



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.20

(21) Номер заявки
201201324

(22) Дата подачи заявки
2011.03.23

(51) Int. Cl. **C07K 16/26** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) ПРОФИЛАКТИКА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО И ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО РАКА

(31) 61/317,245

(32) 2010.03.24

(33) US

(43) 2013.08.30

(86) PCT/EP2011/001448

(87) WO 2011/116954 2011.09.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЛЕ ЛАБОРАТУАР СЕРВЬЕ;
ИНСТИТЮ НАСЪОНАЛЬ ДЕ
ЛЯ СЕНТ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ (ИНСЕРМ); САНТР
НАСЪОНАЛЬ ДЕ ЛЯ ССЕНТ Э ДЕ
ЛЯ РЕШЕРШ СЪЕНТИФИК (СНРС)
(FR)**

(72) Изобретатель:
**Уу Лейла, Жубер Доминик (FR),
Олланд Фредерик (AU), Петремани
Матью (FR)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)**

(56) WO-A2-2007135542
SINGH POMILA ET AL.: "Development of progastrin (PG) specific monoclonal antibodies (MAbs) and PG specific vaccine for attenuating growth factor effects of autocrine and endocrine PG-like peptides on colon cancer cells and colon carcinogenesis, respectively", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN

ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 48, 18 April 2007 (2007-04-18), page 845, XP009146815, ISSN: 0197-016X, the whole document

SMITH A. M. ET AL.: "Gastrin and gastrin receptor activation: an early event in the adenoma-carcinoma sequence.", GUT DEC 2000 LNKD-PUBMED:11076881, vol. 47, no. 6, December 2000 (2000-12), pages 820-824, XP002638890, ISSN: 0017-5749, abstract; table 1

WO-A1-2008076454

SIDDHESHWAR R. K. ET AL.: "Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma", GUT, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, UK, vol. 48, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 47-52, XP002398546, ISSN: 0017-5749, DOI: DOI:10.1136/GUT.48.1.47, cited in the application, the whole document

SINGH P. ET AL.: "PROGASTRIN EXPRESSION PREDISPOSES MICE TO COLON CARCINOMAS AND ADENOMAS IN RESPONSE TO A CHEMICAL CARCINOGEN", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 119, no. 1, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 162-171, XP001053110, ISSN: 0016-5085, DOI: DOI:10.1053/GAST.2000.8527, abstract

SINGH POMILA ET AL.: "Mice overexpressing progastrin are predisposed for developing aberrant colonic crypt foci in response to AOM", 20000301, vol. 278, no. 3 part 1, 1 March 2000 (2000-03-01), pages G390-G399, XP002188103, abstract

WO-A2-2011045080

(57) Изобретение обеспечивает способы и композиции, полезные для предотвращения желудочно-кишечного и/или колоректального рака у животных, включая людей, имеющих предраковые аденоматозные полипы. Настоящее изобретение обеспечивает композиции, включающие анти-PG антитела, приемлемые для применения в способах в соответствии с изобретением. Настоящее изобретение также обеспечивает способы и композиции, полезные для мониторинга эффективности анти-PG лечения у субъектов с предраковыми полипами.

1. Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) временной заявки под номером 61/317245, поданной 24 марта 2010 года, полное содержание которой является введенным в данную заявку в качестве ссылки в своей целостности.

2. Ссылка на список последовательностей, таблицу или компьютерную программу

Список последовательностей представляется одновременно с данной заявкой.

3. Область, к которой относится изобретение

Настоящая заявка является направленной, среди прочего, на способы предотвращения колоректального и/или желудочно-кишечного рака у субъектов, предрасположенных к развитию аденоматозных полипов, путем введения субъекту композиции, включающей антитело, специфическое для прогастрина.

4. Предпосылки создания изобретения

Рак желудочно-кишечного тракта, включая колоректальный рак ("CRC"), поражает сотни тысяч индивидуумов каждый год, и десятки тысяч смертей, связанных с CRC, имеют место только в Соединенных Штатах. См. Rustgi, 2010, "The genetics of hereditary colon cancer," *Genes & Development* 21: 2525-2538. CRC может возникать различными путями, один из которых представляет собой трансформацию аденоматозных полипов в злокачественные опухоли. Аденоматозный полипоз может быть наследственным, как в случае для индивидуумов с семейным аденоматозным полипозом ("FAP"), или он может быть спорадическим. Индивидуумы с FAP или спорадическим аденоматозным полипозом несут мутации Adenomatous Poliposis Coli ("APC") гена супрессора опухолевого роста, которые ассоциируются с образованием аденоматозных полипов в тонком кишечнике, толстом кишечнике и/или прямой кишке. Эти полипы, в свою очередь, могут развиваться в колоректальный или желудочно-кишечный рак. В случае спорадического аденоматозного полипоза ненаследственного состояния, которое лежит в основе многих случаев CRC, APC ген мутирует в соматических клетках. Индивидуумы со спорадическим аденоматозным полипозом развивают доброкачественные полипы, подмножество которых может последовательно трансформироваться в злокачественные карциномы.

FAP насчитывает приблизительно 1% от общего количества случаев CRC и поражает одного из 13000 рожденных. Мутация гена APC у FAP пациентов ассоциируется с образованием от сотен до тысяч небольших аденоматозных полипов в толстом кишечнике. Развитие полипов до доброкачественных опухолей является фактически неизбежным. В среднем, при отсутствии профилактического лечения индивидуумы с FAP развивают CRC к 39 годам. Профилактическое лечение представляет собой стандартное ведение пациента и вовлекает радикальную хирургию, включая удаление толстой кишки, или как толстой, так и прямой кишки, в общем случае до достижения возраста 25 лет. В то время как профилактика является предпочтительной по отношению к отсутствию лечения, хирургическое удаление толстого кишечника (колэктомия) у молодых пациентов вызывает тяжелое нарушение качества жизни. Кроме того, хирургическое удаление само по себе может быть недостаточным для того, чтобы пациенты не имели рака: пациенты, которые подверглись колэктомии, имеют высокий риск развития полипов и рака в верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Существует серьезная потребность в эффективных способах лечения, особенно нехирургических способах лечения, которые позволяют свободную от рака жизнь индивидуумов с FAP и индивидуумов с аденоматозным полипозом.

5. Краткое изложение сущности изобретения

Настоящая заявка обеспечивает способы и композиции, полезные для предотвращения желудочно-кишечного рака, включая CRC, у животных, включая людей, предрасположенных к развитию аденоматозных полипов. Как описывается ниже, настоящая заявка представляет режимы лечения, которые, как предполагается, связывают прогастрин ("PG"), с очевидной способностью нейтрализовать биологическую активность PG, которые являются полезными у субъектов, имеющих повышенную вероятность развития, но еще не имеют развившегося CRC или рака в верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Различные изобретения, описанные в заявке, частично основываются на открытии заявителя того, что анти-PG антитела предотвращают развитие желудочно-кишечных опухолей в мышинной модели FAP. Не имея намерения связываться с какой-либо теорией операции, можно сказать, что связывание PG и его взаимодействие с другими белками в организме, как предполагается, предотвращает развитие аденоматозных полипов в злокачественные опухоли.

В соответствии с этим в одном аспекте настоящая заявка обеспечивает способы предотвращения желудочно-кишечного рака, включая CRC, у субъектов, предрасположенных к развитию аденоматозных полипов, путем введения композиции, включающей анти-PG антитело. В общем случае, способы включают введение субъекту, который в этом нуждается, эффективного количества анти-PG антитела. Анти-PG антитела и их композиции, могут вводиться в соответствии с режимами, известными в области техники для терапии на основе антител, при эффективной дозировке, то есть, в количестве, эффективном для предотвращения или отсрочки желудочно-кишечного рака, включая CRC, у субъекта.

Приемлемые субъекты для профилактического анти-PG лечения являются такими, которые предрасположены к развитию аденоматозных полипов, включая субъектов с семейной историей CRC, индивидуумов с FAP, и тех, у которых аденоматозные полипы были ранее обнаружены и/или удалены. Типично, приемлемые субъекты имеют одну или более мутаций в APC гене, что приводит к FAP или спо-

радикальному аденоматозному полипозу. Приемлемые субъекты также включают индивидуумов, которые ранее подверглись колэктомии и имеют повышенный риск развития полипов и рака в верхних отделах желудочно-кишечного тракта.

Анти-PG антитела в соответствии с настоящей заявкой включают антитела, способные к связыванию PG. Любое антитело, способное к связыванию PG, может использоваться в способах настоящей заявки, включая, но без ограничения таковыми, поликлональные и моноклональные анти-PG антитела. Предпочтительно, анти-PG антитело является специфическим для PG видов, которые подвергаются лечению. Например, человеческое анти-PG (анти-hPG) антитело вводится человеческому субъекту. Приемлемые анти-PG антитела могут колебаться в зависимости от связывающей аффинности от, по крайней мере, приблизительно 5000 нМ до, по крайней мере, приблизительно 0,001 нМ, или выше, или имеют любое значение в этом интервале.

Анти-PG антитела, описанные в данной заявке, могут использоваться в комбинации с, или дополнительно к, другим способом лечения для предотвращения или отсрочки желудочно-кишечного рака, включая CRC. Неограничивающие примеры других способов лечения включают хирургическое удаление, химиотерапию, терапию на основе антител, лучевую терапию и лечение при использовании второго агента так, как описано в данной заявке. Анти-PG антитела могут вводиться совместно с, или перед или после, другого способа лечения.

Композиции, приемлемые для применения в способах настоящей заявки, могут включать, в дополнение к анти-PG антителу, фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель и/или разбавитель. Композиции могут быть рецептированы для различных способов введения, как описывается в данной заявке, при этом они включают носители, наполнители и/или разбавители, приемлемые для выбранного способа. Для лечения животных и человека композиции, включающие анти-PG антитела, могут вводиться при использовании любого приемлемого способа введения, такого, как инъекция или другие пути введения, известные в области техники для клинических продуктов на основе антител. Для целей лечения композиции могут быть упакованы в виде единичных доз для легкости их применения.

Как показано в данной заявке, пациенты с множественными аденоматозными полипами имеют повышенные уровни PG в сыворотке, в то время как пациенты, у которых были удалены полипы, имеют низкие или неопределяемые уровни PG в сыворотке крови. Это открытие обеспечивает новые мощные орудия диагностики и мониторинга течения sporadического или семейного аденоматозного полипоза и его лечения.

В соответствии с этим, в другом аспекте настоящая заявка обеспечивает способы мониторинга эффективности анти-PG лечения у индивидуума, предрасположенного к развитию аденоматозных полипов. В общем случае, способы включают измерение концентрации или уровня PG в образце крови (сыворотке, плазме или цельной крови) от индивидуума, который получает анти-PG терапию, во время или после курса анти-PG терапии, и сравнение измеренного уровня PG с базовым уровнем PG (например, с уровнем PG у индивидуума в начале лечения), где измеренный уровень PG, который является ниже базового уровня, является показательным для эффективности лечения, а измеренный уровень PG, выше такового базовой линии, является показательным для отсутствия эффективности. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает оценку количества и размеров полипов у субъекта, например, с помощью эндоскопии.

Еще в одном аспекте настоящая заявка обеспечивает способы отбора индивидуумов, которым показана эндоскопия или анти-PG лечение. Способы являются предназначенными для осуществления у индивидуумов, предрасположенных к развитию аденоматозных полипов. В общем случае, способ осуществляют путем измерения уровня PG в образце крови от индивидуума, и сравнения измеренного уровня PG с базовым уровнем, где измеренный уровень PG, который является более высоким, чем базовый уровень, свидетельствует о необходимости эндоскопии. В некоторых воплощениях уровень PG, который является выше базового уровня, свидетельствует о необходимости анти-PG лечения. Базовая линия может быть получена из одного или более образцов от индивидуума в более ранней точке времени или может основываться на уровнях PG, измеренных в популяции, имеющей характеристики, подобные таковым для индивидуума.

6. Краткое описание фигур

Фиг. 1 обеспечивает аминокислотные последовательности человеческого препрогастрина (SEQ ID NO: 100), где последовательность сигнального пептида подчеркнута, зрелого человеческого прогастрина (SEQ ID NO: 20) и некоторых продуктов процессинга прогастрина, включая G34 (SEQ ID NO: 102), G34-Gly (SEQ ID NO: 103), G17 (SEQ ID NO: 104), G17-Gly (SEQ ID NO: 105) и CTFP (SEQ ID NO: 106).

Фиг. 2 обеспечивает полинуклеотидные и аминокислотные последовательности переменных легких и переменных тяжелых цепей некоторых типичных мышинных анти-hPG моноклональных антител. В каждом случае три CDR показаны в виде текста, выделенного жирным шрифтом с подчеркиванием. В частности:

Фиг. 2A обеспечивает полипептидную последовательность V_H цепи мышинного анти-hPG MAb3 (SEQ ID NO: 12) и полинуклеотидную последовательность, кодирующую ее (SEQ ID NO: 16);

Фиг. 2B обеспечивает полипептидную последовательность V_L цепи мышинного анти-hPG MAb3

рованного MAb16(c) (SEQ ID NO: 88);

Фиг. 3Т обеспечивает спрогнозированную аминокислотную последовательность V_L цепи гуманизованного MAb16(c) (SEQ ID NO: 89);

Фиг. 3U обеспечивает спрогнозированную аминокислотную последовательность V_H цепи гуманизованного MAb19(a) (SEQ ID NO: 90);

Фиг. 3V обеспечивает спрогнозированную аминокислотную последовательность V_L цепи гуманизованного MAb19(a) (SEQ ID NO: 91);

Фиг. 3W обеспечивает спрогнозированную аминокислотную последовательность V_H цепи гуманизованного MAb19(b) (SEQ ID NO: 92);

Фиг. 3X обеспечивает спрогнозированную аминокислотную последовательность V_L цепи гуманизованного MAb19(b) (SEQ ID NO: 93);

Фиг. 3Y обеспечивает спрогнозированную аминокислотную последовательность V_H цепи гуманизованного MAb19(c) (SEQ ID NO: 94); and

Фиг. 3Z обеспечивает спрогнозированную аминокислотную последовательность V_L цепи гуманизованного MAb19(c) (SEQ ID NO: 95).

7. Подробное описание

7.1 Рак при семейном и спорадическом аденоматозном полипозе

Семейный аденоматозный полипоз (FAP) представляет собой редкое наследственное состояние, которое ассоциируется с зародышевой мутацией в одном аллеле гена APC. Многочисленные мутации APC гена были картированы у субъектов с FAP, при этом много мутаций приводят к образованию укороченного белка. См., например, Rustgi, 2010, "The genetics of hereditary colon cancer," *Genes & Development* 21: 2525-2538; Groves и др., 2002, "Duodenal cancer in patients with familial adenomatous polyposis (FAP): results of a 10 year prospective study," *Gut* 50: 636-641. Эти мутации в APC ассоциируются с FAP варьирующей тяжести.

FAP характеризуется появлением множества аденом (полипов) в тонком и толстом кишечнике пораженных болезнью индивидуумов в очень раннем возрасте. Подмножество этих полипов трансформируется в колоректальный рак (CRC), при этом имеющие происхождение от FAP случаи CRC составляют приблизительно 1% от общего количества случаев CRC. Там, где существует семейная история CRC, индивидуумы типично подвергаются генетическому исследованию в очень раннем возрасте для определения присутствия мутации в гене APC. Классическая система мероприятий, осуществляемых у индивидуумов, у которых обнаружена такая мутация, начинается с колоноскопии, удаления полипов, если обнаружены полипы, и если полипы являются весьма многочисленными для удаления эндоскопически, частичное или полное удаление ободочной кишки (колэктомия). Большинство индивидуумов с FAP будут подвергаться удалению ободочной кишки в возрасте 25 лет.

Большой процент спорадических аденоматозных полипов также несет мутации в APC гене. См., Rutsge, 2010, "The genetics of hereditary colon cancer," *Genes & Development* 21: 2525-2538. При отсутствии семейной истории CRC индивидуумов, представляющих симптомы, такие, как ректальное кровотечение, типично проверяют с помощью колоноскопии. Индивидуумы, определенные как такие, которые имеют большое количество полипов, или те, у которых полипы повторно возникли после удаления, будут типично также тестироваться генетически. Если обнаружена мутация в гене APC, то колэктомия представляет собой рекомендованное лечение.

Даже после колэктомии индивидуумы, предрасположенные к развитию аденоматозных полипов, имеют повышенный риск развития аденоматозных полипов в неудаленной части их желудочно-кишечного тракта. Такие индивидуумы регулярно подвергаются эндоскопии и оцениваются на аденоматоз в верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Индивидуумы подвергаются оценке стадии в соответствии с классификацией Шпигельмана, которая основывается на четырех параметрах для оценки степени или тяжести аденоматоза: количество полипов, размер полипов, гистология полипов и степень дисплазии полипов (беспорядочный рост). Смотри, Spigelman и др., 1989, "Upper gastrointestinal cancer in patients with Familial Adenomatous Polyposis" *Lancet* 2: 783-785. Классификация Шпигельмана категоризирует индивидуумов в одну из пяти стадий для дуоденального полипоза, стадия от 0 до IV, на основе четырех параметров, как показано в табл. 1.

Таблица 1. Классификация Шпигельмана

Баллы	Количество полипов	Размер полипов (мм)	Гистология	Дисплазия
1	1-4	1-4	Тубулярные	Легкая
2	5-20	5-10	Тубулярно-ворсинчатые	Средняя
3	> 20	> 10	Ворсинчатые	Тяжелая

Стадия I: 1-4 балла; Стадия II: 5-6 баллов; Стадия III: 7-8 баллов; Стадия IV: 9-12 баллов.

Десятигодичное исследование 114 индивидуумов с FAP выявило, что пациенты на стадии IV по классификации Шпигельмана имеют 36,4% риск развития дуоденального рака, по сравнению с 0% - 2,4% риска для пациентов, классифицированных в стадиях 0-III. См., Groves и др., 2002, "Duodenal cancer in patients with familial adenomatous polyposis (FAP): results of a 10 year prospective study" Gut 50: 636-641.

Было ранее показано, что приблизительно 70% пациентов с CRC имеют повышенные уровни PG. Как показано в примерах, приведенных ниже, авторы обнаружили, что уровни PG в крови могут быть повышенными у индивидуумов с FAP, которые еще не развили CRC, а также приблизительно у 20% пациентов, которые демонстрируют спорадический аденоматозный полипоз. Не имея намерения связываться с какой-либо теорией операции, можно сказать, что PG, как предполагается, является частью механизма, с помощью которого полипы превращаются в злокачественные опухоли. Связывание PG анти-PG антителами, как предполагается, будет препятствовать такому превращению, как было продемонстрировано в мышинной модели FAP, APC Δ 14. Профилактическое лечение с помощью анти-PG антител представляет возможность избежать или отсрочить основное хирургическое вмешательство, значительно повышая качество жизни.

7.2 Способы профилактики

Настоящая заявка обеспечивает способы предотвращения желудочно-кишечного рака, включая CRC, у пациентов, предрасположенных к развитию аденоматозных полипов. В общем случае, способы включают введение таким пациентам определенного количества одного или более анти-PG антитела(антител), эффективных для обеспечения терапевтического преимущества. Анти-PG антитела, в общем случае, и специфические анти-PG антитела, полезные в способах, более подробно описываются в следующем разделе.

"Субъект" или "пациент" для профилактики предпочтительно представляет собой млекопитающего, такого как не-примат (например, корова, свинья, лошадь, кот, собака, крыса и т.д.) или примат (например, обезьяна, шимпанзе, человекообразная обезьяна или человек). Анти-PG антитело, которое вводится, должно быть специфическим для видов животных, которые подвергаются лечению. Для лечения человеческих субъектов анти-PG антитело(антитела) будет(ут) специфически связывать человеческий прогастрин (в данной заявке называется(ются) как "анти-hPG антитела", описанные более подробно ниже).

Субъект может представлять собой человека, такого, как взрослый пациент или педиатрический пациент. Приемлемые субъекты представляют собой индивидуумов, которые являются предрасположенными к развитию аденоматозных полипов, и, как результат, имеют повышенную вероятность развития CRC или желудочно-кишечного рака, включая индивидуумов с семейной историей CRC, индивидуумов, у которых определяются или были определены, или были удалены аденоматозные полипы, индивидуумов с FAP, индивидуумов, которые подверглись колэктомии для удаления полипов, и индивидуумов с мутацией(ями) в APC гене.

Лечение с помощью анти-PG может назначаться в комбинации с или в дополнение к одному или более других способов лечения для предотвращения или отсрочки желудочно-кишечного рака, включая CRC. Другие способы лечения включают, но без ограничения, химиотерапевтическое лечение, лучевую терапию, хирургическое удаление, терапию на основе антитела и лечения при использовании второго агента, как описано в данной заявке. Комбинационное лечение, как обеспечивается в данной заявке, вовлекает введение по крайней мере двух способов лечения пациенту, первое из которых представляет собой анти-PG лечение при использовании по крайней мере одного анти-PG антитела и второе из которых представляет собой лечение с помощью терапевтического или профилактического агента или процедуры.

Анти-PG лечение может сочетаться с хирургическими процедурами, такими как хирургическое удаление. Анти-PG антитела могут вводиться субъектам, которые обнаружены как таковые, которые имеют или являются предрасположенными к развитию предраковых полипов, таких как индивидуумы с семейным аденоматозным полипозом, в комбинации с хирургическим удалением поврежденной(ых) части(ей) желудочно-кишечного тракта. Анти-PG лечение может инициироваться перед, одновременно с, или после хирургического удаления.

Анти-PG лечение может также сочетаться с лучевой терапией. Лучевая терапия представляет собой применение излучения высоких энергий от рентгеновских лучей, гамма лучей, нейтронов, протонов и других источников для уничтожения раковых клеток и уменьшения размера опухолей. Излучение может исходить от устройства за пределами организма (дистанционная лучевая терапия), или оно может исходить от радиоактивного материала, помещенного в организм рядом с раковыми клетками (внутренняя лучевая терапия, или брахитерапия). Системная лучевая терапия использует радиоактивное вещество, такое, как радиоактивно меченное моноклональное антитело, которое мигрирует через кровь к тканям в организме. Лучевая терапия может также именоваться облучением и радиотерапией. Другие способы радиационной терапии также включают пространственную конформную лучевую терапию (3D-CRT) и лучевую терапию с модулируемой интенсивностью (IMRT). Другие способы лучевой терапии также являются возможными.

Если лечение на основе анти-PG антитела сочетают со вторым агентом, то второй агент может представлять собой химиотерапевтический агент. Химиотерапия представляет собой применение лекарственных средств на основе малых молекул, которые уничтожают (цитотоксические или цитотидные)

или предотвращают рост (цитостатические) раковые клетки. Химиотерапевтические агенты включают, но без ограничения таковыми, токсины, которые также называются как цитотоксины или цитотоксические агенты, которые включают любой агент, который является разрушительным для жизнеспособности клеток, и липосомы или другие носители, содержащие химиотерапевтические соединения. Примеры приемлемых химиотерапевтических агентов включают, но без ограничения таковыми, 1-дегидротестостерон, 5-фторурацил декарбазин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, актиномицин D, адриамицин, альдеслейкин, алкилирующие агенты, аллопуринол натрия, альтретамин, амифостин, анастрозол, антрамицин (АМС), анти-митотические агенты, цис-дихлордиамин платина (II) (DDP) цисплатин), диаминодихлор платина, антрациклины, антибиотики, антиметаболиты, аспарагиназу, BCG живую (интравезикальную), бетаметазон фосфат натрия и бетаметазон ацетат, бикалутамид, блеомицин сульфат, бусульфид, лейковорин кальция, калихеамицин, капецитабин, карбоплатин, ломустин (CCNU), кармустин (BSNU), хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, колхицин, конъюгированные эстрогены, циклофосфамид, циклотосфамид, цитарабин, цитарабин, цитохалазин В, цитоксан, дакарбазин, дактиномицин, дактиноцин (бывший актиномицин), даунорубин HCL, даунорубин цитрат, денилейкин дифтитокс, дексразоксан, дибромоманнитол, дигидроксид антрацин дион, доцетаксел, доластерон мезилат, доксорубин HCL, дронабинол, L-аспарагиназу E. coli, эметин, эпоэтин- α , L-аспарагиназу Egrwinia, эстрифидцированные эстрогены, эстрадиол, эстрамустин фосфат натрия, бромид этидия, этинил эстрадиол, этидронат, этопозид цитророрум фактор, этопозид фосфат, филграстим, флоксуридин, флуконазол, флударабин фосфат, фторурацил, флутамид, фолиновую кислоту, гемцитабин HCL, глюкокортикоиды, гозерелин ацетат, грамицидин D, гранисетрон HCL, гидроксимочевину, идарубин HCL, ифосфамид, интерферон α -2b, иринотекан HCL, летрозол, лейковорин кальция, лейпролид ацетат, левамизол HCL, лидокаин, ломустин, майтансиноид, мехлорэтамин HCL, медроксипрогестерон ацетат, мегестрол ацетат, мелфалан HCL, меркаптипурин, месна, метотрексат, метилтестостерон, митрамицин, митомицин C, митотан, митоксантрон, нилутамид, октреотид ацетат, ондансетрон HCL, оксалиплатин, паклитаксел, памидронат динатрия, пентостатин, пилокарпин HCL, плимицин, полифепросан 20 с имплантатом кармустина, порфирин натрия, прокаин, прокарбазин HCL, пропранолол, ритуксимаб, сарграмостин, стрептозотозин, тамоксифен, таксол, тегафур, тенипозид, тенопозид, тестволактон, тетракаин, тиотепа хлорамбуцил, тиогуанин, тиотепа, топотекан HCL, торемифен цитрат, трастузумаб, третиноин, валрубицин, винбластин сульфат, винкристин сульфат и винорелбин тартрат.

Анти-PG антитела могут также вводиться с комбинацией химиотерапевтических агентов. Типичные комбинации химиотерапевтических агентов включают 5-фторурацил (5FU) в сочетании с лейковорином (фолиновая кислота или LV); капецитабин в сочетании с урацилом (UFT) и лейковорином; тегафур в сочетании с урацилом (UFT) и лейковорином; оксалиплатин в сочетании с 5FU, иринотеканом и капецитабином; митомицин C в сочетании с 5FU, иринотеканом или капецитабином. Другие комбинации химиотерапевтических агентов и других терапевтических агентов также являются возможными.

Стандартные режимы дозирования для химиотерапевтических агентов, используемые для пациентов, страдающих от CRC, могут использоваться в способах настоящей заявки. Как является известным в соответствующей области техники, химиотерапевтические режимы для колоректального рака, использующие комбинации различных химиотерапевтических агентов, были стандартизованы в клинических исследованиях. Такие режимы часто известны как акронимы и включают 5FU Mayo, 5FU Roswell Park, LVFU2, FOLFOX4, FOLFOX6, bFOL, FUFOX, IFL, XELOX, XELIRI и CAPIRI, FOLFOXIRI. См., например, Chau, I. и др., 2009, Br. J., Cancer 100: 1704-19, и Field, K. и др., 2007, World J. Gastroenterol. 13: 3806-15, которые оба являются введенными в качестве ссылки.

Анти-PG антитела могут также использоваться в комбинации с другими антителами, включая, но без ограничения таковыми, моноклональные антитела, которые непосредственно или опосредованно уничтожают, замедляют или останавливают рост раковых клеток. Такие антитела могут функционировать с помощью множества различных механизмов. Например, некоторые антитела могут маркировать раковые клетки для атаки иммунной системой пациента посредством антителозависимой опосредованной клетками цитотоксичности (ADCC) или других механизмов. Предполагается, что ритуксимаб (Ритуксан®), который связывает CD20 антиген, находится на В клетках, и эдреколомаб, который связывает 17-1А антиген, функционирует этим путем. Другие антитела связывают и изменяют или ингибируют функцию антигенов, которые являются необходимыми раковым клеткам для выживания и/или роста. Ряд антител, как предполагается, функционирует таким образом, включая, например, цетуксимаб (Эрбитукс®) и панитумумаб (Вектибикс®), каждый из которых связывает EGF рецептор (EGFR); и бевацизумаб (Avastin®), который связывается с ростовым фактором VEGF. Другие механизмы также являются возможными, а определенные антитела могут быть способными работать с помощью одного или более механизмов действия. Другие антитела могут быть конъюгированными с радиоактивными или хемотоксическими остатками и нацеливать их на раковые клетки, которые предпочтительно экспрессируют антигены, которые специфически узнаются антителами.

Анти-PG антитела могут также вводиться в комбинации с нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами ("НПВП"). Например, целекоксиб, или 4-[5-(4-метилфенил)-3-

(трифторметил)пиразол-1-ил]бензолсульфонамид, представляет собой НПВП, который был продемонстрирован как такой, который уменьшает аденоматозные полипы у FAP пациентов.

Анти-PG антитело и второй агент могут вводиться одновременно, последовательно или раздельно. Как используется в данной заявке, говорится, что анти-PG антитело и второй агент вводятся последовательно, если они вводятся пациенту в тот же день, например, во время того же визита пациента. Последовательное введение может осуществляться спустя 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 ч. В противовес этому говорится, что анти-PG антитело и второй агент, вводятся раздельно, если они вводятся пациенту в различные дни, например, анти-PG антитело и второй терапевтический агент могут вводиться с интервалами в 1 день, 2 дня или 3 дня, одна неделя, 2 недели или с месячными интервалами. В способах настоящей заявки введение анти-PG антитела в соответствии с заявкой может предшествовать введению второго агента или следовать за ним.

В качестве неограничивающего примера, анти-PG антитело и второй агент могут вводиться параллельно в течение периода времени, после которого следует второй период времени, в котором введение анти-PG антитела и второго агента чередуются.

7.3 Фармацевтические композиции и наборы

Анти-PG антитела, полезные в способах в соответствии с настоящей заявкой, могут быть рецептированы в виде композиции. Необязательно, композиции могут включать один или более дополнительный(ых) терапевтический(их) агент(ов), таких как второй агент, описанный выше. Композиции обычно будут поставляться как часть стерильной фармацевтической композиции, которая в норме будет включать фармацевтически приемлемый носитель. Такая композиция может находиться в любой приемлемой форме (в зависимости от желаемого способа введения ее пациенту).

Анти-PG антитела могут вводиться индивидууму разнообразными путями, такими, как пероральный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, интраокулярный, местный, интратекальный и интрацеребровентрикулярный. Наиболее приемлемый путь введения в любом конкретном случае будет зависеть от частного антитела, субъекта, а также природы и тяжести заболевания и физического состояния субъекта. Антитела могут быть рецептированы в виде водного раствора и вводятся путем подкожной инъекции. Фармацевтически приемлемые носители для применения в заявке могут приобретать разнообразные формы в зависимости, например, от состояния, которое подвергается лечению, и способа введения.

Фармацевтические композиции могут традиционно быть представлены в виде единичных дозированных форм, содержащих предварительно определенное количество анти-PG антитела на дозу. Такая единица может содержать, например, но без ограничения, от 5 мг до 5 г, например от 10 мг до 1 г, или от 20 до 50 мг анти-PG антитела на единичную дозу. Фармацевтические композиции могут включать анти-PG антитела, способные к связыванию более, чем одного PG эпитопа. Альтернативно, фармацевтические композиции могут включать комбинацию анти-PG антител, каждое из которых является способным к связыванию отличного PG эпитопа.

Фармацевтические композиции в соответствии с данной заявкой могут быть получены для хранения в виде лиофилизированных композиций или в виде водных растворов путем смешивания антитела, обладающего достаточной степенью чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами, которые типично используются в области техники (они все обозначаются в данной заявке как "носители"), то есть, буферными агентами, стабилизирующими агентами, консервантами, изотоническими агентами, неионными детергентами, антиоксидантами и другими вспомогательными добавками. См. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-ое издание (Osol, ред. 1980). Такие добавки должны быть нетоксическими для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях.

Буферные агенты помогают поддерживать pH в интервале, который приближен к физиологическим условиям. Они могут присутствовать при концентрации, которая колеблется в интервале от приблизительно 2 мМ до приблизительно 50 мМ. Приемлемые буферные агенты для применения в настоящей заявке включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли, такие, как цитратные буферы (например, смесь цитрат мононатрия - цитрат динатрия, смесь лимонная кислота - цитрат тринатрия, смесь лимонная кислота - цитрат мононатрия и т.д.), сукцинатные буферы (например, смесь янтарная кислота - сукцинат мононатрия, смесь янтарная кислота - гидроокись натрия, смесь янтарная кислота - сукцинат динатрия и т.д.), тартратные буферы (например, смесь винная кислота - тартрат натрия, смесь винная кислота - тартрат калия, смесь винная кислота - гидроокись натрия и т.д.), фумаратные буферы (например, смесь фумаровая кислота - фумарат мононатрия, смесь фумаровая кислота - фумарат динатрия, смесь фумарат мононатрия - фумарат динатрия и т.д.), глюконатные буферы (например, смесь глюконовая кислота - глюконат натрия, смесь глюконовая кислота - гидроокись натрия, смесь глюконовая кислота - глюконат калия и т.д.), оксалатный буфер (например, смесь щавелевая кислота - оксалат натрия, смесь щавелевая кислота - гидроокись натрия, смесь щавелевая кислота - оксалат калия и т.д.), лактатные буферы (например, смесь молочная кислота - лактат натрия, смесь молочная кислота - гидроокись натрия, смесь молочная кислота - лактат калия и т.д.) и ацетатные буферы (например, смесь уксусная кислота - ацетат натрия, смесь уксусная кислота - гидроокись натрия и т.д.). Дополнительно могут ис-

пользоваться фосфатные буферы, гистидиновые буферы и соли триметиламина, такие как Трис.

Консерванты могут прибавляться для задержки микробного роста, при этом они могут прибавляться в количествах, которые колеблются в интервале от 0,2 до 1% (вес./об.). Приемлемые консерванты для применения в настоящей заявке включают фенол, бензиловый спирт, мета-крезол, метилпарабен, пропилпарабен, октадецилдиметилбензил аммоний хлорид, галиды бензалкония (например хлорид, бромид и иодид), хлорид гексаметония и алкил парабены, такие как метил или пропил парабен, катехол, резорцинол, циклогексанол и 3-пентанол. Изотонические агенты, иногда являются известными как "стабилизаторы", могут прибавляться для обеспечения изотоничности жидких композиций в соответствии с настоящей заявкой и включают многоатомные сахарные спирты, например, трехатомные или более высокие сахарные спирты, такие как глицерин, эритритол, арабитол, ксилитол, сорбитол и маннитол. Стабилизаторы относятся к широкой категории наполнителей, которые могут варьировать по своей функции от объемобразующего агента до добавки, которая солубирует терапевтический агент или помогает предотвратить денатурацию или приклеивание к стенке контейнера. Типичные стабилизаторы могут представлять собой многоатомные сахарные спирты (перечислены выше); аминокислоты, такие как аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин, и т.д., органические сахара или сахарные спирты, такие как лактоза, трегалоza, стахилоза, маннитол, сорбитол, ксилитол, рибитол, миоинозитол, галактитол, глицерол и тому подобное, включая циклитолы, такие как инозитол; полиэтиленгликоль; аминокислотные полимеры; содержащие серу восстанавливающие агенты, такие, как мочевины, глутатион, липоевая кислота, тиогликолат натрия, тиоглицерол, α -монотиоглицерол и тиосульфат натрия; полипептиды с низким молекулярным весом (например, пептиды из 10 остатков или меньше); белки, такие, как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие, как поливинилпирролидон; моносахариды, такие, как ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды, такие как лактоза, мальтоза, сахароза и трисахариды, такие, как раффиноза; и полисахариды, такие, как декстран. Стабилизаторы могут присутствовать в интервале от 0,1 до 10000 вес.ч. на весовую часть активного белка.

Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как "смачивающие агенты") могут прибавляться для того, чтобы помочь солубилизовать терапевтический агент, а также для того, чтобы защитить терапевтический белок от индуцированной перемешиванием агрегации, что также помогает композиции подвергаться сдвигу поверхности без денатурации белка. Приемлемые неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 80 и т.д.), полиоксамеры (184, 188, и т.д.), полиолы Плуороника, моноэтеры полиоксиэтилен сорбитана (ТВИН®-20, ТВИН®-80, и т.д.). Неионные поверхностно-активные вещества могут присутствовать в интервале от приблизительно 0,05 мг/мл до приблизительно 1,0 мг/мл, например от приблизительно 0,07 до приблизительно 0,2 мг/мл.

Дополнительные разнообразные наполнители могут включать хелатирующие агенты (например, ЭДТА), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е) и сорастворители.

Анти-PG антитела могут вводиться отдельно или в виде смесей одного или более отдельных анти-PG антител, в смеси или комбинации с другими агентами, полезными для предотвращения CRC, или дополнениями к терапии CRC. Примеры приемлемой комбинации и дополнительных способов терапии обеспечиваются выше.

Настоящая заявка также охватывает фармацевтические наборы, содержащие анти-PG антитела (включая конъюгаты антитела) в соответствии с данной заявкой. Фармацевтический набор представляет собой упаковку, включающую композицию анти-PG антитела (например, либо в лиофилизированной форме, либо в виде водного раствора) и один или более из следующих компонентов:

второй агент, например, такой, как описывается выше;

устройство для введения композиции анти-PG антитела, например ручку-шприц, иглу и/или шприц;

и

воду фармацевтической марки или буфер для ресуспендирования антитела, если антитело находится в лиофилизированной форме.

Каждая единичная доза анти-PG антитела может быть упакована отдельно, и набор может содержать одну или более единичных доз (например, две единичные дозы, три единичные дозы, четыре единичные дозы, пять единичных доз, семь единичных доз, восемь единичных доз, десять единичных доз или более). В частном воплощении одна или более единичных доз каждая является помещенной в шприц или ручку-шприц.

7.4 Эффективные дозировки и режимы лечения

Анти-PG антитела в соответствии с настоящей заявкой вводятся субъекту в количестве, достаточном или эффективном для обеспечения терапевтического преимущества. В контексте предотвращения желудочно-кишечного рака, включая CRC, у субъекта, предрасположенного к развитию аденоматозных полипов, терапевтическое преимущество может прогнозироваться, если достигается одно или более: снижение или отсутствие повышения количества и/или размера полипов у субъекта; отсутствие злокачественных опухолей, включая случаи, когда субъект имеет или имел полипы; снижение или отсутствие

повышения уровня PG в плазме или сыворотке; обратное развитие от более продвинутой стадии полипоза к менее продвинутой стадии полипоза в соответствии с классификацией Шпигельмана (например, обратное развитие от стадии IV до стадии III, от стадии III до стадии II, от стадии II до стадии I); отсутствие прогрессирования от стадии IV полипоза по классификации Шпигельмана до желудочно-кишечного рака. Фармацевтические композиции, включающие анти-PG антитела, могут вводиться индивидуумам (например, субъектам, которые представляют собой людей) при эффективных дозировках.

Полное предотвращение желудочно-кишечного рака, несмотря на то, что является желательным, не требуется для существования терапевтического преимущества. Действительно, большинство пациентов, которые страдают от FAP, требуют проведения основной хирургии к моменту достижения возраста 25 лет, замедление прогрессирования заболевания так, что хирургия может быть отложена, улучшает качество жизни. Кроме того, любая отсрочка начала желудочно-кишечного рака, такого, как CRC, обеспечивает терапевтическое преимущество.

В некоторых случаях терапевтическое преимущество может коррелировать с одним или более идентифицирующими конечных баллов, в соответствии со знанием среднего специалиста в данной области техники. В качестве примера, но не в качестве ограничения, концентрации PG в плазме и/или сыворотке может измеряться у субъекта в течение периода времени, со снижением уровней PG или уровня, ниже порогового значения, например, ниже приблизительно 50, 40, 30, 20, 10 или 5 пМ, что является показателем для терапевтического преимущества.

Размер полипа и количества могут измеряться при использовании эндоскопических методик, таких, как колоноскопия, а также других способов, известных среднему специалисту в данной области техники.

Связывание всего свободного PG не требуется для достижения терапевтической эффективности, несмотря на то, что это является желательным. Свободный PG означает PG, который является доступным для связывания с помощью анти-PG антитела. Более того, снижение концентрации свободного PG в полипах или вокруг полипов, систематически, в частности, в жидкостях организма, или где-либо в другом месте, до более ограниченной степени, может также быть эффективным. Типичные ткани и жидкости организма, в которых концентрация свободного PG может снижаться путем введения композиции анти-PG антитела(антител), включают, но без ограничения таковыми, образцы полипов и опухоли, удаленные у пациента, асцитную жидкость, жидкость из плевральных выпотов, цереброспинальную жидкость, лимфу, кровь, плазму, сыворотку и другие. Концентрация PG в одной или более этих тканях или жидкостях организма может количественно оцениваться при использовании методики ELISA или других методик, известных среднему специалисту в данной области техники.

В соответствии со знанием среднего специалиста в данной области техники доза анти-PG антитела может быть оттитрована у пациента для того, чтобы снизить концентрацию свободного PG в ткани или жидкости организма, которые представляют интерес, в определенное время после введения по крайней мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, или приблизительно на 5-10%, приблизительно 10-15%, приблизительно 15-20%, приблизительно 20-25%, приблизительно 25-30%, приблизительно 30-35%, приблизительно 35-40%, приблизительно 40-45%, приблизительно 45-50%, приблизительно 50-55%, приблизительно 55-60%, приблизительно 60-65%, приблизительно 65-70%, приблизительно 70-75%, приблизительно 75-80%, приблизительно 80-85%, приблизительно 85-90% или приблизительно 90%-95%, или процентное снижение свободного PG колеблется между любыми из указанных выше значений.

Количество вводимого анти-PG антитела будет зависеть от разнообразных факторов, включая количество и размер аденоматозных полипов, обнаруженных у субъекта, форму, путь и сайт введения, режим лечения (например, используется ли второй терапевтический агент), возраст и состояние конкретного субъекта, которого подвергают лечению, чувствительность пациента к анти-PG антителам. Приемлемая дозировка может быть легко определена квалифицированным специалистом в данной области техники. В конечном итоге, лечащий врач будет определять приемлемые дозировки, которые используются. Эта дозировка может быть повторяемой так часто, как это является приемлемым. Если развиваются побочные эффекты, то количество и/или частота введения дозировки может изменяться или снижаться в соответствии с нормальной клинической практикой. Надлежащая дозировка и режим лечения могут устанавливаться путем мониторинга развития лечения при использовании традиционных методик, известных среднему специалисту в данной области техники.

Эффективные дозировки могут оцениваться изначально из анализов *in vitro*. Например, начальная доза для применения у животных может быть рецептирована для достижения концентрации анти-PG антитела в циркулирующей крови или сыворотке, которая находится на уровне или выше связывающей аффинности антитела для прогастрина, как измеряется *in vitro*. Подсчет дозировок для достижения таких концентраций в циркулирующей крови или сыворотке с учетом биодоступности конкретного антитела находится в пределах способностей среднего специалиста в области техники. Для руководства можно отослать читателя к части 1: General Principles в "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics," 11-ое изд., Hardman, J.G., и др., ред., McGraw-Hill Professional, и ссылкам, которые там приводятся.

Начальные дозировки могут также оцениваться из данных *in vivo*, таких, как животные модели.

Животные модели, полезные для исследования эффективности соединений для задержки или предотвращения развития желудочно-кишечных опухолей, включая CRC опухоли, являются хорошо известными в области техники. Средний специалист в области техники может обычным образом адаптировать эту информацию для определения дозировок, приемлемых для введения человеку.

В специфических воплощениях внутривенная доза может быть определена для индивидуального субъекта путем измерения концентрации РГ в сыворотке или плазме индивидуума несколько раз на протяжении периода времени от нескольких дней до нескольких недель перед лечением и подсчета количества анти-РГ антитела, которое будет насыщающим, то есть, количества, которое будет достаточным для связывания всего РГ. Как будет оценено квалифицированными специалистами, количество какого-либо специфического антитела, необходимое для достижения насыщения для данной концентрации РГ в плазме или сыворотке крови, будет зависеть, отчасти, от константы аффинности конкретного антитела. Способы подсчета насыщающих количеств для специфических анти-РГ антител, которые представляют интерес, являются хорошо известными.

Для достижения насыщения может вводиться количество, которое является большим, чем подсчитанное насыщающее количество, например по крайней мере в 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- или даже 10 раз более высокое, чем подсчитанное насыщающее количество. Для способов введения, отличных от внутривенного, количество может доводиться на основе фармакокинетики и биодоступности, что является хорошо известным в данной области техники.

Эффективная доза анти-РГ антитела в соответствии с заявкой может колебаться от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 75 мг/кг на одно (например, болюс) введение, множественное введение или непрерывное (например, инфузия) введение, или для достижения концентрации в сыворотке 0,01-5000 мкг/мл на одно введение, множественное введения или непрерывное введение, или может представлять любой эффективный интервал или значение в этих пределах в зависимости от состояния, которое подвергается лечению, способа введения и возраста, веса и состояния субъекта. В некоторых воплощениях каждая доза будет колебаться от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 мг/кг; от приблизительно 0,25 до приблизительно 0,75 мг/кг; от приблизительно 0,5 до приблизительно 1 мг/кг; от приблизительно 1 до приблизительно 2 мг/кг; от приблизительно 1,5 до приблизительно 2,5 мг/кг; от приблизительно 2 до приблизительно 3 мг/кг; от приблизительно 2,5 до приблизительно 3,5 мг/кг; от приблизительно 3 до приблизительно 4 мг/кг; от приблизительно 3,5 до приблизительно 4,5 мг/кг; от приблизительно 4 до приблизительно 5 мг/кг; от приблизительно 5 до приблизительно 7 мг/кг; от приблизительно 6 до приблизительно 8 мг/кг; от приблизительно 7 до приблизительно 9 мг/кг; от приблизительно 8 до приблизительно 10 мг/кг; от приблизительно 10 до приблизительно 15 мг/кг; от приблизительно 12,5 до приблизительно 17,5 мг/кг; от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг; от приблизительно 17,5 до приблизительно 22,5 мг/кг; от приблизительно 20 до приблизительно 25 мг/кг; от приблизительно 22,5 до приблизительно 27,5 мг/кг; от приблизительно 25 до приблизительно 30 мг/кг; от приблизительно 30 до приблизительно 40 мг/кг; от приблизительно 35 до приблизительно 45 мг/кг; от приблизительно 40 до приблизительно 50 мг/кг; от приблизительно 45 до приблизительно 55 мг/кг; от приблизительно 50 до приблизительно 60 мг/кг; от приблизительно 55 до приблизительно 65 мг/кг; от приблизительно 60 до приблизительно 70 мг/кг; от приблизительно 65 до приблизительно 75 мг/кг. Другие интервалы дозировок также являются возможными.

Количество, частота и длительность введений будут зависеть от разнообразных факторов, таких, как возраст, вес и состояние заболевания пациента. Анти-РГ лечение является показанным у субъектов, у которых были определены и/или удалены предраковые аденоматозные полипы, и у субъектов, диагностированных с FAP, которые еще не проявили полипы. У людей с FAP полипы в общем случае начинают появляться на втором десятилетии. Анти-РГ лечение может начинаться до того как или в то время, как полипы определяются у субъектов с FAP. Для субъектов со sporadическим аденоматозным полипозом анти-РГ лечение может быть инициировано тогда, когда определены полипы. Анти-РГ лечение может также инициироваться у субъектов, которые имеют, по крайней мере, один удаленный полип и, таким образом, имеют высокий риск развития большего количества полипов и желудочно-кишечного рака, включая CRC.

Режим лечения для введения может продолжаться от 2 недель до неопределенного времени. Необязательно, режим лечения обеспечивается для повторяемого введения, например, один раз в день, два раза в день, через день, один раз в три дня, один раз в пять дней, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц. Повторяемое введение может осуществлять при той же дозе или при отличной дозе. Введение может повторяться один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз или более. Эффективное количество анти-РГ антитела может вводиться в виде единичной дозы или на протяжении курса терапевтического режима. Длительность анти-РГ лечения для пациентов, предрасположенных к развитию аденоматозного полипоза, предпочтительно является большей, например, в течение одного года, но может быть более короткой, например, от одного до нескольких месяцев или до года.

7.5 Способы отбора пациентов для контроля или лечения и мониторинг пациентов для определения эффективности лечения

Не имея намерения быть связанным с конкретной теорией операции, предполагается, что повышенные уровни PG ассоциируются с трансформацией аденоматозных полипов от доброкачественных до злокачественных. Как показано в Примере 6, приведенном ниже, субъекты с множественными полипами имели повышенные уровни PG, в то время как субъекты, которые не имели полипов, имели либо низкие, либо неопределяемые уровни сывороточного PG. Основываясь на этом наблюдении, уровни PG в плазме и/или сыворотке могут использоваться для идентификации пациентов для контроля или лечения, а также для мониторинга эффективности профилактики у пациентов, подвергающихся лечению.

Мониторинг уровней PG у индивидуумов с FAP или историей спорадического аденоматозного полипоза является полезным для идентификации субъектов, которым предписывается контроль с помощью колоноскопии, а также пациентов, которые нуждаются в анти-PG лечении. Стандартное медицинское наблюдение для индивидуумов, предрасположенных к развитию аденоматозных полипов, представляет собой эндоскопию с интервалами от 3 до 5 лет. Этот интервал между исследованиями может означать, что у некоторых индивидуумов многочисленные полипы или рак развиваются к тому моменту, когда осуществляется эндоскопия. Простой анализ крови для определения уровней PG легко осуществляется при более частых интервалах и может дать возможность идентифицировать тех индивидуумов, которые будут подвергаться эндоскопии (например, колоноскопии) позднее, или тех, которые являются кандидатами для анти-PG лечения.

Индивидуумы, диагностированные с FAP, или те, у которых ранее были определены полипы, могут подвергаться мониторингу для определения уровня или концентрации PG в жидкости организма, такой, как кровь, плазма или сыворотка, по сравнению с базовым уровнем. В соответствии с этим уровень PG измеряется в образце от индивидуума и потом сравнивается с базовым уровнем PG.

Если уровень PG у субъекта с FAP или история спорадического аденоматозного полипоза не изменились по сравнению с предыдущими измерениями у субъекта или является равным базовому уровню для релевантной популяции, с которой сравнивается субъект, то субъект оценивается как такой, который не требует продолжения контроля. В противовес этому, если концентрация PG является выше базовой линии, или наблюдается повышение в течение периода времени у субъекта, то субъект представляет собой кандидата для дальнейшего контроля, включая, например, колоноскопию и анти-PG лечения.

Для целей мониторинга эффективности лечения уровни PG в крови, плазме и сыворотке могут измеряться у пациента, получающего анти-PG лечение при указанном периоде времени, и использоваться для определения того, является ли лечение эффективным на основе того, является ли определяемый уровень выше или ниже базового уровня PG. Эта информация может использоваться лечащими врачами для решения продолжать ли введение анти-PG антитела или модифицировать лечение. Эти способы могут использоваться для мониторинга анти-PG лечения, которое используется самостоятельно или в комбинации с другими способами лечения, как описывается выше.

В некоторых воплощениях способов уровень PG в одной или более жидкостях организма, таких, как цельная кровь, плазма, сыворотка пациента, получающего лечение на основе анти-PG антитела, может измеряться и потом сравниваться с базовым уровнем. Снижение концентрации в течение периода времени и/или тогда, когда измеренный уровень является ниже порогового значения в определенной точке времени, является показательным для эффективности. Повышение концентрации в течение периода времени и/или тогда, когда измеренный уровень является выше базового уровня PG, является показательным для отсутствия эффективности лечения. Типично, уровень PG представляет собой концентрацию PG в образце, выраженную в молярных количествах (M) или в моль/литр (моль/л).

Базовый уровень может представлять собой определенное число или интервал, ограниченный определенными значениями. Базовая линия может основываться на одном или более измерениях, полученных от пациента или основываться на измерениях PG в образцах от популяции индивидуумов. В некоторых воплощениях способов базовая линия представляет собой уровень PG одного и того же пациента, взятый при одном или более интервалах, например, перед началом анти-PG лечения, во время курса лечения или после того, как лечение закончено. В некоторых воплощениях базовая линия может представлять собой средний уровень PG в популяции индивидуумов с характеристиками, подобными тем, которые существуют у индивидуума, подвергающегося мониторингу. Такие характеристики могут включать, но не обязательно ограничены таковыми, возраст, расположение мутации в APC гене, стадию по классификации Шпигельмана, историю хирургического вмешательства, анти-PG лечение или другие способы лечения. В некоторых воплощениях базовая линия представляет собой специфический уровень PG, такой, как приблизительно 50 пМ, приблизительно 40 пМ, приблизительно 30 пМ, приблизительно 20 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 5 пМ, приблизительно 2 пМ, приблизительно 1 пМ или даже ниже. В некоторых воплощениях базовая линия представляет собой интервал.

Уровни PG могут измеряться при использовании методик, известных среднему специалисту в данной области техники, таких, как, но без ограничения таковыми, RIA и ELISA. В специфическом воплощении уровни PG могут измеряться при использовании сэндвич ELISA с одним анти-PG антителом, нацеленным на N-терминальный конец прогастрина, и вторым анти-PG антителом, нацеленным на C-терминальный конец прогастрина. Типичные N- и C-терминальные анти-PG антитела, полезные для такого сэндвич-анализа, описываются в разделе, приведенном ниже. В таком анализе готовят поверхность,

такую, как ячейки в планшете на 96 ячеек, с которой связывается известное количество первого, "иммобилизованного" N-терминального или C-терминального анти-PG антитела. Исследуемый образец потом применяют к поверхности и выдерживают в течение периода инкубации. Поверхность потом промывают для удаления несвязанного антигена и применяют раствор, содержащий второе "идентифицирующее" анти-PG антитело, где идентифицирующее антитело связывает отличный эпитоп PG (например, иммобилизованное антитело представляет собой C-терминальное анти-PG антитело, а N-терминальное анти-PG антитело используют как идентифицирующее антитело, и наоборот). Уровни PG потом измеряют либо непосредственно (если, например, идентифицирующее антитело является конъюгированным со способной к определению меткой) или опосредованно (с помощью меченого вторичного антитела, которое связывает идентифицирующее анти-PG антитело). Для этого анализа антитела могут использоваться в избытке, так, что весь PG связывается и количественно оценивается. Специфический сэндвич-анализ для измерения уровней PG в плазме/сыворотке крови обеспечивается в примере 1.

Могут быть проведены многочисленные измерения при различных интервалах, после чего строится график для определения, существует ли определенная тенденция. В неограничивающем примере уровни PG могут определяться при еженедельных, месячных или ежегодных интервалах тогда, когда пациент получает анти-PG антитела. Другие интервалы также являются возможными.

В воплощении, вовлекающем цикл терапии при использовании анти-PG антитела, одно или более измерений могут также осуществляться в процессе курса терапии так, что может оцениваться влияние антител на уровни PG. В других таких воплощениях, где у пациента присутствуют остаточные анти-PG антитела во время взятия образцов, данные могут демонстрировать снижение уровней PG благодаря секвестрации PG антителом, за которым следует повышение, поскольку этот эффект снижается, после этого происходит последующее снижение, если лечение было эффективным.

В других воплощениях измерения после осуществления терапии могут осуществляться после того, как произведена оценка того, что анти-PG антитела были выведены у пациента, так, что связывание PG таким антителом не оказывает влияния на точность определения концентрации PG.

Поскольку потребление пищи обычно повышает синтез и секрецию гастрина, оно может также вызывать краткосрочное повышение уровней PG в крови, что может препятствовать точному измерению уровней PG у пациентов, которые подвергаются мониторингу. Для того чтобы избежать этого эффекта, в частности тогда, когда определяют концентрацию PG в образцах крови, образцы могут быть взяты от пациента натощак.

7.6 Анти-PG антитела

Антитела, полезные в способах, раскрытых в данной заявке, являются такими, которые специфически связывают прогастрин по сравнению с другими продуктами прогастринового гена. Ссылаясь на фиг. 1, ген гастрина человека транслируется с образованием полипептида из 101 аминокислоты, который называется пре-прогастрин, содержащий сигнальную последовательность (подчеркнута), которая отщепляется с образованием человеческого прогастрина, полипептида из 80 аминокислот. Прогастрин, в свою очередь, расщепляется с образованием продукта из 34 аминокислот, соответствующей последовательности остатков 38-71 прогастрина, который потом удлиняется на своем карбокситерминальном конце с помощью остатка глицина, образуя удлиненный глицином G34 ("G34-Gly") продукт. Побочный продукт этого расщепления представляет собой пептид, состоящий из 6 аминокислот, называемый C-терминальным фланкирующим пептидом, или СТФР, который соответствует последовательности остатков 75-80 прогастрина. G34-Gly потом дополнительно расщепляется с образованием полипептида из 17 остатков, соответствующего последовательности остатков 55-71 прогастрина и обозначается как G17-Gly. Удаление C-терминальных глицинов G34-Gly и G17-Gly, после чего осуществляется C-терминальное амидирование, обеспечивает G34 и G17, соответственно, которые оба являются C-терминально амидированными.

Как используется в данной заявке, антитело является "высоко специфическим для" hPG или "высоко специфически связывает" hPG, если оно связывается с полноразмерным прогастрином, но не связывается вообще с СТФР, амидированным гастрином или с удлиненным глицином гастрином, и является "специфическим для" hPG или "специфически связывает" hPG, если он демонстрирует, по крайней мере, приблизительно в 5 раз большее связывание hPG, чем СТФР и другие продукты гастринового гена, как измеряется в стандартных анализах связывания. Специфический анализ ELISA, который может использоваться для оценки специфичности определенного анти-hPG антитела, обеспечивается в примере 2.

Такие высоко специфические и/или специфические анти-hPG антитела (в данной заявке называются как "анти-hPG антитела") могут быть поликлональными ("анти-hPG PAb") или моноклональными ("анти-hPG MAб"), хотя для терапевтических применений и, в некоторых случаях, диагностических или других *in vitro* применений моноклональные антитела являются предпочтительными.

Эпитоп, который связывается анти-hPG антителом, не является критическим. Полезные анти-hPG антитела могут связывать N-терминальный участок hPG, C-терминальный участок hPG или другой участок hPG. Недавно было продемонстрировано, что, по крайней мере, для моноклональных анти-hPG антител, выбор антигена, который используется для того, чтобы вызвать образование анти-hPG антител, может быть важным (см. международную заявку PCT/EP2010/006329, поданную 15 октября 2010 г., и

заявку США № 12/906041, поданную 15 октября 2010 г., раскрытие которых и, в частности, раскрытые анти-hPG антитела, которые являются введенными в данную заявку в качестве ссылки; далее упоминаются как '329 и '041 заявки соответственно). Как раскрывается в заявках '329 и '041, не все антигены, которые имеют происхождение от hPG, стимулируют образование моноклональных антител, которые, в частности, связывают hPG при физиологических условиях. Действительно, некоторые антигены, которые успешно использовались для получения поликлональных анти-hPG антител, таких как полноразмерный рекомбинантный hPG (смотри, например, WO 08/076454, которая относится к Singh) и пептид, соответствующий последним десяти аминокислотам на С-терминальном конце hPG (смотри WO 07/135542, которая относится к Hollande и др.), были неуспешными для получения моноклональных антител. Как указывается в '329 и '041 заявках, антигенные N-терминальные и С-терминальные последовательности в пределах hPG последовательности были идентифицированы как такие, которые могут использоваться для получения моноклональных антител, которые, в частности, связывают hPG. Интересно отметить, что необходимая антигенная последовательность не является ограниченной участками hPG последовательности, которые являются уникальными для нее. Пептидные антигены, имеющие участки последовательности наряду с другими продуктами гастринного гена, например, G17, G34 и CTFP, обеспечивают получение моноклональных антител, которые не только связывают hPG, но связывают его специфически.

Анти-hPG антитела, получаемые при использовании пептидного антигена, имеющего последовательность, соответствующую N-терминальному участку hPG, и/или такие, которые связывают N-терминальный участок hPG, называются в данной заявке "N-терминальными анти-PG антителами." Специфический типичный антигенный участок hPG, который может использоваться для конструирования иммуногена, приемлемого для получения как поликлональных, так и моноклональных антител, специфических для hPG, соответствует остаткам 1 - 14 hPG: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO:25). Типичные иммуногены, полезные для получения N-терминальных анти-hPG моноклональных антител, полученные при использовании этих типичных иммуногенов, обеспечиваются в табл. 2А, приведенной ниже, и в разделе примеры:

Таблица 2А. N-терминальные анти-hPG моноклональные антитела

Иммуноген	Гибридома (депозит. №)	MAb	Последовательности мышиных CDR	Последовательности мышиных V _H и V _L	Гуманизированные последовательности V _H и V _L (прогнозируемые)
N1	43B9G11	MAb1			
N1	WE5H2G7	MAb2			
N2	6B5B11C10	MAb3	V _H CDR 1.3 GYIFTSYW (SEQ ID NO:1) V _H CDR 2.3 FYPGNSDS (SEQ ID NO:2) V _H CDR 3.3 TRRDSPOQY (SEQ ID NO:3) V _L CDR 1.3 QSIVHSGNGTY (SEQ ID NO:4) V _L CDR 2.3 KVS (SEQ ID NO:5) V _L CDR 3.3 FQGSHPFFT (SEQ ID NO:6)	mV _H .3 (SEQ ID NO:12) mV _L .3 (SEQ ID NO:13)	hV _H .3 (SEQ ID NO:21) hV _L .3 (SEQ ID NO:22)
N2	20D2C3G2	MAb4	V _H CDR 1.4 GYTFSSSW (SEQ ID NO:7) V _H CDR 2.4 FLPGSGST (SEQ ID NO:8) V _H CDR 3.4 ATDGNVDWFAY (SEQ ID NO:9) V _L CDR 1.4 QSLVHSSGVTY (SEQ ID NO:10) V _L CDR 2.4 KVS (SEQ ID NO:5) V _L CDR 3.4 SQSTHVPPT (SEQ ID NO:11)	mV _H .4 (SEQ ID NO:14) mV _L .4 (SEQ ID NO:15)	hV _H .4 (SEQ ID NO:23) hV _L .4 (SEQ ID NO:24)
N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAb15			
N2	1E9D9B6	MAb16	V _H CDR 1.16 GYTFTSY (SEQ ID NO:39) 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) V _L CDR 3.16 WQGTSPYT (SEQ ID NO:57)	mV _H .16 (SEQ ID NO:61) mV _L .16 (SEQ ID NO:65)	hV _H .16a (SEQ ID NO:84) hV _H .16b (SEQ ID NO:86) hV _H .16c (SEQ ID NO:88) hV _L .16a (SEQ ID NO:85) hV _L .16b (SEQ ID NO:87) hV _L .16c (SEQ ID NO:89)
N2	1C8D10F5	MAb17			
N2	1A7C3F11	MAb18			
N2	1B3B4F11	MAb19	V _H CDR 1.19 GYSITSDYA (SEQ ID NO:40) V _H CDR 2.19 ISFSGYT (SEQ ID NO:44) V _H CDR 3.19 AREVNYGDSYHFDY (SEQ ID NO:48) V _L CDR 1.19 SQHRITYT (SEQ ID NO:51) V _L CDR 2.19 VKKDGSH (SEQ ID NO:54)	mV _H .19 (SEQ ID NO:62) mV _L .19 (SEQ ID NO:66)	hV _H .19a (SEQ ID NO:90) hV _H .19b (SEQ ID NO:92) hV _H .19c (SEQ ID NO:94) hV _L .19a (SEQ ID NO:91) 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	Иммуноген N1 = SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys-BSA, также представленный как (SEQ ID NO:25)-Ahx-Cys-BSA			
			Иммуноген N2 = SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys-KLH, также представленный как (SEQ ID NO:25)-Ahx-Cys-KLH			

В табл. 2А все аминокислотные последовательности являются представленными при использовании традиционной N→C ориентации. Для каждого иммуногена прогастриновый пептид синтезировали при использовании С-терминального линкера одного остатка аминокислотной кислоты (Ahx), после которого следует остаток цистеина (Cys), который потом конъюгируют с носителем, представленным либо бычьим сывороточным альбумином ("BSA"), либо гемоцианином лимфы улитки ("KLH"), через линкерный остаток Cys.

Анти-hPG антитела, получаемые при использовании пептидного антигена, имеющего последовательность, соответствующую С-терминальному участку hPG, и/или такие, которые связывают С-терминальный участок hPG, называются в данной заявке "С-терминальными анти-РG антителами." Специфический типичный антигенный участок hPG, который может использоваться для конструирования иммуногена, полезного для получения как поликлональных, так и моноклональных С-терминальных антител, соответствует остаткам 55-80 QGPWLEEEEEAYGWMDFGRSAEDEN (SEQ ID NO: 27). Типичные иммуногены, полезные для получения С-терминальных анти-hPG антител, а также последовательности CDR и V_H и V_L С-терминальных анти-hPG моноклональных антител, полученные при использовании этих типичных иммуногенов, обеспечиваются в табл. 2В, приведенной ниже, и в разделе примеры.

Таблица 2В. С-терминальные анти-hPG моноклональные антитела

Иммуноген	Гибридома (депозит. №)	MAb	Последовательности мышиных CDR			Последовательности мышиных V _H и V _L		Гуманизированные последовательности V _H и V _L (прогнозируемые)	
C1	1B4A11D11 (I-4371)	MAb5							
C1	1B6A11F2 (I-4372)	MAb6							
C1	1B11E4B11 (I-4373)	MAb7							
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)	mV _L .8 (SEQ ID NO:63)		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	AQNLELPLT (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)	mV _L .13 (SEQ ID NO:64)		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	WQGTHFPQT (SEQ ID NO:56)					
C1	2H9F4B7	MAb14							
C2	1F11F5E10	MAb21							
C2	1F11F5G9	MAb22							
C2	1A11F2C9	MAb23							
			Иммуноген C1 = KLH-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRSAEDEN, также представленный как KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:27)						
			Иммуноген C2 = DT-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRSAEDEN, также представленный как DT-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:27)						

В табл. 1В все аминокислотные последовательности являются представленными при использовании традиционной N→C ориентации. Для каждого иммуногена прогастриновый пептид синтезировали при использовании N-терминального линкера Ahx-Ahx-Cys, который потом конъюгируют с носителем, представленным либо гемоцианином лимфы улитки ("KLH"), либо токсином дифтерии, через линкерный остаток Cys.

Специфические эпитопы, связанные с типичными анти-hPG моноклональными антителами MAb1-MAb23, которые обеспечиваются в табл. 2А и 2В, картировали при использовании SPOT методики и аланинового сканирования, как описывается у Laune и др., 2002, J. Immunol. Methods 267: 53-70 и Laune, 1997, J. Biol. Chem. 272: 30937-30944, соответственно (см. также пример 6 заявки '329).

В методике SPOT пептидные последовательности из 15 аминокислот, охватывающие путативный эпитоп, получали и переносили на нитроцеллюлозные фильтры, которые потом подвергали зондированию с исследуемым антителом для определения минимальной последовательности эпитопа, которая узнается этим антителом. Аланиновое сканирование использовали для определения остатков в пределах эпитопа, которые являются критическими для связывания антитела. Каждый остаток в пределах путативного эпитопа подвергали мутации, один за другим, до аланина, и содержащие аланин пептиды потом зондировали с исследуемым антителом.

Для N-терминальных анти-hPG моноклональных антител MAб 1-4 и 15-20, эпитопы включали, по крайней мере, следующие последовательности: DAPLG (SEQ ID NO: 28), PDAPLG (SEQ ID NO: 29), PRSQQP (SEQ ID NO: 30), WKPRSQQPD (SEQ ID NO: 31) или WKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 32), как показано в табл. 3А, приведенной ниже.

Таблица 3А

MAб#	PG пептидный антиген: SWKPRSQQPDAPLG	SEQ ID NO
MAб2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAб4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAб1	PDAPLG	29
MAб3	DAPLG	28
MAб17	WKPRSQQPD	31
MAб18	WKPRSQQPD	31
MAб19	WKPRSQQPD	31
MAб20	WKPRSQQPD	31
MAб15	PRSQQP	30
MAб16	PRSQQP	30

Для С-терминальных анти-hPG моноклональных антител MAб 5-7, 9-12, 14 и 21-23, эпитопы включали, по крайней мере, следующие последовательности: FGRR (SEQ ID NO: 33), MDFGR (SEQ ID NO: 34), AEDEN (SEQ ID NO: 35) и GWDMDFGRR (SEQ ID NO: 36), как показано в табл. 3В, приведенной ниже.

Таблица 3В

MAб#	PG пептидный антиген: QGFWLEEEEAAYGWDMDFGRRSAEDEN	SEQ ID NO
MAб14	GWDMDFGRR	36
MAб11	MDFGR	34
MAб5	FGRR	33
MAб6	FGRR	33
MAб7	FGRR	33
MAб9	FGRR	33
MAб10	FGRR . . E	33
MAб12	FGRR	33
MAб23	AEDEN	35

Эксперименты по картированию эпитопов выявили, что анти-hPG MAб2 и MAб4 связывают тот же эпитоп; анти-hPG MAб1 и MAб3 связывают приблизительно тот же эпитоп; MAб17, MAб18, MAб19, и MAб20 связывают приблизительно тот же эпитоп; MAб15 и MAб16 связывают приблизительно тот же эпитоп; анти-hPG MAб5, MAб6, MAб7, MAб9 и MAб12 связывают тот же эпитоп и связывают приблизительно тот же эпитоп, что и анти-hPG MAб10; и анти-hPG MAб11 и MAб14 связывают приблизительно тот же эпитоп.

Специфические воплощения N-терминальных анти-PG антител, полезных в способах и наборах, описанных в данной заявке, включают антитела, которые связывают эпитоп, включающий остатки 10-14 hPG (SEQ ID NO: 28), остатки 9-14 hPG (SEQ ID NO: 29), остатки 4-10 hPG (SEQ ID NO: 30), остатки 2-10 hPG (SEQ ID NO: 31) или остатки 2-14 hPG (SEQ ID NO: 32).

Специфические воплощения С-терминальных анти-PG антител, полезных в способах и наборах, описанных в данной заявке, включают антитела, которые связывают эпитоп, включающий остатки 71-74 hPG (SEQ ID NO: 33), остатки 69 - 73 hPG (SEQ ID NO: 34), остатки 76 - 80 hPG (SEQ ID NO: 35), или остатки 67-74 hPG (SEQ ID NO: 36).

N-терминальные и С-терминальные анти-hPG антитела, полезные в способах и наборах, описанных в данной заявке, в дополнение к тем, которые обеспечиваются в табл. 2А и 2В, могут быть идентифицированы в конкурентных анализах связывания с типичными MAб 1-23, или с другими эталонными антителами, которые связывают N- или С-терминальные эпитопы, как будет описано более подробно в разделе, приведенном ниже.

Как также описано в заявках '329 и '041, не все анти-hPG антитела, даже те, которые демонстрируют высокую степень специфичности и аффинности для hPG, нейтрализуют биологическую активность hPG. Например, несмотря на то, что анти-hPG MAб14 связывает hPG со значением K_D приблизительно 6 пМ, оно не ингибировало, по крайней мере, при исследуемых концентрациях, рост клеток колоректального рака в анализе *in vitro*, в то время как другие анти-hPG моноклональные антитела демонстрировали значительную ингибиторную активность (см., например, пример 7 заявки '329). В то время как оба как не-

нейтрализующее, так и нейтрализующее антитело, которые, в частности, связывают hPG, являются полезными для диагностических способов и способов мониторинга, описанных в данной заявке, анти-hPG антитела, полезные для терапевтических способов, будут демонстрировать нейтрализующую активность.

Как используется в данной заявке, "нейтрализующее анти-hPG антитело" представляет собой анти-hPG антитело, которое обеспечивает статистически значимое снижение количества живых клеток LS174T в исследуемом образце, обработанном с помощью анти-hPG антитела по сравнению с контрольным образцом, обработанным с помощью неспецифического антитела. Специфический анализ для оценки способности какого-либо конкретного анти-hPG антитела нейтрализовать hPG описывается в примере 3. Те анти-hPG антитела, которые демонстрируют, по крайней мере, приблизительно 50% снижение количества живых клеток в этом анализе, предполагаются как особенно полезные в предотвращении желудочно-кишечного рака, включая CRC, несмотря на то, что анти-hPG антитела, демонстрирующие более низкие уровни нейтрализующей активности, например статистически значимое снижение 40, 30, 20, 15%, или даже 10%, количества живых клеток в этом анализе, предполагаются как такие, которые обеспечивают терапевтические преимущества.

В соответствии с этим, в некоторых воплощениях, например, терапевтических воплощениях, полезные анти-hPG антитела являются нейтрализующими. Как раскрыто в заявках '329' и '041', способность анти-hPG моноклонального антитела быть нейтрализующим не является зависимой от эпитопа, как N-терминальные, так и C-терминальные анти-hPG моноклональные антитела демонстрируют нейтрализующую активность в анализа с клетками колоректального рака, несущими мутацию в гене APC. Таким образом, в некоторых специфических воплощениях нейтрализующие анти-hPG антитела представляют собой N-терминальные нейтрализующие анти-hPG антитела. В других воплощениях нейтрализующие анти-hPG антитела представляют собой C-терминальные нейтрализующие анти-hPG антитела.

Аффинность какого-либо специфического анти-hPG антитела не является критической. Однако при некоторых применениях антитела, демонстрирующие аффинности, по крайней мере, приблизительно 1 мкМ, могут быть предпочтительными. Для терапевтических применений аффинность, по крайней мере, приблизительно 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1, 0,01, 0,001 нМ или даже больше, может быть желательной. Измеренные аффинности анти-hPG моноклональных антител, идентифицированных в табл. 2А и 2В, колеблются от 10^{-6} до 10^{-12} М.

Таблица 4

Моноклональное антитело	Аффинность (измеренное значение К _d)
Анти-hPG MAб 1	2,5 мкМ ($2,5 \times 10^{-6}$ М)
Анти-hPG MAб 2	185 нМ ($1,85 \times 10^{-7}$ М)
Анти-hPG MAб 3	6,4 нМ ($6,4 \times 10^{-9}$ М)
Анти-hPG MAб 4	3,5 нМ ($3,5 \times 10^{-9}$ М)
Анти-hPG MAб 5	13 пМ ($1,30 \times 10^{-11}$ М)
Анти-hPG MAб 6	0,6 нМ ($6,38 \times 10^{-10}$ М)
Анти-hPG MAб 7	58 пМ ($5,84 \times 10^{-11}$ М)
Анти-hPG MAб 8	0,1 нМ ($1,08 \times 10^{-10}$ М)
Анти-hPG MAб 10	3,6 нМ ($3,62 \times 10^{-9}$ М)
Анти-hPG MAб 11	0,3 нМ ($3,12 \times 10^{-10}$ М)
Анти-hPG MAб 12	0,4 нМ ($4,43 \times 10^{-10}$ М)
Анти-hPG MAб 13	0,6 нМ ($6,12 \times 10^{-10}$ М)
Анти-hPG MAб 14	6,8 пМ ($6,86 \times 10^{-12}$ М)
Анти-hPG MAб 15	0,2 нМ ($2,11 \times 10^{-10}$ М)
Анти-hPG MAб 16	0,2 нМ ($2,78 \times 10^{-10}$ М)
Анти-hPG MAб 17	8,3 нМ ($8,29 \times 10^{-9}$ М)
Анти-hPG MAб 18	1,2 нМ ($1,24 \times 10^{-9}$ М)
Анти-hPG MAб 19	0,7 нМ ($7,79 \times 10^{-10}$ М)
Анти-hPG MAб 20	0,2 нМ ($2,47 \times 10^{-10}$ М)
Анти-hPG MAб 21	3,9 нМ ($3,90 \times 10^{-9}$ М)
Анти-hPG MAб 22	5 нМ ($4,94 \times 10^{-9}$ М)
Анти-hPG MAб 23	0,4 мкМ ($3,99 \times 10^{-7}$ М)

Анти-PG моноклональное антитело, обладающее аффинностью, особенно приемлемой для конкретного желаемого применения, может быть легко выбрано из них, или получено, или сконструировано при использовании различных иммуногенов, последовательностей участка, определяющего комплементарность (CDR), последовательностей вариабельной тяжелой (V_H) и вариабельной легкой (V_L) цепи анти-hPG антител, описанных в данной заявке. Аффинность какого-либо конкретного анти-PG моноклонального антитела может быть определена при использовании методик, хорошо известных в данной области техники или описанных в данной заявке, таких, как, например, анализы ELISA, изотермальная титрационная калориметрия (ИТС), ВΙΑсог, или анализы флуоресцентной поляризации. Специфический анализ обеспечивается в примере 4.

Как указано в табл. 2А и 2В, были идентифицированы некоторые N-терминальные и C-терминальные моноклональные анти-hPG антитела. Все эти антитела являются специфическими для hPG, и все, за исключением MAб14, демонстрируют нейтрализующую активность в анализах с клетками колоректального рака. Несколько гибридом, полезных для получения антител, были депонированы 6

октября 2010 г. в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) в соответствии с Будапештским договором. Наименования гибридом, которые продуцируют анти-hPG MAb1-23, и регистрационные номера этих задепонированных гибридом, присвоенные коллекцией, обеспечиваются в табл. 2А и 2В. В дополнение, для некоторых из этих антител были определены переменные легкие цепи (V_L), V_L участки, определяющие комплементарность (CDR) и V_H CDR. Эти аминокислотные последовательности и сокращенное наименование, которое используется для ссылки на них в заявке, также обеспечиваются в табл. 2А и 2В. Кроме того, для нескольких антител были определены аминокислотные последовательности их переменных тяжелых цепей (V_H), переменных легких (V_L), участки, определяющие комплементарность (CDR) V_L и CDR V_H . Эти аминокислотные последовательности и сокращенная номенклатура, используемая для ссылки на них в описании, также обеспечиваются в табл. 2А и 2В. Кратко, мышиные переменные домены тяжелой и легкой цепей обозначаются в данной заявке как mV_H и mV_L , после чего приводится номер соответствующего моноклонального антитела, например, mV_H :3 и mV_L :3 для переменной легкой и переменной тяжелой цепей анти-hPG MAb3, соответственно. Подобно этому, человеческие переменные домены тяжелой и легкой цепей обозначаются в данной заявке как hV_H и hV_L , после чего приводится номер соответствующего моноклонального антитела. Три CDR переменной тяжелой цепи и три CDR переменной легкой цепи обозначаются как V_H CDR 1, 2 или 3, и V_L CDR 1, 2 или 3 соответственно, после чего следует номер специфического анти-hPG моноклонального антитела. Например, V_H CDR 1 MAb3 обозначается как V_H CDR 1.3 и V_L CDR 1 MAb3 обозначается как V_L CDR 1.3. V_H CDR 2 MAb3 обозначается как V_H CDR 2.3, и V_L CDR 2 MAb3 обозначается как V_L CDR 2.3.

Предполагается, что соответствующие CDR и/или V_H и V_L цепи анти-hPG моноклональных антител, которые связывают приблизительно одинаковые эпитопы, могут быть взаимно заменены с получением анти-hPG моноклональных антител, полезных в способах и наборах, описанных в данной заявке. Например, как указано выше, типичные анти-hPG моноклональные антитела MAb5 и MAb6 связывают один и тот же эпитоп. Анти-hPG моноклональное антитело может быть сконструировано так, что включает в своей V_L цепи различные комбинации V_L CDR этих двух антител, и/или в своей V_H цепи различные комбинации V_H CDR этих двух антител. В качестве специфического неограничивающего примера для иллюстрации различных возможных комбинаций, такое антитело может включать в своей V_L цепи CDR 1 и 2 MAb5 (V_L CDR 1.5 и V_L CDR 2.5 соответственно) и CDR 3 MAb6 (V_L CDR 3.6), и в своей V_H цепи, CDR 1 MAb6 (V_H CDR 1.6) и CDR 2 и 3 MAb5 (V_H CDR 2.5 и V_H CDR 3.5 соответственно). Аминокислотные последовательности CDR антител (которые являются также известными как гиперпеременные участки), вырабатываемых гибридомами, которые были задепонированы, могут быть получены при использовании традиционных средств.

Как является известным в области техники, аминокислотное положение/очерченный границами гиперпеременный участок антитела может варьировать в зависимости от контекста и различных определений, известных в уровне техники. Некоторые положения в рамках переменной домена могут рассматриваться как гибриды гиперпеременных положений в том, что эти положения могут подразумеваться как такие, которые находятся в рамках гиперпеременного участка в соответствии с одним набором критериев, в то время как подразумеваются как такие, которые находятся за пределами гиперпеременного участка в соответствии с другим набором критериев. Одно или более из этих положений может также обнаруживаться в удлиненных гиперпеременных участках. Заявка обеспечивает антитела, включающие модификации в этих гибридных гиперпеременных положениях. Переменный домен нативных тяжелой и легкой цепей каждый включает четыре FR участка, главным образом, путем приобретения β -складчатой конфигурации, связанной тремя CDR, которые образуют петлю, соединяющую, а, в некоторых случаях, формирующую, часть β -складчатой структуры. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости с CDR из других цепей с помощью FR участков, которые осуществляют свой вклад в образование сайта целевого связывания антитела (смотри Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987).

Как используется в данной заявке, нумерация аминокислотных остатков иммуноглобулина осуществляется в соответствии с системой нумерации аминокислотных остатков иммуноглобулина Kabat и др., если не указано другое.

Со ссылкой на табл. 2А специфические воплощения N-терминальных анти-hPG антител, полезных в способах и наборах, описанных в данной заявке, включают, но без ограничения таковыми, следующие:

(a) антитела, имеющие V_L CDRs, которые соответствуют по последовательности V_L CDRs MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 или MAb20, и V_H CDRs, которые соответствуют по последовательности V_H CDRs MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 или MAb20;

(b) антитела, имеющие V_L CDRs и V_H CDRs, которые соответствуют по последовательности V_L и V_H CDRs MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 или MAb20;

(c) антитела, в которых:

(i) V_L CDR 1 является выбранным из QSIVHSNGNTY (" V_L CDR 1.3"; SEQ ID NO: 4), QSLVHSSGVTY (" V_L CDR 1.4"; SEQ ID NO: 10), QSLLDSDGKTY (" V_L CDR 1.16"; SEQ ID NO: 50) и

SQHRITYT ("V_L CDR 1.19"; SEQ ID NO: 51);

(ii) V_L CDR 2 является выбранным из KVS ("V_L CDR 2.3" или "V_L CDR 2.4"; SEQ ID NO: 5), LVS ("V_L CDR 2.16"; SEQ ID NO: 53) и VKKDGS ("V_L CDR 2.19"; SEQ ID NO: 54);

(iii) V_L CDR 3 является выбранным из FQGSHPVPT ("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) и GVGDAIKGQSVFV ("V_L CDR 3.19"; SEQ ID NO: 58);

(iv) V_H CDR 1 является выбранным из GYIFTSYW ("V_H CDR 1.3"; SEQ ID NO: 1), GYTFSSSW ("V_H CDR 1.4"; SEQ ID NO: 7), GYTFSTYY ("V_H CDR 1.16"; SEQ ID NO: 39) и GYSITSDYA ("V_H CDR 1.19"; SEQ ID NO: 40);

(v) V_H CDR 2 является выбранным из 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) и ISFSGYT ("V_H CDR 2.19"; SEQ ID NO: 44); и

(vi) V_H CDR 3 является выбранным из TRRDSPQY ("V_H CDR 3.3"; SEQ ID NO: 3), AT-DGNYDWFAY ("V_H CDR 3.4" SEQ ID NO: 9), TRGGYYPFDY ("V_H CDR 3.16"; SEQ ID NO: 47) и REV-NYGDSYHFDY ("V_H CDR 3.19"; SEQ ID NO: 48);

(d) антитела, имеющие V_L, который соответствует по последовательности V_L MAб1, MAб2, MAб3, MAб4, MAб15, MAб16, MAб17, MAб18, MAб19 или MAб20, и V_H, который соответствует по последовательности V_H MAб1, MAб2, MAб3, MAб4, MAб15, MAб16, MAб17, MAб18, MAб19 или MAб20; и

(e) антитела, имеющие V_L и V_H, которые соответствуют по последовательности V_L и V_H MAб1, MAб2, MAб3, MAб4, MAб15, MAб16, MAб17, MAб18, MAб19 или MAб20.

Со ссылкой на табл. 2B специфические воплощения С-терминальных анти-hPG антител, полезных в способах и наборах, описанных в данной заявке, включают, но без ограничения таковыми, следующие:

(a) антитела, имеющие V_L CDRs, которые соответствуют по последовательности V_L CDRs MAб5, MAб6, MAб7, MAб8, MAб9, MAб10, MAб11, MAб12, MAб13, MAб14, MAб21, MAб22 или MAб23, и V_H CDRs, которые соответствуют по последовательности V_H CDRs MAб5, MAб6, MAб7, MAб8, MAб9, MAб10, MAб11, MAб12, MAб13, MAб14, MAб21, MAб22 или MAб23;

(b) антитела, имеющие V_L CDRs и V_H CDRs, которые соответствуют по последовательности V_L и V_H CDRs MAб5, MAб6, MAб7, MAб8, MAб9, MAб10, MAб11, MAб12, MAб13, MAб14, MAб21, MAб22 или MAб23;

(c) антитела, в которых:

(i) V_L CDR 1 является выбранным из KSLRHTKGITF ("V_L CDR 1.8"; SEQ ID NO: 49) и QSLLDSDGKTY ("V_L CDR 1.13"; SEQ ID NO: 50);

(ii) V_L CDR 2 является выбранным из QMS ("V_L CDR 2.8"; SEQ ID NO: 52) и LVS ("V_L CDR 2.13"; SEQ ID NO: 53);

(iii) V_L CDR 3 является выбранным из AQNLELPLT ("V_L CDR 3.8"; SEQ ID NO: 55) и WQGTH-FPQT ("V_L CDR 3.13"; SEQ ID NO: 56);

(iv) V_H CDR 1 является выбранным из GFTFTTYA ("V_H CDR 1.8"; SEQ ID NO: 37) и GFIFSSYG ("V_H CDR 1.13"; SEQ ID NO: 38);

(v) V_H CDR 2 является выбранным из ISSGGTYT ("V_H CDR 2.8"; SEQ ID NO: 41) и INTFGDRT ("V_H CDR 2.13"; SEQ ID NO: 42) и

(vi) V_H CDR 3 является выбранным из ATQGNYSLDF ("V_H CDR 3.8"; SEQ ID NO: 45) hRGTGTY ("V_H CDR 3.13"; SEQ ID NO: 46);

(d) антитела, имеющие V_L, который соответствует по последовательности V_L MAб5, MAб6, MAб7, MAб8, MAб9, MAб10, MAб11, MAб12, MAб13, MAб14, MAб21, MAб22 или MAб23, и V_H, который соответствует по последовательности V_H MAб5, MAб6, MAб7, MAб8, MAб9, MAб10, MAб11, MAб12, MAб13, MAб14, MAб21, MAб22 или MAб23; и

(e) антитела, имеющие V_L и V_H, которые соответствуют по последовательности V_L и V_H, которые соответствуют по последовательности V_L и V_H MAб5, MAб6, MAб7, MAб8, MAб9, MAб10, MAб11, MAб12, MAб13, MAб14, MAб21, MAб22 или MAб23.

Как будет оценено квалифицированными специалистами в данной области техники, анти-hPG антитела, полезные в диагностических способах, могут иметь любое происхождение, включая, например, от млекопитающего (например, человека, примата, грызуна, козы или кролика), от животного, отличного от млекопитающего, или быть химерными по своей природе (иметь происхождение от более чем одного вида). Антитела, приемлемые для терапевтических применений у животных, включая людей, предпочтительно имеют происхождение от тех же видов, для лечения которых они предназначаются, или были модифицированы или сконструированы для того, чтобы быть неиммуногенными или иметь сниженную иммуногенность у животного, которого подвергают лечению. Специфический класс анти-hPG антител, полезных для терапевтических применений у людей, представляет собой класс гуманизированных антител, которые обсуждаются более подробно ниже. Анти-hPG антитела, полезные в способах и наборах, описанных в данной заявке, могут также быть или иметь происхождение от любого изотипа, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. Анти-hPG антитела, предназначенные для терапевтических применений, предпочтительно являются та-

кими IgG изотипа.

В некоторых воплощениях анти-hPG антитела, полезные для терапевтических способов, описанных в данной заявке, являются гуманизированными. В общем случае, гуманизированные антитела включают существенно все или по крайней мере один и типично два, вариабельных домена, в которых все или существенно все CDR участки соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или существенно все каркасные участки являются таковыми с консенсусными последовательностями человеческого иммуноглобулина, и могут обозначаться как "CDR-привитые." Гуманизированное антитело может также включать, по крайней мере, часть константного участка иммуноглобулина (Fc), типично такие с консенсусной последовательностью человеческого иммуноглобулина. Способы гуманизации антител, включая способы конструирования гуманизированных антител, являются хорошо известными в области техники. См., например, Lefranc и др., 2003, *Dev. Contr. Immunol.* 27: 55-77; Lefranc и др., 2009, *Nucl. Acids Res.* 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, *Mol. Biotechnol.* 40: 101-111; Riechmann и др., 1988, *Nature* 332:323-7; патенты США №№ 5530101, 5585089, 5693761, 5693762 и 6180370, которые относятся к Queen и др., EP239400; PCT публикация WO 91/09967; патент США № 5225539; EP 592106; EP 519596; Padlan, 1991, *Mol. Immunol.* 28: 489-498; Studnicka и др., 1994, *Prot. Eng.* 7:805-814; Roguska и др., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 969-973; и патент США № 5565332, раскрытие которых является введенным в данную заявку в своей целостности.

Гуманизированные варианты антител, имеющих CDR последовательности, соответствующую CDR нечеловеческих анти-hPG антител, включая в качестве примера и без ограничения, различные N-терминальные анти-hPG моноклональные антитела, которые обеспечиваются в табл. 2А, и различные С-терминальные анти-hPG моноклональные антитела, которые обеспечиваются в табл. 2В, могут быть получены при использовании этих хорошо известных способов. Прогнозируемые последовательности для гуманизированных V_L и V_H цепей выбранных анти-hPG антител обеспечиваются в табл. 2А и 2В. Специфические примеры гуманизированных антител включают антитела, включающие:

- (a) какие-либо три V_L CDRs и какие-либо три V_H CDRs, раскрытые в данной заявке;
- (b) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 21, и вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 22;
- (c) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 23, и вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 24;
- (d) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 75, 77 и 79, и вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 76 и 78;
- (e) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 80 и 82 и вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 81 и 83;
- (f) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 84, 86 и 88, и вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 85, 8 и 89; и
- (g) вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 90, 92 и 94, и вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 91, 93 и 95.

Как будет признано квалифицированными специалистами, анти-hPG антитела, обладающие свойствами специфического связывания, такими, как способность к связыванию специфического эпитопа, представляющего интерес, могут быть легко получены при использовании различных антигенов и иммуногенов, описанных в данной заявке, и будут подвергаться анализу на их способность конкурировать за связывание hPG с эталонным антителом, которое представляет интерес. Любое из анти-hPG антител, описанных в данной заявке, может использоваться как эталонное антитело в таком конкурентном анализе. Специфический анализ, полезный для оценки способности антитела конкурировать за связывание hPG с биотинилированным эталонным анти-hPG антителом, которое представляет интерес, обеспечивается в примере 5.

При проведении исследования конкуренции антитела между эталонным анти-hPG антителом и любым исследуемым антителом (вне зависимости от видов или изотипа), следует сначала пометить эталонное антитело с помощью метки, которая определяется либо непосредственно, например, с помощью радиоизотопа или флуорофора, или опосредованно, например, с помощью биотина (является способной к определению посредством связывания с флуоресцентно-меченным стрептавидином) или фермента (ферментативной реакции), для того, чтобы позволить осуществить последующую идентификацию. В этом

случае меченное референтное анти-hPG антитело (в фиксированных или повышающихся концентрациях) инкубируют с помощью известного количества hPG, образующего комплекс hPG:меченное анти-hPG антитело. Немеченное исследуемое антитело потом прибавляют к комплексу. Измеряют интенсивность комплексированной метки. Если исследуемое антитело конкурирует с меченым эталонным анти-hPG антителом за hPG путем связывания с перекрывающимся эпитопом, то интенсивность комплексированной метки будет снижаться по сравнению с контрольным экспериментом, который осуществляют при отсутствии исследуемого антитела.

Многочисленные способы для осуществления анализов конкурентного связывания являются известными и могут быть адаптированы для получения результатов, сравнимых с такими для анализа, описанного выше и в примере 5.

Считается, что антитело конкурирует за связывание hPG с эталонным анти-hPG антителом, и таким образом, считается таким, которое связывает приблизительно тот же или перекрывающийся эпитоп hPG, что и эталонное анти-hPG антитело, если оно снижает связывание эталонного анти-hPG антитела с hPG в конкурентном анализе связывания, и в частности, конкурентном анализе связывания примера 24, по крайней мере, на 50%, при концентрации исследуемого антитела в интервале 0,01-100 мкг/мл (например, 0,01, 0,08, 0,4, 2, 10, 50 или 100 мкг/мл или другая концентрация в пределах указанного интервала), несмотря на то, что более высокие уровни снижения, например 60, 70, 80, 90 или даже 100%, могут быть желательными.

Средние специалисты в данной области техники смогут оценить, что в некоторых случаях, например, в диагностических случаях и в случае мониторинга, может быть желательным метить анти-PG антитела. Такие метки являются полезными для определения и количественной оценки. Приемлемые метки являются хорошо известными в области техники, и могут быть "непосредственными" в том, что они непосредственно наблюдаются или определяются (например, флуорофоры или радиоизотопы) или "опосредованными" в том, что они взаимодействуют с чем-либо еще, что обеспечивает получение наблюдаемого или определяемого сигнала (например, фермент, который воздействует на субстрат с образованием определяемого сигнала, или связывающая молекула, такая, как биотин, который связывает меченную стрептавидином молекулу). Многочисленные системы для мечения, а также средства для мечения антител с помощью них, которые являются известными в области техники, предполагаются для применения в данной заявке.

Несмотря на то, что различные анти-hPG антитела, полезные в способах, описанных в данной заявке, были представлены с помощью антитела полной длины, квалифицированные специалисты смогут оценить, что связывающие фрагменты, или суррогатные сконструированные антитела или такие, которые имеют происхождение от антитела полной длины или связывающих фрагментов, могут также использоваться. Приемлемые фрагменты, суррогаты и тому подобное включают, но без ограничения таковы: Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, vIgG, scFv фрагменты и сурротела. Если не указано другое, то термин "антитело", как используется в данной заявке, является предназначенным для включения всех форм молекул антитела и "антителоподобных" суррогатных молекул, включая одноцепочечные антитела, сурротела и связывающие фрагменты. Антитела, имеющие структуры, типичные для существующих в природе антител, обозначаются в данной заявке как "нативные антитела."

7.7 Способы получения анти-PG антител

Анти-PG антитела, полезные в способах, описанных в данной заявке, могут быть получены при использовании стандартных, хорошо известных способов. Для экспрессии анти-PG антител, полезных в способах, описанных в данной заявке, ДНК, которые кодируют частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, встраивают в экспрессионные векторы так, что гены являются оперативно связанными с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. В этом контексте термин "оперативно связанный" является предназначенным для понимания того, что ген антитела является лигированным в вектор, так, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в пределах вектора служат для его предписанной функции регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимыми с используемой для экспрессии хозяйской клеткой. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть встроены в отдельные векторы или, более типично, оба гена встраивают в один и тот же экспрессионный вектор.

Гены антитела встраивают в экспрессионный вектор с помощью стандартных способов (например, путем лигирования комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора или лигирования тупых концов в случае, если отсутствуют сайты рестрикции). Перед встраиванием последовательностей легкой или тяжелой цепей анти-PG антитела экспрессионный вектор может уже нести последовательности константного участка антитела. Например, один подход для превращения последовательностей V_H и V_L анти-PG антитела в полноразмерные гены антитела заключается во встраивании их в экспрессионные векторы, которые уже кодируют константные участки тяжелых цепей и константные участки легких цепей, соответственно, так, что V_H сегмент является оперативно связанным с C_H сегментом (ами) в пределах вектора, а V_L сегмент является оперативно связанным с C_L сегментом в пределах вектора. Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать

сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из хозяйской клетки. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор, так, что сигнальный пептид является связанным в-рамке с аминоконцевым концом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный пептид (то есть, сигнальный пептид из белка, отличного от иммуноглобулина).

Дополнительно к генам цепей антитела рекомбинантные экспрессионные векторы в соответствии с описанием несут последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в хозяйской клетке. Термин "регуляторная последовательность" является предназначенным для включения промоторов, энхансеров и других элементов контроля экспрессии (например, сигналов полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности являются описанными, например, у Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Квалифицированные специалисты в данной области техники смогут оценить то, что конструирование экспрессионного вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор хозяйской клетки, которую подвергают трансформации, уровень экспрессии желаемого белка и т.д. Приемлемые регуляторные последовательности для экспрессии в хозяйской клетке млекопитающего включают вирусные элементы, которые направляют высокие уровни белковой экспрессии в хозяйских клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV) (такие как промотор/энхансер CMV), обезьяньего вируса 40 (SV40) (такие, как промотор/энхансер SV40), аденовирусов, (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и полиомы. Для дополнительного описания вирусных регуляторных элементов и их последовательностей, смотри, например, патент США № 5168062, который относится к Stinski, патент США № 4510245, который относится к Bell и др., и патент США № 4968615, который относится к Schaffner и др.

Дополнительно к генам цепей антитела и регуляторным последовательностям рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести дополнительные последовательности, такие, как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в хозяйских клетках (то есть, источники репликации) и гены селективного маркерного гена. Ген селективного маркерного гена способствует селекции хозяйских клеток, в которые этот вектор был введен (См., например, Патент США №№ 4399216, 4634665 и 5179017, которые все относятся к Axel и др.). Например, типично ген селективного маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким, как G418, пуромин, бластицидин, гигромицин или метотрексат, хозяйской клетке, в которую был введен вектор. Приемлемые гены селективного маркера включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в DHFR^r хозяйских клетках с селекцией/амплификацией при использовании метотрексата) и ген neo (для G418 селекции). Для экспрессии тяжелых и легких цепей экспрессионный(ые) вектор(ы), кодирующие тяжелые и легкие цепи, трансфицировали в хозяйскую клетку с помощью стандартных методик. Различные формы термина "трансфекция" является предназначенным для того, чтобы охватывать широкое разнообразие методик, которые обычно используются для введения экзогенной ДНК в прокариотические или эукариотических хозяйские клетки, например, электропорация, липофекция, преципитация, опосредованная фосфатом кальция, DE-AE-декстраном и тому подобное.

Является возможным экспрессировать антитела, описанные в данной заявке, либо в прокариотических, либо в эукариотических хозяйских клетках. В некоторых воплощениях, экспрессию антитела осуществляют в эукариотических клетках, например, хозяйских клетках млекопитающего, для оптимальной секреции правильно собранного и иммунологически активного антитела. Типичные хозяйские клетки млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител в соответствии с описанием включают клетки яичника китайского хомячка (CHO клетки) (включая DHFR^rCHO клетки, описанные у Urlaub и Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220, которые используются с DHFR селективным маркером, например, так, как описано у Kaufman и Sharp, 1982, *Mol. Biol.* 159: 601-621), миеломные NS0 клетки, COS клетки, 293 клетки и SP2/0 клетки. Когда рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие гены антитела, вводят в хозяйские клетки млекопитающих, антитела получают путем культивирования хозяйских клеток в течение периода времени, достаточного для того, чтобы позволить осуществить экспрессию антитела в хозяйских клетках или секрецию антитела в культуральную среду, в которой выращивают хозяйские клетки. Антитела могут быть извлечены из культуральной среды при использовании стандартных способов очистки белка. Хозяйские клетки могут также использоваться для получения частей интактного антитела, таких, как F_{ab} фрагменты или scF_v молекулы. Является понятным, что вариации указанной выше процедуры находятся в пределах настоящей заявки. Например, является желательным трансфицировать хозяйскую клетку с помощью ДНК, кодирующей либо тяжелую цепь, либо легкую цепь (или обе) анти-PG антитела, описанного в данной заявке.

Методика рекомбинантной ДНК может также использоваться для удаления некоторой части или всей ДНК, кодирующей какую-либо одну из них, либо обе легкую и тяжелую цепи, которые не являются необходимыми для связывания с PG. Молекулы, которые экспрессируются из таких укороченных молекул ДНК, также являются полезными в способах, описанных в данной заявке.

Для рекомбинантной экспрессии анти-PG антитела хозяйская клетка может быть совместно тран-

фицирована с помощью двух экспрессионных векторов, где первый вектор кодирует полипептид, имеющий происхождение тяжелой цепи, а второй вектор кодирует полипептид, имеющий происхождение легкой цепи. Типично, каждый из этих двух векторов содержит отдельный селективный маркер. Альтернативно, может использоваться один вектор, который кодирует полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи.

Анти-PG антитела могут также быть получены с помощью химического синтеза (например, при использовании способов, описанных в *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2-ое изд., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, 111.). Вариантные антитела также могут быть получены при использовании бесклеточных методов (См., например, Chu и др., 2001, *Biochemia No. 2* (Roche Molecular Biologicals)).

После того, как анти-PG антитело получено с помощью рекомбинантной экспрессии или при использовании методов синтеза, оно может быть очищено с помощью любого способа, известного в области техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной хроматографии, аффинной, в частности, при использовании аффинности для PG после селекции с использованием белка А или белка G, и эксклюзионной колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости, или с помощью стандартной методики для очистки белка. Кроме того, анти-PG антитела или их связывающие фрагменты могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данной заявке или иным образом известными в области техники для того, чтобы способствовать очистке.

8. Примеры

8.1 Пример 1. Количественная оценка уровней PG в плазме и сыворотке крови

Уровни PG в плазме или сыворотке крови могут быть традиционно определены при использовании следующего анализа. Планшеты на 96 ячеек покрывали с помощью 0,5-10 мкг/мл С-терминального анти-hPG антитела, например кроличьего С-терминального анти-hPG поликлонального антитела или С-терминального анти-hPG антитела, описанного в данной заявке, и потом инкубировали в течение ночи. Планшеты трижды промывали в смеси PBS-Твин (0,05%) и блокировали при использовании 2% (вес./об.) обезжиренного сухого молока в PBS-Твин (0,05%). Отдельно готовили исследуемые образцы, контрольные образцы (чистый образец или негативный по PG образец крови или сыворотки), и от приблизительно 5 пМ ($0,5 \times 10^{-11}$ М) до приблизительно 0,1 нМ (1×10^{-10} М) эталонного стандартного hPG (лиофилизированный hPG, разведенный в негативной по PG плазме или сыворотке) в приемлемом разбавителе (например, PBS-Твин 0,05%). Образцы инкубировали на покрытых планшетах в течение 2-4 ч при 37°C, или альтернативно от 12 до 16 ч при 21°C. После инкубации планшеты трижды промывали с помощью PBS-Твин (0,05%) и инкубировали с 0,001-0,1 мкг/мл N-терминального анти-hPG антитела или N-терминального анти-hPG моноклонального антитела, описанного в данной заявке, слитого с пероксидазой хрена (HRP) (смотри Nakane и др., 1974, *J. Histochem. Cytochem.* 22(12): 1084-1091) в течение 30 мин при 21°C. Планшеты трижды промывали в PBS-Твин (0,05%) и прибавляли субстрат HRP в течение 15 мин при 21°C. Реакцию останавливали путем прибавления 100 мкл 0,5М серной кислоты и осуществляли измерения оптической плотности при 405 нМ. Уровни hPG исследуемого образца определяли путем сравнения со стандартной кривой, построенной из измерений, полученных с эталонным стандартом hPG.

8.2 Пример 2. Анализ ELISA для оценки специфичности анти-hPG антитела

Специфичность анти-hPG антител может быть традиционно определена при использовании ELISA анализов, как описано ниже. Планшеты на 96 ячеек инкубировали в течение ночи при 4°C с приемлемой(ыми) концентрацией(ями) исследуемого полипептида (например, 25 и 50 нг рекомбинантного человеческого PG, и 50 и 250 нг СТФР или других продуктов, имеющих происхождение от гена гастрина) в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), после чего ячейки трижды промывали промывочным раствором (PBS и 0,1% Твин-20) и потом инкубировали в течение 2 ч при 22°C с 100 мкл блокирующего раствора (PBS, 0,1% Твин-20, 0,1% бычьего сывороточного альбумина или гидролизата казеина) на ячейку. После блокирования ячейки трижды промывали и прибавляли антитело, которое подвергается анализу (исследуемое антитело). 100 мкл исследуемого антитела (при концентрации от 0,3 до 1 нг/мл) в PBS и 0,1% Твин-20 прибавляли к каждой ячейке. Потом планшеты инкубировали в течение 2 ч при 22°C, после чего раствор исследуемого антитела отбрасывали и заменяли, после этапа промывания (3×100 мкл промывочного раствора, как указано выше) с помощью блокирующего раствора, содержащего вторичное антитело, прибавляли козье анти-мышинное IgG (Fc) антитело, слитое с пероксидазой хрена. Через 1 ч инкубации со вторичным антителом 100 мкл раствора субстрата (например, Fast OPD или О-фенилендиамин дигидрохлорид, доступный от Sigma-Aldrich Co., приготовленный в соответствии с инструкциями производителя) прибавляли к каждой ячейке и инкубировали в темноте в течение 20 мин при 22°C. Реакцию останавливали путем прибавления 50 мкл 4N серной кислоты и определяли количество катализованного субстрата путем измерения оптической плотности при (O.D.) 492 нм. Превращение субстрата является пропорциональным количеству первичного (исследуемого) антитела, связанного с антигеном. Эксперименты проводили в двукратной повторности, и измерения OD выстраивали как функцию концентрации антигена. Исследованные антитела считали высоко специфическими для PG, если измеренное значение O.D. составляло от 0,2 до 1,5 для hPG и не существовало статистически зна-

чимого сигнала выше фона с СТФР или каким-либо другим пептидом, имеющим происхождение от гена гастрина, где фон представлял собой среднее значение сигнала от контрольных ячеек, содержащих только PBS.

8.3 Пример 3. Анализ для оценки нейтрализующей активности анти-hPG антитела

Специфический тест для оценки, является ли специфическое анти-hPG антитело нейтрализующим, может быть осуществлен так, как описано ниже. LS174Т клетки высевали в планшет на 6 ячеек при концентрации приблизительно 50000 клеток на ячейку. Клетки потом подвергали обработке с 12-часовыми интервалами в течение 48 ч с помощью исследуемого анти-hPG антитела или контрольного антитела при концентрациях антитела приблизительно 5 мкг/мл. Исследуемое антитело определяется как нейтрализующее в анализе, если количество клеток, обработанных с помощью исследуемого антитела, демонстрирует статистически значимое снижение по крайней мере 10% в отношении количества выживших клеток по сравнению с количеством клеток, обработанных с помощью контроля, неспецифического антитела, при использовании двустороннего критерия Манна-Уитни (с различиями, которые считаются достоверными тогда, когда $p < 0,05$). Общее количество клеток подвергали корректировки с учетом количества клеток в начале периода обработки, которое обозначалось как T_0 .

8.4 Пример 4. Анализ для оценки аффинности анти-hPG антитела

Константы аффинности анти-hPG антител могут измеряться при использовании методики Proteon (BioRad) в соответствии с Nahshol и др. (2008) *Analytical Biochemistry* 383: 52-60, которая является введенной в данную заявку в качестве ссылки в своей целостности. Кратко, для мышинных анти-PG антител анти-мышинное IgG антитело (50 мкг/мл) сначала наносили на сенсорный чип, убеждаясь, что определяемый чипом сигнал после введения антитела находится в интервале от 10,000 до 11,500 единиц ответа (RU). Потом вводили мышинное анти-hPG антитело, которое представляет интерес (исследуемое антитело) (при типичной концентрации 30 мкг/мл). Если исследуемое антитело связывается достаточно, то будет наблюдаться дополнительный сигнал по крайней мере 500 RU. Процесс связывания между исследуемым антителом и hPG потом осуществляли путем введения варьирующих концентраций hPG, например 200, 100, 50, 25 и 12,5 нМ, и определения уровня ассоциации. Типично некоторые каналы были доступными для исследуемого множества антител параллельно в одном эксперименте, делая возможным анализ связывания единственного исследуемого антитела при различных концентрациях hPG параллельно. Один канал будет заполняться мышинным моноклональным антителом, которое не является специфическим для hPG, в качестве контрольного для неспецифического связывания, а другие каналы будут заполняться буфером для разведения, взятым отдельно в качестве базовой линии для фонового сигнала. В общем случае никакого связывания не определяют в канале, в который вводится неспецифическое мышинное антитело. Антитела, которые демонстрируют высокий уровень ассоциации в анализе, что может приводить к насыщению захваченного моноклонального антитела hPG, могут анализироваться против более низких концентраций hPG (50, 25, 12,5, 6,25 и 3,125 нМ), позволяя осуществлять более точное измерение.

Константы аффинности (K_D) подсчитывают как соотношение между константой диссоциации (k_d) и константой ассоциации (k_a). Экспериментальные значения могут быть подтверждены путем анализа статистически релевантного подобия между экспериментальными кривыми на основе измерений связывания и теоретических профилей.

Константы аффинности неммышинных анти-hPG антител могут быть оценены в подобном формате при использовании IgG, специфических для видов происхождения анти-hPG исследуемого антитела.

8.5. Пример 5. Анализ для оценки конкурентного связывания с эталонным анти-hPG антителом

Специфический анализ для оценки, конкурирует ли антитело, которое представляет интерес (исследуемое антитело), за связывание hPG с биотинилированным эталонным анти-hPG антителом, может осуществляться так, как описано ниже. Планшеты на 96 ячеек покрывали с помощью иммобилизованного анти-hPG антитела (поликлональное или моноклональное антитело, узнающее N- или C-терминальный участок hPG, который отличается от эпитопа, который узнается биотинилированным эталонным анти-hPG антителом), при концентрации, которая является выбранной в пределах интервала 1-10 мкг/мл, в течение ночи при 4°C (от 0,1 до 1 мкг/ячейка). После блокирования с помощью блокирующего буфера (0,1% Твин-20, 0,1% BSA в PBS) в течение 2 ч при 22°C, прибавляли рекомбинантный hPG при концентрации, которая колеблется от 10 пМ до 1 нМ (от 10 до 1000 пг/ячейка), и инкубировали в течение 2 ч при 22°C. После этого прибавляли биотинилированное эталонное анти-hPG антитело (или смесь, содержащую биотинилированное эталонное анти-hPG антитело), вместе с повышающимися концентрациями немеченного исследуемого антитела и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. После промывания для удаления несвязанного антитела определение связанного меченного эталонного анти-hPG антитела осуществляли путем инкубации смеси с 50 нг/мл страптавидин-HRP в течение 1 ч при 22°C, после чего проводили инкубацию с хемиллюминисцентным субстратом для пероксидазы хрена в течение 5 мин при 22°C и потом осуществляли количественную оценку относительных световых единиц (RLU) в люминометре. Анализы осуществляли в двукратной повторности.

Антитела, которые конкурируют с эталонным анти-hPG антителом, ингибируют связывание эталонного антитела с hPG. Антитело, которое связывается с существенно тем же эпитопом или с перекры-

вающимся эпитопом, что и эталонное антитело, существенно снижает (например, по крайней мере, на 50%) количество связанного эталонного анти-hPG антитела, как становится очевидным с помощью снижения наблюдаемых RLU.

Высокое контрольное значение получают из контрольного эксперимента, который осуществляется путем инкубации меченного эталонного антитела с рекомбинантным hPG без исследуемого антитела. Низкое контрольное значение получают из контрольного эксперимента, который осуществляется путем инкубации меченного эталонного антитела с рекомбинантным hPG в присутствии избыточных концентраций немеченного эталонного антитела (немеченное эталонное антитело, таким образом, конкурирует с меченым антителом за связывание с hPG). Способность исследуемого антитела конкурировать с эталонным анти-hPG антителом потом определяют путем инкубации меченного эталонного антитела с рекомбинантным hPG в присутствии повышающихся концентраций немеченного исследуемого антитела.

В тестовом анализе значительное снижение наблюдаемых уровней RLU в присутствии исследуемого антитела свидетельствует о том, что исследуемое антитело узнает существенно тот же эпитоп, что и эталонное анти-hPG антитело.

Ингибирование связывания может выражаться как ингибирование константы, или K_i , которая поддается в соответствии со следующей формулой:

$$K_i = IC_{50} / (1 + ([\text{концентрация эталонного анти-hPG Ab}] / K_D \text{ эталонного анти-hPG Ab}))$$

где "IC₅₀" представляет собой концентрацию исследуемого антитела, которая обеспечивает 50% снижение связывания эталонного антитела,

K_D эталонного анти-hPG Ab представляет собой константу диссоциации эталонного анти-hPG антитела, меру его аффинности для hPG.

Полезные исследуемые антитела, которые конкурируют с эталонным анти-hPG антителом (например одним из анти-hPG антител, описанных в данной заявке), будут типично иметь значения K_i , которые колеблются от 10 пМ до 100 нМ при условиях проведения анализа, описанных в данной заявке.

8.6. Пример 6. Определение сывороточного PG в образцах от пациентов с семейным аденоматозным полипозом

Этот пример показывает, что повышенные уровни сывороточного PG могут коррелировать с присутствием полипов у индивидуумов с FAP.

8.6.1. Способы

Уровни сывороточного PG количественно оценивали так, как описано в примере 1 в образцах, полученных от 6 пациентов с семейным аденоматозным полипозом. Образцы сыворотки получали от пациентов со следующими характеристиками:

два индивидуума (A и B), оба старше 55, ранее подвергались колэктомии, регулярно подвергаются мониторингу с помощью эндоскопии, у которых не определяли никаких полипов с момента осуществления хирургического удаления;

один индивидуум (C), в возрасте 30, ранее подвергался колэктомии и последующей хирургии для удаления дополнительных полипов. Индивидуум подвергался хирургическому вмешательству за несколько месяцев до взятия образца крови;

один индивидуум (D), в возрасте 27, ранее подвергался колэктомии, имеет многочисленные полипы в тонком кишечнике (но не рак) на момент взятия образца крови;

один индивидуум (E), в возрасте 52, ранее подвергался колэктомии имеет многочисленные полипы в прямой кишке на момент взятия образца крови;

один индивидуум (F), в возрасте 10, имеет многочисленные колоректальные полипы на момент взятия образца крови.

8.6.2. Результаты

Результаты, представленные в табл. 5, приведенной ниже, выражали как среднее значение концентрации PG \pm стандартное отклонение (pM):

Таблица 5

Пациент	Среднее значение концентрации PG (pM) \pm станд. откл.
A	6,9 \pm 3,3
B	0,0
C	0,0
D	167,5 \pm 43,0
E	351,85 \pm 96,0
F	233 \pm 11,3

Результаты свидетельствуют о том, что уровни PG являются особенно повышенными у индивидуумов, которые имеют большое количество полипов на момент взятия образца. Для сравнения, пациенты, которые подвергались хирургии, демонстрировали очень низкие или неопределяемые уровни PG.

8.7. Пример 7. Определение сывороточного PG в образцах, полученных от пациентов с предраковыми спорадическими аденоматозными полипами

Этот пример демонстрирует, что более 25% индивидуумов со спорадическим аденоматозным поли-

позом имели повышенные уровни сывороточного PГ.

8.7.1. Способы

Уровни PГ измеряли в двух различных наборах образцов: первый набор образцов получали от двадцати пяти индивидуумов, которые имели многочисленные аденоматозные полипы, подобное тому количеству, которое обнаруживается у субъектов с FAP, и второй набор образцов из банка плазмы крови, которые собирали у 104 индивидуумов в возрасте от 45 до 65 лет. Уровни прогастрина в плазме крови подвергали количественной оценке при использовании анализа ELISA так, как описано выше в примере 1.

8.7.2. Результаты

23% (12/52) исследуемых субъектов с аденоматозными полипами имели уровни прогастрина, превышающие 50 пМ. Для сравнения, 16,3% (17/104) субъектов из группы, которая включала индивидуумов, образцы крови которых получали из банка крови, имели уровни PГ, превышающие 50 пМ. Медицинская история индивидуумов, образцы которых содержались в банке крови, была неизвестной. Здоровые индивидуумы имели низкие уровни PГ, типично такие, которые не превышали 50 пМ. См., например, Siddheshwar и др., 2001, "Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin или glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma," *Gut* 48: 47-52. Уровни, превышающие 50 пМ, как предполагается, являются показательными для лежащей в основе патологии.

Почти четверть индивидуумов, у которых были обнаружены полипы, также имели повышенные уровни PГ. Это является последовательным с наблюдением, что приблизительно 20% спорадических аденоматозных полипов развивается в злокачественные опухоли, трансформация, как предполагается, сопровождается повышенными уровнями PГ. Таким образом, повышенные уровни PГ при наличии аденоматозных полипов могут служить в качестве полезного показателя при идентификации пациентов для последующего медицинского наблюдения или для профилактического анти-PГ лечения.

В отношении образцов из банка плазмы крови можно сказать, что, вероятно, некоторые или все образцы из банка крови с уровнями PГ, превышающими 50 пМ, являются такими, которые получены от индивидуумов с лежащими в основе состояниями, которые вызывают повышенные уровни PГ. Применение контрольных образцов, подвергнутых приемлемому скринингу, будет, вероятно, демонстрировать более высокое отличие между процентом индивидуумов со спорадическими аденоматозными полипами и такими без полипов, которые имеют уровни PГ, превышающие 50 пМ.

8.8. Пример 8. Анти-PГ композиции предотвращают развитие опухоли в мышинной модели FAP

Этот пример демонстрирует способность анти-hPГ антител предотвращать образование опухолей *in vivo*.

8.8.1. Способы

Трансгенных мышей, которые несут мутацию в аллеле гена Adenomatous Poliposis Coli ("APC"), подобно такой, которая была обнаружена у индивидуумов с семейным аденоматозным полипозом (FAP), подвергали обработке при использовании анти-hPГ антитела. Эти мыши, которые обозначаются как APCΔ14 мыши, спонтанно развивали опухоли в своем кишечнике тогда, когда второй аллель (дикого типа) APC утрачивался при механизме "потери гетерозиготности" (LOH), (Colnot и др., 2004, "Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers," *Lab Investigation* 84: 1619-1630). Первые определяемые опухоли можно было обнаружить в возрасте приблизительно 2 месяца, и к 3,5 месяцев, количество опухолей, в общем случае, составляло приблизительно 15-20. Эти опухоли были продемонстрированы как такие, которые продуцируют прогастрин.

Мышей APCΔ14 в возрасте четырех месяцев подвергали обработке два раза в неделю в течение шести недель либо с помощью контрольного поликлонального антитела -антисыворотки на основе кроличьего анти-человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch (ссылка № 309-005-0089) - или анти-PГ поликлонального антитела, образованного против (1) N-терминального пептида и (2) C-терминального пептида, как описано у Hollande и др., WO 07/135542, путем интраперитонеальной инъекции при дозе 9 мг/кг.

Мышей взвешивали один раз в неделю. В конце периода шестинедельного режима лечения фотографировали их кишечники и подсчитывали общее количество опухолей. Было шесть мышей в группе лечения и контрольной группе. Генотипирование идентифицировало двух мышей из контрольной группы, которые не несли прогнозируемой гетерозиготной APC мутации, и они были исключены из эксперимента.

8.8.2. Результаты

Результаты являются представленными ниже в табл. 6. Мыши, которых подвергали лечению при использовании контрольного антитела, демонстрировали в общей сложности 125 опухолей, со средним значением 31,25 опухоли на мышь. Мыши, которых подвергали лечению при использовании анти-PГ, имели в общей сложности 46 опухолей или в среднем 7,6 опухолей на мышь. Это отличие является статистически значимым (критерий Манна-Уитни, P=0,0095).

Таблица 6

Лечение (количество мышей)	Количество опухолей на мышь					
	Контрольное РАb (4)	23	48	28	26	
Анти-hPG РАb (6)	2	16	15	9	2	2

Результаты свидетельствуют о том, что количество опухолей, обнаруженное у четырех из шести животных, которых подвергали лечению при использовании антипрогастриновых антител, уменьшалось ниже среднего количества 15-20 опухолей, которые в среднем обнаруживали у APCΔ14 мышей в возрасте 3,5 месяцев. См. табл. 6, приведенную выше. Эти данные свидетельствуют о том, что лечение с помощью антипрогастриновых антител предотвращает развитие новых опухолей у этих животных.

Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, приведенные в данной заявке, являются введенными в качестве ссылки в своей целостности для всех целей до такой степени, как если бы каждая индивидуальная публикация, патент, патентная заявка и другой документ были индивидуально указаны для включения в качестве ссылки для всех целей. Несмотря на то, что различные специфические воплощения были проиллюстрированы и описаны, будет понятным, что могут быть внесены различные изменения без отступления от духа и объема данного(ых) изобретения(ий).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ профилактики желудочно-кишечного рака у пациентов, предрасположенных к развитию аденоматозных полипов, причем APC ген указанных пациентов содержит мутацию, включающей введение эффективного количества N-концевого или C-концевого моноклонального антитела к человеческому прогастрину (анти-чПГ), причем N-концевое анти-чПГ моноклональные антитела вырабатываются против иммуногена, включающего пептид с последовательностью SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 25) и C-концевое анти-чПГ моноклональное антитело вырабатывается против иммуногена, включающего пептид с последовательностью QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 7), и выбирается из группы состоящей из:

а) антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 1.3 (SEQ ID NO: 1), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 2.3 (SEQ ID NO: 2) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 3.3 (SEQ ID NO: 3), и легкую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 1.3 (SEQ ID NO: 4), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 2.3 (SEQ ID NO: 5) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 3.3 (SEQ ID NO: 6);

б) антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 1.4 (SEQ ID NO: 7), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 2.4 (SEQ ID NO: 8) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 3.4 (SEQ ID NO: 9), и легкую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 1.4 (SEQ ID NO: 10), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 2.4 (SEQ ID NO: 5) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 3.4 (SEQ ID NO: 11);

в) антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 1.16 (SEQ ID NO: 39), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 2.16 (SEQ ID NO: 3) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 3.16 (SEQ ID NO: 7), и легкую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 1.16 (SEQ ID NO: 50), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 2.16 (SEQ ID NO: 53) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 3.16 (SEQ ID NO: 57);

г) антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 1.19 (SEQ ID NO: 40), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 2.19 (SEQ ID NO: 44) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 3.19 (SEQ ID NO: 48), и легкую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 1.19 (SEQ ID NO: 51), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 2.19 (SEQ ID NO: 54) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 3.19 (SEQ ID NO: 58);

д) антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 1.8 (SEQ ID NO: 37), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 2.8 (SEQ ID NO: 41) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 3.8 (SEQ ID NO: 45), и легкую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 1.8 (SEQ ID NO: 49), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 2.8 (SEQ ID NO: 52) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR

3.8 (SEQ ID NO: 55); и

е) антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 1.13 (SEQ ID NO: 38), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 2.13 (SEQ ID NO: 42) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_H CDR 3.13 (SEQ ID NO: 46), и легкую цепь вариабельной области, в которой CDR 1 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 1.13 (SEQ ID NO: 50), CDR 2 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 2.13 (SEQ ID NO: 53) и CDR 3 содержит аминокислотную последовательность V_L CDR 3.13 (SEQ ID NO: 56).

2. Способ по п.1, в котором анти-hPG моноклональное антитело является химерным анти-hPG моноклональным антителом.

3. Способ по п.1, в котором анти-hPG моноклональное антитело представляет собой гуманизованное анти-hPG моноклональное антитело.

4. Способ по п.1, в котором указанное антитело выбирают из группы, состоящей из антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области с последовательностью SEQ ID NO: 21 и легкую цепь вариабельной области с последовательностью SEQ ID NO: 22;

антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области с последовательностью SEQ ID NO: 23 и легкую цепь вариабельной области с последовательностью SEQ ID NO: 24;

антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 79, и легкую цепь вариабельной области с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 78;

антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 82, и легкую цепь вариабельной области с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 83;

антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 88, и легкую цепь вариабельной области с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 89; и

антитела, содержащего тяжелую цепь вариабельной области с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92 и SEQ ID NO: 94, и легкую цепь вариабельной области с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93 и SEQ ID NO: 95.

5. Способ по п.1, в котором N-терминальное анти-hPG моноклональное антитело связывает эпитоп, включающий последовательность, выбранную из группы, которая состоит из DAPLG (SEQ ID NO: 28), PDAPLG (SEQ ID NO: 29), PRSQPD (SEQ ID NO: 30), WKPRSQPD (SEQ ID NO: 31) и WKPRSQPDAPLG (SEQ ID NO: 32).

6. Способ п.1, в котором C-терминальное анти-hPG моноклональное антитело связывает эпитоп, включающий последовательность, выбранную из группы, которая состоит из FGRR (SEQ ID NO: 33), MDFGR (SEQ ID NO: 34), AEDEN (SEQ ID NO: 35) и GWMDFGRR (SEQ ID NO: 36).

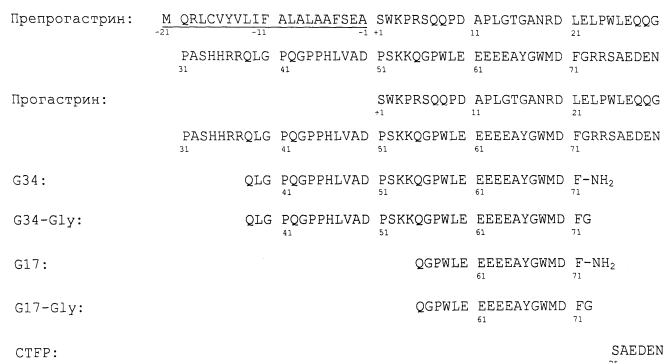
7. Способ по п.1, где субъект имеет семейный аденоматозный полипоз.

8. Способ по п.1, где субъект имеет спорадический аденоматозный полипоз.

9. Способ по п.1, в котором анти-hPG моноклональное антитело вводится дополнительно к хирургическому удалению ткани, включающей аденоматозные полипы.

10. Способ по п.1, в котором анти-hPG моноклональное антитело вводится дополнительно к химиотерапии.

11. Способ по п.1, в котором анти-hPG моноклональное антитело вводится дополнительно к лечению с помощью нестероидного противовоспалительного агента.



Фиг. 1

036967

mV_H MAб3

```
gag gtt cag ctc cag cag tct 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
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
```

Фиг. 2А

mV_L MAб3

```
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
```

Фиг. 2В

036967

mV_H MAb4

```
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
aag ggc aag gcc aca ttc act gca gac aca tcc tcc gac aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg cta ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcc gtc tat tac tgt 288
Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gca act gat ggt aat tat gac tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act 336
Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
ctg gtc act gtc tct gca 354
Leu Val Thr Val Ser Ala
115
```

Фиг. 2С

mV_L MAb4

```
gat ctt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Leu Val 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 ctt gta cac agt 96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
agt gga gtc acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Ser Gly Val Thr Tyr Leu His 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 gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
aca cat gtt cct ccc acg ttc ggc tgc 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
```

Фиг. 2D

036967

mV_H MAb8

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 ctc 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 351
Leu Thr Val Ser Ser
115

Фиг. 2E

mV_L MAb8

gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

aca tcc gct tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc cga cat act 96
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
20 25 30

aaa ggc atc act ttt ttg tat tgg tat ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cct cag ctc ctg att tat cag atg tcc aac ctt gcc tca gga gtc cca 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt agc agt ggg tca gga act gat ttc aca ctg aga atc 240
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg ggt gtt tat tac tgt gct caa aat 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 336
Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Фиг. 2F

036967

mV_H MAb13

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct gga ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt agc tat 96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtt cgc cag tct cca gac agg agg ctg gag ttg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Asp Arg Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

gca agt att aat act ttt ggt gat aga acc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

ctg caa atg acc agt ctg aag tct gag gac aca gcc att tat tac tgt 288
Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga ggg acc gga acc tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc 336
Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

tcc tca 342
Ser Ser

Фиг. 2G

mV_L MAb13

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

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

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

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

gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe 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 ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

Фиг. 2H

036967

mV_H MAb16

cag gtc caa ctg cag cag tct 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

tca 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

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

Фиг. 2I

mV_L MAb16

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

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

Фиг. 2J

036967

mV_H MAb19

```
gat gtg cag ctt cag gag tgc 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

tct ctg tcc ctc aca tgc act gtc act ggc tac tca atc acc agt gat 96
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

tat gcc tgg aat tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag tgg 144
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

atg ggc tac ata agc ttc agt ggt tac act agt tac aac cca tct ctc 192
Met Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

aaa agt cga atc tct gtc act cgg gac aca tcc agg aac caa ttc ttc 240
Lys Ser Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

ctc cag ttg act tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat tac tgt 288
Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga gag gtc aac tat ggg gac tcc tac cac ttt gac tac tgg ggc 336
Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

caa ggc acc att gtc aca gtc tcc tca 363
Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser
115 120
```

Фиг. 2К

mV_L MAb19

```
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 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
```

Фиг. 2Л

036967

hV_H MAb3

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

Val Ser Ser
115

Фиг. 3А

hV_L MAb3

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

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

Фиг. 3В

036967

hV_H MAb4

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

Фиг. 3С

hV_L MAb4

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

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

Фиг. 3D

036967

hV_H MAb8(a)

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

Фиг. 3E

hV_L MAb8(a)

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

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

Фиг. 3F

036967

hV_H MAb8(b)

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 Asn 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

Фиг. 3Г

hV_L MAb8(b)

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

Lys Gly Ile Thr Phe Leu Asp 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

Фиг. 3И

036967

hV_H MAb8(c)

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
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

Фиг. 3I

hV_L MAb8(c)

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
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

Фиг. 3J

036967

hV_H MAb13(a)

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

Фиг. 3К

hV_L MAb13(a)

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

Фиг. 3Л

036967

hV_H MAb13(b)

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

Фиг. 3М

hV_L MAb13(b)

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

Фиг. 3N

036967

hV_H MAb16(a)

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

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

Фиг. 30

hV_L MAb16(a)

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

Фиг. 3P

036967

hV_H MAb16(b)

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

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

Фиг. 3Q

hV_L MAb16(b)

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

Фиг. 3R

036967

hV_H MAb16(c)

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

Фиг. 3S

hV_L MAb16(c)

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

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

Фиг. 3T

036967

hV_H MAb19(a)

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

Фиг. 3U

hV_L MAb19(a)

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

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

Фиг. 3V

036967

hV_H MAb19(b)

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

Фиг. 3W

hV_L MAb19(b)

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

Фиг. 3X

036967

hV_H MAb19(c)

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

Фиг. 3Y

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

Фиг. 3Z



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2