫应答,未进行融合。

[0239] 在第三实验中,使用了包含并非hPG特有的C端序列的26氨基酸肽。将包含与KLH或DT连接的对应于SEQ ID NO:96的肽的免疫原注射入小鼠。用来自具有最强应答的两只小鼠的脾细胞进行了与Sp2骨髓瘤细胞的融合。从每只小鼠的一个融合接种了3840个杂交瘤。总体上,在所筛选的7680个杂交瘤中,382个(5%)为PG阳性和PG特异,回收了13个(0.17%)稳定的阳性亚克隆:1B4A11D11(产生抗-hPG MA b 5)、1B6A11F2(产生抗-hPG MA b 6)、1B11E4B11(产生抗-hPG MA b 7)、1C10D3B9(产生抗-hPG MA b 8)、D8F5B3(产生抗-hPG MA b 9)、1E1C7B4(产生抗-hPG MA b 10)、2B4C8C8(产生抗-hPG MA b 11)、2B11E6G4(产生抗-hPG MA b 12)、2C6C3C7(产生抗-hPG MA b 13)、2H9F4B7(产生抗-hPG MA b 14)、1F11F5E10(产生抗-hPG MA b 21)、1F11F5G9(产生抗-hPG MA b 22)和1A11F2C9(产生抗-hPG MA b 23)。

[0240] 下表显示各实验接种的克隆数目、所使用的免疫原、筛选的杂交瘤数目、PG特异且在三轮亚克隆后满足选择标准(生长、单克隆性、相对亲和力等)的产生结合PG和免疫原的单克隆抗体的杂交瘤数目和百分比。

[0241]

表 4					
实验	免疫原	接种的克隆	PG ⁺ 杂交瘤上清	PG 特异的克隆	PG 特异的产 IgG 亚克隆
1	BSA-接头-(SEQ ID NO:97)	3072	10 (0.32%)	9 (0.29%)	0
2	KLH- 接头-(SEQ ID NO:97)	1920	27 (0.47%)	4 (0.07%)	0
	(SEQ ID NO:97)- 接头-KLH		0	0	0
3	KLH-接头-(SEQ ID NO:96)	3840	192 (5%)	17 (0.44%)	10 (0.26%)
	DT-接头-(SEQ ID NO:96)	3840	190 (4.95%)	13 (0.34%)	3 (0.08%)

[0242] 下表中详述单克隆抗体及产生它们的稳定杂交瘤：

[0243]

表 5		
单克隆抗体	杂交瘤	小鼠 Ig
MAb 1	43B9G11	IgG1
MAb 2	WE5H2G7	IgG1
MAb 3	6B5B11C10	IgG1
MAb 4	20D2C3G2	IgG1
MAb 5	1B4A11D11	IgG1
MAb 6	1B6A11F2	IgG1
MAb 7	1B11E4B11	IgG1
MAb 8	1C10D3B9	IgG1
MAb 9	1D8F5B3	IgG1
MAb 10	1E1C7B4	IgG1
MAb 11	2B4C8C8	IgG1
MAb 12	2B11E6G4	IgG1
MAb 13	2C6C3C7	IgG1
MAb 14	2H9F4B7	IgG1
MAb 15	1E9A4A4	IgG1
MAb 16	1E9D9B6	IgG1
MAb 17	1C8D10F5	N.D.
MAb 18	1A7C3F11	IgG2
MAb 19	1B3B4F11	IgG2
MAb 20	1C11F5E8	IgG2
MAb 21	1F11F5E10	IgG2
MAb 22	1F11F5G9	IgG2
MAb 23	1A11F2C9	IgG2

[0244] 按照布达佩斯条约(Treaty of Budapest)保藏了杂交瘤细胞系1B4A11D11(MAb 5,保藏号CNCM I-4371)、1B6A11F2(MAb 6,保藏号CNCM I-4372)、1B11E4B11(MAb 7,保藏号CNCM I-4373)、2B4C8C8(MAb 11,保藏号CNCM I-4374)、2B11E6G4(MAb 12,保藏号CNCM I-4375)和1E9A4A4(MAb 15,保藏号CNCM I-4376),并于2010年10月6日被法国微生物保藏中

心(Collection Nationale de Cultures de Microorganisms(CNCM),Institut Pasteur),巴黎,法国接收。

[0245] 抗-hPG单克隆抗体的克隆和测序

[0246] 可以用本领域技术人员已知的技术克隆和测序由杂交瘤产生的单克隆抗体。按下文所述测序了来自以上表5中所列杂交瘤的单克隆抗体。

[0247] 用标准技术克隆和测序了编码由杂交瘤6B5B11C10和20D2C3G2产生的单克隆抗体的序列。简言之,按厂家的说明使用,用RNABee试剂(AMSBio目录号CS-104B)从冷冻的细胞沉淀分离总RNA。用反转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)从mRNA制备V区cDNA,然后5'快速扩增cDNA末端(RACE)。用恒定区特异的引物进行cDNA合成,然后纯化第一链产物,并用末端脱氧核苷酸转移酶来在cDNA的3'末端加入同聚核苷酸尾序。然后用引物对通过PCR扩增“有尾”cDNA序列,引物对的每条引物分别用于同聚核苷酸尾序和V_H或V_L区。然后将重链和轻链可变区PCR产物克隆入“TA”克隆载体(p-GEM-T easy,Promega目录号A 1360),并用标准方法测序。见图2A-B(MAb 3)、图2C-D(MAb 4)。

[0248] 按以下测定了编码由杂交瘤1C10D3B9、2C6C3C7、1B3B4F1和1E9D9B61产生的单克隆抗体的序列。按厂家的说明使用,用**RNAqueous®**-4PCR试剂盒(Ambion目录号AM1914)从冷冻的细胞沉淀分离总RNA。用六个简并引物库(HA至HF)的一组扩增重链V区mRNA,用八个简并引物库(七个用于κ簇(KA至KG),一个用于λ簇(LA))的一组扩增轻链V区mRNA。用RT-PCR从mRNA制备可变区cDNA。用恒定区特异的引物进行cDNA合成,然后用5'鼠信号序列的简并引物及IgGVH、IgκVL和IgλVL中每一个的3'恒定区引物的库进行PCR。(Jones等,1991,Rapid PCR cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions,Bio/Technology 9:88-89)。然后将重链和轻链可变区PCR产物克隆入“TA”克隆载体(p-GEM-T easy,Promega目录号A 1360),并用标准方法测序。见图2E-F(MAb 8)、2G-H(MAb 13)、2I-J(Mab 16)和2K-L(Mab 19)。

[0249] 实施例2:抗-hPG抗体的结合亲和力

[0250] A. 相对亲和力

[0251] 用上文所述ELISA方法测量了示例性单克隆抗体的相对亲和力,其中,用包含50ng前胃泌素的肽溶液包被孔,然后在如下渐增浓度的各单克隆抗体的存在下孵育:

[0252]

单克隆抗体	所测试的浓度范围
N端抗-hPG单克隆抗体MAb 1-4	0.001-1μg/mL
N端抗-hPG单克隆抗体MAb 3、15-20	0.1-100ng/mL
C端抗-hPG单克隆抗体MAb 5-14、21-23	0.03-30ng/mL

[0253] 图3A显示在1ng/mL至1μg/mL的浓度下测试的四种抗-hPG单克隆抗体MAb 1-4的相对亲和力。图3B显示在0.1-100ng/mL的抗体浓度下测试的N端抗-hPG单克隆抗体MAb 3和15-20的相对亲和力。图3C显示在0.03-30ng/mL的抗体浓度下测试的C端抗-hPG单克隆抗体MAb 5-14和21-23的相对亲和力。

[0254] B. 亲和常数测量

[0255] 为了提供单克隆抗体亲和力的更绝对的定量,按照Nahshol等,2008,Analytical Biochemistry 383:52-60(在此以其整体引入作为参考)用Proton Technique(BioRad)测

量了亲和常数。简言之,首先将抗-小鼠IgG抗体(50 μ g/ml)包被在传感芯片上,确保注射抗体后通过芯片检测的信号落在10,000和11,500RU(响应单位)之间。然后注射待测试的鼠单克隆抗体(典型浓度:30 μ g/ml)。根据传感芯片上至少500RU的进一步信号确定待测试的单克隆抗体的充分结合。然后通过注射不同浓度的前胃泌素(例如200、100、50、25和12.5nM)来测量单克隆抗-前胃泌素抗体和前胃泌素之间相互作用的时程,并检测结合水平。通常,可获得几个通道来在单个实验中平行测试多个抗体,使得可能以不同的PG浓度平行测定测试抗体的结合。通常,保留一个通道用于并非对PG特异的鼠单克隆抗体作为非特异性结合的对照,另一个通道单独注射稀释缓冲液作为背景信号的基线。通常,在注射非特异性鼠抗体的通道中检测不到结合。可以针对更低的前胃泌素浓度(50、25、12.5、6.25和3.125nM)测试在此背景(其可以导致前胃泌素饱和捕获(trapped)的单克隆抗体)中显示高水平结合的抗体,以允许获得更精细的测量结果。

[0256] 将亲和常数(KD)计算为解离常数(kd)和结合常数(ka)之间的比值。通过分析基于结合测量结果的实验曲线和理论廓线间统计上相关的相似性来验证实验值。在Proteon实验中用来选择实验曲线是否符合理论模型的数学模型是基于前胃泌素分子和抗-前胃泌素单克隆抗体间1:1相互作用的Langmuir模型。

[0257]

表 6	
单克隆抗体	亲和常数测量的 KD (M)
抗-hPG MAb 1	2.5 μ M (2.5 $\times 10^{-6}$ M)
抗-hPG MAb 2	185 nM (1.85 $\times 10^{-7}$ M)
抗-hPG MAb 3	6.4 nM (6.4 $\times 10^{-9}$ M)
抗-hPG MAb 4	3.5 nM (3.5 $\times 10^{-9}$ M)
抗-hPG MAb 5	13 pM (1.30 $\times 10^{-11}$ M)
抗-hPG MAb 6	0.6 nM (6.38 $\times 10^{-10}$ M)
抗-hPG MAb 7	58 pM (5.84 $\times 10^{-11}$ M)
抗-hPG MAb 8	0.1 nM (1.08 $\times 10^{-10}$ M)
抗-hPG MAb 10	3.6 nM (3.62 $\times 10^{-9}$ M)
抗-hPG MAb 11	0.3 nM (3.12 $\times 10^{-10}$ M)
抗-hPG MAb 12	0.4 nM (4.43 $\times 10^{-10}$ M)
抗-hPG MAb 13	0.6 nM (6.12 $\times 10^{-10}$ M)
抗-hPG MAb 14	6.8 pM (6.86 $\times 10^{-12}$ M)
抗-hPG MAb 15	0.2 nM (2.11 $\times 10^{-10}$ M)
抗-hPG MAb 16	0.2 nM (2.78 $\times 10^{-10}$ M)
抗-hPG MAb 17	8.3 nM (8.29 $\times 10^{-9}$ M)
抗-hPG MAb 18	1.2 nM (1.24 $\times 10^{-9}$ M)
抗-hPG MAb 19	0.7 nM (7.79 $\times 10^{-10}$ M)
抗-hPG MAb 20	0.2 nM (2.47 $\times 10^{-10}$ M)
抗-hPG MAb 21	3.9 nM (3.90 $\times 10^{-9}$ M)
抗-hPG MAb 22	5 nM (4.94 $\times 10^{-9}$ M)
抗-hPG MAb 23	0.4 μ M (3.99 $\times 10^{-7}$ M)

[0258] 实施例3:抗-hPG抗体的聚集

[0259] 抗体的聚集可以通过减少结合靶蛋白质可得的抗体量来降低治疗功效。优选将具有非常低的聚集水平的抗体用于治疗应用。每个批次的抗体与其他批次的同一单克隆抗体相比可不同。通常希望使用具有低聚集的批次。为了定量抗体聚集,将抗体溶液置于荧光分光光度计(Photon Technology International)中,并在280nm照射。在280nm测量扩散,而在330nm测量由芳族氨基酸(主要是色氨酸)引起的发射。然后按Nominé等,2003, Biochemistry 42:4909-4917中所述通过计算280nm对320nm的OD测量值之间的比值来定量聚集水平。更高的280/330nm比值表示更高的聚集量。所使用的抗体浓度为15 μ g/ml,比用于体外处理的浓度高5至15倍。

[0260] 结果显示在以下表7和图4中。

[0261] 表7

[0262]

样品	280/330nm比值
牛血清白蛋白(n=1)	6.4
抗-hPG MAbs 1(n=1)	15.42
抗-hPG MAbs 2(n=2)	9.81
抗-hPG MAbs 3(n=2)	3.08
抗-hPG MAbs 4(n=2)	1.94

[0263] 实施例4:抗-hPG单克隆抗体的结合特异性

[0264] PG只是胃泌素基因的肽产物之一。其他胃泌素基因产物在正常稳态中具有作用,但PG在CRC中的作用使它成为用于治疗 and 诊断目的的有效靶标。本文所述单克隆抗体对全长前胃泌素特异,而不是产生自胃泌素基因的表达和加工的所有其他肽,如甘氨酸延长(G17-gly)、酰胺化(胃泌素17)胃泌素和C端侧翼肽(CTFP)。这些肽存在于循环中。通过用上文实施例1中所述的ELISA测定针对人前胃泌素和其他胃泌素基因衍生肽测定抗体来确定抗-hPG单克隆抗体的结合特异性。

[0265] 具体而言,用以所示量包含以下肽之一的溶液包被孔:前胃泌素、匙孔棘血蓝蛋白(KLH)、酰胺化胃泌素-17(G17)、甘氨酸延长的胃泌素17(Ggly)或C端侧翼肽(CTFP):

[0266]

筛选肽	测试量
重组前胃泌素	50 ng (实验 1) 25 ng (实验 2)
人酰胺化胃泌素 I (G-17)	50 和 250 ng
甘氨酸延长的胃泌素 17 (G17-Gly)	50 和 250 ng
KLH	50 和 250 ng
C 端侧翼肽(CTFP)	50 和 250 ng

[0267] 在第一实验中,使用3ng/ml(0.3ng)的抗-hPG MAbs 3及1 μ g/ml(0.1 μ g)的抗-hPG MAbs 1、2和4中的每一种。见图5A。在第二实验中,按0.3ng/mL测试抗-hPG MAbs 5-14和21-23的结合亲和力,见图5B,按1ng/mL测试抗-hPG MAbs 3、15-20的结合亲和力,见图5C。

[0268] 抗体显示与高量KLH的弱反应,该KLH与在上文实施例1中用于一些免疫原来接种小鼠的抗原肽偶联。未检测到BSA对任意抗体(包括针对包含BSA作为载体的免疫原产生的那些)的PG结合的影响。

[0269] 与其他胃泌素基因衍生肽(如酰胺化胃泌素-17、甘氨酸延长的胃泌素17和C端侧翼肽(在正常加工多肽形成胃泌素的过程中从前胃泌素切割的5个氨基酸的肽))相比,所有抗体都显示与全长hPG(在50ng测试,然后在25ng测试)结合的高特异性。示例性抗体显示与除hPG外的任意胃泌素基因衍生肽无可检测到的结合(信号高于“PBS单独”背景)。

[0270] 实施例5:竞争测定

[0271] 用具有“捕获”抗-hPG抗体和“检测”抗-hPG抗体的ELISA测定了抗-hPG单克隆抗体与抗-hPG多克隆抗体竞争结合前胃泌素的能力。按如下测定了抗-hPG MAb 3:用针对由hPG的残基71至80组成的肽产生的C端前胃泌素多克隆抗体预包被96孔板。然后用100pM前胃泌素孵育平板,然后加入10 μ g/ml的生物素化N端抗-hPG多克隆抗体(针对由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成的肽产生)和渐增浓度的抗-hPG MAb 3单克隆抗体。按照标准流程,通过用链霉抗生物素蛋白-HRP孵育平板后用OPD孵育来检测生物素化N端抗-hPG多克隆抗体的结合。通过定量发光来测量结合。

[0272] 结果显示,渐增浓度(μ g/ml)的抗-hPG MAb 3降低了多克隆抗-hPG抗体与前胃泌素结合的能力,显示单克隆抗体与多克隆抗体竞争。见图6。

[0273] 实施例6:表位定位

[0274] 用分别描述于Laune,D.等,2002,J.Immunol.Methods 267:53-70和Laune,D.,1997,J.Biol.Chem.272:30937-30944中的SPOT技术和丙氨酸扫描定位了示例性单克隆抗体结合的具体表位。在SPOT技术中,产生跨越假定的表位的15个氨基酸肽序列,并点在硝酸纤维素膜上,然后用测试抗体探测来确定抗体识别的最小表位序列。用丙氨酸扫描来确定表位内对抗体结合重要的残基:将假定的表位内的每个残基逐一突变为丙氨酸,然后用测试抗体探测包含丙氨酸的肽。

[0275] 鉴定了本公开的示例性抗体的表位家族。对于抗hPG的N端单克隆抗体MAb 1-4和15-20,表位至少包含以下序列:DAPLG(SEQ ID NO:28)、PDAPLG(SEQ ID NO:29)、PRSQQPD(SEQ ID NO:30)、WKPRSQQPD(SEQ ID NO:31)或WKPRSQQPDAPLG(SEQ ID NO:32),如以下表8中所示。

[0276]

表 8		
MAb	PG 肽抗原: SWKPRSQQPDAPLG	SEQ ID NO
MAb 2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 1	PDAPLG	29
MAb 3	DAPLG	28
MAb 17	WKPRSQQPD	31
MAb 18	WKPRSQQPD	31
MAb 19	WKPRSQQPD	31
MAb 20	WKPRSQQPD	31
MAb 15	PRSQQPD	30
MAb 16	PRSQQPD	30

[0277] 对于抗hPG的C端单克隆抗体MAb 5-7、9-12、14和21-23,表位至少包含以下序列: FGRR(SEQ ID NO:33)、MDFGR(SEQ ID NO:34)、AEDEN(SEQ ID NO:35)和GWMDFGRR(SEQ ID NO:36),如以下表9中所示。

[0278]

表 9		
MAb	PG 肽抗原: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	SEQ ID NO
MAb 14	GWMDFGRR	36
MAb 11	MDFGR	34
MAb 5	FGRR	33
MAb 6	FGRR	33
MAb 7	FGRR	33
MAb 9	FGRR	33
MAb 10	FGRR..E	33
MAb 12	FGRR	33
MAb 23	AEDEN	35

[0279] 实施例7:抗-hPG抗体对癌细胞系的中和活性

[0280] (A)抗-hPG单克隆抗体的中和活性

[0281] 抗-hPG单克隆抗体在代表性结肠直肠癌细胞系中减少细胞存活。适宜的结肠直肠癌细胞系为本领域已知。例如,HCT116、LS174T、SW480和SW620是常用来研究结肠癌的细胞系,其产生和分泌前胃泌素。针对它们在这些不同细胞系中抑制增殖的能力测试了抗PG的单克隆抗体。用不同的抗-hPG单克隆抗体测试了来自各HCT116、LST174T、SW480和SW620的细胞的存活。

[0282] 对于每个实验,将50,000个细胞在包含胎牛血清的培养基中接种在6孔板中,并孵育8小时。对细胞进行过夜血清饥饿,从接种后24小时(时间“T0”)开始,用1 μ g/ml单克隆对照抗体(小鼠抗-人IgG1,Calbiochem,Ref#411451)(CT mAb)或用所示1 μ g/ml抗-hPG MAb 1-4在缺乏胎牛血清的情况下每12小时一式两份地处理细胞,进行48小时。通过单克隆抗体的进一步定量,确定抗体已按约3至5 μ g/ml使用。对于每个实验,在对照孔中计数T0的细胞

数目。对于HCT116细胞,在0.5%胎牛血清的存在下进行实验。开始处理后48小时,在盲法实验中计数各孔中的存活细胞数三次。通过将存活的抗-hPG MAb处理的细胞计算为对照MAb处理的细胞的百分比来确定CRC细胞增殖或存活的降低。从48小时测量的测试和对照细胞计数减去开始处理(T0)时的细胞计数。具体而言,在48小时计数对照孔和抗-hPG MAb处理孔二者中的活细胞数目,然后计算各细胞计数与在T0测定的细胞计数之间的差。然后将得到的抗-hPG MAb处理的细胞的数目表示为对照MAb处理的细胞的数目的百分比。

[0283] 图7A-C显示来自代表性实验的抗-hPG MAb 3和抗-hPG MAb 4对SW480细胞、LS174T细胞和HCT116细胞存活的影响。结果为来自两个独立实验的4个孔的平均值 $\pm$ 标准误差。与用对照抗体处理相比,用抗-hPG单克隆抗体处理显著减少了细胞数目。用斯氏t检验确定了统计显著性: $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$ 。在各细胞系中,抗-hPG抗体降低了细胞存活。在一个细胞系(LST174T)中,用抗-hPG抗体处理的48小时结束时的细胞数目低于开始实验时的细胞数目,表明抗体除抑制细胞增殖外还导致细胞死亡。

[0284] 表10显示用四种单克隆抗-hPG抗体中的每一种处理的百分比存活SW480结肠直肠癌细胞,与对照单克隆抗体(小鼠抗-人IgG1,Calbiochem,Ref#411451)(CT m Ab)相比。

[0285]

表 10			
SW480 (T0 = 26 667)	细胞数目-T0	对照的%	p (处理 vs 对照) Mann Whitney, 双尾
对照 mAb	36050 $\pm$ 3228		
抗-hPG MAb 1	30425 $\pm$ 3098	84.4	0.3556
抗-hPG MAb 2	28925 $\pm$ 2757	80.2	0.0476
抗-hPG MAb 3	6050 $\pm$ 1788	16.8	< 0.0001
抗-hPG MAb 4	17560 $\pm$ 3439	48.7	0.0002

[0286] 与对照相比,抗-hPG单克隆抗体处理使癌细胞的存活降低了83.2%(抗-hPG MAb 3)、51.3%(抗-hPG MAb 4)、19.8%(抗-hPG MAb 2)和15.6%(抗-hPG MAb 1)。

[0287] 下表显示用抗-hPG MAb 3和4处理的百分比存活LS174T和HCT-116细胞,与对照单克隆抗体相比。在图7的对应的图中图示数据。

[0288]

表 11

HCT-116 (T0 = 42 750)	细胞数目 -T0	对照的%	P (处理 vs 对照) Mann Whitney, 双尾
对照 MAb	151 250 +/- 9071		
MAb3	62 750 +/- 9194	41.5 %	< 0.0001
MAb4	82 250 +/-7435	54.4 %	<0.0001

[0289]

表 12

LS 174T (T0 = 51 666)	细胞数目 - T0	对照的%	P (处理 vs 对照) Mann Whitney, 双尾
对照 MAb	85 334 +/- 7520		
MAb3	-6666 +/- 5000	- 8 %	0.0084
MAb4	+8334 +/- 2500	7 %	0.0085

[0290] 在体外测定条件下,不预期完全抑制细胞生长。在细胞培养物中,癌细胞持续分泌前胃泌素,并累积在细胞培养基中。预期前胃泌素水平将这样随时间增加得比体内循环中存在的更多,提高了靶蛋白质与抗体的比值,稀释了抗体的中和作用。因此,预期用抗体在体外观察到的中和作用在体内更强,其中肿瘤细胞分泌的前胃泌素在血流中运走,减少了其原位累积。

[0291] 在SW620、HCT116和LS47T中的一个或多个CRC细胞系中测定了抗-hPG MAb 5至23的细胞增殖抑制。用5 μ g/ml对照或测试(抗-hPG)单克隆抗体按上文所述在6孔板中进行测定。HCT116和LS174T细胞按每孔50,000个细胞接种,SW620细胞按每孔100,000个细胞接种。下表提供来自代表性实验的处理细胞相对于对照处理的存活百分比。图7G-I中分别图示细胞系SW620、LS174T和HCT-116的平均结果。

[0292]

表 13

	细胞数目-T0	对照的%	P (处理 vs 对照) Mann Whitney, 双尾
实验 1			
SW 620 (T0 = 103 067)			
对照 MAb	82 100 +/- 15489	-	
MAb 5	54 511 +/-8292	66 %	< 0.0001
MAb 6	44367 +/- 9321	54 %	< 0.0001
MAb 7	49279 +/- 8009	60 %	< 0.0001
MAb 8	32673 +/- 4680	40 %	< 0.0001
MAb 9	73283 +/- 3835	89%	0.1305
MAb 10	70178 +/- 4173	85 %	0.0618
实验 2			
SW 620 (T0 = 118 553)			
对照 MAb	81 347 +/-6062		
MAb 11	46 974 +/-7422	58 %	0.0003
MAb 12	52 980 +/- 10529	65 %	0.0002
MAb 13	38 933 +/- 5284	48 %	0.0003
MAb 14	83 767 +/- 9484	103 %	0.21
MAb 21	59 497 +/- 2828	73 %	0.0002
MAb 22	64 227 +/- 7123	79 %	0.0013
MAb 23	83 914 +/- 5629	103 %	0.82
实验 3			
SW 620 (T0 = 116 283)			
对照 MAb	101 333 +/- 17 626	-	
MAb 15	66 052 +/-7739	65 %	< 0.0001
MAb 16	58 883 +/- 9950	58 %	< 0.0001
MAb 17	76 688 +/- 5578	75.5 %	0.0014
MAb 18	75 874 +/- 10129	75 %	0.0005
MAb 19	70 242 +/- 10 851	69 %	< 0.0001
MAb 20	66 470 +/- 7557	66 %	< 0.0001

[0293]

表 14

	细胞数目-T0	对照的%	P (处理 vs 对照) Mann Whitney, 双尾
实验 1			
LS 174T (T0 = 60 944)			
对照 MAb	107 956 +/- 5859		
MAb 13	62 341 +/- 10 683	58 %	0.0003
MAb 16	65 389 +/- 8185	61 %	0.0002
实验 2			
LS 174T (T0 = 86 389)			
对照 Mab	241 711 +/- 11 620		
MAb 14	246 444 +/- 19563	102 %	ns
MAb 19	204 433 +/- 8946	84.5 %	0.0005
实验 3			
LS 174T (T0 = 79 667)			
对照 MAb	135 800 +/- 18 338		
MAb 8	57 333 +/- 12657	42 %	< 0.001

[0294]

表 15

	细胞数目-T0	对照的%	P (处理 vs 对照) Mann Whitney, 双尾
实验 1			
HCT-116 (T0 = 49 286)			
对照 MAb	78 214 +/- 6230		
MAb 13	28 805 +/- 3477	36 %	< 0.0001
MAb 16	56 484 +/- 8333	72 %	< 0.0001
MAb 19	68 945 +/- 8795	88 %	0.0302
实验 2			
HCT-116 (T0 = 60 944)			
对照 MAb	122 456 +/- 1697		
MAb 8	75 867 +/- 15627	62 %	< 0.0001
MAb 16	87011 +/- 5091	71 %	< 0.0001

[0295] (B)抗-hPG多克隆抗体的中和活性

[0296] 按上文所述作以下修改来进行测定。使用实施例5中所述的N端抗-hPG多克隆抗体。作为对照,使用3 μ g/ml的多克隆抗体(多克隆兔抗-人IgG,Affinity BioReagents,Ref#

SA1-600)(CT pAB)。对于抗-PG处理,将3 μ g/ml抗-hPG多克隆抗体用于所有细胞系。在不含FCS的DMEM中用对照或N端抗-hPG多克隆抗体处理SW480和LS174T 24至48小时,而在含0.5%FCS的DMEM中用抗-hPG多克隆抗体处理HCT116 48小时。然后用胰蛋白酶消化存活的细胞并计数,与用等浓度的对照(抗-人IgG)多克隆抗体处理的细胞比较。

[0297] 下表和图7D-F中显示了代表性实验的结果。与用对照抗体处理相比,用抗-hPG多克隆抗体处理显著减少了细胞数目。用斯氏t检验确定了统计显著性: $*$ = $p < 0.05$, $**$ = $p < 0.01$, $***$ = $p < 0.001$ 。相对于开始实验(T0)时培养物中的细胞数目来表示细胞数目。对于各实验,计数4个孔的每一个中的细胞三次。与抗-hPG单克隆抗体一样,抗-hPG多克隆抗体抑制结肠直肠癌细胞增殖,表明在阻断前胃泌素对癌细胞的作用中,用抗前胃泌素的多克隆抗体观察到的抗肿瘤作用可以合理地预测单克隆抗体活性。

[0298]

表 16			
	细胞数目-T0	对照的%	P (处理 vs 对照) Mann Whitney,双尾
实验 1			
SW 480 (T0 = 26 667)			
对照 PAb	37 580 +/- 4233		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	0.0001
实验 2			
HCT-116 (T0 = 58 750)			
对照 PAb	105 350 +/- 8660		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	< 0.05
实验 3			
LS174T (T0 = 112 500)	细胞数目-T0	对照的%	P (处理 vs 对照) Mann Whitney,双尾
对照 PAb	207 500 +/- 10 000		
PG PAb	102 500 +/- 5000	49.5 %	< 0.01

[0299] 实施例8:用纯化的hPG预孵育抗体时消除了抗-hPG单克隆抗体的中和作用

[0300] 为了显示抗-hPG单克隆抗体的中和作用由与hPG的结合介导,在已用hPG预孵育和未用hPG预孵育的示例性抗体(抗-hPG MAbs 8)的存在下培养LS174T细胞。作为阳性和阴性对照,用hPG单独、对照抗体单独及hPG预孵育的对照抗体培养细胞。

[0301] 具体而言,用摩尔量过量20倍或667nM(6.67 μ g/mL)的重组hPG在室温下预孵育33.3nM(5 μ g/mL)抗-hPG MAbs 8。使用按实施例1中所述制备的重组人前胃泌素。同时,在有hPG和无hPG的情况下类似地预孵育33.3nM(5 μ g/mL)鼠抗-人IgG1(General BioScience,索引号AB23420)。

[0302] 将5000个LS174T细胞在包含10%胎牛血清的培养基中接种在96孔板的各孔中,并孵育8小时,然后将细胞转换至无血清培养基,并再培养12小时。在无血清培养基中生长12小时后,每12小时用以下中的一种处理细胞:对照抗体、hPG预孵育的对照抗体、抗-hPG MAbs

8单独、hPG预孵育的抗-hPG MAb 8和hPG单独。第一处理后48小时,通过用Promega CellTiter 96Aqueous One Solution孵育平板并记录490nm吸光度来定量剩余的活细胞。将针对用对照单克隆抗体(“对照MAb”)处理的细胞测量的吸光度设为100%,针对用对照MAb处理的细胞的吸光度测量所有其他实验条件。结果显示在下表和图8中。

[0303]

表 17			
	吸光度	对照的%	P (处理 vs 对照) Mann Whitney, 双尾
PG 处理单独	0.244 +/- 0.088	132.5%	0.099 (n.s.)
对照 MAb	0.184 +/- 0.084	100%	N.A.
抗-hPG MAb 8	0.057 +/- 0.06	31%	0.001
对照 MAb +hPG	0.321 +/- 0.079	174.5%	0.002
抗-hPG MAb8 + hPG	0.271 +/- 0.076	147.6%	0.0229

[0304] 加入hPG或用hPG孵育抗体增加了培养物中的活细胞数目。相反,用抗-hPG MAb 8单独处理细胞导致活细胞数目显著减少。因此,hPG(认为其与抗体结合并饱和抗体)的加入废除了抗-hPG单克隆抗体中和PG活性的能力。此结果确认了抗-hPG单克隆抗体的中和活性的特异性。

[0305] 实施例9:抗-hPG抗体的体内抗肿瘤活性

[0306] 已为结肠直肠癌的研究发展了许多体内实验模型。已发展了小鼠异种移植研究,其中将肿瘤组织或来自人癌细胞系的细胞移植入免疫缺陷小鼠(所谓的“裸鼠”)中。Pocard M.等,In vivo(1996)10(5):463-469。已发展了几种转基因小鼠模型。鼠模型包含腺瘤性结肠息肉(APC)基因中的杂合突变,如Apc^{Min}、Apc1638N、Apc716或Apc Δ 14。APC肿瘤抑制基因编码胞质蛋白质APC,该蛋白质(在完整时)结合胞质中的β-联蛋白,并将其整合在将β-联蛋白靶向蛋白酶体进行降解的多蛋白质复合体中,从而阻止β-联蛋白激活细胞核中的转录因子Tcf-4。Heyer等,Oncogene 18:5325-5333(1999)。APC Δ 14小鼠在腺瘤性结肠息肉(APC)基因中携带外显子14的杂合缺失。与超过70%的散发性结肠直肠癌患者中的情况类似,肠细胞中存在第二Apc等位基因中的体细胞杂合性丢失,导致β-联蛋白/Tcf-4转录复合体的组成性激活及肠肿瘤在这些动物中的自发发展。与小鼠异种移植模型相比,这些腺瘤和癌分子起源以及肿瘤形态学(包括血管形成、炎症反应和免疫细胞的存在)与人肿瘤具有更高的相似性,使得APC Δ 14成为用于人结肠直肠癌疗法研究的高度相关的模型。Colnot等,2004,Lab. Invest. 84:1619-1630。其他转基因小鼠模型基于诸如MSH2、MSH6、CDX2、K-RAS的基因中的突变,以及将APC中的突变与其他癌基因中的突变组合的品系。Heyer等,1999, Oncogene 18:5325-5333; Janssen KP等,2002, Gastroenterology 123:492-504。这些模型广泛用于研究结肠直肠癌和测试关于结肠直肠癌治疗的假说。

[0307] 携带腺瘤性结肠息肉基因外显子14的杂合缺失(APC Δ 14)的转基因小鼠作为结肠直肠癌的模型,其发展与见于人结肠癌的那些相似的肿瘤。在第一实验中,用包含针对(1)对应于SEQ ID NO:25的肽和(2)Hollande等,WO 07/135542中所述的C端肽产生的等量抗-hPG多克隆抗体的制剂处理APC Δ 14小鼠。用对照多克隆抗体或抗-hPG多克隆抗体处理3.5

月龄小鼠5周(每种处理两只小鼠)。通过按10mg/kg的剂量(150 μ l注射体积)每周腹膜内注射两次来施用抗体。在处理结束时,处死小鼠并用PBS洗涤肠,解剖用于数字成像,并在4%多聚甲醛中固定用于免疫组织化学分析。记录结肠直肠组织的肿瘤数目和图像。

[0308] 肠组织的形态学评估显示,抗-hPG抗体不影响健康鼠肠上皮的更新。在处理组和对照组中计数了肿瘤。与用抗-hPG抗体处理的小鼠中的4个肿瘤相比,用对照抗体处理的小鼠的肿瘤总数为27。因此,与对照抗体相比,抗-hPG抗体使肿瘤计数减少了超过6.5倍,同时不影响小鼠肠中健康上皮的更新。

[0309] 在第二实验中,检查了抗-hPG抗体在APC Δ 14小鼠和正常(对照)小鼠(C57BL6J)中的作用。通过按9mg/kg的剂量(150 μ l注射体积)每周腹膜内注射两次来用对照多克隆抗体(兔抗-人IgG抗血清(Jackson ImmunoResearch,索引号309-005-0089))或抗-hPG多克隆抗体处理4月龄小鼠6周,每周两次。处理6周后,在处死前两小时用溴脱氧尿苷(BrdU)(每只小鼠2mg,腹膜内注射)注射小鼠。用抗-hPG多克隆抗体处理6只APC Δ 14小鼠,用对照多克隆抗体处理4只。各对6只正常(C57BL6J)小鼠施用对照抗体和抗-hPG抗体。未在来自任一组的任意小鼠中检测到肠的异常,进一步表明抗-hPG抗体对正常肠组织安全且无副作用。

[0310] 在APC Δ 14小鼠的处理组对对照组中检查了肿瘤数目和大小(高度和长度)。通过测量采集自按如下制备的各动物的肠的图像来测定肿瘤大小。按上文所述漂洗肠,纵向解剖,包埋在石蜡中,并用“Swiss roll”技术处理用于免疫组织化学。用Image J软件进行肿瘤长度和高度的测量。

[0311] 结果显示在表18及图8A和B中。肿瘤大小的结果在对照处理组和抗-hPG处理组之间显示统计上显著的差异。用Mann Whitney检验确定了统计显著性: $*$ = $p < 0.05$, $**$ = $p < 0.01$, $***$ = $p < 0.001$ 。用对照抗体处理的小鼠显示总计125个肿瘤,平均每只小鼠31.25个肿瘤。抗-hPG处理的小鼠显示46个肿瘤或平均每只小鼠7.6个肿瘤。此差异是统计上显著的(Mann-Whitney检验, $P = 0.0095$),表明抗-hPG抗体在体内显著减少了结肠直肠癌肿瘤的数目。

[0312]

表 18						
治疗(小鼠数目)	每只小鼠的肿瘤数目					
对照 PAb (4)	23	48	28		26	
抗-hPG PAb (6)	2	16	15	9	2	2

[0313] 如通过结肠直肠癌的鼠模型中肿瘤数目和肿瘤大小二者的减小所测量,抗-hPG抗体显著减少体内结肠直肠癌肿瘤,而对正常结肠直肠上皮无任何明显的副作用。因此,用抗-hPG处理结肠直肠癌肿瘤提供体内治疗益处。

[0314] 实施例10:人源化抗-hPG抗体的设计

[0315] “在计算机芯片上”从鼠抗-hPG单克隆抗体MAb 3、4、8、13、16和19设计了人源化抗体。按照Lefranc等,2003,Dev. Comp. Immunol. 27:55-77;Lefranc等,2009,Nucl. Acids Res. 37:D1006-1012;Lefranc,2008,Mol. Biotechnol. 40:101-111中所述的方法进行人源化抗体的设计。对于鼠单克隆抗体中的每一种,通过以下确定对应的人源化 V_H 和 V_L 肽序列:用IMGT-ONTOLOGY数据库(Duroux等,2008,Biochimie,90:570-583;Giudicelli和Lefranc,

1999, *Bioinformatics*, 15:1047-1054)及IMGT®数据库和工具(Ehrenmann等, 2010, *Nucl. Acids. Res.*, 38:D301-307; Brochet等, 2008, *Nucl. Acids. Res.*, 36:W503-508)鉴定鼠序列中的CDR和构架区, 然后在IMGT/GENE-DB(Giudicelli等, 2005, *Nucl. Acids. Res.*, 33:D256-261)中鉴定最接近的人构架区序列的氨基酸序列, 将鼠CDR序列移植在人构架区上。更具体而言, 用IMGT V-QUEST和IMGT/DomainGapAlign分析鼠V_H和V_L结构域的核苷酸和氨基酸序列来划定鼠CDR和构架区的界限、确定CDR长度并鉴定锚氨基酸(anchor amino acid)。锚氨基酸是支持CDR1-IMGT、CDR2-IMGT、CDR3-IMGT的IMGT“Collier de Perles”的26、39、55、66、104和118位残基(Kaas和Lefranc, 2007, *Current Bioinformatics*, 2:21-30; Kaas等, *Brief. Funct. Genomic Proteomic*, 2007, 6:253-264)。鉴定最接近鼠序列的人V(可变区)和J(连接区)基因, 选择最适宜的基因。如果通过用两层上的IMGT Collier de Perles与已知的3D结构(Kaas等, 2004, *Nucl. Acids. Res.* 32:208-210)比较认为它们可能有助于抗体的特异性, 则保留鼠构架区中的个体氨基酸。

[0316] 确定了MAb 3的V_H CDR的CDR 1、2和3长度分别为8、8和8个氨基酸。与鼠MAb 3V_H序列最接近的种系小鼠基因IGHV1-5*01在10个残基上不同, 其中3个定位于CDR, 并保留在人源化抗-hPG单克隆抗体的设计中(CDR1中的I29, CDR2中的F56和S65)。此外, 认为V39、G55和R66可能对保持特异性重要, 并保留在设计中。最接近的人种系基因是IGHV1-3*01(根据IMGT/DomainGapAlign, 在氨基酸水平上63.3%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的27个序列差异。在构架区4中, 将苏氨酸123和亮氨酸124改变为亮氨酸123和缬氨酸124, 以匹配人IGHJ1*01基因。总体上, MAb 3的人源化V_H与IGHV1-46*03的可变区87.8%相同, 且四个构架区中的91个氨基酸中的88个相同。

[0317] 确定了MAb3的V_L CDR的CDR 1、2和3长度分别为11、3和9个氨基酸。与鼠MAb 3V_L序列最接近的种系小鼠基因IGKV1-117*01在定位于构架区的单个残基上不同。最接近的人种系基因是IGKV2-30*02(根据IMGT/DomainGapAlign, 在氨基酸水平上81%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的14个序列差异。将残基E40和F68保留在设计中的(projected)人源化序列中。在构架区4中, 将亮氨酸124改变为缬氨酸124, 以匹配人IGKJ4*01基因。总体上, MAb 3的人源化V_κ序列与IGKV2D-29*02 93%相同, 且四个构架区中的89个氨基酸中的87个相同。

[0318] 下表中提供设计的V_H和V_κ序列。

[0319]

表 19		
SEQ ID NO:	氨基酸序列	V 链
21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYVHWVRQAP GQRLEWMGGFYPGNSDSRYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMEL SSLRSEDVAVYYCTRRDSPQYWGQGLTVTVSS	hV _H 3
22	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQ QRPGQSPRRLIYKVSNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCFQGSHPVFTFGGGTKVEIK	hV _κ 3

[0320] 确定了MAb 4的V_H CDR的CDR 1、2和3长度分别为8、8和11个氨基酸。与鼠MAb 4V_H序列最接近的种系小鼠基因IGHV1-9*01在11个残基上不同, 其中4个定位于CDR, 并保留在人源化抗-hPG单克隆抗体的设计中(CDR1中的S35、S36和S37, CDR2中的F56)。此外, 认为D66可

能对保持特异性重要,并保留在设计中。最接近的人种系基因是IGHV1-46*03(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上64.9%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的27个序列差异。在构架区4中,将丙氨酸128改变为丝氨酸128,以匹配人IGHJ5*01基因。总体上,MAb 4的人源化V_H与IGHV1-46*03的可变区91.8%相同,且四个构架区中的91个氨基酸中的90个相同。

[0321] 确定了MAb 4的V_L CDR的CDR 1、2和3长度分别为11、3和9个氨基酸。与鼠MAb 4 V_L序列最接近的种系小鼠基因IGKV1-110*01在3个残基上不同,其中2个定位于CDR1(丝氨酸34和缬氨酸36),并保留在人源化抗-hPG单克隆抗体的设计中。最接近的人种系基因是IGKV2D-29*02(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上81%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的11个序列差异。在构架区4中,将丝氨酸120改变为谷氨酰胺120,以匹配人IGKJ2*01基因。总体上,MAb 4的人源化V_K序列与IGKV2D-29*02 92%相同,且四个构架区100%相同。

[0322] 下表中提供设计的V_H和V_K序列。

[0323]

表 20		
SEQ ID NO:	氨基酸序列	V 链
23	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSSWMHWRQAPG QGLEWMGIFLPGSGSTDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCATDGNVDWFAYWGQGLTVTVSS	hV _H 4
24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSSGVTYLYWYL QKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGCTDFTLKISRVE AEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK	hV _K 4

[0324] 确定了MAb 8的V_H CDR的CDR 1、2和3长度分别为8、8和10个氨基酸。与鼠MAb 8 V_H序列最接近的种系小鼠基因IGHV5-9-3*01在5个残基上不同,其中4个定位于CDR,并保留在人源化抗-hPG单克隆抗体的设计中。最接近的人种系基因是IGHV3-21*01和*02(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上80.4%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的12个序列差异。在构架区4中,将丝氨酸123和亮氨酸124分别改变为苏氨酸123和缬氨酸124,以匹配人IGHJ6*01基因。总体上,MAb 8的人源化V_H与IGHV3-21*01和*02的可变区92.8%相同,且四个构架区100%相同。MAb8的V_H CDR3中存在潜在的N糖基化位点。

[0325] 确定了MAb 8的V_LCDR的CDR 1、2和3长度分别为11、3和9个氨基酸。与鼠MAb 8V_L序列最接近的种系小鼠基因IGKV2-109*01在6个残基上不同,其中4个定位于CDR1,并保留在人源化抗-hPG单克隆抗体的设计中。最接近的人种系基因是IGKV2-28*01和IGKV2D-28*01(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上75%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的12个序列差异。在构架区4中,将丙氨酸120、亮氨酸124和亮氨酸126分别改变为甘氨酸120、缬氨酸124和异亮氨酸126,以匹配人IGKJ4*01基因。总体上,MAb 8的人源化V_K序列与IGKV2-28*01和IGKV2D-28*01 87%相同,且四个构架区100%相同。

[0326] 下表中提供设计的V_H和V_K序列。

[0327]

表 21		
SEQ ID NO:	氨基酸序列	V 链
75	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FTTYAMNWVRQAPGKGLEWVSSISSGGT YTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGT VTVSS	hV _H 8a
76	DIVMTQSPLSLPVTPGEPA SISCRSSKSLRHTKGITFLD WYLQKPGQSPQLLIYQMSNRASGVDP RFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	hV _K 8a
77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVS SISSGGTYTTYADSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCATQGNYSLDFWGQGTITVTVSS	hV _H 8b

[0328]

表 21		
SEQ ID NO:	氨基酸序列	V 链
78	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSKSLRHTKGITFLYWYLQKPG QSPQLLIYQMSNRASGVDP RFGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	hV _K 8b
79	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSG GTYTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTITVTVSS	hV _H 8b

[0329] 确定了MAb 13的V_H CDR的CDR 1、2和3长度分别为8、8和7个氨基酸。与鼠MAb 13 V_H序列最接近的种系小鼠基因IGHV5-6-3*01在10个残基上不同,其中5个定位于CDR,并保留在人源化抗-hPG单克隆抗体的设计中。最接近的人种系基因是IGHV3-7*01和*02(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上78.6%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的13个序列差异。在构架区4中,将苏氨酸123和亮氨酸124分别改变为亮氨酸123和缬氨酸124,以匹配人IGHJ4*01基因。总体上,MAb 13的人源化V_H与IGHV3-7*01和*02的可变区91.8%相同,且四个构架区100%相同。

[0330] 确定了MAb 13的V_LCDR的CDR 1、2和3长度分别为11、3和9个氨基酸。与鼠MAb 13 V_L序列最接近的种系小鼠基因IGKV1-135*01在定位于构架区中的单个残基上不同。最接近的人种系基因是IGKV2-30*01和*02(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上81%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的13个序列差异。在构架区4中,将亮氨酸124改变为缬氨酸124,以匹配人IGKJ4*01基因。总体上,MAb 13的人源化V_K序列与IGKV2-30*01和*02 94%相同,且四个构架区100%相同。

[0331] 下表中提供设计的V_H和V_K序列。

[0332]

表 22

SEQ ID NO:	氨基酸序列	V 链
80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYGMSWVRQAP GKGLEWVANINTFGDRTYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGTGTYWGQGTLLTVSS	hV _H 13a
81	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGKTYLNWFQ QRPQGSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK	hV _K 13a
82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYGMSWVRQ APGKLEWVASINTFGDRTYYVDSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGTYWGQGTLLTVSS	hV _H 13b
83	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGKTYLNW FQQRPGQSPRRLIYLVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK	hV _K 13b

[0333] 确定了MAb 16的V_H CDR的CDR 1、2和3长度分别为8、8和10个氨基酸。与鼠MAb 16V_H序列最接近的种系小鼠基因IGHV1-53*01在7个残基上不同,其中2个定位于CDR,并保留在人源化抗-hPG单克隆抗体的设计中。最接近的人种系基因是IGHV1-46*01和*03(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上71.4%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的25个序列差异。在构架区4中,将亮氨酸124改变为缬氨酸124,以匹配人IGHJ6*01基因。总体上,MAb 16的人源化V_H与IGHV1-46*01和*03的可变区96.9%相同,且四个构架区100%相同。

[0334] 确定了MAb 16的V_L CDR的CDR 1、2和3长度分别为11、3和9个氨基酸。与鼠MAb 16V_L序列最接近的种系小鼠基因IGKV1-135*01在定位于构架区中的4个残基上不同。最接近的人种系基因是IGKV2-30*01和*02(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上79%相同),其因CDR1中的一个氨基酸而不同。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的15个序列差异。在构架区4中,将甘氨酸120改变为谷氨酰胺120,以匹配人IGKJ2*01基因。总体上,MAb 16的人源化V_K序列与IGKV2-30*01和*02 94%相同,且四个构架区100%相同。

[0335] 下表中提供设计的V_H和V_K序列。

[0336]

表 23

SEQ ID NO:	氨基酸序列	V 链
84	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPG QGLEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTITVTVSS	hV _H 16a
85	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGKTYLNWFQQ RPGQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCQWQGTTHSPYTFGQGTKLEIK	hV _K 16a
86	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMYWVRQAPGQG LEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTITVTVSS	hV _H 16b
87	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGKTYLYWFQQR GQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCQWQGTTHSPYTFGQGTKLEIK	hV _K 16b
88	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMYWVRQAPGQGL EWMGEINPSNGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE TAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTITVTVSS	hV _H 16c
89	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGKTYLYWFQQR GQSPRRLIYLVSEKDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCQWQGTTHSPYTFGQGTKLEIK	hV _K 16c

[0337] 确定了MAb 19的V_H CDR的CDR 1、2和3长度分别为9、7和14个氨基酸。与鼠MAb 19V_H序列最接近的种系小鼠基因IGHV3-2*01在5个残基上不同,其中2个定位于CDR,并保留在人源化抗-hPG单克隆抗体的设计中。最接近的人种系基因是IGHV4-30-4*01(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上72.4%相同)。但是,由于此基因是多态基因,选择了IGHV4-31*02和*03(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上71.4%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的21个序列差异。在构架区4中,将异亮氨酸123改变为亮氨酸123,以匹配人IGHJ4*01基因。总体上,MAb 19的人源化V_H与IGHV4-31*02和*03的可变区91.9%相同,且四个构架区100%相同。

[0338] 确定了MAb 19的V_L CDR的CDR 1、2和3长度分别为7、7和13个氨基酸。与鼠MAb 19V_L序列最接近的种系小鼠基因IGLV3*01在8个残基上不同,其中5个定位在CDR中。最接近的人种系基因是IGLV4-69*01和*02(根据IGMT/DomainGapAlign,在氨基酸水平上69.9%相同)。在鼠和人种系基因之间发现了构架区1至3中的23个序列差异。在构架区4中,将缬氨酸124改变为亮氨酸124,以匹配人IGLJ3*01基因。备选地,可以将IGJK4*01用于构架区4。总体上,MAb 19的人源化V_K序列与IGLV4-69*01和*02 92.4%相同,且四个构架区100%相同。

[0339] 下表中提供设计的V_H和V_K序列。

[0340]

表 24

SEQ ID NO:	氨基酸序列	V 链
90	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWSWIRQH PGKGLEWIGYISFSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGTLLTVSS	V _H 19a
91	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRITYTIAWHQQQPEK GPRYLMKVKKDGSLSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSE DEADYYCGVGDAIKQSVFVFGGGTKVEIK	V _K 19a
92	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWIHQHP GKGLEWIGYISFSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGTLLTVSS	V _H 19b
93	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRITYTIEWHQQQPEKG PRYLMKVKKDGSLSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSED EADYYCGVGDAIKQSVFVFGGGTKVEIK	V _K 19b
94	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWIHQHPGK GLEWIGYISFSGYTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGTLLTVSS	V _H 19c
95	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRITYTIEWHQQQPEKGP RYLMEVKKKDGSLSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDE ADYYCGVGDAIKQSVFVFGGGTKVEIK	V _K 19c

[0341] 本申请中引用的所有出版物、专利和专利申请在此为了所有目的以相同的程度以其整体引入作为参考,就如同每一单个出版物、专利、专利申请或其他文件被单独地说明为了所有目的引入作为参考一样。虽然已说明和描述了多种具体实施方案,但应理解,可以进行多种改变而不背离本发明的精神和范围。

序 列 表

<110> 拜若提公司 (BIOREALITES, S.A.S.)
 科学研究国家中心 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS))
 健康和医学国家研究院 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
 MEDICALE (INSERM))

<120> 抗前胃泌素的单克隆抗体及其用途

<130> 382657-001W0

<150> 61/252,625

<151> 2009-10-16

<160> 99

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<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> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

[0001]

<210> 2

<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> 2

Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser

1 5

<210> 3

<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> 3

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr

1 5

<210> 4

<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> 4
Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 5
<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> 5
Lys Val Ser
1

<210> 6
<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> 6
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
1 5

[0002]

<210> 7
<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> 7
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp
1 5

<210> 8
<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> 8
Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 9
<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> 9
 Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <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> 10
 Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr
 1 5 10

<210> 11
 <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> 11
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
 1 5

<210> 12
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述: 合成多肽”
 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 13

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

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

[0004]

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

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

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 14

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述：合成多肽”

[0005]

<400> 15

Asp Leu Val 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 Leu Val His Ser
 20 25 30

Ser Gly Val Thr Tyr Leu His 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 Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

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

<210> 16

<211> 345

<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”			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1).. (345)			
<400> 16			
gag gtt cag ctc cag cag tet ggg act gtg ctg gca agg cct ggg gct		48	
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala			
1 5 10 15			
tcc gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttt acc agc tac		96	
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr			
20 25 30			
tgg gta cac tgg gtt aaa cag agg cct gga cag ggt cta gaa tgg att		144	
Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35 40 45			
ggt ggt ttt tat cct gga aat agt gat tct agg tac aac cag aaa ttc		192	
Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe			
50 55 60			
aag ggc aag gcc aca ctg act gca gtc aca tcc gcc agt act gcc tac		240	
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
65 70 75 80			
[0006]			
atg gac ctc agc agc ctg aca aat gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt		288	
Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
85 90 95			
aca aga aga gat agt ccc cag tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca		336	
Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr			
100 105 110			
gtc tcc tca		345	
Val Ser Ser			
115			
<210> 17			
<211> 336			
<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”			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1).. (336)			
<400> 17			
gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga		48	
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			

1	5	10	15	
gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat agt				96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser				
20	25	30		
aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct				144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser				
35	40	45		
cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca				192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro				
50	55	60		
gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc				240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile				
65	70	75	80	
agc aga ctg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt				288
Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly				
85	90	95		
tca cat gtt ccg ttc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa				336
Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys				
100	105	110		

[0007]

<210> 18
 <211> 354
 <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”
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)
 <400> 18

cag gtt cag ttg cag cag tct gga gct gag ctg atg aag cca ggg gcc				48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala				
1	5	10	15	
tca gtg aag ata tcc tgc aag gct act ggc tac aca ttc agt agc tcc				96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser				
20	25	30		
tgg ata gag tgg tta aaa cag agg cct gga cat ggc ctt gag tgg att				144
Trp Ile Glu Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile				
35	40	45		
gga gag ttt tta cct gga agt ggt agt aca gac tac aat gag aag ttc				192
Gly Glu Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe				
50	55	60		

[0008]

aag ggc aag gcc aca ttc act gca gac aca tcc tcc gac aca gcc tac Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
atg cta ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcc gtc tat tac tgt Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gca act gat ggt aat tat gac tgg ttt gct tac tgg gcc caa ggg act Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110	336
ctg gtc act gtc tct gca Leu Val Thr Val Ser Ala 115	354
<210> 19 <211> 336 <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” <220> <221> CDS <222> (1).. (336) <400> 19	
gat ctt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly 1 5 10 15	48
gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser 20 25 30	96
agt gga gtc acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca gcc cag tct Ser Gly Val Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser 35 40 45	144
cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro 50 55 60	192
gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 80	240
agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser 85 90 95	288

aca cat gtt cct ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20

<211> 80

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 20

Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Asn Arg Asp Leu Glu Leu Pro Trp Leu Glu Gln Gln Gly Pro Ala
 20 25 30

Ser His His Arg Arg Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val
 35 40 45

Ala Asp Pro Ser Lys Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu
 50 55 60

Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
 65 70 75 80

<210> 21

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala 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

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

[0009]

Val Ser Ser
115

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 22

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

Gln Pro 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 Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg 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

[0010]

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

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

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 23

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

Gly Ile Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 24

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

[0011]

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

Pro Gln 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

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

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly
1 5 10

<210> 26

<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”
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Ahx
<400> 26
Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Xaa Cys
1 5 10 15

<210> 27
<211> 26
<212> PRT
<213> 人
<400> 27
Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
1 5 10 15

Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
20 25

[0012] <210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> 人
<400> 28
Asp Ala Pro Leu Gly
1 5

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> 人
<400> 29
Pro Asp Ala Pro Leu Gly
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人
<400> 30
Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 31
Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
1 5

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> 人
<400> 32
Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly
1 5 10

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> 人
<400> 33
Phe Gly Arg Arg
1

[0013] <210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> 人
<400> 34
Met Asp Phe Gly Arg
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人
<400> 35
Ala Glu Asp Glu Asn
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 人
<400> 36
Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg
1 5

<210> 37
<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> 37

Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala
1 5

<210> 38
<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> 38
Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 39
<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> 39
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5

[0014]

<210> 40
<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> 40
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala
1 5

<210> 41
<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> 41
Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr
1 5

<210> 42
<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> 42
Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr
1 5

<210> 43
<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> 43
Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr
1 5

<210> 44
<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> 44
Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr
1 5

[0015]

<210> 45
<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> 45
Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe
1 5 10

<210> 46
<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> 46
Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr
1 5

<210> 47
<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> 47
Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 48
<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> 48
Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr
1 5 10

[0016] <210> 49
<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> 49
Lys Ser Leu Arg His Thr Lys Gly Ile Thr Phe
1 5 10

<210> 50
<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> 50
Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 51
<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> 51
Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
1 5

<210> 52
<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> 52
Gln Met Ser
1

<210> 53
<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> 53
Leu Val Ser
1

[0017] <210> 54
<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> 54
Val Lys Lys Asp Gly Ser His
1 5

<210> 55
<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> 55
Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 56
<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> 56

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr

1 5

<210> 57

<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> 57

Trp Gln Gly Thr His Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 58

<211> 13

<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> 58

Gly Val Gly Asp Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val

1 5 10

[0018]

<210> 59

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 60

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

[0019]

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

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

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

Ser Ser

<210> 61

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 61

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys 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

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 62

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 62

[0020]

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63

<211> 112

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”
 <400> 63
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
 20 25 30
 Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

[0021]

<210> 64
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”
 <400> 64
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr 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 Trp Gln Gly
 85 90 95

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

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 65

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

Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

[0022]

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

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

<210> 66

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 66

Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
20 25 30

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
65 70 75 80

Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

Thr Val Leu
115

<210> 67

<211> 351

<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”

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (351)

<400> 67

[0023] gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aaa etc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc act acc tat 96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

gcc atg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc 144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agt agt ggt ggt act tac acc tac tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag ggt cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac gcc cta tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg agc agt ctg agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aca cag ggg aat tac tct ttg gac ttc tgg ggc caa ggc acc tct 336
Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

ctc aca gtc tcc tca Leu Thr Val Ser Ser 115	351
<210> 68 <211> 342 <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” <220> <221> CDS <222> (1)..(342) <400> 68	
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct gga ggg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15	48
tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt agc tat Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr 20 25 30	96
ggc atg tct tgg gtt cgc cag tct cca gac agg agg ctg gag ttg gtc Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Asp Arg Arg Leu Glu Leu Val 35 40 45	144
[0024]	
gca agt att aat act ttt ggt gat aga acc tat tat cca gac agt gtg Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val 50 55 60	192
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	240
ctg caa atg acc agt ctg aag tct gag gac aca gcc att tat tac tgt Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gca aga ggg acc gga acc tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val 100 105 110	336
tcc tca Ser Ser	342
<210> 69 <211> 351 <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”

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (1).. (351)

<400> 69

cag gtc caa ctg cag cag tet ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tea gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac 96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

tat atg tac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att 144
Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga gag att aat cct agc aat ggt ggt act aac ttc aat gag aag ttc 192
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gca tac 240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0025]

atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

aca aga ggc ggt tac tac ccc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act 336
Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

ctc aca gtc tcc tca 351
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 70

<211> 363

<212> DNA

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈221〉 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成多核苷酸”

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (1).. (363)

<400> 70

gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct tct cag 48
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

[0026]

tct ctg tcc etc aca tgc act gtc act ggc tac tca atc acc agt gat Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp 20 25 30	96
tat gcc tgg aat tgg atc egg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag tgg Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp 35 40 45	144
atg ggc tac ata agc ttc agt ggt tac act agt tac aac cca tct etc Met Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu 50 55 60	192
aaa agt cga atc tct gtc act egg gac aca tcc agg aac caa ttc ttc Lys Ser Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe Phe 65 70 75 80	240
ctc cag ttg act tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat tac tgt Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gca aga gag gtc aac tat ggg gac tcc tac cac ttt gac tac tgg ggc Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly 100 105 110	336
caa ggc acc att gtc aca gtc tcc tca Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser 115 120	363
<210> 71	
<211> 336	
<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”	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1).. (336)	
<400> 71	
gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly 1 5 10 15	48
aca tcc gct tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc cga cat act Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr 20 25 30	96
aaa ggc atc act ttt ttg tat tgg tat ctg cag aag cca ggc cag tct Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser 35 40 45	144

[0027]

cct cag ctc ctg att tat cag atg tcc aac ctt gcc tca gga gtc cca Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro 50 55 60	192
gac agg ttc agt agc agt ggg tca gga act gat ttc aca ctg aga atc Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile 65 70 75 80	240
agc aga gtg gag gct gag gat ttg ggt gtt tat tac tgt gct caa aat Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn 85 90 95	288
cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys 100 105 110	336
<210> 72 <211> 336 <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” <220> <221> CDS <222> (1)..(336) <400> 72	
gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tgc gtt acc att gga Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly 1 5 10 15	48
caa cca gcc tcc atc tcc tgc aag tca agt cag agc ctc tta gat agt Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser 20 25 30	96
gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser 35 40 45	144
cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct gga gtc cct Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro 50 55 60	192
gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 80	240
agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly 85 90 95	288
aca cat ttt cct cag acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa	336

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

<210> 73

<211> 336

<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”

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 73

gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt acc att ggg 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

cgc cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta gac agt 96
 Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

gat gga aag aca tat ttg tat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct 144
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

[0028]

cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct gag ctg gac tct gga gtc cct 192
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg atc act ggc agt ggg tcg ggg aca gat ttc aca ctg aag atc 240
 Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa gga 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

aca cat tct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 336
 Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 74

<211> 345

<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”

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

[0029]	<400> 74	
	caa ctt gcg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc ctg gga gcc	48
	Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala	
	1 5 10 15	
	tca gca aaa cta acg tgc act ttg agt agt caa cac aga acg tac acc	96
	Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr	
	20 25 30	
	att gaa tgg tat cag caa cag tca ctc aag cct cct aag tat gtg atg	144
	Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Ser Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met	
	35 40 45	
	gag gtt aag aaa gat gga agc cac agc aca ggt cat ggg att cct gat	192
	Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly His Gly Ile Pro Asp	
	50 55 60	
	cgc ttc tct gga tcc agt tct ggt gct gat cgc tac ctc agc att tcc	240
	Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser	
	65 70 75 80	
	aac atc cag cct gaa gat gaa gca ata tac atc tgt ggt gtg ggt gat	288
	Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp	
	85 90 95	
	gca att aag gga caa tct gtg ttt gtt ttc ggc ggt ggc acc aag gtc	336
	Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val	
	100 105 110	
	act gtc cta	345
	Thr Val Leu	
	115	
	<210> 75	
	<211> 117	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述: 合成多肽”	
	<400> 75	
	Glu 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 Thr Thr Tyr	
	20 25 30	
	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
	Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala 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 Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 76

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
20 25 30

[0030]

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Arg Ala 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

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

<210> 77

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 77

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

<210> 79
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述: 合成多肽”
 <400> 79
 Glu 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 Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala 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
 [0032]
 Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 80
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述: 合成多肽”
 <400> 80
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val 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 Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 81

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 81

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

[0033]

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

<210> 82

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 82

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val 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 Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

[0034]

<210> 83
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”
 <400> 83
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Arg Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 84

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 84

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

[0035]

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 85

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 85

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly			
85	90	95	
Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	
<210> 86			
<211> 117			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释=“人工序列的描述: 合成多肽”			
<400> 86			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
[0036]			
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr			
100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 87			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释=“人工序列的描述: 合成多肽”			
<400> 87			
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly			
1	5	10	15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser			

	20	25	30
	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
	35	40	45
	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly		
	85	90	95
	Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105	110
	<210> 88		
	<211> 117		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”		
	<400> 88		
[0037]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
	1	5	10 15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
	20	25	30
	Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40	45
	Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
	50	55	60
	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr		
	65	70	75 80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
	100	105	110
	Val Thr Val Ser Ser		
	115		
	<210> 89		
	<211> 112		
	<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 89

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Arg Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

[0038] Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 90

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 90

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

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

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

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 91

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 91

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
20 25 30

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

[0039] Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 92

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 92

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

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

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

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 93

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

[0040]

<400> 93

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
20 25 30

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

Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 94
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”
 <400> 94
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0041]

<210> 95
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”
 <400> 95
 Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45
 Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 96

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成肽”

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(3)

<223> Ahx

<400> 96

Cys Xaa Xaa Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly
1 5 10 15

[0042]

Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
20 25

<210> 97

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成肽”

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(3)

<223> Ahx

<400> 97

Cys Xaa Xaa Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
1 5 10

<210> 98

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成肽”

[0043]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(12)
<223> Ahx
<400> 98
Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn Xaa Xaa Cys
1 5 10

<210> 99
<211> 15
<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> 99
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

前胃泌素原:	M QRLCVYVLIF ALALAAFSEA	SWKPRSQQPD	APLGTGANRD	LLELPWLEQQG
	-21 1 -11 -1 11 21			
	PASHHRRQLG PQGPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWMD	FGRRSAEDEN
	31 41 51 61 71			
前胃泌素:	SWKPRSQQPD	APLGTGANRD	LLELPWLEQQG	
	1 11 21			
	PASHHRRQLG PQGPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWMD	FGRRSAEDEN
	31 41 51 61 71			
G34:	QLG PQGPPHLVAD	PSKKEGPWLE	EEEEAYGWMD	F-NH ₂
	41 51 61 71			
G34-Gly:	QLG PQGPPHLVAD	PSKKEGPWLE	EEEEAYGWMD	FG
	41 51 61 71			
G17:	EGPWLE	EEEEAYGWMD	F-NH ₂	
	61 71			
G17-Gly:	EGPWLE	EEEEAYGWMD	FG	
	61 71			
CTFP:	SAEDEN			75

图1

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAIGTTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTGTACATAGTAATG									
D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N									
mV _L CDR 1.3									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAACACCTATTTAGAAATGGTACCTGCGAGAAACAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT									
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F									
mV _L CDR 1.3									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACACTCAAGATCAGCAGACTGGAGGCTCAGGATCTGGAGTTTATTACTGCTTTCAGGTTTCACATGTTCCG									
S G S G S G T D F T L K I S R L E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P									
mV _L CDR 2.3									
310	320	330							
TTCAGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA									
F T F G G G T K L E I K									
mV _L CDR 3.3									
mV _L CDR 3.3									

图2B

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CAGGTTCA	GTTGAG	CTGAGC	TGATGA	AGCCAG	GGCCCT	CAGTGA	AGATA	TCCCTG	CAAGGCT
Q V Q L	Q Q S G	A E L M	K P G A	S V K I	S C K A	T G Y T	G Y T F	S S S S	W
mV _H CDR 1.4									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TAGAGT	GGTTAA	ACAGAG	GCCTGG	ACATGG	CGCTTG	AGTGG	ATTG	AGAGT	TTTAC
I E W L	K Q R P	G H G L	E W I G	E F L P	G S G S	T D Y N	E K F K	G G C A A	
mV _H CDR 2.4									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GGCCAC	ATTCACT	GCAGAC	ACATC	CTCCG	ACACAG	CCCTAC	TGCTACT	GCAGG	ACTCTG
A T F T	A D T S	S D T A	Y M L L	S S L T	S E D S	A V Y Y	C A T D	G	
mV _H CDR 3.4									
310	320	330	340	350					
AATTAT	GACTGT	GTTTGT	CTTACT	GGGGCC	AAGG	ACTCTG	GTCACT	GTCT	CTGCA
N Y D W	F A Y W	G Q G T	L V T V	S S A					
mV _H CDR 3.4									

图2C

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATCTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAGTG									
D L V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S S									
mV _L CDR 1.4									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAGTCACCTATTTACATTGGTACCTGCGAAGCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT									
G V T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F									
mV _L CDR 1.4									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCCT									
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P									
mV _L CDR 2.4									
310	320	330							
CCCACGTTGGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA									
P T F G S G T K L E I K									
mV _L CDR 3.4									
mV _L CDR 3.4									

图2D

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCACCTACCTATGCCA									
E V Q L V E S G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F T Y A									
mV _H CDR 1.8									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TGTCFTGGGTTGCCAGACTCCGGAGAGGCTGGAGTGGTGCCTGAGTGGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCCG									
M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S S G G T Y T Y P D S V K G R									
mV _H CDR 2.8									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACGCCCTATACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGTGCAACACAGGGG									
F T I S R D N A K N A L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A T Q G									
mV _H CDR 3.8									
310	320	330	340						
AATTACTCTTTGGACTTCTGGGGCCAGGCACCTCTCTCACAGTCTCTCA									
N Y S L D F W G Q G T S L T V S S									
mV _H CDR 3.8									

图2E

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GACATTGTGATGACGAGGCTGCATCCTCTAATCCAGTCACCTTGGAAACATCCGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCGACATATAAAG									
D I V M T Q A A S S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L R H T K									
mV _L CDR 1.8									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GCATCACTTTTTTGTATTGGTATCTGCAGAGCCAGCCAGTCTCTCAGTCTCCTGATTTATCAGATGTCCAACTTGCCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTT									
G I T F L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F									
mV _L CDR 1.8									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTAGCAGTGGGTCAGGAAC TGATTTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAAC TTCCG									
S S S G S G T D F T L R I S R V E A E D L G V Y Y C A Q N L E L P									
mV _L CDR 3.8									
310	320	330							
CTCACGTTGCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA									
L T F G A G T K L E L K									
mV _L CDR 3.8									

图2F

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAATTTTCAGTAGCTATGGCA									
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F I F S S Y G									
mV _H CDR 1.13									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TGCTTTGGTTCCCGAGTCTCCAGACAGGAGGCTGGAGTTGGTGCAGATTAAATACTTTTGGTGATAGAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCG									
M S W V R Q S P D R R L E L V A S I N T F G D R T Y Y P D S V K G R									
mV _H CDR 2.13									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACTCTGCAATGACCACTGTGAAGTCTGAGGACACAGCCATTTATTACTGTGCAAGAGGGACC									
F T I S R D N A K N T L Y L Q M T S L K S E D T A I Y Y C A R G T									
mV _H CDR 3.13									
310	320	330	340						
GGAACCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAGAGTCTCTCA									
G T Y W G Q G T T L T V S S									
mV _H CDR 3.13									

图 2G

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGCTGACCCAGACTCCACTTTCCTGCGTTAACATTGGACAAACCAGCCTCCATCTCCTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATG									
D V V L T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D									
mV _L CDR 1.13									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAAGACATATTGATTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAAGCCCTAATCTATCTGGTGTCTAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTT									
G K T Y L N W L L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F									
mV _L CDR 1.13									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCT									
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P									
mV _L CDR 3.13									
310	320	330							
CAGACGTTGCGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA									
Q T F G G G T K L E I K									
mV _L CDR 3.13									

图2H

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CAGGTCCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTATA									
Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y Y									
mV _H CDR 1.16									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TGTACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAAGGCCCTTGAGTGGGATTTGGAGAGATTAAATCCTAGCAATGGTGGTACTTAATCAATGAGAAGTTCAAGAGCAA									
M Y W V K Q Q R P G Q G L E W I G E I N P S N G G T N F N E K F K S K									
mV _H CDR 2.16									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCATAACATGCAACTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAGAGGCGGT									
A T L T V D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C T R G G									
mV _H CDR 3.16									
310	320	330	340	350					
TACTACCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGCACCACCTCTCACAGTCTCTCA									
Y Y P F D Y W G Q G T T L T V S S									
mV _H CDR 3.16									

图2I

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGTGATGACCCAGACTCCCACTCACTTGTGCGTTACCATTTGGGGCCCGCCAGCCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCCTCTTAGACAGTGATG									
D V V M T Q T P L T L S V T I G R P A S I S C K S S Q S L L D S D									
mV _L CDR 1.16									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAAGACATATTTGTATTTGGTTGTACAGAGGCGCAGGCGCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTGAGCTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGAT									
G K T Y L Y W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S E L D S G V P D R I									
mV _L CDR 1.16									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CACTGGCAGTGGGTCGGGACAGATTTCACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGAACACATTTCTCCG									
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H S P									
mV _L CDR 2.16									
310	320	330	mV _L CDR 3.16						
TACAGGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA									
Y T F G G G T K L E I K									
mV _L CDR 3.16									

图2J

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTGAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCAGATGCACATGCACCTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATG									
D V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C T V T G Y S I T S D Y									
mV _H CDR 1.19									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
CCTGGAATTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAACAACTGGAGTGGGCTACATAAAGCTTCAGTGGTTACACTAGTTACACCCATCTCTCAAAAGTCG									
A W N W I R Q F P G N K L E W M G Y I S F S G Y T S Y N P S L K S R									
mV _H CDR 2.19									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AATCTGTCACTCGGGACACATCCAGGACCAATTCTTCCTCCAGTTGACTTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTAATTACTGTGTCAAGAGGTC									
I S V T R D T S R N Q F F L Q L T S V T T E D T A T Y Y C A R E V									
mV _H CDR 3.19									
310	320	330	340	350	360				
AACATATGGGACTCCTACCACTTTTGACTACTGGGGCCCAAGGCACCAATTGTCAAGTCTCTCTCA									
N Y G D S Y H F D Y W G Q G T I V T V S S									
mV _H CDR 3.19									

图2K

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CAACTTGGGCTCACTCAGTCATCTTCAGCCTCTTTCTCCCTGGGAGCCTCAGCAAACTAACGTGCACITTTGAGTAGTCAACACAGAACGTACACCATTG									
Q L A L T Q S S A S F S L G A S A K L T C T L S S Q H R T Y T I									
mV _L CDR 1.19									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AATGGTATCAGCAACAGTCACCTCAAGCCTCCCTAAAGTATGTGATGGAGGTTAAGAAAGATGGAAGCCACAGCACAGGTCTGATGGGATTCCTGATCGCTTCTC									
E W Y Q Q Q S L K P P K Y V M E V K K D G S H S T G H G I P D R F S									
mV _L CDR 2.19									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
TGGATCCAGTTCTGGTGCTGATCGCTACCTCAGCAITTCCTCAACATCCAGCCTGAAGATGAAGCAATATACATCTGTGGTGTGGGTGATGCAATTAAGGGA									
G S S S G A D R Y L S I S N I Q P E D E A I Y I C G V G D A I K G									
mV _L CDR 3.19									
310	320	330	340						
CAATCTGTGTTTGTTCGGGGTGGCACCAGGTCACCTGTCCTA									
Q S V F V F G G G T K V T V L									
mV _L CDR 3.19									

图2L

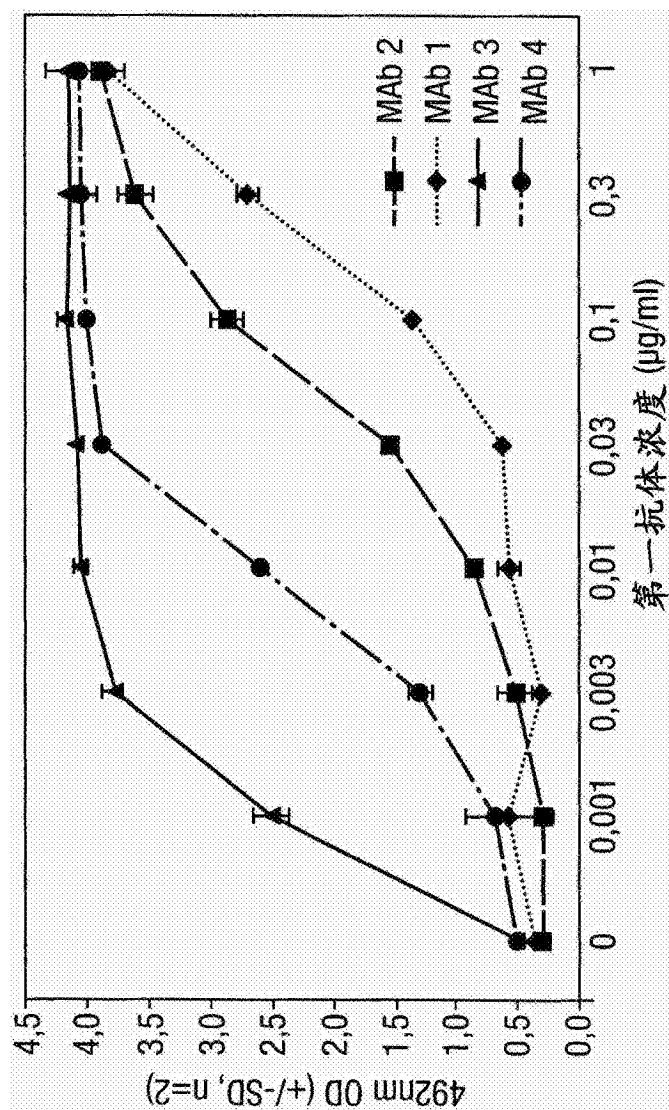


图3A

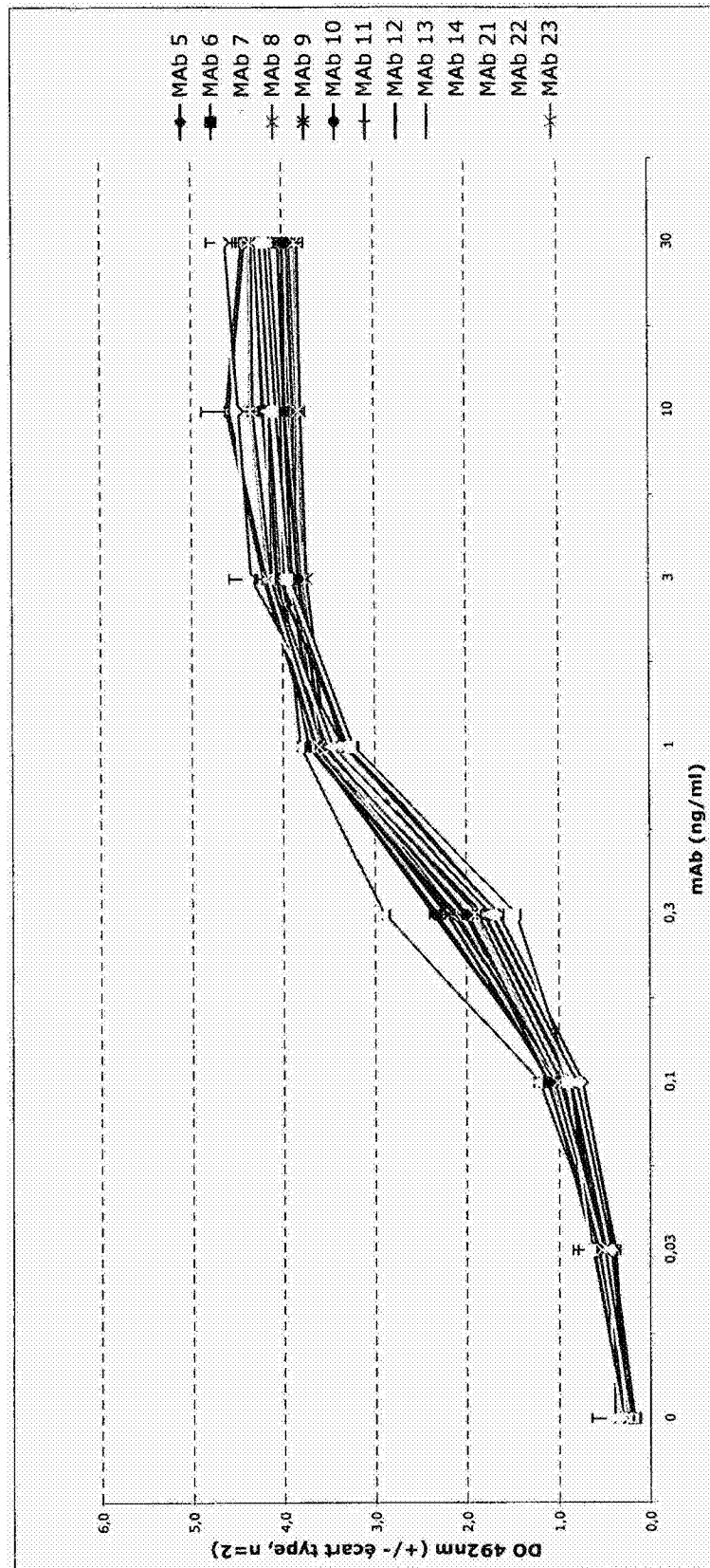


图3B

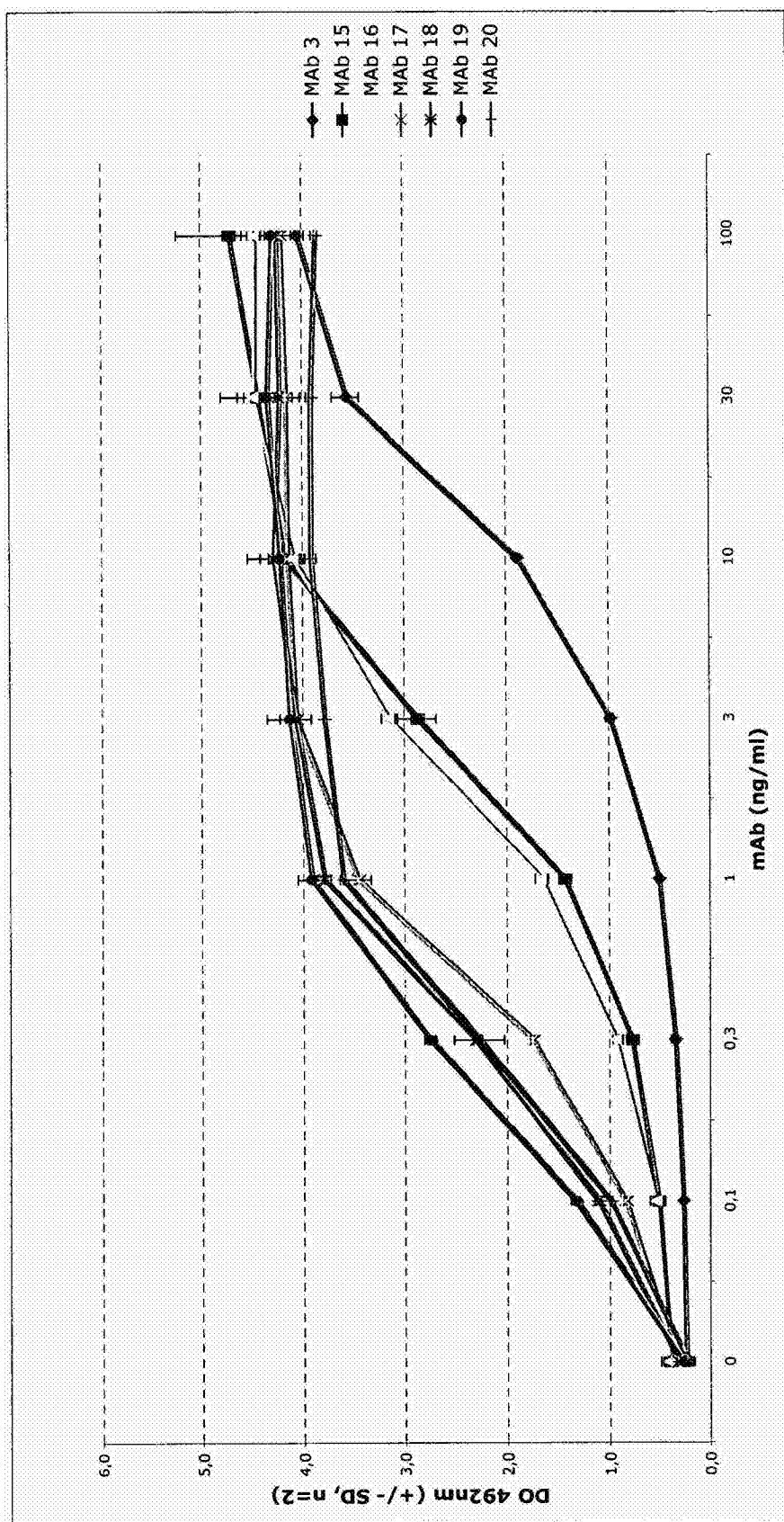


图3C

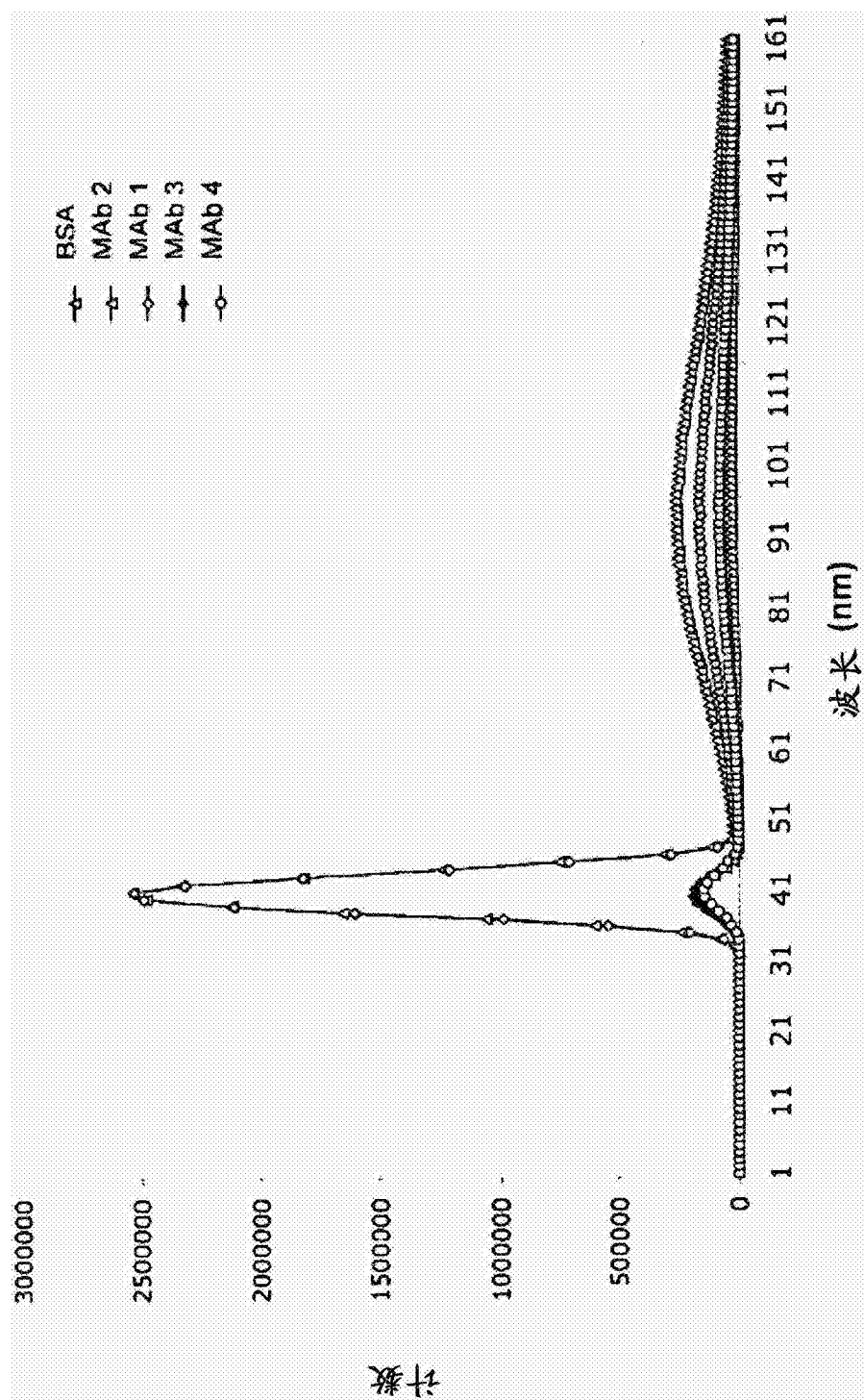


图4

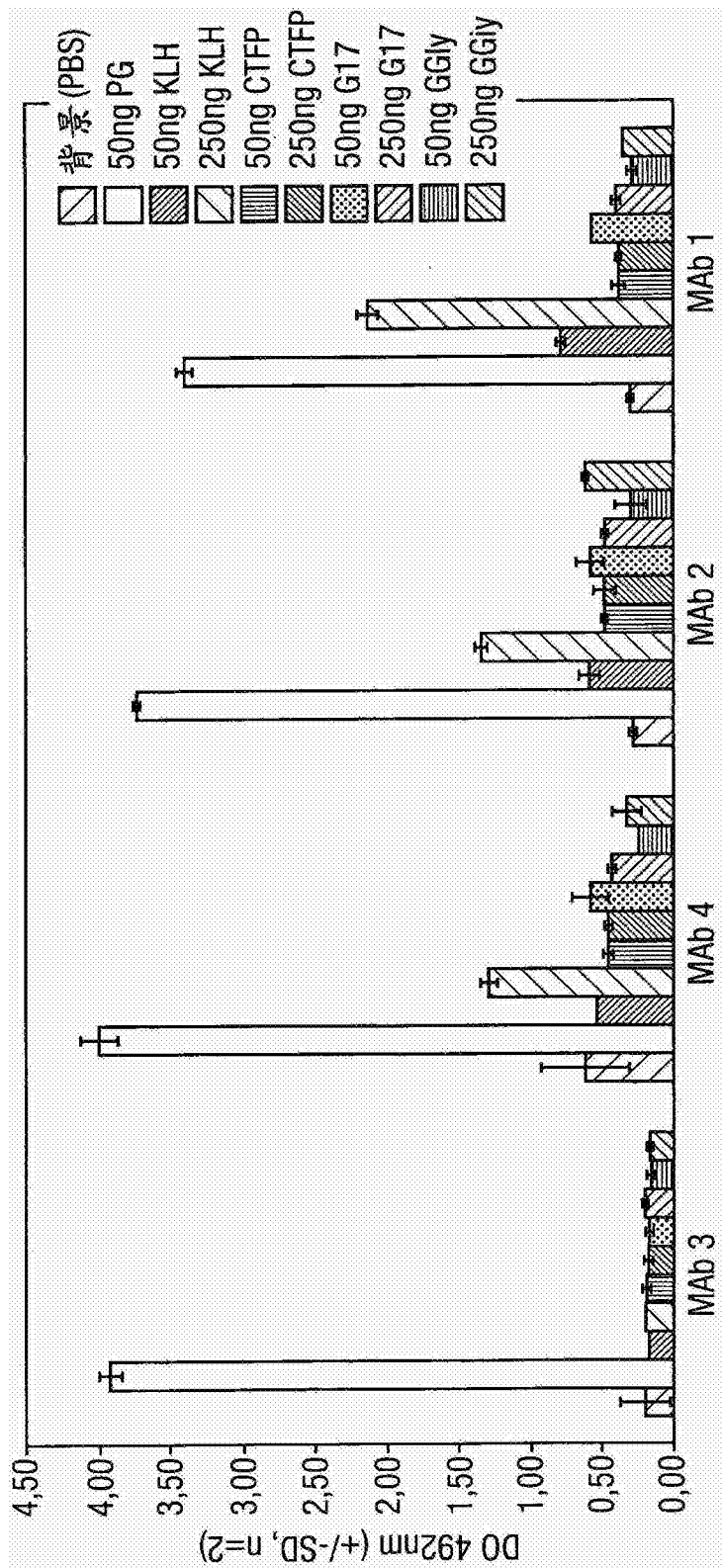


图5A

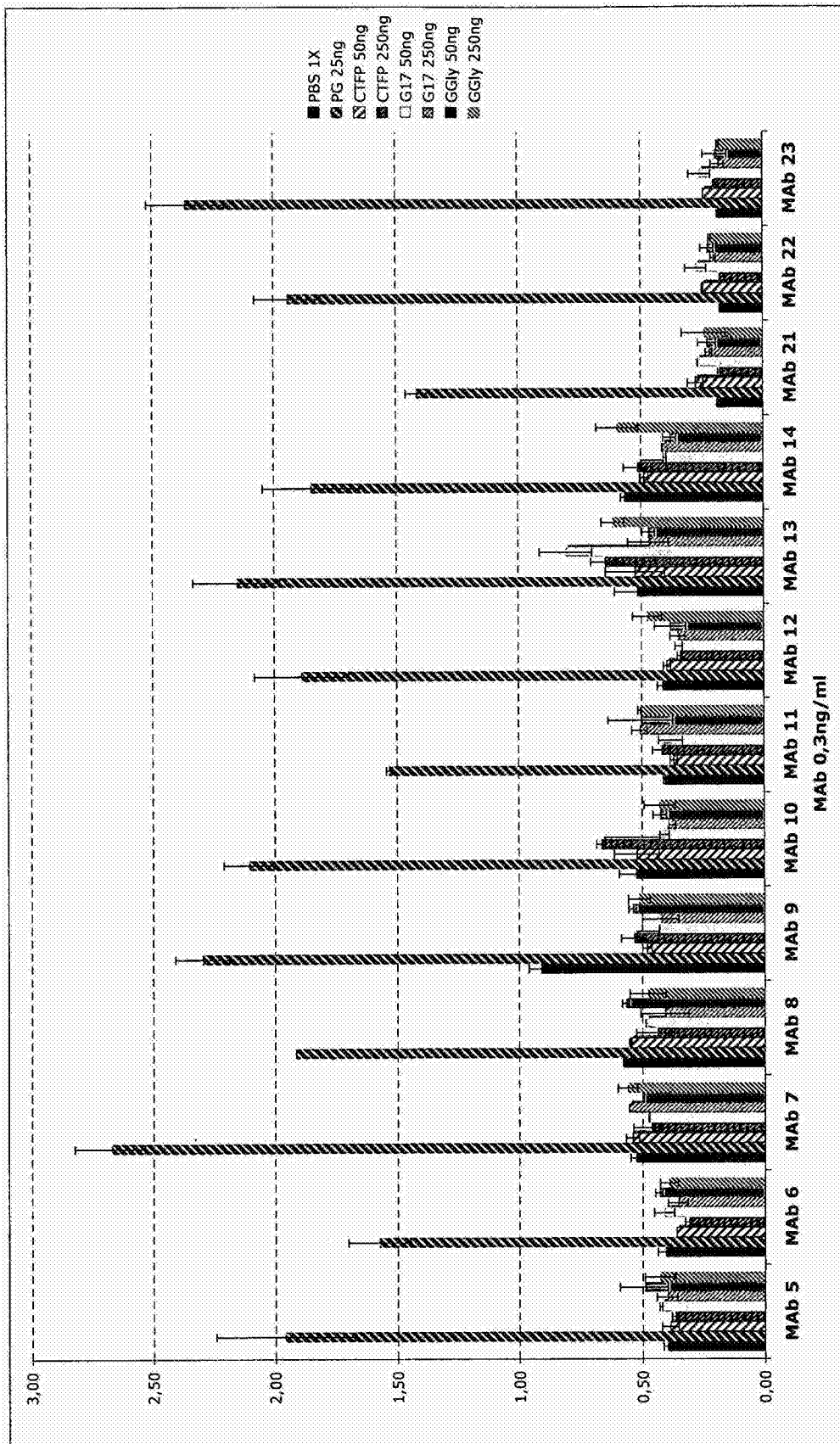


图5B

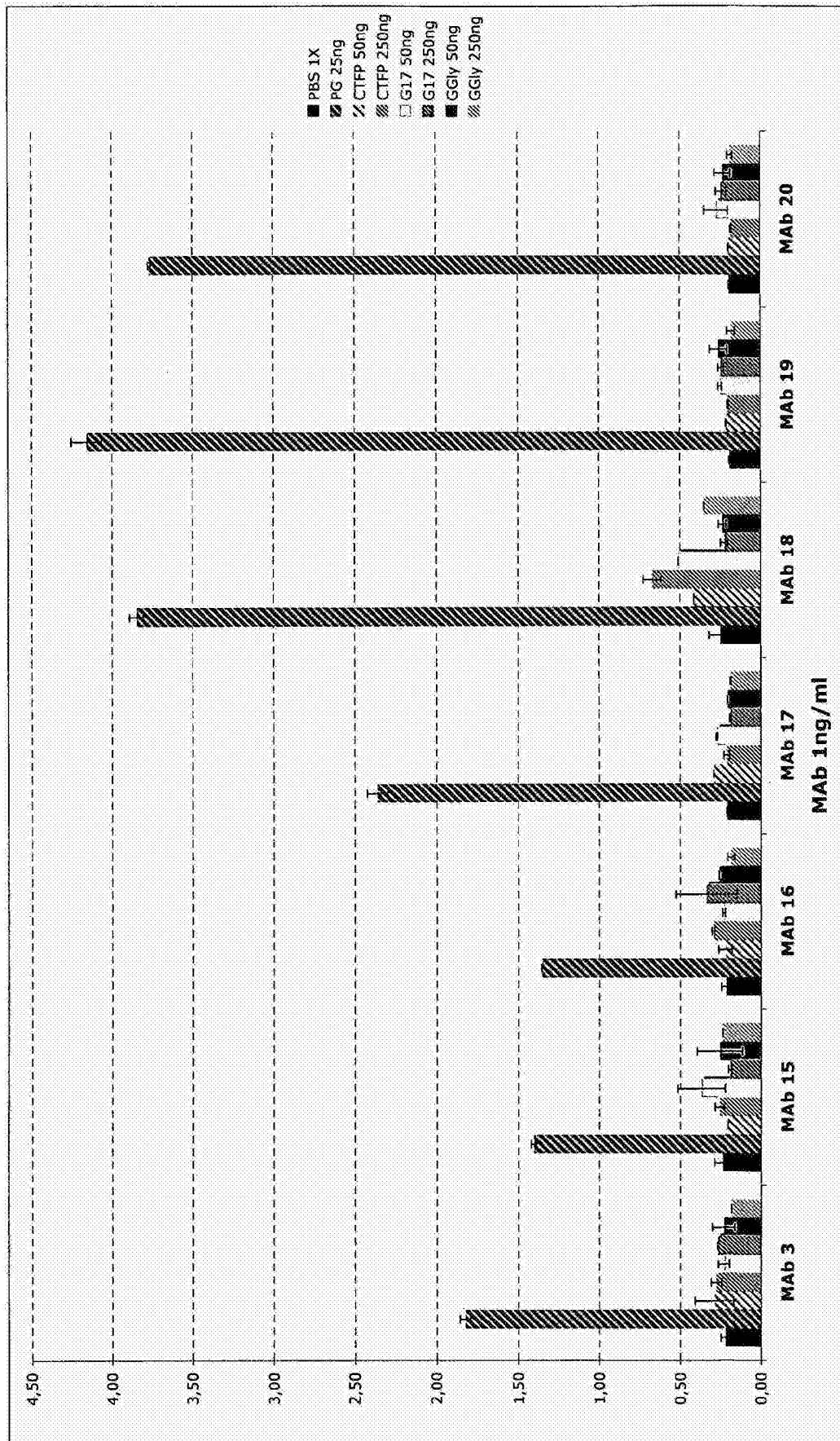


图5C

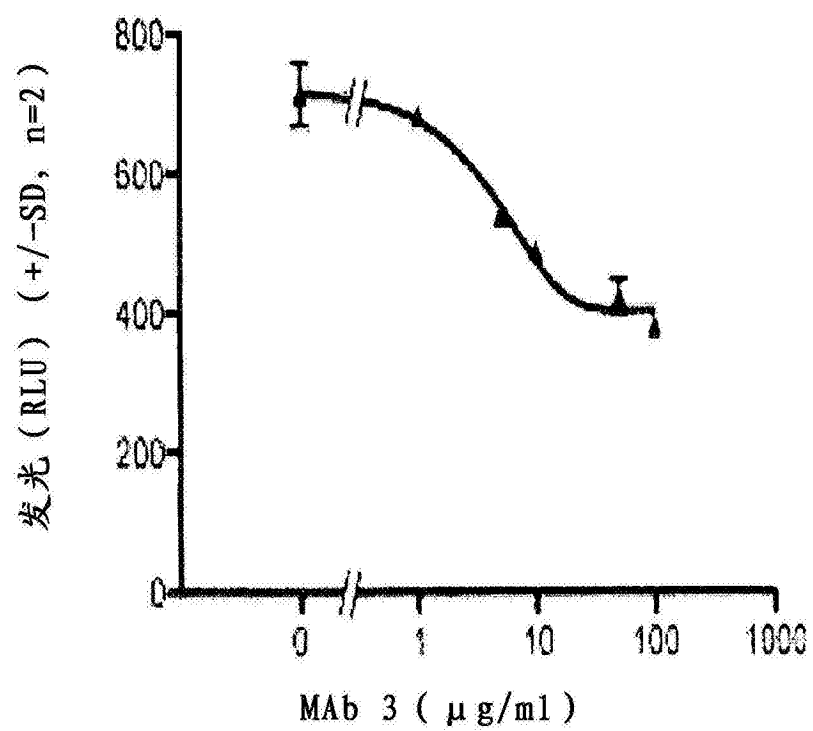


图6

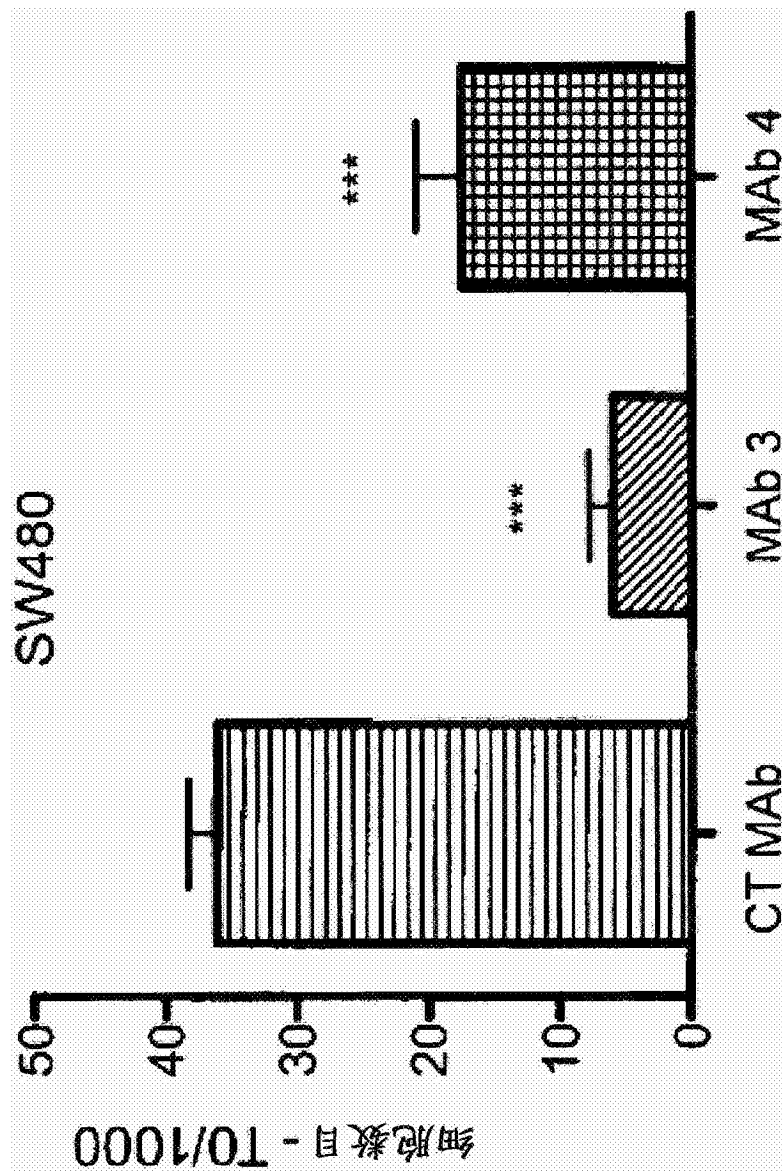


图7A

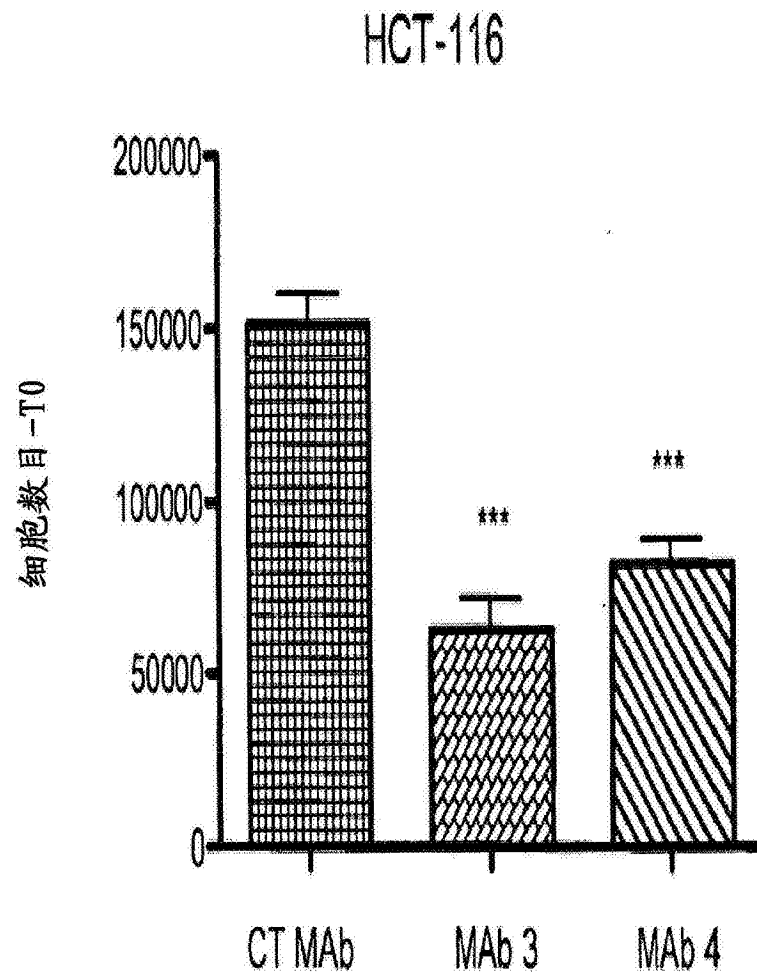


图7B

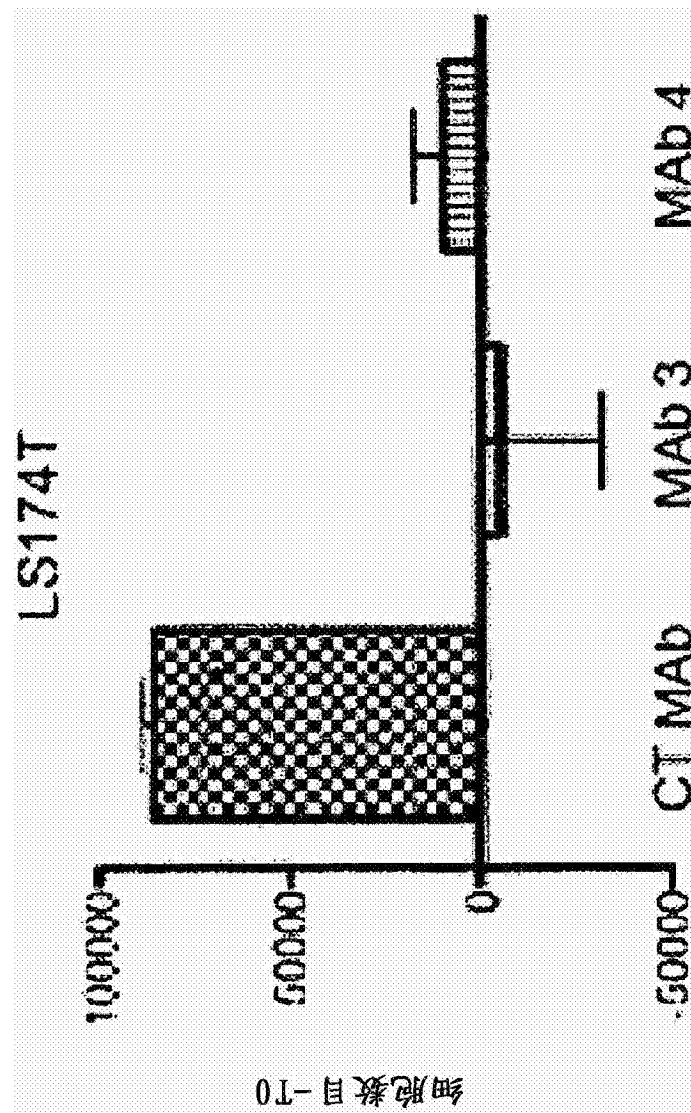


图7C

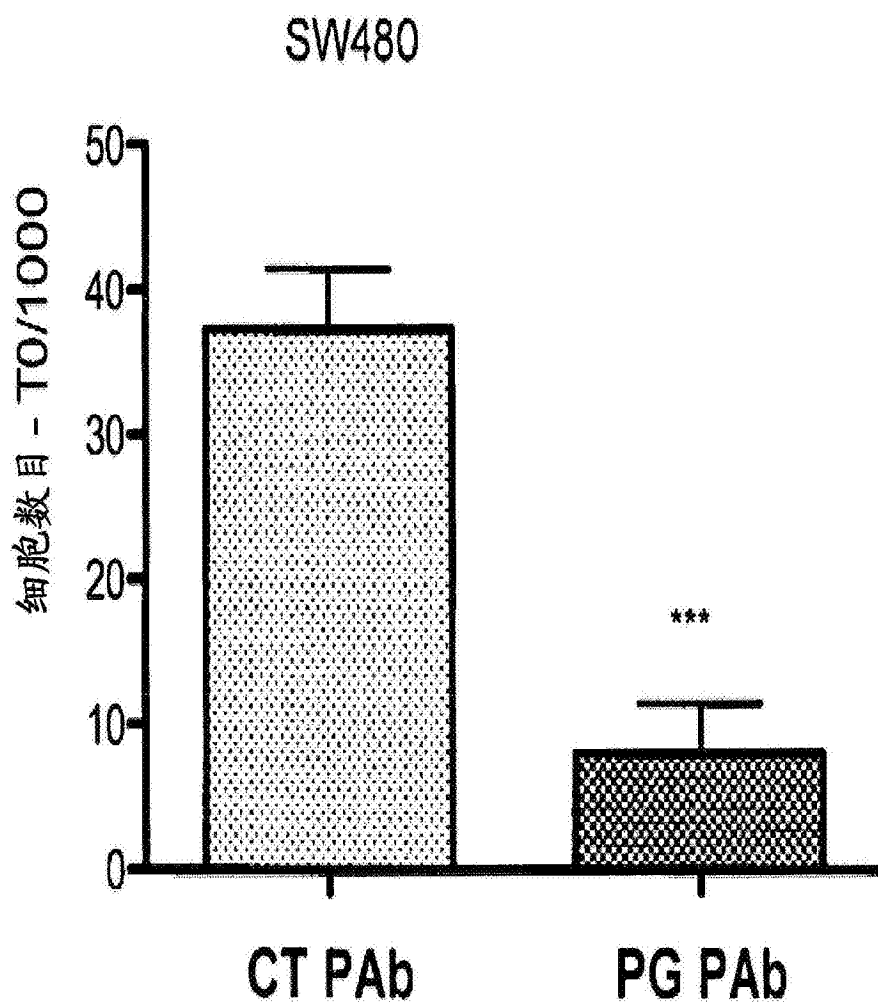


图7D

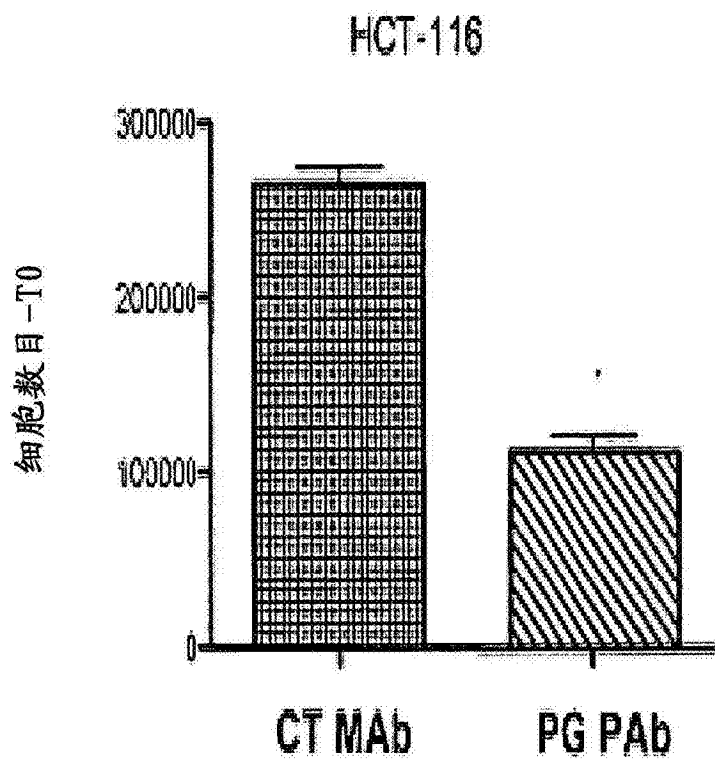


图7E

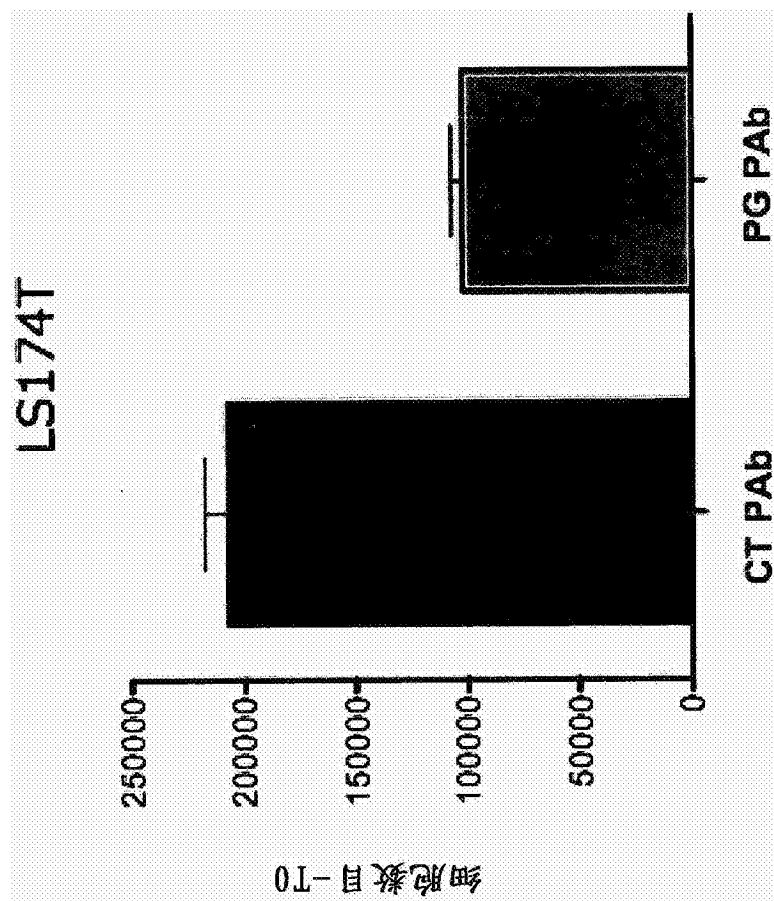


图7F

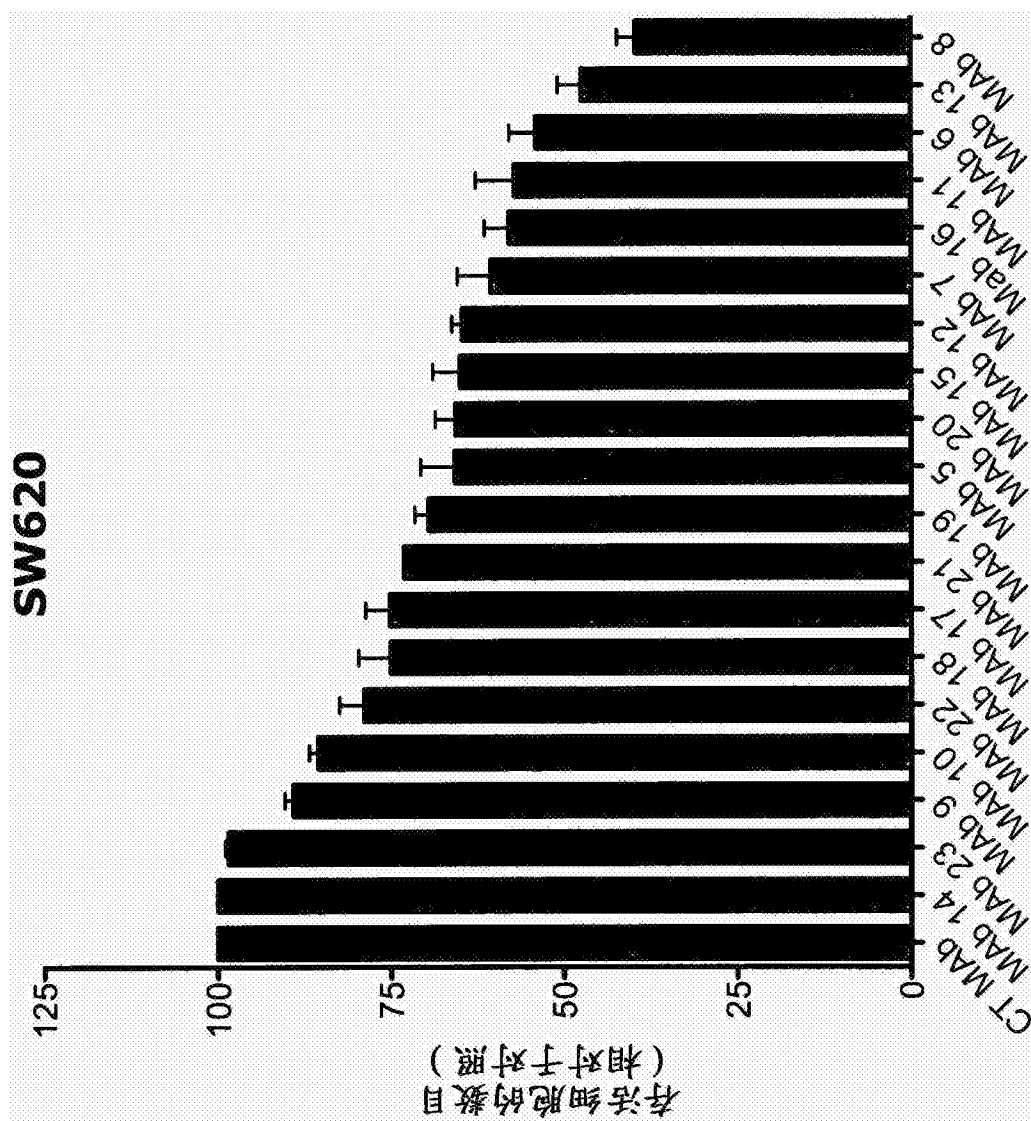


图7G

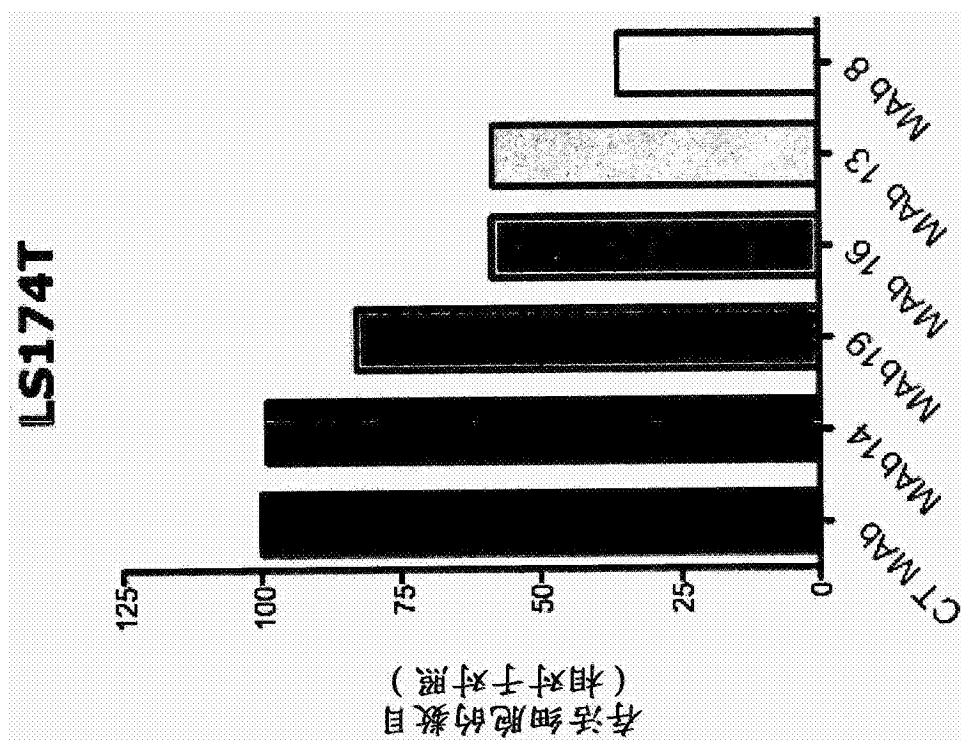


图7H

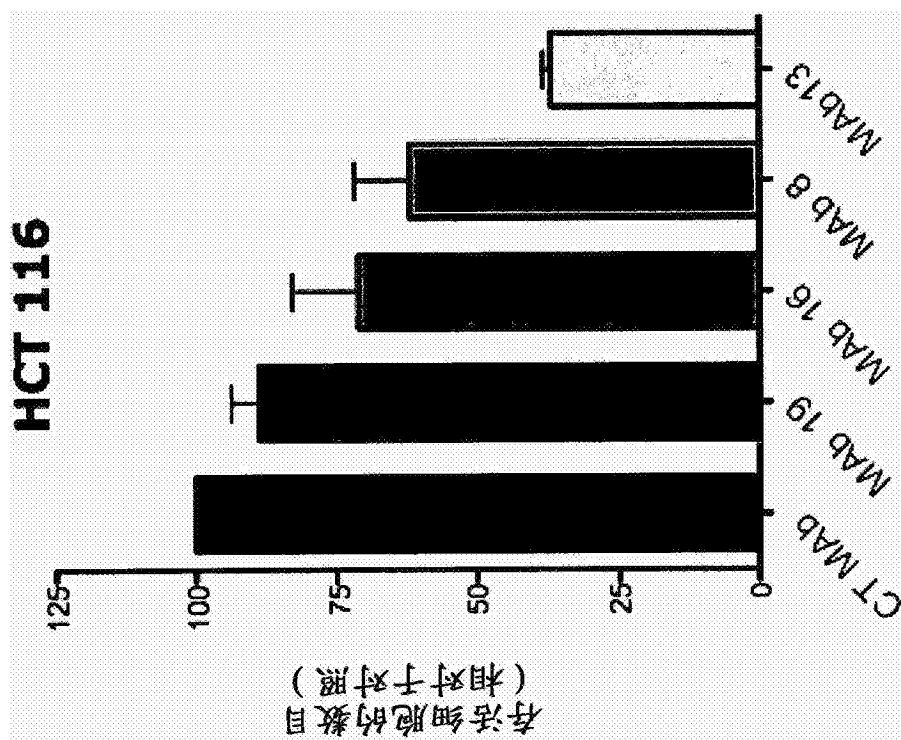


图7I

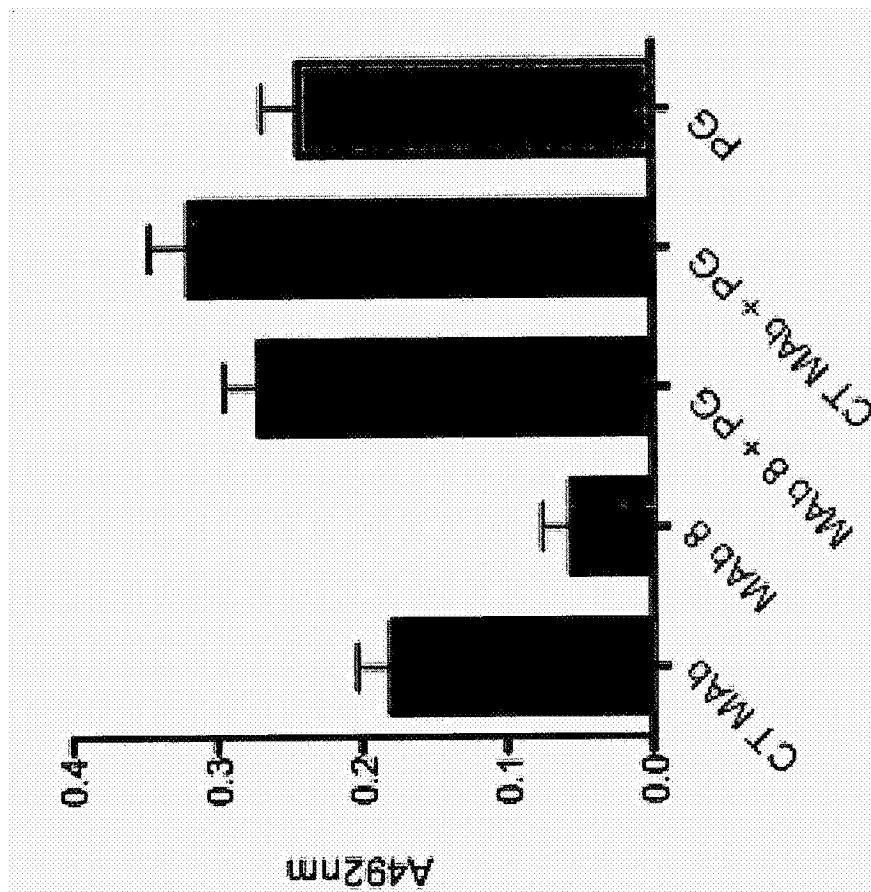


图8

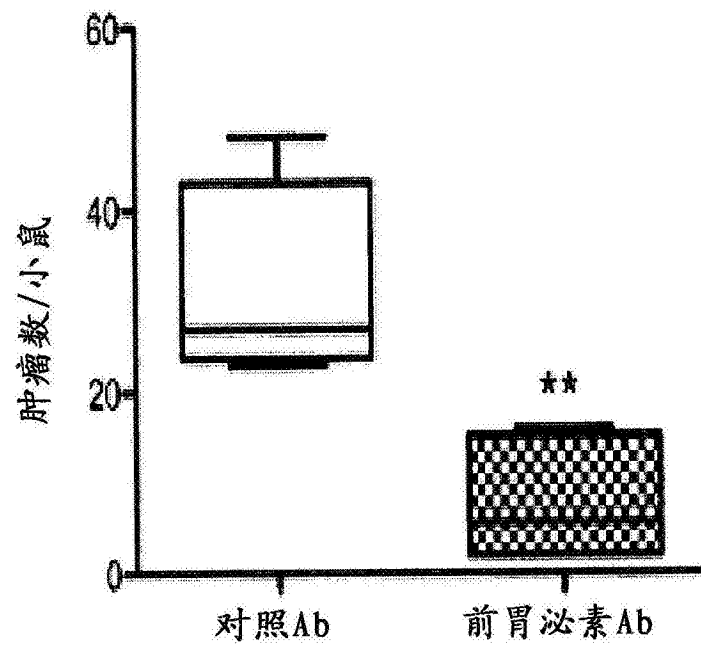


图9A

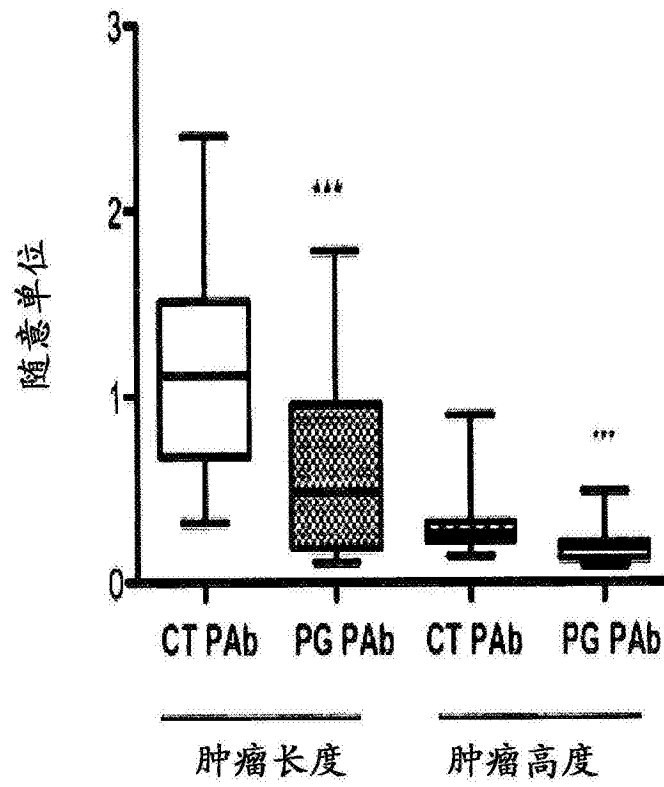


图9B