

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041823**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.07

(21) Номер заявки
201791876

(22) Дата подачи заявки
2010.10.15

(51) Int. Cl. **C07K 16/26** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ПРОГАСТРИНУ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/252,625**

(32) **2009.10.16**

(33) **US**

(43) **2018.01.31**

(62) **201200597; 2010.10.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЛЕ ЛАБОРАТУАР СЕРВЬЕ;
ИНСТИТУ НАСЪОНАЛЬ ДЕ
ЛА-САНТЕ Э ДЕ ЛА-РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ (ИНСЕРМ); САНТР
НАСЪОНАЛЬ ДЕ ЛА-РЕШЕРШ
САЙНТИФИК (СНРС) (FR)**

(72) Изобретатель:

**Паннекен Жюли, Будье Лора, Жубер
Доминик, Олланд Фредерик (FR)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2006032980**

WO-A2-2007135542

WO-A1-2008076454

**LARRICK J.W. ET AL.: "POLYMERASE
CHAIN REACTION USING MIXED PRIMERS:
CLONING OF HUMAN MONOCLONAL**

**ANTIBODY VARIABLE REGION GENES
FROM SINGLE HYBRIDOMA CELLS",
BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO.
NEW YORK, US, vol. 7, 1 September 1989
(1989-09-01), p. 934-938, XP000400715, ISSN:
0733-222X, DOI: 10.1038/NBT0989-934, the whole
document**

**LARRICK J.W. ET AL.: "RAPID CLONING
OF REARRANGED IMMUNOGLOBULIN
GENES FROM HUMAN HYBRIDOMA
CELLS USING MIXED PRIMERS AND
THE POLYMERASE CHAIN REACTION",
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH
COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC.
ORLANDO, FL, US, vol. 160, № 3, 15 May 1989
(1989-05-15), p. 1250-1256, XP000293053, ISSN:
0006-291X, the whole document**

**TOLEIKIS L. ET AL.: "CLONING SINGLE-
CHAIN ANTIBODY FRAGMENTS (SCFV)
FROM HYBRIDOMA CELLS", METHODS IN
MOLECULAR MEDICINE, HUMANA PRESS,
TOTOWA, NJ, US, vol. 94, 1 January 2004
(2004-01-01), p. 447-458, XP008045594, ISSN:
1543-1894, the whole document**

**HORNBECK P. ET AL.: "Enzyme-linked
immunosorbent assays (ELISA)", CURRENT
PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,
WILEY, vol. Chapter 11, 1 May 2001
(2001-05-01), page UNIT11.2, XP002477297,
DOI: 10.1002/0471142727.MB1102S15, the whole
document**

(57) Изобретение является направленным на моноклональные антитела к прогастрину, их фрагменты, композиции, включающие моноклональные антитела к прогастрину, и способы получения и применения моноклональных антител к прогастрину и их композиций. Изобретение является направленным на лечение колоректального рака с помощью моноклональных антител к прогастрину и композиций, включающих моноклональные антитела к прогастрину или их фрагменты. Изобретение является также направленным на определение прогастрина, включая диагностику колоректального рака и мониторинг эффективности противораковой терапии у субъектов, страдающих от колоректального рака.

B1**041823****041823****B1**

1. Перекрестные ссылки на родственные заявки

Эта заявка заявляет приоритет в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) временной заявки № 61/252625, поданной 16 октября 2009 г., содержание которой является введенным в данную заявку в качестве ссылки в своей целостности.

2. Указание относительно финансируемого из федерального бюджета исследования

Отсутствует.

3. Стороны соглашения о совместном исследовании

Отсутствуют.

4. Ссылки на списки последовательностей, таблицы или компьютерные программы

В данную заявку включен список последовательностей.

5. Область техники, к которой относится изобретение

Данная заявка является направленной среди прочего на моноклональные антитела к прогастрину, композиции и способы для создания таких антител, а также способы применения таких антител, например, в диагностике и/или лечении колоректального рака.

6. Предпосылки создания изобретения

Колоректальный рак (CRC) представляет собой основной вопрос здравоохранения, он поражает более чем 1000000 человек ежегодно и вызывает свыше 500000 смертей ежегодно. CRC представляет собой вторую основную причину смерти от рака. Только в Соединенных Штатах в 2009 г., как сообщалось, было выявлено 147000 новых случаев и свыше 49900 смертей по причине CRC. Существует три формы CRC: спорадический CRC; наследственный неполипозный рак толстой кишки (HNPCC), который вызывается эмбриональными мутациями в генах репарации ошибок ДНК, и семейный аденоматозный полипоз (FAP), который вызывается эмбриональными мутациями в APC гене. Спорадический CRC насчитывает приблизительно 85% случаев, в то время как HNPCC насчитывает приблизительно 5%, а FAP составляет приблизительно 1% (Heyer и др., 1999, Oncogene, 18:5325-5333).

Клинический контроль CRC типично вовлекает хирургическое удаление опухолей, которое часто сопровождается химиотерапией. В настоящее время приблизительно 50% пациентов с CRC умирают в течение пяти лет от момента диагностики. Отсутствие надежных анализов для скрининга и неэффективность существующих в настоящее время способов терапии являются основными причинами высокого коэффициента смертности. Существует насущная необходимость в новых клинических подходах для диагностики CRC, а также в способах лечения, эффективных в отношении опухолей колоректального рака, которые обладают минимальным побочным воздействием на другую здоровую ткань.

7. Краткое изложение сущности изобретения

Данная заявка обеспечивает композиции и способы, полезные для диагностики и/или лечения колоректального рака (CRC) у животных, включая людей. Данная заявка основывается на разнообразных изобретениях, частично на открытиях изобретателями моноклональных антител, которые специфически связываются с прогастрином (PG), например прогастрином человека (hPG), полипептидом, который вырабатывается CRC опухолевыми клетками и который демонстрирует антипролиферативные свойства в *in vitro* моделях CRC.

Прогастрин вырабатывается клетками колоректальной опухоли и предполагается как такой, который стимулирует пролиферацию этих клеток путем запуска пути сигнальной трансдукции, который блокирует нормальные процессы дифференциации клеток, включая те процессы, которые приводят к смерти клеток. Истощение транскриптов гена гастрин, который кодирует прогастрин, индуцирует клеточную дифференциацию и запрограммированную клеточную смерть в опухолевых клетках в моделях *in vitro* и *in vivo* CRC, снижая пролиферацию опухолевых клеток. Не имея желания связываться с какой-либо теорией этого процесса, можно сказать, что посредством связывания PG анти-hPG антитела предполагаются как такие, которые блокируют или ингибируют способность прогастрина взаимодействовать с его сигнальным(и) партнером(ами). Это, в свою очередь, ингибирует пути сигнальной трансдукции в клетках колоректального рака, что в противном случае будет приводить к пролиферации.

Соответственно в одном аспекте настоящее описание обеспечивает моноклональные антитела, которые специфически связываются с PG, например hPG, но не с другими продуктами гена гастрин. Со ссылкой на фиг. 1 ген гастрин транслируется в полипептид, содержащий 101 аминокислоту, называемый пре-прогастрином, который содержит сигнальную последовательность (подчеркнута), которая при отщеплении дает начало прогастрину, полипептиду из 80 аминокислот. Прогастрин, в свою очередь, расщепляется с образованием продукта из 34 аминокислот, соответствующего остаткам 38-71 прогастрина, который потом удлиняется на своем карбокситерминальном конце с помощью остатка глицина, образуя удлиненный глицином G34 ("G34-Gly"). Побочный продукт расщепления представляет собой пептид из 5 аминокислот, который называется С-терминальным фланкирующим пептидом, или СТФР, который включает остатки 75-80 прогастрина. G34-Gly потом далее расщепляется с образованием полипептида из 17 остатков, который по последовательности соответствует остаткам 55-71 прогастрина и обозначается как G17-Gly. Удаление С-терминальных глицинов G34-Gly и G17-Gly, после чего происходит С-терминальное амидирование, обеспечивает получение G34 и G17 соответственно, оба из которых являются С-терминально амидированными. Таким образом, в то время как первые 37 остатков прогастрина

являются уникальными для него (т.е. не присутствуют в продуктах его процессинга, таких как G34, G34-Gly, G17, G17-G1, или CFTP), остатки 38-80 являются также присутствующими в пост-трансляционных продуктах гена гастрина.

Заявители обнаружили, что, несмотря на то что анти-PG моноклональные антитела могут образовываться в соответствии со способами, известными специалисту в данной области техники, выбор антигена является важным. Не все антигены, которые имеют происхождение от hPG, стимулируют образование моноклональных антител, которые специфически связываются с hPG при физиологических условиях. Как описано ниже, различные антигены, используемые для стимуляции образования поликлональных антител к hPG, такие как рекомбинантный прогастрин человека полной длины (см., например, Singh WO 08/076454) и пептиды, соответствующие последним десяти аминокислотам на С-терминальном конце hPG (см., например, Hollande WO 07/135542), не вызывают выработки анти-hPG моноклональных антител. Заявители, однако, обнаружили, что антигенные N- и С-терминальные последовательности в пределах hPG последовательности могут использоваться для образования моноклональных антител, которые специфически связываются с hPG. Весьма удивительным является то, что заявители обнаружили, что не является необходимым ограничивать антигенные последовательности цепочками последовательности PG, которые являются уникальными для них, для получения моноклональных антител, которые специфически связываются с PG, а не с другими продуктами, которые имеют происхождение от гена гастрина. Пептидные антигены, имеющие последовательности, общие с другими продуктами гена гастрина, например G17, G34 и CFTP, позволяют получить моноклональные антитела, которые не только связываются с hPG, но также связываются с ним специфически.

Заявители получили моноклональные антитела при использовании антигенов, которые имеют происхождение от других участков hPG молекулы. Моноклональные анти-PG антитела, получаемые при использовании пептидного антигена, имеющего последовательность, соответствующую N-терминальному участку hPG, и/или такую, которая связывается с N-терминальным участком hPG, называются в данной заявке "N-терминальными анти-hPG моноклональными антителами". Специфический пример антигенного участка, который может использоваться для конструирования иммуногена, полезного для получения N-терминального анти-PG моноклонального антитела, соответствует остаткам 1-14 hPG: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 25). Типичные иммуногены, включая этот иммуноген, которые являются полезными в получении N-терминального анти-PG моноклонального антитела, являются описанными в табл. 1A и в разделе примеры.

Моноклональные анти-PG антитела, получаемые при использовании пептидного антигена, имеющего последовательность, соответствующую С-терминальному участку hPG, и/или ту, которая связывается с С-терминальным участком hPG, называются в данной заявке "С-терминальными анти-hPG моноклональными антителами". Специфический пример антигенного участка, который может использоваться для конструирования иммуногена, полезного для получения С-терминального анти-PG моноклонального антитела, соответствует остаткам 55-80 hPG: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 27). Типичные иммуногены, включая этот антиген, которые являются полезными в получении С-терминального анти-PG моноклонального антитела, являются описанными в табл. 1B и в разделе примеры.

Для некоторых применений является желательным иметь анти-hPG моноклональные антитела с высокой аффинностью к hPG. Для некоторых применений, таких как терапевтические применения, аффинность, которая составляет по крайней мере приблизительно 100 нМ, является желательной, несмотря на то что антитела, которые обладают большими аффинностями, например аффинностями, которые составляют по крайней мере приблизительно 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1, 0,01 нМ или даже больше, могут быть желательными. Различные типичные специфические анти-PG моноклональные антитела, раскрытые в данной заявке, демонстрируют аффинности, которые колеблются от 10^{-6} до 10^{-12} М (см. табл. 6). Анти-PG моноклональное антитело, имеющее аффинность, особенно приемлемую для конкретного желательного применения, может быть легко выбрано среди таких, или получено, или сконструировано при использовании различных иммуногенов, последовательностей участка, определяющего комплементарность (CDR), последовательностей варибельной тяжелой цепи V_H и варибельной легкой цепи V_L и способов, 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, ELISA, изотермическая титрационная калориметрия (ITC), BIAcore или анализ поляризации флуоресценции.

hPG представляет собой относительно небольшой полипептид, который содержит только 80 аминокислот в длину. Можно предположить, что любое моноклональное антитело, которое специфически связывается с hPG с относительно высокой аффинностью (например, такой, которая составляет приблизительно 10 нМ), будет препятствовать способности PG взаимодействовать с его сигнальным(и) партнером(ами) и как результат ингибировать пролиферацию CRC клеток. Однако заявители обнаружили, что не все анти-PG моноклональные антитела подвергаются нейтрализации (т.е. не все моноклональные антитела, которые связываются с PG, препятствуют или ингибируют его биологическую сигнальную активность). Кроме того, как будет обсуждаться более подробно в разделе примеры, заявители обнаружили, что некоторые анти-PG моноклональные антитела, несмотря на то что демонстрируют высокую спе-

цифичность и высокую аффинность для PG, не нейтрализуют PG. Например, анти-hPG Mab 14 связывает hPG с K_D , которая составляет приблизительно 6 пМ, но не ингибирует рост CRC клеток *in vitro*, как подробно описано в разделе примеры, представленном ниже. В то время как не-нейтрализующие моноклональные антитела, которые специфически связываются с hPG, являются полезными для диагностических целей, те анти-hPG моноклональные антитела, которые нейтрализуют PG, являются особенно приемлемыми для терапевтических применений при лечении CRC.

Как используется в данной заявке, "нейтрализующее анти-hPG моноклональное антитело" представляет собой анти-hPG моноклональное антитело, которое обеспечивает статистически значимое снижение количества живых CRC клеток в исследуемом образце, обработанном с помощью анти-hPG моноклонального антитела, по сравнению с контрольным образцом, обработанным с помощью неспецифического моноклонального антитела. Специфический анализ для оценки способности какого-либо конкретного анти-hPG моноклонального антитела нейтрализовать hPG описывается в разделе "Подробное описание", представленном ниже. Те анти-hPG моноклональные антитела, которые демонстрируют по крайней мере 50% снижение количества живых клеток в этом анализе, как предполагается, являются особенно полезными в лечении CRC, несмотря на то что анти-hPG моноклональные 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 такими, которые обеспечивают терапевтические преимущества.

В соответствии с этим в некоторых воплощениях анти-PG моноклональные антитела представляют собой нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела. Было обнаружено, что способность анти-PG моноклонального антитела нейтрализовать PG не является зависимой от эпитопа. Как представлено в разделе "Примеры", оба, как N-терминальное, так и C-терминальное, анти-PG антитела обладают нейтрализующей активностью. Таким образом, в некоторых воплощениях нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела представляют собой N-терминальные нейтрализующие антитела, в других воплощениях анти-PG моноклональные антитела представляют собой C-терминальные нейтрализующие антитела.

Картирование эпитопов выявило, что N-терминальные анти-PG моноклональные антитела не все связываются с тем же эпитопом даже в том случае, когда антигеногенез вызывается тем же иммуногеном. То же является справедливым в отношении C-терминальных анти-hPG моноклональных антител. Эпитопы, которые связываются с типичными N-терминальными и C-терминальными анти-hPG моноклональными антителами, как было идентифицировано с помощью аланинового сканирования и SPOT методики, обеспечиваются в разделе "Примеры", в табл. 8 и 9.

В некоторых воплощениях анти-hPG моноклональные антитела связываются с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность, соответствующую N-терминальной части hPG. В специфических воплощениях N-терминальные анти-hPG моноклональные антитела связываются с эпитопом, который включает 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).

В некоторых воплощениях анти-hPG моноклональные антитела связываются с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность, соответствующую части C-терминального участка hPG. В специфических воплощениях C-терминальные анти-hPG моноклональные антитела связываются с эпитопом, который включает 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).

Предполагается, что соответствующие CDR и/или V_H и V_L цепи анти-hPG моноклональных антител, которые связываются примерно с теми же эпитопами, могут быть заменены с получением анти-hPG моноклональных антител. Например, как указано в табл. 9, типичные анти-hPG моноклональные антитела Mab 5 и Mab 6 связываются с тем же эпитопом. Анти-hPG моноклональное антитело может быть сконструировано так, что будет включать в своей V_L цепочке различные комбинации CDR V_L этих двух антител и/или в своей V_H цепочке включать различные комбинации CDR V_H этих двух антител. В качестве специфического примера для иллюстрации различных возможных комбинаций такое антитело может включать в своей V_L цепи CDR 1 и 2 Mab 5 (V_L CDR 1.5 и V_L CDR 2.5 соответственно) и CDR 3 Mab 6 (V_L CDR 3.6), а в своей V_H цепи CDR 1 Mab 6 (V_H CDR 1.6) и CDR 2 и 3 Mab 5 (V_H CDR 2.5 и V_H CDR 3.5 соответственно).

Было идентифицировано несколько анти-hPG моноклональных антител, имеющих высокую специфичность и аффинность для hPG, которые демонстрируют хорошую противоопухолевую активность в *in vitro* анализах, и в некоторых случаях были определены последовательности их CDR, последовательности их V_H и V_L цепочек и/или последовательности предложенных V_H и V_L цепочек для гуманизованных вариантов. Было запатентовано также несколько гибридом. Все эти типичные анти-hPG моноклональные антитела, а также другие специфически воплощения анти-hPG моноклональных антител, полезных в различных наборах и способах, описанных в данной заявке, например моноклональные антитела, которые конкурируют за связывание PG с эталонным антителом, являются описанными более подробно в разделе "Подробное описание изобретения".

Анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с данным описанием включают антитела, ко-

которые конкурируют с референтным анти-hPG моноклональным антителом за связывание с hPG. Эталонное анти-hPG моноклональное антитело может представлять собой какое-либо одно из анти-hPG моноклональных антител, описанных в данной заявке. Неограничивающие примеры включают

антитела, включающие три CDR V_L и три CDR V_H, как описано в данной заявке;

антитела, включающие V_H цепочку и V_L цепочку, имеющие аминокислотные последовательности, такие как представлено в данной заявке;

антитела, включающие гуманизированные тяжелую и легкую цепочки полипептидов, как представлено в данной заявке;

антитела, которые вырабатываются одной из гибридом, раскрытых в данной заявке;

антитела, которые связываются с эпитопом в пределах hPG, как раскрыто в данной заявке.

Анти-PG моноклональные антитела, описанные в данной заявке, могут находиться в форме полно-размерных антител, антител с несколькими цепочками или одноцепочечных антител, фрагментов таких антител, которые селективно связывают PG (включая без ограничения Fab, Fab', (Fab')₂, Fv и scFv), суррогат (включающих конструкцию суррогата легкой цепочки), антител с одним доменом, гуманизированных антител, кемелизированных антител и подобных им. Они могут также принадлежать к любому изотипу или иметь происхождение от любого изотипа, включая, например, IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или IgM. В некоторых воплощениях анти-PG антитело представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4).

Анти-PG моноклональные антитела могут быть человеческими или нечеловеческими. Примеры анти-PG антител не-человеческого происхождения включают без ограничения такие, которые имеют происхождение от млекопитающих (например, обезьян, грызунов, коз и кролей). Анти-PG моноклональные антитела для терапевтического применения у людей предпочтительно являются гуманизированными.

В другом аспекте настоящее описание обеспечивает нуклеиновые кислоты, которые могут использоваться для получения анти-PG моноклональных антител. В данной заявке обеспечиваются нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды легкой цепочки и тяжелой цепочки иммуноглобулина для анти-hPG моноклональных антител, описанных в данной заявке, и векторы, включающие эти нуклеиновые кислоты. Дополнительно в данной заявке обеспечиваются прокариотические и эукариотические хозяйские клетки, трансформированные с помощью таких векторов, а также эукариотические хозяйские клетки, например клетки млекопитающих, сконструированные для экспрессии легкой и тяжелой цепей полипептидов анти-hPG моноклональных антител. Также обеспечиваются хозяйские клетки, способные как к экспрессии легкой и тяжелой цепей, так и к секреции моноклональных антител, описанных в данной заявке, в среду, в которой хозяйские клетки культивируются. В некоторых воплощениях хозяйская клетка представляет собой гибридому. Также обеспечиваются способы получения анти-hPG моноклональных антител путем культивирования хозяйских клеток.

Нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела, такие как анти-hPG моноклональные антитела, связывают PG и блокируют зависимую от PG передачу сигнала, что приводит к ингибированию индуцированных PG ответов CRC опухолевых клеток. В соответствии с этим также обеспечиваются способы ингибирования индуцированных PG ответов CRC клеток, которые включают репрессию клеточной дифференциации, репрессию гибели клеток и/или стимуляцию клеточной пролиферации. В общем случае способ включает контакт CRC клетки или воздействие на популяцию таких клеток нейтрализующим анти-PG моноклональным антителом в количестве, эффективном для ингибирования одного или более индуцированных PG ответов CRC клеток. Способ может осуществляться *in vitro* или *in vivo* путем введения нейтрализующего анти-hPG моноклонального антитела в окружающую среду, содержащую CRC клетки, которые могут представлять собой культуру клеток или находиться в опухоли.

Нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела, описанные в данной заявке, ингибируют зависимую от PG пролиферацию CRC опухолевых клеток, что делает их полезными терапевтическими агентами для лечения колоректального рака. В соответствии с этим также обеспечиваются фармацевтические композиции, включающие нейтрализующее анти-PG моноклональное антитело, и способы при использовании нейтрализующего анти-PG моноклонального антитела и/или фармацевтической композиции для лечения CRC. Фармацевтические композиции могут быть рецептированы для любого приемлемого пути введения, включая, например, парентеральную, подкожную или внутривенную инъекцию, и будут типично включать нейтрализующее анти-hPG моноклональное антитело и один или более приемлемых носителей, наполнителей и/или разбавителей, приемлемых для желаемого способа введения, они могут также включать другие необязательные компоненты, как будет описываться дополнительно в разделе "Подробное описание изобретения". Для терапевтического применения композиции могут быть упакованы в форме единичной дозы для простоты применения.

Способы лечения в общем случае включают введение субъекту, который нуждается в таком лечении, например субъекту, диагностированному как такой, который имеет CRC, количества нейтрализующего анти-PG моноклонального антитела и/или его фармацевтической композиции, которое является эффективным для обеспечения терапевтического преимущества. Терапевтические преимущества, описанные далее более подробно, включают любое облегчение CRC, например замедление или остановку развития CRC, снижение тяжести CRC, ингибирование роста CRC опухолей и пролиферацию CRC кле-

ток, уменьшение размера CRC опухолей и/или снижение уровней PG в сыворотке у CRC пациентов. Субъект может представлять собой человека или не-человека, включая одомашненное животное (например, кота, собаку, корову, свинью, лошадь) или неодомашненное животное. Предпочтительно анти-PG моноклональное антитело является специфическим для PG видов, которые подвергаются лечению. Например, анти-hPG антитело вводят пациенту, который представляет собой человека, собачье анти-PG антитело вводят пациенту, который представляет собой собаку, и т.п. Субъекты, для которых терапия анти-hPG моноклональными антителами является полезной, представляют собой пациентов с любой стадией развития заболевания (например, CRC стадии 0, I, II, III или IV), пациентов, которые получили CRC терапию (например, химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое удаление), или пациентов, которые получают другую терапию для лечения CRC.

Лечение с помощью анти-PG моноклональных антител, как описано в данной заявке, может сочетаться с другой терапией или осуществляться дополнительно к другой терапии. Неограничивающие примеры другой терапии для CRC включают химиотерапевтическое лечение, лучевую терапию, хирургическое удаление и терапию на основе антител, как описано в данной заявке. В специфическом примере анти-hPG моноклональные антитела вводятся в комбинации с химиотерапевтическими агентами. В другом специфическом примере анти-hPG моноклональные антитела вводятся дополнительно к хирургическому удалению. Анти-PG моноклональные антитела могут также использоваться в комбинации друг с другом.

Индивидуумы с CRC опухолями часто имеют повышенные уровни PG (например, в сыворотке крови или плазме крови). В соответствии с этим анти-hPG моноклональные антитела могут использоваться для определения уровней PG с целью диагностики CRC. Дополнительно у пациентов, которые уже были диагностированы как такие, которые имеют CRC, анти-hPG моноклональные антитела могут использоваться для отбора субъектов, приемлемых для получения анти-PG терапии, или для мониторинга эффективности лечения. Как раскрыто в данной заявке, способ диагностики колоректального рака у субъекта включает определение, будет ли количество прогастрина в образце, полученном от субъекта, например в образце крови или образце сыворотки, измеренное при использовании анти-hPG моноклонального антитела в соответствии с настоящим изобретением, выше порогового уровня. В специфическом воплощении пороговый уровень составляет 50 пМ. В некоторых воплощениях используются два анти-PG антитела: одно, которое узнает С-терминальный участок PG, и другое, которое узнает N-терминальный участок PG. В этом воплощении одно или оба N-терминальные или С-терминальные антитела представляют собой анти-PG моноклональные антитела, как описано в данной заявке. Предпочтительно используются N-терминальное и С-терминальное анти-PG моноклональные антитела. Антитела могут быть, но без необходимости, нейтрализующими.

Для целей мониторинга эффективности лечения анти-PG моноклональные антитела могут использоваться для определения, снижается ли уровень прогастрина в течение периода времени в образцах, полученных от субъекта, который подвергался лечению или подвергается лечению CRC, путем сравнения количества PG в образцах, взятых в различные моменты времени. Специфические воплощения анти-PG антитела, описанные в предыдущем абзаце, могут также использоваться в этом анализе.

Также обеспечиваются наборы, приемлемые для осуществления различных диагностических способов и мониторинга, а также других способов, описанных в данной заявке. Такие наборы будут типично включать анти-PG моноклональное антитело, как описано в данной заявке, и необязательно дополнительные анти-PG антитела и/или реагенты, приемлемые для осуществления специфического анализа. В некоторых воплощениях одно или более анти-PG антител, которые включаются в набор, являются меченными с помощью способной к определению метки, такой как флуорофор. В специфическом воплощении набор включает анти-PG антитело, которое специфически связывает N-терминальный участок PG, анти-PG антитело, которое специфически связывает С-терминальный участок PG, и необязательно реагенты, приемлемые для осуществления диагностического анализа, где N-терминальное специфическое антитело представляет собой N-терминальное антитело, которое представляет собой N-терминальное анти-PG моноклональное антитело, как описано в данной заявке, и/или С-терминальное специфическое антитело представляет собой С-терминальное анти-PG моноклональное антитело, как описано в данной заявке.

Характеристики и преимущества различных изобретений, описанных в данной заявке, будут также понятными из следующего подробного описания типичных примеров его осуществления.

8. Краткое описание фигур

Фиг. 1 обеспечивает аминокислотные последовательности пре-прогастрина, прогастрина и продуктов процессинга прогастрина, включая G34, G34-Gly, G17, G17-Gly и С-терминальный фланкирующий пептид, CTFP.

Фиг. 2 обеспечивает полипептидные и соответствующие полинуклеотидные последовательности V_H и V_L цепей для типичных мышиных анти-hPG моноклональных антител: анти-hPG MAb 3 (SEQ ID NOs: 16, 12, 17 и 13 соответственно в порядке их проявления) (фиг. 2A, 2B), анти-hPG MAb 4 (SEQ ID NOs: 18, 14, 19 и 15 соответственно в порядке проявления) (фиг. 2C, 2D), анти-hPG MAb 8 (SEQ ID NOs: 67, 59, 71 и 63 соответственно в порядке проявления) (фиг. 2E, 2F), анти-hPG MAb 13 (SEQ ID NOs: 68, 60, 72 и 64

соответственно в порядке проявления) (фиг. 2G, 2H), анти-hPG MAb 16 (SEQ ID NOs: 69, 61, 73 и 65 соответственно в порядке проявления) (фиг. 2I, 2J) и анти-hPG MAb 19 (SEQ ID NOs: 70, 62, 74 и 66 соответственно в порядке проявления) (фиг. 2K, 2L), в которых три CDR каждой цепи подчеркнуты.

Фиг. 3А-3С обеспечивает диаграммы, иллюстрирующие относительные связывающие аффинности (измеряются как поглощение при 492 нм) при увеличивающихся концентрациях антитела (мкг/мл) типичных мышиных анти-hPG моноклональных антител, MAbs 1-4 (фиг. 3А); MAbs 5-14 и 20-23 (фиг. 3В); и MAbs 3 и 15-19 (фиг. 3С).

Фиг. 4 обеспечивает диаграмму, иллюстрирующую соотношение поглощения (оптическая плотность) при 280 и 330 нм для четырех различных типичных анти-hPG моноклональных антител по сравнению с контрольным образцом бычьего сывороточного альбумина (относительные единицы).

Фиг. 5А-5С обеспечивает диаграмму, иллюстрирующую связывание 23 различных типичных мышиных анти-hPG моноклональных антител с 25 или 50 нг hPG по сравнению с только буфером (негативный контроль), 250 нг KLN (негативный контроль), и пептидами, которые происходят от гена гастрин (50 и 250 нг STFP, G17 или G17-Gly (на фигуре обозначается как "G-Gly"), как указано. Фиг. 5А демонстрирует связывание анти-hPG MAbs 1-4, фиг. 5В демонстрирует связывание анти-hPG MAbs 5-14 и 21-23 и фиг. 5С демонстрирует связывание анти-hPG MAbs 3 и 15-20.

Фиг. 6 обеспечивает диаграмму, иллюстрирующую связывание поликлонального N-терминального анти-hPG антитела с hPG при повышающихся концентрациях анти-hPG Mab 3.

Фиг. 7 обеспечивает диаграмму, иллюстрирующую пролиферацию характерных CRC линий клеток, обработанных с помощью анти-hPG моноклональных антител, таких как приведенные ниже SW480, HCT-116, LS174T, как указано, обработанных с помощью типичных анти-hPG моноклональных антител MAb 3 и MAb 4 (фиг. 7А, 7В, 7С соответственно, демонстрирующие изменение количества живых клеток в конце обработки по отношению к началу обработки (T0) с помощью антитела) или анти-hPG поликлонального антитела (фиг. 7D, 7Е, 7F соответственно, демонстрирующие изменение количества живых клеток в конце обработки по отношению к началу обработки (T0) с помощью антитела); пролиферацию CRC линии клеток SW620, подвергнутой обработке с помощью анти-hPG MAb 5-23 (фиг. 7G, демонстрирующая живые обработанные анти-hPG клетки в виде процента от количества контрольных клеток, обработанных антителом, в конце обработки по отношению к началу обработки (T0)); пролиферацию LS174T клеток, обработанных с помощью анти-hPG MAb 8, 13, 14, 16 и 19 (фиг. 7H, демонстрирующая живые обработанные анти-hPG клетки в виде процента от количества контрольных клеток, обработанных антителом, в конце обработки по отношению к началу обработки (T0)); и пролиферацию HCT-116 клеток, обработанных с помощью анти-hPG моноклональных антител MAb 8, 13, 14, 16, 19 (фиг. 7I, демонстрирующая живые обработанные анти-hPG клетки в виде процента от количества контрольных клеток, обработанных антителом, в конце обработки по отношению к началу обработки (T0)).

Фиг. 8 обеспечивает диаграмму, иллюстрирующую количество живых LS174T клеток через 48 ч после 4 обработок с помощью контрольного моноклонального антитела, анти-hPG MAb 8 (5 мкг/мл), анти-hPG MAb 8, предварительно инкубированного с hPG, контрольного антитела, предварительно инкубированного с hPG, или только hPG.

Фиг. 9 обеспечивает диаграммы, иллюстрирующие количество опухолей на мышь (фиг. 9А) и средние значения длины и ширины опухоли (фиг. 9В) у мышей, обработанных с помощью анти-hPG антитела по сравнению с контрольным поликлональным антителом.

9. Подробное описание характерных воплощений

9.1. Подробное описание.

Прогастрин (PG) был впервые идентифицирован в качестве предшественника гастрин, пептидного гормона кишечника, который стимулирует секрецию желудочного сока. Гастрин существует в виде различных молекулярных форм (G17, G34, удлинённый с помощью глицина G17, удлинённый с помощью глицина G34), которые происходят от прогастрина. См. фиг. 1. Ген гастрин кодирует продукт, состоящий из 101 аминокислоты, препрогастрин. Первое отщепление удаляет остаточный сигнальный пептид, который состоит из 21 аминокислоты (подчеркнут на фиг. 1) и приводит к образованию PG, пептида из 80 аминокислот. Известная полипептидная последовательность человеческого PG (hPG) обеспечивается в SEQ ID NO: 20. Как иллюстрируется на фиг. 1, аминокислотные остатки hPG нумеруются от 1 до 80 с крайним остатком amino, который находится в положении 1. Последовательности в пределах первых 40 аминокислот прогастрина называются "N-терминальными", в то время как последовательности, находящиеся в пределах остатков 41-80, называются "C-терминальными".

Недавние исследования показали, что уровни прогастрина повышаются у пациентов с CRC. При нормальных физиологических условиях прогастрин составляет менее 10% от секретируемых у человека пептидов. При колоректальном раке уровни прогастрина значительно повышаются как в плазме крови, так и в опухолевой ткани, возможно, в результате повышенной экспрессии гена гастрин, ассоциированной с неполным процессингом генного продукта. Одно исследование продемонстрировало значительно более высокие уровни сывороточного прогастрина у CRC пациентов по сравнению с контрольными пациентами, но не продемонстрировало никакого различия для более процессированных форм гастрин (Siddheshwar и др., 2001, Gut, 48:47-52). В проанализированных образцах CRC опухолей 80-100% образ-

цов продемонстрировало повышенные уровни PG. См., например, Ciccotosto и др., 1995, *Gastroenterology*, 109:1142-1153; Baldwin и др., 1998, *Gut*, 42:581-584; Van Solinge, 1993, *Gastroenterology*, 104:1099-1107. Роль PG при CRC была дополнительно подтверждена с помощью экспериментов, демонстрирующих что мыши, которые экспрессируют рекомбинантный человеческий PG, подвергнутые воздействия онкогена азоксиметана, имели значительно более высокое количество очагов аберрантных крипт, аденом и аденокарцином в кишечнике по сравнению с мышами дикого типа или мышами, экспрессирующими амидированные гастрины (Singh и др. 2000, *Gastroenterology*, 119:162-171).

Недавно Hollande и др. продемонстрировали, что прогастрин стимулирует путь бета катенин/Tcf4 путем репрессии ICAT, негативного регулятора пути передачи сигнала бета катенин/Tcf4, и что блокирование прогастрина приводит к *de novo* экспрессии ICAT. См. WO 2007/135542. Не имея намерения быть связанным с какой-либо теорией операции, предполагается, что блокирование пути передачи сигнала прогастрина приводит к репрессии пролиферации, индуцированной бета катенином/Tcf4, как результат повышенной экспрессии ICAT. При отсутствии непрерывной зависимой от PG передачи сигнала клеточная пролиферация ингибируется и запускается клеточная дифференциация и/или смерть клеток (включая апоптоз).

Несмотря на насущную потребность в клинических подходах к лечению и диагностике CRC подтверждение того, что PG стимулирует пролиферацию CRC опухолевых клеток, и несмотря на повышенное внимание к способам терапии для лечения рака на основе моноклональных антител на сегодняшний день отсутствуют сообщения, которые демонстрируют какое-либо моноклональное антитело, способное блокировать зависимую от PG пролиферацию опухолевых клеток, или даже связывание PG. Такие антитела, представленные в данной заявке впервые, оказались сложными для разработки. Первая проблема заключалась в том, что заявители обнаружили, что рекомбинантный человеческий прогастрин, который может использоваться для получения поликлональных анти-hPG антител, не индуцировал выработку моноклональных антител в ответ на иммуноген у исследуемых мышей. Таким образом, являлось необходимым сконструировать иммуногены при использовании только пептидных фрагментов PG для получения антитела, специфического для прогастрина, а не других продуктов гастринного гена. Даже после того как были получены клоны гибридом, образующих антитела, которые связываются с антигенным пептидом, было обнаружено, что связывание с пептидом не является прогнозируемым в отношении способности связывания PG, специфически или вообще. Как показано более подробно в примерах, приведенных ниже, многие гибридомы обеспечивали получение антител, которые связываются с PG антигенным пептидом, используемом в иммуногене, но не связываются с PG.

Настоящее описание обеспечивает анти-hPG моноклональные антитела, которые связываются не только с пептидным антигеном, против которого они направлены, но также специфически связывают hPG. Совершенно неожиданно было обнаружено, что моноклональные антитела, которые являются высоко специфическими для hPG по сравнению с их процессированным продуктом (например, G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, CTFP), получают при использовании антигенов, которые в некоторых случаях не являются уникальными для hPG, но такими, которые включают участки аминокислотной последовательности, общей с одним или более продуктов процессинга прогастрина. Кроме того, было неожиданно обнаружено, что несмотря на относительно небольшой размер hPG (80 аминокислот) не все анти-hPG моноклональные антитела и даже те, которые демонстрируют высокую степень аффинности и специфичности для hPG, нейтрализуют его биологическую активность.

Анти-hPG моноклональные антитела.

Заявители открыли пептидные антигены, полезные для получения анти-hPG моноклональных антител. Пептиды, полезные для получения анти-hPG антител в соответствии с настоящим описанием, включают специфические для прогастрина последовательности, которые не обнаружены в более процессированных формах полипептида, таких как удлиненные с помощью глицина или амидированные гастрины или CTFP, но также включают последовательности, которые обнаруживаются в процессированных формах hPG. В некоторых воплощениях анти-hPG моноклональные антитела возникают против пептидного антигена, имеющего аминокислотную последовательность, соответствующую N-терминальному участку hPG, которые обозначаются как N-терминальные анти-hPG моноклональные антитела. Типичный специфический антигенный участок, который может использоваться для конструирования иммуногена, полезного для получения N-терминального анти-PG моноклонального антитела, соответствует остаткам 1-14 hPG (SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 25)), слитым с линкерной последовательностью. В других воплощениях анти-hPG моноклональные антитела возникают против пептидного антигена, который имеет аминокислотную последовательность, соответствующую C-терминальному участку hPG, и обозначаются как C-терминальные анти-hPG моноклональные антитела. Типичный специфический антигенный участок, который может использоваться для конструирования иммуногена, полезного для получения C-терминального анти-PG моноклонального антитела, соответствует остаткам 55-80 hPG (SEQ ID NO: 27), слитым с линкерной последовательностью. См. табл. 1.

Анти-PG моноклональные антитела в соответствии с настоящим описанием связывают PG и являются полезными для его определения и изоляции из комплексных смесей. Дополнительно анти-PG моноклональные антитела в соответствии с данной заявкой являются уникально приемлемыми для терапевти-

ческих и/или диагностических применений для лечения колоректального рака. В различных воплощениях анти-hPG моноклональные антитела

- (1) специфически связывают PG в отличие от других продуктов гастринового гена;
- (2) имеют высокую аффинность для hPG;
- (3) ингибируют пролиферацию клеток колоректального рака *in vitro* и *in vivo*;
- (4) уменьшают размер и количество опухолей *in vivo*;
- (5) определяют PG в комплексных смесях, которые содержат другие пептиды, которые происходят от гена гастрина.

Ген гастрина экспрессируется и интенсивно процессируется с образованием белковых продуктов, которые играют определенные роли в нормальном гомеостазе. Прогастрин, с другой стороны, типично не определяется в системе циркуляции крови у здоровых субъектов. Моноклональные антитела в соответствии с настоящим описанием являются предназначенными для нацеливания прогастрина, но не других пептидов, которые происходят от гена гастрина. В соответствии с этим анти-hPG моноклональные антитела специфически связываются с прогастрином людей и других животных, но не с другими продуктами гастринового гена, такими как без ограничения удлиненные с помощью глицина или амидированные гастрины, или С-терминальный фланкирующий пептид (CTFP).

Специфичность анти-hPG моноклональных антител может быть определена при использовании ELISA, как описано ниже. Планшеты на 96 ячеек инкубируют 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 CTFP или с другими продуктами, имеющими происхождение от гастринового гена) в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), после чего ячейки трижды промывают с помощью промывочного раствора (PBS и 0,1% Твин-20) и потом инкубируют в течение 2 ч при 22°C с использованием 100 мкл блокирующего раствора (PBS, 0,1% Твин-20, 0,1% бычьего сывороточного альбумина или гидролизата казеина) на ячейку. После блокирования ячейки трижды промывают и прибавляют антитело, которое подвергается анализу (исследуемое антитело). 100 мкл исследуемого антитела (при концентрации 0,3-1 нг/мл) в PBS и 0,1% Твина-20 прибавляют к каждой ячейке. Потом планшеты инкубируют в течение 2 ч при 22°C, после чего раствор исследуемого антитела отбрасывают и заменяют, после этапа промывания (3×100 мкл промывочного раствора, как указывается выше), блокирующим раствором, содержащим вторичное антитело, козье анти-мышинное IgG (Fc) антитело, слитое с пероксидазой хрена. После осуществления инкубации в течение 1 ч со вторичным антителом прибавляют 100 мкл раствора субстрата (например, Fast OPD или О-фенилендиамин дигидрохлорид, которые являются доступными от Sigma-Aldrich Co., приготовленные в соответствии с инструкциями производителя) к каждой ячейке и инкубируют в темноте в течение 20 мин при 22°C. Реакцию останавливают путем прибавления 50 мкл 4N серной кислоты и определяют количество катализированного субстрата путем измерения оптической плотности (O.D.) при 492 нм. Превращение субстрата является пропорциональным количеству первичного (исследуемого) антитела, связанного с антигеном. Эксперименты осуществляют в двукратной повторности и измеренные значения OD выстраивают в виде функции, зависимой от концентрации. Исследуемые антитела рассматривают как специфические для PG, если измеренное значение O.D. составляет 0,2-1,5 для hPG и не существует статистически значимого сигнала, превышающего фон, при использовании CTFP или каких-либо других пептидов, которые имеют происхождение от гастринового гена, где фон представляет собой средний сигнал от контрольных ячеек, которые содержат только PBS.

Несколько анти-hPG моноклональных антител в соответствии с настоящим изобретением были найдены высоко специфическими. В некоторых воплощениях анти-hPG моноклональные антитела демонстрируют в 100 раз более высокую специфичность для прогастрина по сравнению с другими продуктами гастринового гена, и в таких воплощениях требуется в 100 раз больше антигена (например, удлиненного с помощью глицина или амидированного гастрина) для получения такого же связывания, которое наблюдают тогда, когда антиген представляет собой прогастрин.

Другие способы для определения связывания включают, но без ограничения таковыми, иммунофлуоресцентный метод, твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA), иммуноанализ с использованием меченного радиоактивным агентом материала (RIA), сэндвич ELISA (Monoclonal Antibody Experiment Manual (опубл. Kodansha Scientific (1987), Second Series Biochemical Experiment Course, том 5, Immunobiochemistry Research Method, опубл. Tokyo Kagaku Dojin (1986)).

Анти-hPG моноклональные антитела с высокой аффинностью для PG являются желательными как для терапевтического, так и для диагностического применения. Для некоторых применений, таких как терапевтическое применение, аффинность, которая составляет по крайней мере приблизительно 100 нМ, является желательной, несмотря на то что антитела, обладающие более высокими аффинностями, например, аффинностями, которые составляют по крайней мере приблизительно 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1, 0,01 нМ, 10, 1 пМ или даже более, являются желательными. В некоторых воплощениях моноклональные антитела специфически связываются с hPG с высокой аффинностью в интервале от приблизительно 1 пМ до приблизительно 100 нМ, или с аффинностью, которая колеблется в пределах какого-либо из указанных выше значений.

Аффинность анти-hPG моноклональных антител для hPG может быть определена при использова-

нии методик, хорошо известных в данной области техники или описанных в данной заявке, таких как, например, но не с целью ограничения, ELISA, изотермическая титрационная калориметрия (ИТС), BIAcore, Proteom или анализ поляризации флуоресцентного света.

При использовании антигенов из N- или C-терминальных участков hPG могут быть получены антитела, которые узнают различные эпитопы hPG. Эпитоп, который узнается моноклональным антителом, будет зависеть от конкретного антигена, используемого для индукции антителогенеза, и может быть картирован при использовании методик, известных специалисту в данной области техники, таких как аламиноное сканирование и SPOT анализ (см. раздел "Примеры", приведенный ниже). Например, картирование эпитопов выявляет, что анти-hPG MAb 2 и MAb 4 связываются с тем же эпитопом; анти-hPG MAb 1 и MAb 3 связываются приблизительно с одним и тем же эпитопом; MAb 17, MAb 18, MAb 19 и MAb 20 связываются приблизительно с одним и тем же эпитопом; MAb 15 и MAb 16 связываются приблизительно с одним и тем же эпитопом; анти-hPG MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb 9 и MAb 12 связываются приблизительно с одним и тем же эпитопом, что и анти-hPG MAb 10; и анти-hPG MAb 11 и MAb 14 связываются приблизительно с одним и тем же эпитопом.

Узнает ли или нет анти-hPG моноклональное антитело конкретный эпитоп, может быть определено при использовании конкурентного анализа, так как описано в данной заявке, в котором эпитоп, связываемый референтным антителом, является известным. В некоторых воплощениях анти-hPG моноклональное антитело конкурирует с эталонным антителом, которое связывается с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность, соответствующую N-терминальному участку hPG. В специфических воплощениях анти-hPG моноклональные антитела конкурируют с эталонным антителом, которое связывается с эпитопом, который включает 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). В некоторых воплощениях анти-hPG моноклональное антитело конкурирует с эталонным антителом, которое связывается с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность, соответствующую C-терминальному участку hPG. В специфических воплощениях анти-hPG моноклональные антитела конкурируют с эталонным антителом, которое связывается с эпитопом, который включает 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).

Анти-PG моноклональные антитела могут быть нейтрализующими. Не имея намерения связывать себя с теорией операции, посредством связывания PG нейтрализующие анти-hPG моноклональные антитела, как предполагается, блокируют или ингибируют его способность взаимодействовать со своим(и) сигнальным(и) партнером(ами). Это, в свою очередь, ингибирует путь сигнальной трансдукции в коло ректальных опухолевых клетках, что в ином случае приводило бы к пролиферации, сниженной дифференциации и смерти клеток. В некоторых воплощениях нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела связывают N-терминальный участок hPG. В специфических воплощениях нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела конкурируют за связывание PG с анти-hPG MAb 1, MAb 2, MAb 3, MAb 4, MAb 15, MAb 16, MAb 17, MAb 18, MAb 19 или MAb 20. В других воплощениях нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела связывают C-терминальный участок hPG. В специфических воплощениях нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела конкурируют за связывание PG с анти-hPG MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb 8, MAb 9, MAb 10, MAb 11, MAb 12, MAb 13, MAb 21, MAb 22 или MAb 23.

Специфический анализ для выявления, является ли анти-PG моноклональное антитело нейтрализующим, может осуществляться так, как описано ниже. CRC LS174T клетки высевают в планшет на 6 ячеек, как описывается в примере 7, приведенном ниже, при концентрации приблизительно 50000 клеток на ячейку. Потом клетки обрабатывают с 12-часовыми интервалами в течение 48 ч с помощью исследуемого анти-PG моноклонального антитела или контрольного моноклонального антитела, как указано в примере 7, при концентрациях антитела, которые составляют приблизительно 5 мкг/мл. Исследуемое антитело определяют как нейтрализующее в этом анализе, если количество CRC раковых клеток, подвергнутых обработке с помощью исследуемого антитела, демонстрирует статистически значимое снижение по крайней мере на 10% в количестве выживших клеток по сравнению с количеством клеток, подвергнутых обработке с помощью контрольного, неспецифического антитела, при использовании двустороннего критерия Манна-Уитни (с различиями, которые считаются значимыми тогда, когда $p < 0,05$). Общее количество клеток корректируют для количества клеток в начале периода обработки, которое обозначается как T0.

Как используется в данной заявке, антитело (Ab) относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с или является иммунологически реактивной с определенным антигеном и включает поликлональные, моноклональные, генетически сконструированные и иным образом модифицированные формы антител, включая, но без ограничения, химерные антитела, гуманизированные антитела и связывающие антиген фрагменты антитела, включая, например, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG и scFv фрагменты. В различных воплощениях анти-hPG моноклональные антитела включают весь или часть константного участка антитела. В некоторых воплощениях константный участок представляет собой изоти, выбранный из IgA (например, IgA1 или IgA2), IgD, IgE, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) и IgM.

Термин "моноклональное антитело", как используется в данной заявке, не является ограниченным антителами, которые получены при использовании гибридной технологии. Моноклональное антитело является таким, которое происходит от одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, с помощью любого средства, доступного или известного в области техники. Моноклональные антитела, полезные для настоящего изобретения, могут быть получены при использовании широкого разнообразия методик, известных в области техники, включая применение гибридных, рекомбинантных методик и способов фагового дисплея или их комбинаций. Во многих применениях настоящего изобретения, включая *in vivo* применение анти-hPG моноклональных антител у человека и *in vitro* анализы определения, могут приемлемым образом применяться химерные, приматизированные, гуманизированные или человеческие антитела.

Термин "scFv" относится к одной цепочке Fv антитела, в которой переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи из традиционного антитела были объединены с образованием одной цепочки.

Ссылка на "V_H" относится к переменному участку тяжелой цепи иммуноглобулина антитела, включая тяжелую цепь Fv, scFv или Fab. Ссылка на "V_L" относится к переменному участку легкой цепи иммуноглобулина, включая легкую цепь Fv, scFv, dsFv или Fab. Антитела (Ab) и иммуноглобулины (Ig) представляют собой гликопротеины, обладающие одинаковыми структурными характеристиками. В то время как антитела демонстрируют связывающую специфичность по отношению к специфической мишени, иммуноглобулины включают как антитела, так и другие антителоподобные молекулы, которые не имеют целевой специфичности. Нативные антитела и иммуноглобулины обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины весом приблизительно 150000 дальтон, которые состоят из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (V_H), после которого следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен (V_L) на одном конце и константный домен на своем другом конце.

Анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с данной заявкой включают участки, определяющие комплементарность (CDR). CDR являются хорошо известными как гиперпеременные участки в переменных доменах как легкой, так и тяжелой цепей. Более высоко консервативные части переменных доменов называются каркасными участками (FR). Как является известным в области техники, аминокислотное положение/определенная граница гиперпеременного участка антитела может варьировать в зависимости от контекста и различных определений, известных в области техники. Некоторые положения в пределах переменного домена могут рассматриваться как гибридные гиперпеременные положения в том смысле, что эти положения могут предполагаться как такие, которые находятся в гиперпеременном участке в соответствии с набором критериев и в то же время могут предполагаться как такие, которые находятся за пределами гиперпеременного участка в соответствии с другим набором критериев. Одно или более из этих положений могут также быть обнаружены в вытянутых гиперпеременных участках. Данная заявка обеспечивает антитела, включающие модификации в этих гибридных гиперпеременных положениях. Каждый из переменных доменов нативной тяжелой и легкой цепи включают четыре FR участка, главным образом, за счет того, что приобретают β-складчатую конфигурацию, связанную посредством CDR, которая образует петли, которые соединяют, и в некоторых случаях формируют часть β-складчатой структуры. CDR в каждой цепочке удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR участков и вместе с CDR из другой цепочки осуществляют свой вклад в формирование сайта целевого связывания антитела (См. Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987).

Было идентифицировано несколько анти-hPG моноклональных антител, имеющих высокую специфичность и аффинность для hPG и обладающих хорошей противоопухолевой активностью, также были секвенированы их CDR и переменные участки тяжелой и легкой цепей. Переменные домены мышиной тяжелой и легкой цепи называются в данной заявке mV_H и mV_L, после чего следует номер соответствующего моноклонального антитела, например mV_H 3 и mV_L 3 для анти-hPG Mab 3. Анти-hPG моноклональные антитела имеют три CDR переменной легкой цепи и три CDR переменной тяжелой цепи, которые называются как V_H CDR 1, 2 или 3 и V_L CDR 1, 2 или 3 соответственно, после чего следует номер типичного анти-hPG моноклонального антитела. Например, V_L CDR 1 Mab 3 обозначается как V_L CDR 1.3 и V_H CDR 1, а Mab 3 обозначается как V_H CDR 1.3. Подобно этому переменные домены человеческой тяжелой и легкой цепей называются в данной заявке hV_H и hV_L, после чего следует номер соответствующего моноклонального антитела.

В некоторых воплощениях анти-hPG моноклональные антитела, образованные против N-терминальной части hPG, имеют три CDR переменной легкой цепи и три CDR переменной тяжелой цепи, где

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), QSLDSDGKTY ("V_L CDR 1.16"; SEQ ID NO: 50) и SQHRTYT ("V_L CDR 1.19"; SEQ ID NO: 51);

V_L CDR 2 является выбранным из KVS ("V_L CDR 2.3" и ("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);

V_L CDR 3 является выбранным из FQGSHVPFT ("V_L CDR 3.3"; SEQ ID NO: 6), SQSTHVPPT ("V_L CDR 3.4"; SEQ ID NO: 11), WQGTHSPYT ("V_L CDR 3.16"; SEQ ID NO: 57) и GVGDAIKGQSVFV ("V_L CDR 3.19"; SEQ ID NO: 58);

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

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

V_H CDR 3 является выбранным из TRRDSPQY ("V_H CDR 3.3"; SEQ ID NO: 3), ATDGNYDWFAY ("V_H CDR 3.4"; SEQ ID NO: 9), TRGGYYPFDY ("V_H CDR 3.16"; SEQ ID NO: 47) и AREVNYGDSYHFDY ("V_H CDR 3.19"; SEQ ID NO: 48).

См. табл. 1A.

В некоторых воплощениях анти-hPG моноклональные антитела, образованные против N-терминальной части hPG, имеют три CDR варибельной легкой цепи и три CDR варибельной тяжелой цепи, где

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

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);

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

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_H CDR2 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

V_H CDR 3 является выбранным из ATQGNYSLDF ("V_H CDR 3.8"; SEQ ID NO: 45) и ARGTGTY ("V_H CDR 3.13"; SEQ ID NO: 46).

См. табл. 1B.

Таблица 1A

N-Терминальные анти-hPG моноклональные антитела

Иммуноген	Гибридома (депоз. №)	MAb	Мышьиные CDR последовательности		Мышьиные V _H и V _L последовательности	Гуманизированные V _H и V _L последовательности (спроектированные)
N1	43B9G11	MAb1				
N1	WE5H2G7	MAb2				
N2	6B5B11C10	MAb3	V _H CDR 1.3	GYFTSYW (SEQ ID NO:1)	mV _H 3 (SEQ ID NO:12)	hV _H 3 (SEQ ID NO:21)
			V _H CDR 2.3	FYPGNSDS (SEQ ID NO:2)		
			V _H CDR 3.3	TRRDSPQY (SEQ ID NO:3)		
			V _L CDR 1.3	QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO:4)	mV _L 3 (SEQ ID NO:13)	hV _L 3 (SEQ ID NO:22)
			V _L CDR 2.3	KVS (SEQ ID NO:5)		
			V _L CDR 3.3	FQGSHVPFT (SEQ ID NO:6)		
N2	20D2C3G2	MAb4	V _H CDR 1.4	GYTFSSSW (SEQ ID NO:7)	mV _H 4 (SEQ ID NO:14)	hV _H 4 (SEQ ID NO:23)
			V _H CDR 2.4	FLPGSGST (SEQ ID NO:8)		
			V _H CDR 3.4	ATDGNYDWFAY (SEQ ID NO:9)		
			V _L CDR 1.4	QSLVHSSGVTY (SEQ ID NO:10)	mV _L 4 (SEQ ID NO:15)	hV _L 4 (SEQ ID NO:24)
			V _L CDR 2.4	KVS (SEQ ID NO:5)		
			V _L CDR 3.4	SQSTHVPPT (SEQ ID NO:11)		
N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAb15				

N2	1E9D9B6	MAb16	V _H CDR 1.16	GYTFTSY	(SEQ ID NO:39)	mV _H 16	(SEQ ID NO:61)	hV _H 16a	(SEQ ID NO:84)
			V _H CDR 2.16	INPSNGGT	(SEQ ID NO:43)			hV _H 16b	(SEQ ID NO:86)
			V _H CDR 3.16	TRGGYYPFDY	(SEQ ID NO:47)			hV _H 16c	(SEQ ID NO:88)
			V _L CDR 1.16	QSLDSDGKTY	(SEQ ID NO:50)	mV _L 16	(SEQ ID NO:65)	hV _L 16a	(SEQ ID NO:85)
			V _L CDR 2.16	LVS	(SEQ ID NO:53)			hV _L 16b	(SEQ ID NO:87)
			V _L CDR 3.16	WQGTHTSPYT	(SEQ ID NO:57)			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)	mV _H 19	(SEQ ID NO:62)	hV _H 19a	(SEQ ID NO:90)
			V _H CDR 2.19	ISFSGYT	(SEQ ID NO:44)			hV _H 19b	(SEQ ID NO:92)
			V _H CDR 3.19	AREVNYGDSYHFDY	(SEQ ID NO:48)			hV _H 19c	(SEQ ID NO:94)
			V _L CDR 1.19	SQHRITYT	(SEQ ID NO:51)	mV _L 19	(SEQ ID NO:66)	hV _L 19a	(SEQ ID NO:91)
			V _L CDR 2.19	VKKDGS	(SEQ ID NO:54)			hV _L 19b	(SEQ ID NO:93)
			V _L CDR 3.19	GVGDAIKGQSVFV	(SEQ ID NO:58)			hV _L 19c	(SEQ ID NO:95)
N2	1C11F5E8	MAB20							
Иммуноген N1 = SWKPRSQQPDAPLG Ahx Cys BSA, также является представленным как (SEQ ID NO:25) Ahx Cys BSA									
Иммуноген N2 = SWKPRSQQPDAPLG Ahx Cys KLH, также является представленным как (SEQ ID NO:25) Ahx Cys KLH									

В табл. 1А все аминокислотные последовательности представлены при использовании традиционной N→C ориентации. Для каждого иммуногена прогастроновый пептид синтезировали с линкером из одного остатка аминокислотной кислоты (Ahx), после которого следует цистеин, который потом конъюгировали либо с помощью носителя на основе бычьего сывороточного альбумина ("BSA") или гемоцианина лимфы улитки ("KLH").

Таблица 1В

С-Терминальные анти-hPG моноклональные антитела

Иммуноген	Гибридома (депоз. №)	MAb	Мышечные CDR последовательности			Мышечные V _H и V _L последовательности		Гуманизированные V _H и V _L последовательности (спроектированные)	
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	WQGTHTFPQT	(SEQ ID NO:56)				
C1	2H9F4B7	MAB14							
C2	1F11F5E10	MAB21							
C2	1F11F5G9	MAB22							
C2	1A11F2C9	MAB23							
Иммуноген C1 = KLH Cys Ahx Ahx QGPWLEEEEEAYGWMDGRRSAEDEN, также представленный как KLH Cys Ahx Ahx (SEQ ID NO:27)									
Иммуноген C2 = DT Cys Ahx Ahx QGPWLEEEEEAYGWMDGRRSAEDEN, также представленный как DT Cys Ahx Ahx (SEQ ID NO:27)									

В табл. 1В все аминокислотные последовательности представлены при использовании традиционной N→C ориентации. Для каждого иммуногена прогастроновый пептид синтезировали с линкером из одного остатка аминокислотной кислоты (Ahx), после которого следует цистеин, который потом конъюгировали либо с помощью носителя на основе бычьего сывороточного альбумина ("BSA") или гемоцианина лимфы улитки ("KLH").

V_L CDR 3.8. В специфическом воплощении анти-hPG моноклональное антитело представляет собой анти-hPG MAb 8, описанное в данной заявке, и включает аминокислотную последовательность, соответствующую mV_H 8 (SEQ ID NO: 59), и аминокислотную последовательность, соответствующую mV_L 8 (SEQ ID NO: 63).

В некоторых воплощениях CDR V_H цепочки анти-hPG моноклонального антитела представляют собой V_H CDR 1.3, V_H CDR 2.13 и V_H CDR 3.13, CDR V_L цепочки представляют собой V_L CDR 1.13, V_L CDR 2.13 и V_L CDR 3.13. В специфическом воплощении анти-hPG моноклональное антитело представляет собой анти-hPG MAb 13, описанное в данной заявке, и включает аминокислотную последовательность, соответствующую mV_H 13 (SEQ ID NO: 60), и аминокислотную последовательность, соответствующую mV_L 13 (SEQ ID NO: 64).

В некоторых воплощениях CDR V_H цепочки анти-hPG моноклонального антитела представляют собой V_H CDR 1.16, V_H CDR 2.16 и V_H CDR 3.16 и CDR V_L цепочки представляют собой V_L CDR 1.16, V_L CDR 2.16 и V_L CDR 3.16. В специфическом воплощении анти-hPG моноклональное антитело представляет собой анти-hPG MAb 16, описанное в данной заявке, и включает аминокислотную последовательность, соответствующую mV_H 16 (SEQ ID NO: 61), и аминокислотную последовательность, соответствующую mV_L 16 (SEQ ID NO: 65).

В некоторых воплощениях CDR V_H цепочки анти-hPG моноклонального антитела представляют собой V_H CDR 1.19, V_H CDR 2.19 и V_H CDR 3.19 и CDR V_L цепочки представляют собой V_L CDR 1.19, V_L CDR 2.19 и V_L CDR 3.19. В специфическом воплощении анти-hPG моноклональное антитело представляет собой анти-hPG MAb 19, описанное в данной заявке, и включает аминокислотную последовательность, соответствующую mV_H 19 (SEQ ID NO: 62), и аминокислотную последовательность, соответствующую mV_L 19 (SEQ ID NO: 66).

Анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с данной заявкой включают как интактные молекулы, так и фрагменты антитела (такие как, например, Fab и F(ab')₂ фрагменты), которые являются способными к специфическому связыванию с hPG. Fab и F(ab')₂ фрагменты не содержат Fc фрагмента интактного антитела, более быстро выводятся из системы циркуляции животного или растения и имеют меньшее неспецифическое связывание с тканями, чем интактное антитело (Wahl и др., 1983, J. Nucl. Med., 24:316). Фрагменты антитела, таким образом, являются полезными в терапевтических применениях среди прочих применений.

Термин "фрагмент антитела" относится к части антитела полной длины, сайту связывания или вариабельному участку. Примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты. "Fv" фрагмент представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт целевого узнавания и связывания. Этот участок состоит из димера одной тяжелой и одной легкой цепи вариабельного домена в непосредственной нековалентной связи (V_H-V_L димер). Это конфигурация, в которой три CDR каждого вариабельного домена взаимодействуют для определения целевого сайта связывания на поверхности V_H-V_L димера. Часто шесть CDR придают целевую связывающую специфичность антителу. Однако в некоторых случаях даже единичный вариабельный домен (или половина Fv, включающего только три CDR, специфических для мишени) могут обладать способностью узнавать и связывать мишень, хотя и при более низкой аффинности, чем при использовании цельного сайта связывания. "Одноцепочечные Fv" или "scFv" фрагменты антитела включают V_H и V_L домены антитела, где эти домены являются присутствующими в одной полипептидной цепочке. В общем случае Fv полипептид дополнительно включает полипептидный линкер между V_H и V_L доменами, который позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания мишени. "Антитела с одним доменом" состоят из единичных V_H или V_L доменов, которые демонстрируют достаточную аффинность по отношению к hPG. В специфическом воплощении антитело, которое состоит из одного домена, представляет собой камелизированное (оверблужинное) антитело (см., например, Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods, 231:25-38).

Fab фрагмент содержит константный домен легкой цепочки и первый константный домен (CH₁) тяжелой цепочки. Fab' фрагменты отличаются от Fab фрагментов присоединением нескольких остатков на карбокси-терминальном конце тяжелой цепочки CH₁ домена, включая один или более остатков цистеина из шарнирного участка антитела. F(ab') фрагменты получают путем расщепления дисульфидной связи между цистеинами шарнирного участка продукта переваривания пепсином F(ab')₂. Дополнительные химические слияния фрагментов антитела являются известными квалифицированному специалисту в данной области техники.

Анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с данной заявкой могут представлять собой химерные антитела. Термин "химерное" антитело, как используется в данной заявке, относится к антителу, содержащему вариабельные последовательности, которые имеют происхождение от не-человеческих иммуноглобулинов, таких, как крысиное или мышьеанное антитело, и константные участки человеческого иммуноглобулина, типично выбранные из матрицы человеческого иммуноглобулина. Способы получения химерных антител являются известными в области техники. См., например, Morrison, 1985, Science, 229(4719):1202-7; Oi и др., 1986, BioTechniques, 4:214-221; Gillies и др., 1985, J. Immunol. Methods, 125:191-202; патенты США № 5807715; 4816567; и 4816397, которые являются введенными в данную

заявку в качестве ссылки в своей целостности.

Анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с данной заявкой могут быть гуманизированными. "Гуманизированные" формы не-человеческих (например, мышиных) антител представляют собой химерные иммуноглобулины, цепочки иммуноглобулина или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие субпоследовательности связывания с мишенью антитела), которые содержат минимальные последовательности, которые имеют происхождение от не-человеческих иммуноглобулинов. В общем случае гуманизированное антитело будет включать существенно все из по крайней мере одного, и типично двух, переменных доменов, в которых все или существенно все из CDR участков соответствуют таким не-человеческого иммуноглобулина, и все или существенно все FR участки представляют собой таковые консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина, и могут обозначаться как "CDR-привитые". Гуманизированное антитело может также включать, по крайней мере, часть константного участка (Fc) иммуноглобулина, типично такого, как консенсусная последовательность человеческого иммуноглобулина. Способы гуманизации антитела, включая способы конструирования гуманизированных антител, являются известными в области техники. См., например, Lefranc и др., 2003, *Dev. Comp. 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., EP, 239400; публикация PCT 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, которые все являются введенными в данную заявку в качестве ссылки в своей целостности.

Последовательности гуманизированных анти-hPG моноклональных антител были сконструированы для мышиных анти-hPG моноклональных антител в соответствии с настоящим изобретением, как описывается в разделе примеры, приведенном ниже. Специфические воплощения гуманизированных антител включают антитела, включающие

- (1) любые три V_L CDR и любые три V_H CDR, раскрытые в данной заявке;
- (2) тяжелую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 21, и легкую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 22;
- (3) тяжелую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 23, и легкую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность соответствующую SEQ ID NO: 24;
- (4) тяжелую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 75, 77 и 79, и легкую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 76 и 78;
- (5) тяжелую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 80 и 82, и легкую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 81 и 83;
- (6) тяжелую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 84, 86 и 88, и легкую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 85, 87 и 89;
- (7) тяжелую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 90, 92 и 94, и легкую цепочку переменного участка, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 91, 93 и 95.

Анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с данной заявкой могут быть приматизированы. Термин "приматизированное антитело" относится к антителу, включающем обезьяньи переменные участки и человеческие константные участки. Способы для получения приматизированного антитела являются известными в области техники. См., например, патенты США № 5658570; 5681722; и 5693780, которые являются введенными в данную заявку в качестве ссылки в своей целостности.

Включенными в анти-hPG моноклональные антитела являются антитела, которые конкурируют с эталонным антителом, таким, как, например, поликлональное анти-hPG антитело, или любым из анти-hPG моноклональных антител, раскрытых в данной заявке. Антитела, которые конкурируют с анти-hPG моноклональными антителами в соответствии с данной заявкой, являются полезными для разнообразных диагностических и терапевтических применений. Специфические воплощения приемлемых эталонных анти-hPG моноклональных антител включают следующие антитела, описанные в данной заявке, например, но не для ограничения таковыми:

антитела, включающие какие-либо три V_L CDR и какие-либо три V_H CDR, раскрытые в данной заявке;

антитела, в которых V_H цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую

SEQ ID NO: 12 (mV_H 3), и V_L цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 13 (mV_L 3); и

антитела, в которых V_H цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 14 (mV_H 4), и V_L цепочка имеет последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 15 (mV_L 4), антитела, в которых V_H цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 59 (mV_H 8), и V_L цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 63 (mV_L 8);

антитела, в которых V_H цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 60 (mV_H 13), и V_L цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 64 (mV_L 13);

антитела, в которых V_H цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 61 (mV_H 16), и V_L цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 65 (mV_L 16);

антитела, в которых V_H цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 62 (mV_H 19), и V_L цепочка имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 66 (mV_L 19), или какую-либо из комбинаций V_H и V_L цепочек, раскрытых в данной заявке.

Приемлемые эталонные антитела также включают

антитела, полученные с помощью гибридомы, выбранной из группы, которая состоит из 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9 и 1A11F2C9;

антитела, которые связываются с эпитопом, который включает 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); и

антитела, которые связываются с эпитопом, который включает 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).

Способность конкурировать с моноклональным антителом в соответствии с настоящим изобретением за связывание с PG, например hPG, может быть проанализирована, например, при использовании конкурентного анализа так, как описано ниже. Планшеты на 96 ячеек покрывали при использовании иммобилизованного антитела (поликлональное или моноклональное антитело, которое узнает N- или C-терминальный участок прогастрина, который отличается от эпитопа, который узнается эталонным моноклональным антителом), при концентрации, которая выбирается в интервале 1-10 мкг/мл, в течение ночи при 4°C (0,1-1 мкг/ячейка). После блокирования с помощью 0,1% Твин-20/0,1% BSA в PBS (блокирующий буфер) в течение 2 ч при 22°C прибавляли рекомбинантный прогастрин человека при концентрации 10 пМ-1 нМ (10-1000 пг/ячейка) и инкубировали в течение 2 ч при 22°C. После этого прибавляли биотинилированное эталонное анти-hPG моноклональное антитело или смесь, содержащую эталонное моноклональное антитело, вместе с повышающимися концентрациями немеченного исследуемого антитела и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. После промывания определение осуществляли путем инкубации в течение 1 ч при 22°C с флуорогенным субстратом для пероксидазы хрена, после чего проводили количественную оценку относительных световых единиц (RLU) в люминометре. Анализы осуществляли в двукратной повторности. Антитела, которые конкурируют с эталонным анти-hPG моноклональным антителом в соответствии с настоящим изобретением, ингибируют связывание эталонного антитела с hPG. Антитело, которое связывает тот же эпитоп, что и контрольные антитела, будет способным конкурировать за связывание с эталонным антителом и, таким образом, будет существенно снижать (например по крайней мере на 50%) связывание эталонного антитела, как подтверждается путем снижения количества связанной метки. Реактивность (меченного) эталонного антитела при отсутствии полностью несоответствующего антитела будет представлять собой контрольное высокое значение. Контрольное низкое значение будет получено при инкубации немеченного исследуемого антитела с клетками, экспрессирующими прогастрин, после чего инкубируют смесь клетка/антитело с меченным контрольным антителом точно того же изотипа, когда будет возникать конкуренция и снижать связывание меченного антитела. При осуществлении анализа значительное снижение реактивности меченного антитела в присутствии исследуемого антитела является показательным для исследуемого антитела, которое узнается существенно тем же эпитопом.

Ингибирование связывания может выражаться в виде константы ингибирования или K_i, которая подсчитывается в соответствии со следующей формулой:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [\text{Концентрация эталонного Ab}]/K_d)$$

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

K_d представляет собой константу диссоциации эталонного антитела, меру его аффинности для прогастрина.

Антитела, которые конкурируют с анти-hPG моноклональными антителами, раскрытыми в данной

заявке, могут иметь K_i от 10 пМ до 10 нМ при условиях проведения анализа, описанных в данной заявке.

В различных воплощениях немеченное анти-hPG моноклональное антитело в соответствии с данной заявкой снижает связывание меченного эталонного антитела по крайней мере на 40%, по крайней мере на 50%, по крайней мере на 60%, по крайней мере на 70%, по крайней мере на 80%, по крайней мере на 90%, на 100% или на процент, который колеблется в пределах любого из указанных выше интервалов (например, анти-hPG моноклональное антитело в соответствии с данной заявкой снижает связывание меченного эталонного антитела на 50-70%), когда анти-hPG моноклональное антитело используется при концентрации 0,01, 0,08, 0,4, 2, 10, 50, 100 мкг/мл или при концентрации, которая колеблется в рамках интервала указанных выше значений (например, при концентрации, которая колеблется от 2 до 10 мкг/мл).

При осуществлении исследования конкуренции антитела между эталонным антителом и любым исследуемым антителом (несоответствующих видов или изотипа), можно сначала метить эталонное антитело с помощью способной к определению метки, такой как биотин или ферментативной (или даже радиоактивной) метки, для того чтобы позволить осуществить последующую идентификацию. В этом случае меченное эталонное антитело (в фиксированной или в повышающейся концентрации) инкубируют с известным количеством прогастина. Немеченное исследуемое антитело потом прибавляют к предварительно связанному комплексу прогастина и меченного антитела. Измеряют интенсивность связанной метки. Если исследуемое антитело конкурирует с меченым антителом путем связывания перекрывающегося эпитопа, то интенсивность будет снижаться по отношению к связыванию контрольного меченного антитела при отсутствии исследуемого антитела.

Анализы на конкуренцию являются известными и могут адаптироваться к анализу, приведенному выше, для получения сравнимых результатов. Этот анализ может представлять собой любой из широкого спектра анализов иммуноглобулина, которые основываются на конкуренции антитела, и эталонное антитело будет определяться с помощью определения их метки, например, при использовании стрептавидина в случае биотинилированного антитела, или при использовании хромогенного субстрата в случае ферментативной метки (такого, как субстрат на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) при использовании пероксидазного фермента) или путем простого определения радиоактивной метки или флуоресцентной метки.

Также в данную заявку включаются анти-hPG моноклональные антитела, которые являются дериватизованными, ковалентно модифицированными или конъюгированными с другими молекулами, для применения в диагностических и терапевтических способах. Например, но не с целью ограничения, дериватизованные антитела включают антитела, которые были модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, ПЭГилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации при использовании известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любая из многочисленных химических модификаций может осуществляться при использовании известных методик, включая, но без ограничения, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Дополнительно производная может содержать одну или более неклассических аминокислот.

В другом примере антитела в соответствии с настоящим изобретением могут присоединяться к остаткам поли(этиленгликоля) (ПЭГ). В специфическом воплощении антитело представляет собой фрагмент антитела, а остатки ПЭГ присоединяются с помощью какой-либо доступной боковой аминокислотной цепи или терминальной аминокислотной функциональной группы, расположенной в фрагменте антитела, например, любой свободной группе amino, imino, тиола, гидроксила или карбоксила. Такие аминокислоты могут естественным образом существовать во фрагмент антитела или могут быть введены во фрагмент при использовании способов рекомбинантной ДНК. См., например, патент США № 5219996. Множественные сайты могут использоваться для присоединения двух или более молекул ПЭГ. Остатки ПЭГ могут быть ковалентно связаны с помощью группы тиола по крайней мере одного остатка цистеина, расположенного во фрагменте антитела. Когда группа тиола используется в качестве точки присоединения, могут использоваться приемлемым образом активированные эффекторные остатки, например селективные производные тиола, такие как малеимиды и производные цистеина.

В специфическом примере анти-hPG конъюгаты на основе моноклонального антитела представляют собой модифицированный Fab' фрагмент, который является ПЭГилированным, т.е. имеет ПЭГ (поли(этиленгликоль)), ковалентно присоединенный к нему, например, в соответствии со способом, раскрытым в EP 0948544. См. также Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications (J. Milton. Harris (ред.), Plenum Press, New York, 1992); Poly(ethyleneglycol) Chemistry и Biological Applications, (J. Milton Harris и S. Zalipsky, ред., American Chemical Society, Washington D.C., 1997); и Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences (M. Aslam и A. Dent, ред., Grove Publishers, New York, 1998); и Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54:531-545. ПЭГ может присоединяться к цистеину в шарнирном участке. В одном примере модифицированный с помощью ПЭГ Fab' фрагмент содержит малеимидную группу, ковалентно связанную с одной группой тиола в модифицированном шарнирном участке. Остаток лизина может быть ковалентно связан с малеимидной группой и к каждой аминокислотной группе остатка лизина может быть присоединен полимер метоксиполи(этиленгликоля), который имеет молекулярный вес, приблизительно составляющий 20000 Да. Общий молекулярный вес

ПЭГ, присоединенного к Fab' фрагменту, может, таким образом, составлять приблизительно 40000 Да.

Анти-hPG моноклональные антитела включают меченные антитела, полезные при диагностических применениях. Антитела могут использоваться с диагностической целью, например, для определения экспрессии мишени, которая представляет интерес, в специфической клетке, тканях или сыворотке, или для мониторинга развития или прогрессирования иммунологического ответа как части процедуры клинического тестирования, например для определения эффективности данного режима лечения. Определение может быть улучшено путем слияния антитела со способным к определению веществом или "меткой". Метка может быть конъюгирована непосредственно или опосредованно с анти-hPG моноклональным антителом в соответствии с настоящей заявкой. Метка может быть сама по себе способной к определению (например, радиоизотопные метки, изотопные метки, или флуоресцентные метки) или в случае ферментативной метки может катализировать химическое превращение соединения субстрата или композиции, которая является способной к определению. Примеры способных к определению веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминисцентные материалы, биолуминисцентные материалы, радиоактивные материалы, испускающие позитроны металлы, используемые в различных способах позитронно-эмиссионной томографии, и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. Определяемое вещество может быть связанным или конъюгированным с антителом (или его фрагментом) непосредственно или опосредованно с помощью промежуточного соединения (такого, как, например, линкер, известный в области техники) при использовании методик, известных в области техники. Примеры ферментативных меток включают люциферазы (например, люциферазу светлячка и бактериальную люциферазу; патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, малатдегидрогеназу, уреазу, пероксидазу, такую как пероксидаза хрена (HRPO), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, ацетилхолинэстеразу, глюкоамилазу, лизоцим, сахарид оксидазы (например, глюкоза оксидазу, галактоза оксидазу и глюкоза-6-фосфат дегидрогеназу), гетероциклические оксидазы (такие как уриказа и ксантин оксидаза), лактопероксидазу, микропероксидазу и т.п. Примеры приемлемых комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры приемлемых флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлоротриазиниламин флуоресцеин, данзил хлорид, диметиламин-1-нафталинсульфонил хлорид или фикоэритрин и т.п.; пример люминисцентного материала включает люминол; примеры биолуминисцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; примеры приемлемых изотопных материалов включают ^{13}C , ^{15}N и дейтерий; а примеры радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In или ^{99}Tc .

Анти-hPG моноклональные антитела всех видов происхождения включены в данное изобретение. Нелимитирующие типичные природные антитела включают антитела, которые имеют происхождение от людей, обезьян, кур, коз, кролей и грызунов (например, крыс, мышей и хомяков) (см., например, Lonberg и др., WO 93/12227; патент США № 5545806; и Kucherlapati, и др., WO 91/10741; патент США № 6150584, которые все являются включенными в данную заявку в качестве ссылки в своей целостности). Природные антитела представляют собой антитела, которые вырабатываются животным-хозяином после иммунизации с помощью антигена, такого как полипептид.

Нуклеиновые кислоты и экспрессионные системы.

Настоящее описание охватывает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие гены легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина для анти-hPG моноклональных антител, векторы, включающие такие нуклеиновые кислоты, и хозяйские клетки, которые способны вырабатывать анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с изобретением.

Анти-hPG моноклональное антитело в соответствии с данной заявкой может быть получено с помощью рекомбинантной экспрессии генов легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина в хозяйской клетке. Для рекомбинантной экспрессии антитела хозяйская клетка подвергается трансфекции при использовании одного или более рекомбинантных экспрессионных векторов, которые несут фрагменты ДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепь иммуноглобулина антитела, так, что легкие и тяжелые цепи экспрессируются в хозяйской клетке и необязательно секретируются в среду, в которой культивируют хозяйские клетки, из этой среды могут быть извлечены антитела. Стандартные методики рекомбинантной ДНК используются для получения генов тяжелой и легкой цепей антитела, введения этих генов в рекомбинантные экспрессионные векторы и встраивания этих векторов в хозяйские клетки, такие как те, что описываются в *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2-е изд. (Sambrook, Fritsch и Maniatis (ред.), Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M. и др., ред., Greene Publishing Associates, 1989) и в патенте США № 4816397.

Для получения нуклеиновых кислот, кодирующих такие анти-hPG моноклональные антитела, сначала получают ДНК фрагменты, кодирующие переменные участки легкой и тяжелой цепи. Такие ДНК могут быть получены путем амплификации и модификации эмбриональной ДНК или кДНК, кодирующих переменные последовательности легкой и тяжелой цепей, например, при использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). Эмбриональные ДНК последовательности для человеческих генов переменного участка тяжелой и легкой цепей являются известными в области техники (см., например, Lefranc и др., 2003, *Dev. Comp. Immunol.*, 27:55-77; Lefranc и др., 2009, *Nucl. Acids Res.*, 37:D1006-1012; Lefranc, 2008, *Mol. Biotechnol.*, 40:101-111; "VBASE" human germline sequence database; см. также Kabat, E.A. и др., 1991,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., U.S. Department of Health и Human Services, NIH номер публикации 91-3242; Tomlinson и др., 1992, J. Mol. Biol., 227:116-198; и Cox и др., 1994, Eur. J. Immunol., 24:827-836; содержание каждого из которых является введенным в данную заявку в качестве ссылки).

Когда получены ДНК фрагменты, кодирующие V_H и V_L сегменты, относящиеся к анти-hPG моноклональному антителу, эти ДНК фрагменты могут дополнительно подвергаться манипуляциям при использовании стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, для превращения генов варибельного участка в цепочку генов антитела полной длины, в гены Fab фрагмента или в ген scFv. При этих манипуляциях ДНК фрагмент, кодирующий V_L - или V_H , оперативно связывается с другим ДНК фрагментом, кодирующим другой белок, такой, как константный участок антитела или гибкий линкер. Термин "оперативно связанный", как используется в данном контексте, является предназначенным для понимания того, что два ДНК фрагмента соединяются так, что аминокислотные последовательности, кодируемые этими двумя ДНК фрагментами, остаются в рамке.

Изолированная ДНК, кодирующая V_H участок, может быть превращена в ген тяжелой цепи полной длины путем оперативного связывания ДНК, кодирующей V_H , с другой молекулой ДНК, кодирующей константные участки тяжелой цепи (CH_1 , CH_2 , CH_3 и необязательно CH_4). Последовательности генов константного участка тяжелой цепи человека являются известными в области техники (см., например, Kabat, E.A., и др., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., U.S. Department of Health и Human Services, NIH номер публикации 91-3242), и ДНК фрагменты, охватывающие эти участки, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР амплификации. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM или IgD константный участок, но в некоторых определенных воплощениях он представляет собой IgG₁ или IgG₄ константный участок. Для создания гена Fab фрагмента тяжелой цепи кодирующая V_H ДНК может быть оперативно связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только один CH_1 константный участок тяжелой цепи.

Изолированная ДНК, кодирующая V_H участок, может быть превращена в ген легкой цепи полной длины (а также ген Fab легкой цепи) путем оперативного связывания ДНК, кодирующей V_L , с другой молекулой ДНК, кодирующей константный участок легкой цепи, CL. Последовательности генов константного участка легкой цепи человека являются известными в области техники (см., например, Kabat, E.A. и др., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., U.S. Department of Health и Human Services, NIH номер публикации 91-3242), и ДНК фрагменты, охватывающие эти участки, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР амплификации. Константный участок легкой цепи может представлять собой каппа или лямбда константный участок, но в некоторых воплощениях он представляет собой каппа константный участок. Для создания scFv гена ДНК фрагменты, кодирующие V_H и V_L оперативно связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например таким, который кодирует аминокислотную последовательность (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 99), так что V_H и V_L последовательности могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка, содержащего V_L и V_H участки, соединенные гибким линкером (см., например, Bird и др., 1988, Science, 242:423-426; Huston и др., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:5879-5883; McCafferty и др., 1990, Nature, 348:552-554).

Для экспрессии анти-hPG моноклональных антител в соответствии с настоящим изобретением, ДНК, кодирующие частичные или полные тяжелые или легкие цепи, полученные так, как описано выше, 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 лигируют в вектор, так, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в пределах вектора служат своей функции регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии являются выбранными для того, чтобы быть совместимыми с экспрессией в выбранной хозяйской клетке. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть встроены в отдельные векторы или, более типично, оба гена встраиваются в один и тот же экспрессионный вектор.

Гены антитела встраиваются в экспрессионный вектор с помощью стандартных способов (например, лигирования комплементарных сайтов рестрикции во фрагмент гена антитела и вектор, или лигирования тупых концов, если рестрикционные сайты не присутствуют). Перед встраиванием последовательностей легкой и тяжелой цепей, полученных из анти-hPG моноклонального антитела, экспрессионный вектор может уже нести последовательности константного участка антитела. Например, один подход для превращения V_H и V_L последовательностей, полученных из анти-hPG моноклонального антитела, в гены антитела полной длины заключается во встраивании их в экспрессионные векторы, которые уже кодируют константный участок тяжелой цепи и константный участок легкой цепи, соответственно, так, что V_H сегмент является оперативно связанным с CH сегментом(ами) в рамках вектора и так, что V_L сегмент является оперативно связанным с CL сегментом в векторе. Дополнительно или альтернативно рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепочки антитела из хозяйской клетки. Ген цепочки антитела может быть клонирован в вектор, так, что сигнальный пептид является связанным в рамке с аминокислотным концом гена цепочки антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологич-

ный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, отличного от иммуноглобулина).

В дополнение к генам цепочки антитела, рекомбинантные экспрессионные векторы в соответствии с данной заявкой несут регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепочки антитела в хозяйской клетке. Термин "регуляторная последовательность" является предназначенным для включения промоторов, энхансеров и других элементов контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию и трансляцию генов цепочки антитела. Такие регуляторные последовательности описываются, например, у Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Специалист в данной области техники сможет оценить, что конструирование экспрессионного вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор хозяйской клетки, которая подвергается трансформации, уровень экспрессии желаемого белка и т.д. Приемлемые регуляторные последовательности для экспрессии в хозяйской клетке млекопитающего, включают вирусные элементы, которые направляют высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, которые имеют происхождение от цитомегаловируса (CMV) (такие как CMV промотор/энхансер), вакуолизирующего вируса обезьян 40 (SV40) (такие как SV40 промотор/энхансер), аденовируса, (например, из основного позднего промотора аденовируса (AdMLP)) и полиомы. Для дополнительного описания вирусных регуляторных элементов и их последовательностей, см., 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.

В дополнение к генам цепи антитела и регуляторным последовательностям, рекомбинантные экспрессионные векторы в соответствии с данной заявкой могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в хозяйских клетках (например, источники репликации), и гены селективного маркера. Ген селективного маркера способствует селекции хозяйских клеток, в которые был введен вектор (см., например, патенты 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, гигромицин или метотрексат, в хозяйской клетке, в которую был введен вектор. Приемлемые гены селективных маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в DHFR^r хозяйских клетках с селекцией/амплификацией на метотрексат) и ген нео (для G418 селекции). Для экспрессии легкой и тяжелой цепей экспрессионный(е) вектор(ы), кодирующий(е) тяжелую и легкую цепи трансфицируют в хозяйскую клетку с помощью стандартных методик. Различные формы термина "трансфекция" являются предназначенными для охвата широкого разнообразия методик, которые традиционно используются для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую хозяйскую клетку, например, электропорации, липофекции, преципитации при использовании кальция-фосфата, трансфекции на основе DEAE, декстрана и подобных им.

Является возможным экспрессировать антитела в соответствии с данной заявкой либо в прокариотических, либо в эукариотических хозяйских клетках. В некоторых воплощениях экспрессия антител осуществляется в эукариотических клетках, например, хозяйских клетках млекопитающих с оптимальной секрецией правильно собранного и иммунологически активного антитела. Типичные хозяйские клетки млекопитающих для экспрессии рекомбинантного антитела в соответствии с данной заявкой включают клетки яичника китайского хомяка (CHO клетки) (включая DHFR^r CHO клетки, описанные у Urlaub и Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77:4216-4220, которые используются с DHFR селективным маркером, например, как описывается у Kaufman и Sharp, 1982, *Mol. Biol.*, 159:601-621), NSO миеломные клетки, COS клетки и SP2 клетки. Когда рекомбинантные экспрессионные векторы, кодирующие гены антитела, вводят в хозяйские клетки млекопитающих, антитела получают путем культивирования хозяйских клеток в течение периода времени, достаточного для осуществления экспрессии антитела в хозяйских клетках или секреции 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 Fab фрагменты или scFv молекулы. При этом является понятным, что вариации описанной выше процедуры находятся в пределах настоящего раскрытия. Например, может быть желательным трансфицировать хозяйскую клетку с помощью ДНК, кодирующей либо легкую цепочку, либо тяжелую цепочку (но не обе) анти-hPG моноклонального антитела в соответствии с данным изобретением.

Методика рекомбинантной ДНК может также использоваться для удаления части или всей ДНК, кодирующей либо легкую цепочку, либо тяжелую цепочку, которая не является необходимой для связывания с hPG. Молекулы, экспрессированные из такой укороченной молекулы ДНК, могут также охватываться антителами в соответствии с данным раскрытием.

Для рекомбинантной экспрессии анти-hPG моноклонального антитела в соответствии с данным раскрытием хозяйская клетка может быть ко-трансфицирована с помощью двух экспрессионных векторов в соответствии с данной заявкой, первым вектором, кодирующим полипептид, имеющий происхождение от тяжелой цепочки, и вторым вектором, кодирующим полипептид, имеющий происхождение от легкой цепочки. Два вектора могут содержать селективные маркеры, или они могут каждый содержать

отдельный селективный маркер. Альтернативно может использоваться один вектор, который кодирует полипептиды как тяжелой, так и легкой цепочки.

В одном воплощении дополнительные изменения или мутации могут быть введены в кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или более частей анти-hPG моноклонального антитела, например, для получения нуклеиновой кислоты, кодирующей антитела с различными CDR последовательностями, антитела со сниженной аффинностью к Fc рецептору, или антитела различных подклассов.

Анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с данной заявкой также могут быть получены с помощью химического синтеза (например, при использовании способов, описанных в *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2-е изд., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill). Вариант антитела может также быть получен при использовании способов на бесклеточной основе (см., например, Chu и др., *Biochemia*, № 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals)).

В одном воплощении анти-hPG моноклональное антитело в соответствии с данной заявкой является полученным с помощью рекомбинантной экспрессии, оно может быть очищено с помощью любого способа, известного в области техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, путем хроматографии (например, ионообменной, аффинной и эксклюзионной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или с помощью любой другой стандартной методики для очистки белков. Кроме того, анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с настоящим изобретением или их фрагменты могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данной заявке, или в другом случае, известными в области техники для улучшения очистки.

В одном воплощении изолированное анти-hPG моноклональное антитело может быть, если это является желательным, дополнительно очищено, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (см., например, Fisher, *Laboratory Techniques In Biochemistry и Molecular Biology (Work and Burdon*, ред., Elsevier, 1980) или путем гelfильтрационной хроматографии на Superdex™ 75 колонке (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden).

Настоящее описание обеспечивает хозяйские клетки, способные к продукции анти-hPG моноклональных антител. Хозяйские клетки могут представлять собой клетки, сконструированные при использовании методик рекомбинантной ДНК для экспрессии генов, кодирующие тяжелую и легкую цепочку, или гибридомы, которые имеют происхождение от приемлемого организма и подвергнуты селекции на их способность вырабатывать желаемые антитела.

Хозяйские клетки, способные вырабатывать анти-PG моноклональные антитела, могут представлять собой гибридомы. Способы получения гибридом являются известными в области техники (см., например, Kohler и Milstein, 1975, *Nature*, 256:495), один такой пример обеспечивается ниже. В общем случае животное-хозяин, такое как мышь, иммунизируют с помощью иммуногена, такого как пептид, который представляет интерес, для того чтобы индуцировать развитие лимфоцитов, например, клеток селезенки, которые вырабатывают антитела, способные к специфическому связыванию иммуногена. Альтернативно изолированные лимфоциты, включая клетки селезенки, клетки лимфатических узлов или лимфоциты периферической крови, могут быть иммунизированы *in vitro*. Лимфоциты потом сливают с иммортализованной линией клеток, такой как миеломная линия клеток, при использовании приемлемого агента (например, полиэтиленгликоля) для образования гибридомной линии клеток. Приемлемые иммортализованные линии клеток могут иметь происхождение от млекопитающих, таких как мышь, корова или человек. Гибридные клетки потом подвергают культивированию в любой приемлемой среде, которая содержит одно или более из веществ, которые ингибируют рост или выживание негибридных, иммортализованных клеток. Например, когда используют родительские клетки, в которых отсутствует фермент гипоксантингуанин фосфорибозил трансфераза (HGPRT или HPRT), гибридные клетки могут выращиваться в среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин, ("HAT" среда), которая ингибирует рост родительских негибридных клеток.

В некоторых воплощениях N-терминальные анти-hPG моноклональные антитела имеют CDR варибельной легкой цепи (V_L), которые соответствуют V_L моноклонального антитела, которое получают из гибридом 43B9G11 (вырабатывающая анти-hPG MAb 1), WE5H2G7 (вырабатывающая анти-hPG MAb 2), 6B5B11C10 (вырабатывающая анти-hPG MAb 3), 20D2C3G2 (вырабатывающая анти-hPG MAb 4), 1E9A4A4 (вырабатывающая анти-hPG MAb 15), 1E9D9B6 (вырабатывающая анти-hPG MAb 16), 1C8D10F5 (вырабатывающая анти-hPG MAb 17), 1A7C3F11 (вырабатывающая анти-hPG MAb 18), 1B3B4F11 (вырабатывающая анти-hPG MAb 19) и 1C11F5E8 (вырабатывающая анти-hPG MAb 20).

В некоторых воплощениях N-терминальные анти-hPG моноклональные антитела имеют CDR V_L и V_H , которые соответствуют CDR V_L и V_H моноклонального антитела, получаемого из указанных выше гибридом.

В некоторых воплощениях C-терминальные анти-hPG моноклональные антитела имеют CDR V_L , которые соответствуют V_L моноклонального антитела, которое получают из гибридом 1B4A11D11 (вырабатывающая анти-hPG MAb 5), 1B6A11F2 (вырабатывающая анти-hPG MAb 6), 1B11E4B11 (вырабатывающая анти-hPG MAb 7), 1C10D3B9 (вырабатывающая анти-hPG MAb 8), 1D8F5B3 (вырабатывающая анти-hPG MAb 9), 1E1C7B4 (вырабатывающая анти-hPG MAb 10), 2B4C8C8 (вырабатывающая анти-

hPG MAb 11), 2B11E6G4 (вырабатывающая анти-hPG MAb 12), 2C6C3C7 (вырабатывающая анти-hPG MAb 13), 2H9F4B7 (вырабатывающая анти-hPG MAb 14), 1F11F5E10 (вырабатывающая анти-hPG MAb 21), 1F11F5G9 (вырабатывающая анти-hPG MAb 22) и 1A11F2C9 (вырабатывающая анти-hPG MAb 23).

В некоторых воплощениях С-терминальные анти-hPG моноклональные антитела имеют CDR V_L и V_H, которые соответствуют CDR V_L и V_H моноклонального антитела, получаемого из указанных выше гибридом.

В одном воплощении обеспечивается хозяйская клетка, способная вырабатывать анти-hPG антитело, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий SEQ ID NO: 12, и переменный участок легкой цепи, включающий SEQ ID NO: 13. В одном воплощении обеспечивается хозяйская клетка, способная вырабатывать анти-hPG антитело, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий SEQ ID NO: 14, и переменный участок легкой цепи, включающий SEQ ID NO: 15. В одном воплощении обеспечивается хозяйская клетка, способная вырабатывать анти-hPG антитело, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий SEQ ID NO: 59, и переменный участок легкой цепи, включающий SEQ ID NO: 63. В одном воплощении обеспечивается хозяйская клетка, способная вырабатывать анти-hPG антитело, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий SEQ ID NO: 60, и переменный участок легкой цепи, включающий SEQ ID NO: 64. В одном воплощении обеспечивается хозяйская клетка, способная вырабатывать анти-hPG антитело, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий SEQ ID NO: 61, и переменный участок легкой цепи, включающий SEQ ID NO: 65. В одном воплощении обеспечивается хозяйская клетка, способная вырабатывать анти-hPG антитело, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий SEQ ID NO: 62, и переменный участок легкой цепи, включающий SEQ ID NO: 66.

В некоторых воплощениях хозяйская клетка в соответствии с данной заявкой включает нуклеиновую кислоту, выбранную из нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид переменного участка тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 12, 14, 59, 60, 61 и 62; и

нуклеиновую кислоту, выбранную из нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид переменного участка легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 13, 15, 63, 64, 65 и 66.

В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 16, 18, 67, 68, 69 и 70. В некоторых воплощениях переменный участок легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 17, 19, 71, 72, 73 и 74.

В некоторых воплощениях обеспечиваются полинуклеотидные последовательности, кодирующие переменный участок тяжелой цепи гуманизированного анти-hPG моноклонального антитела. Специфические воплощения включают полинуклеотиды, кодирующие полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 21, 23, 75, 77, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92 и 94. В некоторых воплощениях обеспечиваются полинуклеотидные последовательности, кодирующие переменный участок тяжелой цепи гуманизированного анти-hPG моноклонального антитела. Специфические воплощения включают полинуклеотиды, кодирующие полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 22, 24, 76, 78, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93 и 95.

Биологические активности анти-hPG моноклональных антител PG является втянутым в выживание и/или пролиферацию CRC опухолевых клеток. Не имея намерения связывать себя с какой-либо теорией механизма, следует отметить, что посредством связывания PG нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела, как предполагается, блокируют или ингибируют способность PG взаимодействовать со своим(и) сигнальным(и) партнером(ами). Это, в свою очередь, блокирует и ингибирует клеточные ответы на прогастрин, такие как клеточная пролиферация, сниженная клеточная дифференциация и/или сниженная смерть клеток, и/или опухолевый рост. Как следствие таких активностей, нейтрализующие анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с данной заявкой могут использоваться в разнообразных *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* контекстах для связывания PG и блокирования зависимой от PG передачи сигнала.

В соответствии с этим заявка обеспечивает способы ингибирования зависимых от PG ответов в CRC клетках. В общем случае способы включают приведение CRC клеток в контакт с или воздействие на клеточную популяцию с помощью нейтрализующего анти-PG моноклонального антитела в количестве, эффективном для ингибирования одного или более индуцированных PG ответов CRC клеток, например пролиферации и/или выживания CRC клеток. Их пролиферация или ингибирование может быть определено *in vitro* и *in vivo* в соответствии с анализами для измерения повышения количества клеток, количества опухолей или размера опухоли в течение периода времени. Анализы для ингибирования пролиферации клеток и опухолей являются хорошо известными в области техники.

Блокирование зависимой от PG передачи сигнала может ингибировать выживание CRC клеток путем повышения гибели клеток. Ингибирование выживания CRC клеток *in vitro* или *in vivo* может быть определено путем измерения снижения количества живых раковых клеток в течение периода времени (например, в течение 24 или 48 ч). Анализы для определения гибели клеток являются хорошо известными в области техники. Дополнительно пример анализа на выживание клеток обеспечивается в данной заявке.

Исследование также предполагают, что ингибирование зависимой от PG передачи сигнала в CRC опухолевых клетках может ингибировать выживание CRC клеток путем запуска запрограммированной клеточной смерти или апоптоза. Индукция апоптоза может быть определена с помощью любого из способов, известных в области техники, включая, но не с целью ограничения, измерение изменений в экспрессии генов, обладающих про- или анти-апоптотической активностью. Например, повышение экспрессии на протяжении периода времени (например, в течение 48 ч) про-апоптотического гена, такого как, например, Вах, является показательным для повышения апоптоза. Подобно этому снижение экспрессии на протяжении периода времени (например, в течение 72 или 96 ч) анти-апоптотического гена, такого как, например, но не с целью ограничения, Bcl-2, является показательным для повышения апоптоза. Методики для определения изменения генной экспрессии, такие как количественная ПЦР в реальном времени, являются хорошо известными в области техники. См., например, Hollande и др., WO 2007/135542.

Ингибирование зависимой от проагстрина передачи сигнала также стимулирует клеточную дифференциацию. В соответствии с этим способы ингибирования пролиферации и/или выживания CRC клеток включают введение определенного количества нейтрализующего анти-PG моноклонального антитела, эффективного для индукции пролиферации CRC клеток *in vitro* или *in vivo*. Дифференциация CRC клеток может быть определена путем измерения повышения в течение периода времени (например, в течение 24 или 48 ч) в экспрессии генетических маркеров для клеточной пролиферации, таких как, например, но не с целью ограничения, Muc-2 или другие маркеры для дифференцированных клеток кишечника (например, бокаловидных клеток). Изменения в генной экспрессии могут измеряться с помощью любого из средств, известных в области техники. См., например, Hollande и др., WO 2007/135542. Другие гены, экспрессия или репрессия которых является зависимой от PG, такие как ICAT, могут также подвергаться оценке при использовании стандартных способов. См. там же.

Фармацевтические композиции.

Анти-PG моноклональные антитела могут быть рецептированы в виде композиции. В данной заявке необязательно могут обеспечиваться композиции, которые могут включать один или более дополнительных терапевтических агентов, таких как вторые терапевтические агенты, описанные ниже. Композиции будут обычно обеспечиваться как часть стерильной фармацевтической композиции, которая будет в норме включать фармацевтически приемлемый носитель. Эта композиция может быть представлена в приемлемой форме (в зависимости от желаемого способа ее введения пациенту).

Анти-hPG моноклональные антитела в соответствии с данной заявкой могут вводиться пациенту при использовании разнообразных путей, таких как пероральный, трансдермальный, подкожный, интраназальный, внутривенный, внутримышечный, интраокулярный, местный, интратекальный и интрацеребровентрикулярный. Наиболее приемлемый путь для введения в каждом случае будет зависеть от конкретного антитела, субъекта, природы и тяжести заболевания, а также от физического состояния субъекта. Антитело может быть рецептировано в виде водного раствора и может вводиться путем подкожной инъекции.

Фармацевтическая композиция может быть традиционным образом представлена в формах единичной дозы, содержащих предварительно определенное количество анти-hPG моноклонального антитела в соответствии с данной заявкой на дозу. Такая единичная форма 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. Фармацевтически приемлемые носители для применения в данном изобретении могут принимать различные формы в зависимости, например, от состояния, которое подвергается лечению, или от способа введения.

Фармацевтическая композиция в соответствии с данной заявкой может быть приготовлена для хранения в виде лиофилизованного препарата или водных растворов путем смешивания антитела, обладающего желаемой степенью чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами, которые типично используются в области техники (которые все называются в данной заявке "носителями"), т.е. буферными агентами, стабилизирующими агентами, консервантами, изотоническими агентами, неионными поверхностно-активными веществами, антиоксидантами и различными другими добавками. См. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд. (Osol, ред. 1980). Такие добавки должны быть нетоксическими для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях.

Буферные агенты помогают поддерживать значение pH в интервале, который приблизительно соответствует физиологическим условиям. Они могут быть представлены при концентрации, которая колеблется в интервале от приблизительно 2 мМ до приблизительно 50 мМ. Приемлемые буферные агенты для применения в соответствии с настоящим изобретением включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли, такие как цитратные буферы (например, смесь цитрата мононатрия-цитрата динатрия, смесь лимонной кислоты-цитрата тринатрия, смесь лимонной кислоты-цитрата мононатрия и т.д.), сукцинатные буферы (например, смесь янтарной кислоты-сукцината мононатрия, смесь янтарной кислоты-гидроокиси натрия, смесь янтарной кислоты-сукцината динатрия и т.д.), тартратные буферы (например, смесь винной кислоты-тартрата натрия, смесь винной кислоты-тартрата калия, смесь винной кислоты-гидроокиси натрия и т.д.), фумаратные буферы (например, смесь фумаровой кислоты-фумарат мононатрия, смесь фумаровой кислоты-фумарат динатрия, смесь фумарат мононатрия-фумарат динатрия и т.д.), глюко-

натные буферы (например, смесь глюконовая кислота-глюконат натрия, смесь глюконовая кислота-гидроокись натрия смесь глюконовая кислота-глюконат калия и т.д.), оксалатные буферы (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.). Кроме того, могут использоваться, гистидиновые буферы или буферы на основе солей триметиламина, такие как Трис.

Могут прибавляться консерванты для замедления роста бактерий, при этом они могут прибавляться в количествах, которые варьируют от 0,2 до 1% (вес./об.). Приемлемые консерванты, приемлемые для применения в соответствии с настоящим изобретением, включают фенол, бензиловый спирт, метакрезол, метил парабен, пропил парабен, октадецилдиметилбензил аммоний хлорид, галиды бензалкония (например, хлорид, бромид и йодид), гексаметоний хлорид и алкилпарабены, такие как метил или этил парабен, катехол, резорцинол, циклогексанол и 3-пентанол. Изотонирующие агенты, иногда известные как "стабилизаторы", могут прибавляться для обеспечения изотоничности жидкой композиции в соответствии с настоящим изобретением 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 иметь широкий спектр функций от объемобразующего агента до добавки, которая повышает растворимость терапевтического агента или помогает предотвратить денатурацию или прилипание 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 и сахарные спирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, маннитол, сорбитол, ксилитол, миоинозитол, галактитол, глицерин и т.п., включая циклитолы, такие как инозитол, полиэтиленгликоль;

аминокислотные полимеры;

содержащие серу восстанавливающие агенты, такие как мочевины, глутатион, липоевая кислота, тиогликолат натрия, тиоглицерин, α-монотиоглицерин и тиосульфат натрия;

полипептиды с низким молекулярным весом (например, пептиды, содержащие 10 остатков или менее);

белки, такие как сывороточный альбумин человека, 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 весовых частей на часть веса активного белка.

Неионные поверхностно активные вещества и детергенты (также являются известными как "смачивающие агенты") могут прибавляться, для того чтобы помочь в растворении терапевтического агента, а также для того чтобы защитить терапевтический белок от индуцированной перемешиванием агрегации, что также позволяет композиции подвергаться воздействию поверхностного сдвига при отсутствии денатурации белка. Приемлемые неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 80 и т.д.), полиоксамеры (184, 188 и т.д.), полиолы Плурионика, моноэтеры полиоксиэтилен сорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-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 мг/мл до приблизительно 0,2 мг/мл.

Дополнительные вспомогательные наполнители включают объемобразующие агенты (например, крахмал), хелатирующие агенты (например, ЭДТА), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, метионин, витамин Е), и совместные растворители.

Анти-PG моноклональные антитела могут вводиться самостоятельно как смеси одного или более анти-PG моноклональных антител, в смеси или с комбинации с другими агентами, полезными для лечения CRC, или совместно с другими способами терапии CRC. Примеры приемлемой комбинации и дополнительных лечебных мероприятий обеспечиваются ниже.

Настоящим изобретением охватываются фармацевтические наборы, содержащие нейтрализующие анти-hPG моноклональные антитела (включая конъюгаты антитела) в соответствии с заявкой. Фармацевтический набор представляет собой упаковку, включающую нейтрализующее анти-hPG моноклональное антитело (например, либо в лиофилизированной форме, либо в виде водного раствора) и один или более из приведенных ниже:

второй терапевтический агент, например такой, как описан ниже;

устройство для введения анти-hPG моноклонального антитела, например шприц-ручка, игла и/или

шприц; и

вода фармацевтической степени чистоты или буфер для ресуспендирования антитела, если антитело находится в лиофилизированной форме.

Каждая единичная доза анти-hPG моноклонального 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, восемь единичных доз, десять единичных доз или более). В специфическом воплощении одна или более единичных доз каждая помещается в шприц или шприц-ручку.

Эффективные дозировки.

Нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела или их композиции будут в общем случае использоваться в количестве, эффективном для достижения планируемого результата, например в количестве, эффективном для лечения CRC у субъекта, который в этом нуждается. Фармацевтические композиции, включающие нейтрализующие анти-PG моноклональные антитела, могут вводиться пациентам (например, пациентам, которые представляют собой людей) при терапевтически эффективных дозировках. Как используется в данной заявке, "терапевтически эффективная" доза представляет собой количество, которое обеспечивает терапевтическое преимущество. В контексте CRC терапии терапевтическое преимущество означает ослабление CRC, включая какой-либо один из или комбинацию остановки или замедления развития CRC (например, от первой стадии колоректального рака до следующей), остановки или задержки ухудшения или усугубления симптомов или признаков CRC, снижения тяжести CRC, включая ремиссию CRC, ингибирование пролиферации CRC опухолевых клеток, размера CRC опухоли или количества CRC опухолей или снижение уровней PG в сыворотке крови.

Количество нейтрализующих анти-PG моноклональных антител, которые вводятся, будет зависеть от разнообразных факторов, включая природу и стадию CRC, который подвергается лечению, формы, пути и сайта введения, терапевтического режима (например, используется ли второй терапевтический агент), возраста и состояния конкретного субъекта, который подвергается лечению, чувствительности пациента, который подвергается лечению, к анти-PG моноклональным антителам. Приемлемая дозировка может быть легко определена квалифицированным специалистом в данной области техники. В конечном счете, лечащий врач будет определять используемую приемлемую дозировку. Эта дозировка будет повторяться так часто, как это является необходимым. Если развиваются побочные эффекты, то количество и/или частота введения дозировки будут изменяться или снижаться в соответствии с обычной клинической практикой. Точная дозировка и режим лечения будут определяться путем мониторинга развития терапии при использовании традиционных методик, известных специалистам в данной области техники.

Эффективные дозировки могут изначально оцениваться из *in vitro* анализов. Например, начальная доза для применения у животных может быть рецептирована для достижения концентрации анти-PG моноклонального антитела в циркулирующей крови или сыворотке крови, которые находятся на уровне или выше уровня связывающей аффинности антитела для проагстрина, как измеряется *in vitro*. Расчет дозировок для достижения таких концентраций в циркулирующей крови или сыворотке крови, принимающих во внимание биодоступность конкретного антитела находится в рамках способностей квалифицированного специалиста. Для руководства, можно отослать читателя к Fingl & Woodbury, "General Principles" в Goodman and Gilman's The Pharmaceutic Basis of Therapeutics, глава 1, последнее издание, Pagamonon Press, и ссылки, которые там приводятся.

Исходные дозировки могут оцениваться из данных, полученных *in vivo*, таких как модели животных. Животные модели, приемлемые для анализа эффективности соединений для лечения CRC, являются хорошо известными в области техники. Кроме того, животные модели CRC являются описанными в разделе примеры, приведенном ниже. Средний специалист в данной области техники может традиционно адаптировать эту информацию для определения дозировок, приемлемых для введения людям.

Эффективная доза нейтрализующего анти-hPG моноклонального антитела в соответствии с данной заявкой может колебаться от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 75 мг/кг на одно (например, болюс) введение, множественное введение или непрерывное введение или для достижения концентрации в сыворотке крови 0,01-5000 мкг/мл сыворотки на одно (например, болюс) введение, множественное введение или непрерывное введение или составлять любой эффективный интервал или значение, которое находится в этом интервале, в зависимости от состояния, которое подвергается лечению, способа введения и возраста, веса и состояния субъекта. В некоторых воплощениях каждая доза может колебаться от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 50 мкг на килограмм веса тела, например от приблизительно 3 мкг до приблизительно 30 мкг на килограмм веса тела.

Количество, частота и длительность введения будут зависеть от разнообразных факторов, таких как возраст, вес и состояние пациента. Терапевтический режим для введения может длиться от 2 недель до бесконечности, в течение от 2 недель до 6 месяцев, от 3 месяцев до 5 лет, от 6 месяцев до 1 года или 2 лет, от 8 до 18 месяцев или подобно этому. Необязательно терапевтический режим обеспечивает повторные введения, например, один раз в день ежедневно, два раза в день, через день, через два дня, через пять дней, через неделю, через две недели или через один месяц. Повторные введения могут осуществ-

ляться в той же дозе или при отличной дозе. Введение может повторяться однократно, двукратно, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз и более. Терапевтически эффективное количество анти-hPG моноклонального антитела может вводиться в виде единичной дозы или в течение курса терапевтического режима, например, в течение курса, который составляет неделю, две недели, три недели, один месяц, три месяца, шесть месяцев, один год или более.

Терапевтические способы.

Способность нейтрализующих анти-hPG моноклональных антител в соответствии с настоящим изобретением блокировать зависимые от PG ответы, включая клеточную пролиферацию, делает их полезными для лечения колоректального рака. В соответствии с этим в другом аспекте настоящее описание обеспечивает способы лечения CRC у пациентов, которые в этом нуждаются. В общем случае способы включают введение пациенту терапевтически эффективного количества нейтрализующего анти-hPG моноклонального антитела в соответствии с изобретением.

"Субъект" или "пациент", которому вводят анти-hPG моноклональное антитело в соответствии с данной заявкой, предпочтительно представляет собой млекопитающее, такое как животное, отличное от примата (например, корову, свинью, лошадь, собаку, кошку, крысу и т.д.) или примата (например, обезьяну или человека). Субъект или пациент может представлять собой человека, такого как взрослый пациент или педиатрический пациент.

Пациенты, которые являются приемлемыми для терапии с использованием анти-hPG моноклонального антитела, представляют собой пациентов, диагностированных как такие, которые имеют CRC. CRC может быть таковым любого типа или на любой стадии клинического развития или проявления. Приемлемые субъекты включают пациентов с CRC опухолями (операбельными или неоперабельными), пациентов, опухоли которых были хирургически удалены или подвергнуты резекции, пациентов с CRC опухолью, включающей клетки, которые несут мутацию в онкогене, таком как, например, RAS или APC, пациентов, которые получали или получают другую терапию для CRC в комбинации с или дополнительно к терапии при использовании анти-hPG моноклонального антитела. Другие способы терапии для CRC включают, но без ограничения таковыми, химиотерапевтическое лечение, лучевую терапию, хирургическое удаление и лечение с помощью одного или более других терапевтических антител, как подробно описано ниже.

Терапия на основе анти-hPG антитела может сочетаться с или применяться дополнительно к одному или более другим способам лечения. Другие способы лечения включают, но без ограничения, химиотерапевтическое лечение, лучевую терапию, хирургическое удаление и терапию на основе антитела, как описано в данной заявке.

Терапия на основе анти-hPG моноклонального антитела может быть дополнительной к другим способам терапии, включая хирургическое удаление.

Комбинационная терапия, как описывается в данной заявке, вовлекает введение по крайней мере двух агентов, пациенту, первый из которых представляет собой нейтрализующее анти-hPG моноклональное антитело в соответствии с данной заявкой и второй из которых представляет собой второй терапевтический агент. Нейтрализующее анти-hPG моноклональное антитело и второй терапевтический агент могут вводиться одновременно, последовательно или отдельно.

Как используется в данной заявке, нейтрализующее анти-hPG моноклональное антитело и второй терапевтический агент вводятся последовательно, если они вводятся пациенту в тот же день, например, во время того же визита пациента. Последовательное введение может осуществляться через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 ч. В противовес этому анти-hPG моноклональное антитело в соответствии с данной заявкой и второй терапевтический агент, как сообщается, вводятся отдельно, если они вводятся пациенту в различные дни, например, анти-hPG моноклональное антитело в соответствии с данной заявкой и второй терапевтический агент могут вводиться с интервалами 1, 2 или 3 дня, 1, 2 недели или месяц. В способах в соответствии с данной заявкой введение анти-hPG моноклонального антитела в соответствии с данной заявкой может предшествовать введению второго терапевтического агента или следовать за ним.

В качестве неограничивающего примера, нейтрализующее анти-hPG моноклональное антитело и второй терапевтический агент могут вводиться одновременно в течение периода времени, после чего следует второй период времени, в течение которого введение анти-hPG моноклонального антитела в соответствии с данной заявкой и второго терапевтического агента чередуются.

Комбинационные терапии в соответствии с настоящим изобретением могут приводить к более, чем аддитивному или синергетическому, эффекту, обеспечивая терапевтические преимущества, где ни нейтрализующее анти-hPG моноклональное антитело, ни второй терапевтический агент не вводятся в количестве, которое отдельно является терапевтически эффективным. Таким образом, такие агенты могут вводиться в более низких количествах, снижая вероятность и/или тяжесть побочных эффектов.

Второй терапевтический агент может представлять собой химиотерапевтический агент. Химиотерапевтические агенты включают, но без ограничения таковыми, радиоактивные молекулы, токсины, которые также называются цитотоксинами или цитотоксическими агентами, которые включает любой агент, который является разрушительным для жизнеспособности клетки, агенты, 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 (AMC)), антимитотические агенты, цис-дихлородиамин платины (II) (DDP) (цисплатин), диаминодихлор платину, антрациклины, антибиотик, антиметаболиты, аспарагиназу, BCG живую (интравезикулярную), бетаметазон фосфат натрия и бетаметазон ацетат, бикалутамид, блеомицин сульфат, бусульфан, лейковорин кальция, калихеамицин, капецитабин, карбоплатин, ломустин (CCNU), кармустин (BSNU), хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, колхицин, конъюгированные эстрогены, циклофосфамид, циклотосфамид, цитарабин, цитохалазин B, цитоксан, дакарбазин, дактиномицин, дактиномицин (бывший актиномицин), даунорубин HCL, даунорубин цитрат, денилейкин дифтитокс, декразоксан, дибромоманнитол, дигидрокси антрацин дион, доцетаксел, долазетрон мезилат, доксорубин HCL, дронабинол, E.coli L-аспарагиназу, эметин, эпоэтин- α , Erwinia L-аспарагиназу, эстерифицированные эстрогены, эстрадиол, эстрамустин фосфат натрия, бромид этидия, этинилэстрадиол, этидронат, этопозид цитроворум 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, лейп-ролид ацетат, левamisole HCL, лидокаин, ломустин, майтансиноид, мехлорамин HCL, медроксипрогестерон ацетат, мегестрол ацетат, мелфалан HCL, меркаптопурин, месна, метотрексат, метилтестостерон, митрамицин, митамицин C, митотан, митоксантрон, нилутамид, октреотид ацетат, ондасетрон HCL, оксалиплатин, паклитаксел, памидронат динамид, пентостатин, пилокарпин HCL, плимицин, полифепросан 20 с кармустиновым имплантатом, порфирин натрия, прокаин, прокарбазин HCL, пропранолол, ритуксимаб, сарграмостин, стрептозотозин, тамоксифен, таксол, тегафур, тенипозид, тенопозид, тестолактон, тетракаин, тиотепа хлорамбуцил, тиогуанин, тиотепа, топотекан HCL, торемифен цитрат, трастузумаб, третиноин, валрубин, винбластин сульфат, винкристин сульфат и винорелбин тартрат.

Нейтрализующие анти-hPG моноклональные антитела, раскрытые в данной заявке, могут вводиться пациенту, который нуждается в лечении колоректального рака, и который получает комбинацию химиотерапевтических агентов. Типичные комбинации химиотерапевтических агентов включают 5-фторурацил (5FU) в комбинации с лейковорином (фолиновая кислота или LV); капецитабин в комбинации с урацилом (UFT) и лейковорином; тегафур в комбинации с урацилом (UFT) и лейковорином; оксалиплатин в комбинации с 5FU или в комбинации с капецитабином; иринотекан в комбинации с капецитабином, митомин C в комбинации с 5FU, иринотеканом или капецитабином. Является также возможным применение других химиотерапевтических агентов, раскрытых в данной заявке.

Как является известным в данной области техники, химиотерапевтические режимы для колоректального рака при использовании комбинаций различных химиотерапевтических агентов были стандартизированы в клинических исследованиях. Такие режимы часто являются известными по аббревиатурам и включают 5FU Mayo, 5FU Roswell Park, LVFU2, FOLFOX, FOLFOX4, FOLFOX6, bFOL, FUFOX, FOLFIRI, IFL, XELOX, CAPOX, XELIRI, 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.

Нейтрализующие анти-hPG моноклональные антитела могут также сочетаться с другими терапевтическими антителами. В соответствии с этим терапии на основе анти-hPG моноклональных антител могут сочетаться с отличным моноклональным антителом, таким, как, например, но не с целью ограничения, анти-EGFR (EGF рецептор) моноклональное антитело или анти-VEGF моноклональное антитело, или могут вводиться дополнительно к нему. Специфические примеры анти-EGFR антител включают цетуксимаб и панитумумаб. Специфический пример анти-VEGF антитела представляет собой бевацизумаб.

Определение прогастрина при использовании анти-hPG антител.

Анти-PG моноклональные антитела, либо нейтрализующие, либо не-нейтрализующее, являются часто полезными для применений, которые зависят от определения PG, таких, как диагностика CRC или миниторинг эффектов лечения у субъекта с CRC. В соответствии с этим в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики колоректального рака у пациента, включающий определение количества прогастрина в образце от пациента при использовании анти-hPG моноклонального антитела в соответствии с настоящим изобретением. В общем случае способы диагностики колоректального рака у пациента включают измерение прогастрина в образце, полученном от пациента, при использовании анти-hPG моноклональных антител в соответствии с данной заявкой, где измерение количества прогастрина в образце в пределах от 20 до 400 пМ является показательным для колоректального рака. Прогастрин может измеряться, например, в образцах крови, сыворотки, плазмы, ткани и/или клеток. Определение hPG может осуществляться при использовании анализов, известных в области техники и/или описанных в данной заявке, таких, как ELISA, сэндвич ELISA, иммуноблоттинг (Вестерн блоттинг), иммунопреципитация, методика BIACORE и т.п.

Как отмечается в данной заявке, прогастрин представляет собой предпоследний из ряда различных полипептидов, которые образуются в результате посттрансляционного процессинга гена гастринового

продукта. Диагностические, мониторинговые и другие способы, описанные в данной заявке, специфически определяют hPG в противовес другим продуктам гастринного гена, включая продукты деградации. В соответствии с этим в специфических воплощениях hPG определяется при использовании ELISA, как раскрыто в данной заявке, где используются два антитела к hPG, которые нацелены на N- и C-терминальный конец hPG соответственно. В некоторых воплощениях одно из двух антител, используемых для определения, представляет собой анти-hPG моноклональное антитело, как описано в данной заявке. Уровни hPG, которые колеблются от 20 до 400 пМ являются показательными для колоректального рака.

В общем случае процедура определения уровней hPG при использовании анти-hPG моноклональных антител является следующей. Готовят поверхность, такую, как ячейки в планшете на 96 ячеек, с которой связывается известное количество первого, "иммобилизованного" антитела к hPG. Иммуобилизованное антитело может представлять собой, например, анти-hPG антитело, которое связывается с C- или N-терминальным hPG. После блокирования образец для анализа применяют к поверхности, после чего осуществляют период инкубации. Потом поверхность промывают для удаления несвязанного антигена и применяют раствор, содержащий второе антитело к hPG для "определения". Антитело для определения может представлять собой любое из анти-hPG моноклональных антител, описанных в данной заявке, при условии, что антитело для определения связывает отличный от иммуобилизованного антитела эпитоп. Например, если иммуобилизованное антитело связывает C-терминальный пептидный участок hPG, то приемлемое антитело для определения будет таким, которое связывает N-терминальный пептидный участок hPG. Уровни прогастрина потом могут определяться непосредственно (если, например, антитело для определения является конъюгированным со способной к определению меткой) или опосредованно (с помощью меченного вторичного антитела, которое связывает анти-hPG антитело для определения).

В специфическом воплощении уровни hPG измеряют так, как описано ниже для исследуемого образца. Микротитровальные планшеты на 96 ячеек покрывают при использовании от 0,5 до 10 мкг/мл кроличьего C-терминального анти-hPG поликлонального антитела и инкубируют в течение ночи. Потом планшеты трижды промывают с помощью PBS-Твин (0,05%) и блокируют при использовании 2% (вес./об.) обезжиренного высушенного молока PBS-Твин (0,05%). Отдельно готовят исследуемые образцы, контрольные образцы (пустые образцы или PG-негативные образцы плазмы или сыворотки), и приблизительно от 5 пМ ($0,5 \times 10^{-11}$ М) до приблизительно 0,1 нМ (1×10^{-10} М) эталона для сравнения hPG (лиофилизированный hPG, разведенный в PG-негативной плазме или сыворотке) в приемлемом разбавителе (например, PBS-Твин 0,05%). Образцы инкубируют на покрытых планшетах в течение 2-4 ч при 37°C или альтернативно от 12 до 16 ч при 21°C. После инкубирования планшеты трижды промывают с помощью PBS-Твин (0,05%) и инкубируют с 0,001-0,1 мкг/мл N-терминального анти-hPG моноклонального антитела, как описано в данной заявке, слитого с пероксидазой хрена (HRP (Nakane и др., 1974, J. Histochem. Cytochem., 22(12):1084-1091) в течение 30 мин при 21°C. Потом планшеты трижды промывают в PBS-Твин (0,05%) и прибавляют HRP субстрат на 15 мин при 21°C. Реакцию останавливают путем прибавления 100 мкл 0,5 М серной кислоты и осуществляют измерение оптической плотности при 405 нм. Уровни hPG исследуемого образца определяют путем сравнения со стандартной кривой, построенной на основе измерений, полученных на эталоне сравнения hPG.

Типично, пациенты диагностируются на основе инвазивных процедур, таких, как гистологическая оценка ткани, полученной в результате биопсии, а также других инвазивных процедур, таких как колоноскопия. CRC подразделяется на 5 стадий, которые определяются в диапазоне от стадии 0 (опухоль, ограниченная внутренней выстилкой толстой кишки или прямой кишки), к стадии 1 (опухоль во внутренней стенке толстой кишки или прямой кишки), к стадии 2 (рак, который простирается через стенку кишки, но не обнаружен в соседних лимфатических узлах), к стадии 3 (рак, который обнаруживается в лимфатических узлах и ткани, которая окружает толстую кишку или прямую кишку) и до стадии 4 (рак, которые распространился на другие части организма). Исходя из гистологического видения колоректальные опухоли присутствуют в широком спектре новообразований, которые колеблются от доброкачественного роста до инвазивного рака и главным образом представляют собой происходящие от эпителия опухоли (т.е. аденомы и аденокарциномы). Повреждения могут быть классифицированы на три группы: ненеопластические полипы, неопластические полипы (аденоматозные полипы, аденомы) и различные виды рака. Аденоматозные полипы представляют собой доброкачественные опухоли, которые могут подвергаться злокачественной трансформации, и подразделяются на три гистологических типа, в порядке увеличения злокачественного потенциала: тубулярные, тубулярно-ворсистые и ворсистые. Аденокарциномы также были категоризированы в соответствии с их гистологией на муцинозные (коллоидные) аденокарциномы; перстневидноклеточные аденокарциномы; фиброзные опухоли; и нейроэндокринные опухоли.

В противовес существующим в настоящее время средствам для диагностики CRC настоящее изобретение обеспечивает способы для диагностики субъектов с CRC при отсутствии какого-либо гистологического анализа или определения стадии развития заболевания и основывается на измерении уровней hPG, которые могут быть определены исходя из образца крови. Кроме того, способы в соответствии с настоящим изобретением являются полезными для отбора CRC пациентов, приемлемых для анти-hPG

моноклональной терапии, без учета того, как был диагностирован пациент.

Уровни PG в сыворотке являются также полезными в оценке эффективности CRC лечения. В соответствии с этим настоящее описание обеспечивает способ для мониторинга эффективности терапии, направленной против колоректального рака, включающий определение PG уровней у пациента, который подвергается лечению CRC. Способы для мониторинга эффективности терапии, направленной против колоректального рака, включают повторяемое определение hPG уровней при использовании анти-PG моноклонального антитела в соответствии с настоящим изобретением у пациента с колоректальным раком, подвергающегося лечению колоректального рака, где снижение уровней циркулирующего hPG у пациента в течение определенного интервала лечения является показательным для эффективности лечения. Например, после первого измерения уровней циркулирующего hPG у пациента может быть осуществлено второе измерение, одновременно с получением лечения, направленного против колоректального рака, или после него. Потом эти два измерения сравнивают и снижение уровней hPG является показателем для терапевтического преимущества.

В одном своем аспекте изобретение обеспечивает диагностические наборы, содержащие анти-hPG моноклональные антитела (включая конъюгаты антитела). Диагностический набор представляет собой упаковку, включающую по крайней мере одно анти-hPG моноклональное антитело в соответствии с данной заявкой (например, либо в лиофилизированной форме, либо в виде водного раствора) и один или более реагентов, полезных для осуществления диагностического анализа (например, разбавители, меченное антитело, которое связывается с анти-hPG моноклональным антителом, приемлемый субстрат для меченного антитела, hPG в форме, приемлемой для применения в качестве позитивного контроля и эталон сравнения, негативный контроль). В специфических воплощениях набор включает два анти-hPG антитела, где по крайней мере одно из антител представляет собой анти-hPG моноклональное антитело. Необязательно второе антитело представляет собой поликлональное анти-hPG антитело. В некоторых воплощениях набор в соответствии с настоящим изобретением включает N-терминальное анти-hPG моноклональное антитело, как описано в данной заявке.

Анти-hPG антитела могут быть мечеными так, как описано выше. Альтернативно набор может включать меченное антитело, которое связывается с анти-hPG моноклональным антителом и является конъюгированным с ферментом. Если анти-hPG моноклональное антитело или другое антитело является конъюгированным с ферментом для определения, то набор может включать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, предшественник субстрата, который обеспечивает способный к определению хромофор или флуорофор). В дополнение, другие добавки могут включать агенты, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или литический буфер и т.п.). Анти-hPG моноклональные антитела, включаемые в диагностический набор, могут быть иммобилизованными на твердой поверхности, или альтернативно твердая поверхность (например, предметном стекле), на которой может быть иммобилизовано антитело, могут включаться в такой набор. Относительные количества различных реагентов могут варьировать в широком диапазоне для обеспечения концентрации реагентов в растворе, которые существенно оптимизируют чувствительность анализа. Антитела и другие реагенты могут обеспечиваться в виде (самостоятельно или в комбинации) сухих порошков, обычно лиофилизированных, включая наполнители, которые при растворении будут обеспечивать получение раствора реагента, имеющего приемлемую концентрацию.

Наборы могут включать инструктивные материалы, содержащие инструкции (например, прописи) для осуществления диагностических способов. Несмотря на то что инструктивные материалы типично включают написанные или напечатанные материалы, они не ограничиваются таковыми. Средство, способное к сохранению таких инструкций и их передаче заключительному пользователю, предполагается данным изобретением. Такие средства включают, но без ограничения таковыми, электронные носители информации (например, магнитные диски, ленты, картриджи, чипы), оптические средства (например, CD ROM) и т.п. Такие средства могут включать отсылки к Интернет-сайтам, которые обеспечивают такие инструкционные материалы.

10. Примеры

Следующие примеры являются иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Пример 1. Получение моноклональных антител против прогастрина.

Иммуногены для человеческого прогастрина.

Было получено несколько иммуногенов для разработки гибридом, вырабатывающих моноклональные антитела против прогастрина человека. Ранее используемые антигены для получения антител, такие как прогастрин человека полной длины, и иммуногены, которые основываются на остатках 70-80 hPG, оказались неудачными для получения моноклонального иммунного ответа или вызывали образование PG-специфического моноклонального антитела. Как описывается более подробно ниже, антигены из 14 аминокислот и длиннее, которые содержат последовательности, уникальные для hPG либо на N-терминальном, либо на C-терминальном конце белка, были способными к индукции адекватного иммунного ответа у животных и использовались для получения гибридом, вырабатывающих свыше 20 различных моноклональных антител к hPG. Неожиданно было обнаружено, что иммуногены, которые включают остатки 55-80 hPG, некоторые из которых также являются обнаруженными в других пептидах,

имеющих происхождение от гена прогастрина, успешно использовались для получения моноклональных антител, которые были специфическими для hPG. Таблица, приведенная ниже, суммирует исследованные иммуногены.

Таблица 2

Эксперимент	Иммуноген	Номера позитивных клонов
1	Прогастрин человека (SEQ ID NO:20)	0*
1	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-BSA	2
2	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	2
3	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	8
1	BSA-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:97)	0
2	KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:97)	0
3	KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:96)	10
	DT-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:96)	3

* Иммунизированные мыши не демонстрировали иммунного ответа.

Иммуногены, приведенные в табл. 2, были получены в соответствии с методиками, известными в области техники, при использовании химического синтеза пептидной последовательности и линкера, после чего осуществляли перекрестное связывание носителя на основе бычьего сывороточного альбумина (BSA), гемоцианина лимфы улитки (KLH) или дифтерийного токсина (DT) с помощью приемлемого агента для перекрестного связывания (например, MBS (эстер м-малеимидобензоил-N-гидросукцинимид), глутаральдегида или сульфо-SMCC (сульфосукцинимидил 4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат). (Coligan J.E. и др., Current protocols in Immunology, том 2, New York: John Wiley and Sons, 1996, с. 9.0.1-9.0.15; Harlow D.L., Antibodies: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1998, с. 72-87). Используемые линкеры представляли собой один или два остатка аминокислотной цепи (Ahx), слитые с остатком цистеина.

В каждом из трех экспериментов Balb/c мышей 4-5 раз инъецировали с помощью N-терминальных иммуногенов и 2-4 раза с помощью C-терминальных иммуногенов. С каждой инъекцией было введено 10 мкг иммуногена с адъювантом Ribi, Alun или адъювантом Фрейнда.

Слияние клеток и скрининг гибридом.

Сыворотку, полученную от каждой мыши, анализировали с помощью ELISA против иммуногена и собирали спленоциты от мышей с самым сильным иммунным ответом. Спленоциты сливали с Sp2 миеломными клетками при использовании полиэтиленгликоля, и высевали на планшеты на 96 ячеек при плотности 15000-35000 клеток на ячейку. Слитые клетки подвергали селекции при использовании среды, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (HAT среда).

Супернатанты гибридом подвергали скринингу при использовании ELISA на способность связывать иммуноген и прогастрин полной длины. Осуществляли три цикла скрининга, для того чтобы убедиться, что отобраны только те гибридомы, которые стабильно вырабатывают антитела, узнающие hPG полной длины и иммуноген.

Скрининг гибридом и моноклональных антител для определения связывания с различными PG пептидами проводили при использовании методики ELISA так, как описано ниже. Эту процедуру использовали для скрининга на PG связывание слитых спленоцитов, субклонов первого и второго цикла, а также на проверку специфичности антитела по отношению к PG, по сравнению с другими пептидами, которые имеют происхождение от гена гастринина.

Кратко, планшеты на 96 ячеек инкубировали в течение ночи при 4°C с приемлемой(ыми) концентрацией(ями) исследуемого пептида в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), после чего ячейки трижды промывали с помощью промывочного раствора (PBS и 0,1% Твин-20) и 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 трижды промывали ячейки и прибавляли первичное антитело - антитело, которое подвергается анализу. Для начального скрининга на слитые спленоциты прибавляли 50 мкл культурального супернатанта из каждой культуры, которая подвергается оценке, к каждой ячейке планшета. В анализах, которые осуществляли на моноклональных антителах, 100 мкл исследуемого антитела в PBS и 0,1% Твин-20 прибавляли к каждой ячейке. Потом планшеты инкубировали в течение 2 ч при 22°C, после чего раствор первичного антитела отбрасывали и после этапа промывки (3×100 мкл промывочного раствора, как указано выше) заменяли блокирующим раствором, содержащим вторичное антитело, которое связывает первичное антитело и является слитым с ферментом. Вторичное антитело представляло собой козье анти-мышинное IgG (Fc) антитело, слитое с пероксидазой хрена. После 1-часовой инкубации со вторичным антителом прибавляли 100 мкл субстратного раствора (например, Fast OPD или О-фенилендиамин дигидрохлорид, который является доступным от Sigma-Aldrich Co., приготовленный в соответствии с инструкциями производителя) к каждой ячейке и инкубировали в темноте в течение 20 мин при 22°C. Потом реакцию останавливали

путем прибавления 50 мкл 4N серной кислоты и количество катализированного субстрата определяли путем измерения оптической плотности (O.D.) при 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 или антитела в зависимости от цели проведения эксперимента. Образцы считали позитивными на анти-PG антитела, если измеренное значение O.D. находилось в интервале 0,2-1,5. Этот интервал O.D. использовали для идентификации антител, которые связывают иммуногенный пептид, используемый для инокуляции животных.

Типичные материалы и реагенты, применяемые в анализе, являются представленными ниже.

Компонент	Источник	Ссылочный номер
Планшеты на 96 ячеек Greiner Microlon	Dutscher	# 655092
10X DPBS	Dutscher	# P04-53500
Твин-20	Sigma	# 63158
BSA (для блокирования)	Euromedex	# 04-100-810-C
Гидролизированный казеин (тогда, когда используется вместо BSA)	Sigma	22090
Гибридомные супернатанты или N-терминальное или C-терминальное моноклональные антитела	BioRéalités	Как описано в данной заявке
Козий анти-мышинный IgG (Fc), слитый с пероксидазой	Thermo	# 31439
Fast OPD	Sigma	# P9187
95-97% серная кислота	Sigma	# 30743

Типичные пептиды, используемые в скрининге гибридом и моноклональных антител, являются следующими.

Пептиды для скрининга	Источник	Ссылочный номер
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
Рекомбинантный прогастрин человека	BioRéalités	McQueen и др., 2002, J. Protein Chem., 21(7):465-471.
Человеческий гастрин I (G-17)	Sigma	# 53673
Удлиненный глицином гастрин 17 (G-Gly)	Auspep	# S10082
KLH	Pierce (Perbio)	# 77653
C-терминальный фланкирующий пептид (CTFP)	Auspep	# R41345

Рекомбинантный прогастрин человека получали так, как описывается у McQueen и др., 2002, J. Protein Chem., 21:465-471) с незначительными модификациями. Кратко, бактериальные клетки BL21 DE3 Star (Invitrogen) подвергали трансформации с помощью вектора, содержащего последовательность прогастрина человека полной длины в PGEX-GST-TEV скелете (GE Healthcare).

Бактерии выращивали в среде LB, содержащей 0,5 mM IPTG в течение 3 ч при 37°C. Разбивали бактериальные осадки при использовании французского пресса и отделяли растворимые, а также нерастворимые фракции путем центрифугирования. После этого меченный GST hPG изолировали при использовании аффинной колонки с глутатионом и PG отщепляли от GST с помощью протеазы вируса гравировки табака NIa (TEV). В заключение PG подвергали диализу против заключительного раствора (10 mM Hepes, 0,5 % BSA, pH 7,4).

Сначала гибридомы клонировали, потом субклонировали и размножали. Позитивные гибридомы отбирали на основе следующих критериев:

- (1) специфичность в отношении PG и иммуногена;
- (2) относительная аффинность антитела;
- (3) рост гибридомных клеток;
- (4) секреция антитела; и
- (5) моноклональность гибридом.

Анализы и критерии отбора были следующими.

Для специфичности супернатанты исследуемых гибридом оценивали с помощью ELISA так, как описано выше (50 мкл 1 в 2 разведения супернатанта в аналитической среде PBS). Гибридомы считали позитивными, если измеренное значение O.D. составляло от 0,2 до 1,5 в анализе при использовании hPG или иммуногена, применяемого для инокуляции мышей. В качестве дополнительного для специфичности клоны отбирали на основе отсутствия связывания с другими пептидами, которые происходят от гена гастрина. Отсутствие связывания измеряли как нестатистически значимое различие между сигналом от исследуемых ячеек и средним сигналом от контрольных ячеек, содержащих только PBS.

Для характеристики аффинности серийные разведения антитела оценивали с помощью ELISA на связывание с hPG так, как описано выше. Стандартные разведения, используемые в анализах N-терминального антитела, составляли 0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 нг/мл. Стандартные разведения, ис-

пользуемые в анализах С-терминального антитела, составляли 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, нг/мл.

Рост клеток гибридомы в процессе повторяемых циклов серийной культуры оценивали путем микроскопического наблюдения через 2 дня после посева. Клетки, как предполагалось, пролиферировали и заполняли ячейку через 48 ч после посева. Осуществляли серийное разведение (типично, первое разведение при 1:5, после этого по крайней мере 2 дополнительных разведения при 1:10), после этого осуществляли микроскопическое наблюдения через 48 ч для подтверждения адекватного роста. Клетки гибридом, которые соответствуют этим критериям, разводили и снова высевали, после чего подвергали исследованию под микроскопом через 48 ч. Такие циклы "разведение-высевание-наблюдение" повторяли три раза до тех пор, пока гибридома не считалась такой, которая соответствует критерию "роста".

Секрецию антитела анализировали путем осуществления ELISA при использовании hPG так, как описано выше, на серийных разведениях (1/2, 1/20, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000) свободных от клеток супернатантов.

Моноклональность определяли путем высевания клона или гибридомы в планшет на 96 ячеек при плотности 0,6 клетки/ячейки и инкубировали в течение 2 недель. Через 2 недели супернатанты оценивали на связывание hPG с помощью ELISA и клональную природу популяции определяли на основе наличия единообразного значения OD по крайней мере для 90% ячеек, содержащих живые клетки.

Моноклональные антитела против прогастрина полной длины.

Каждую из трех мышей инокулировали с помощью рекомбинантного прогастрина человека (описан выше). Иммуноген не вызывал какого-либо определяемого иммунного ответа у мышей: нельзя было определить связывание PG при использовании ELISA так, как описано выше. Никакого связывания не происходило.

N-терминальные моноклональные антитела против прогастрина.

Как указано выше, N-терминальные моноклональные антитела получали против антигена, содержащего остатки 1-14 hPG, связанные с бычьим сывороточным альбумином (BSA) или гемоцианином лимфы улитки (KLH) с помощью Ahx-Cys линкера на C-терминальном конце 14 остатка антигена (SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys (SEQ ID NO: 26)).

В первом эксперименте трех мышей инокулировали с помощью связанного с BSA N-терминального пептида. Из трех слияний, которые осуществляли при использовании спленоцитов от двух из трех мышей, одно слияние не давало клонов, которые демонстрируют связывание с PG или с иммуногеном. Из двух других слияний, высеянных на планшеты с 96 ячейками, одно обеспечивало 4 PG-связывание и PG-специфические гибридомы, из которых восстанавливали одну стабильную, вырабатывающую IgG субклон. Второе слияние также приводило к получению одного стабильного субклона гибридомы, вырабатывающего IgG1, связывающего PG и PG-специфического. В общей сложности из трех мышей 17 первых циклов гибридомы (или 0,74% гибридом, которые подвергали скринингу) были позитивными на связывание PG и иммуногена, из которых субклонировали 9 позитивных линий клеток, из которых две были позитивными линиями клеток, вырабатывающими IgG. Таким образом, первый эксперимент обеспечивал получение двух клонов после пары циклов субклонирования, которые сохраняли сильный позитивный сигнал против иммуногена и hPG (позитивные для "PG-связывания") и не связывали другие пептиды, которые происходят от гена гастрин (позитивные на "специфический для PG"): гибридомы 43B9G11 и WE5H2G7, вырабатывающие анти-hPG Mab 1 и анти-hPG Mab 2 соответственно.

Во втором эксперименте мышей инокулировали с помощью связанного с KLH N-терминального пептида. Два слияния осуществляли при использовании Sp2 миеломных клеток. Из них только одно слияние генерировало позитивные по PG- и иммуногену клоны, которые были также PG-специфическими. Из них были высеяны 1920 гибридомы. Много проанализированных гибридом были позитивными с иммунизирующими пептидами, но не с прогастрином, или не были специфическими для PG. Специфически, 297 гибридом продемонстрировало сильный позитивный сигнал для иммунизирующего пептида (приблизительно 15,5% из 1920), из которых 124 были также позитивными по связыванию прогастрина (6,5%). Существовало 36 гибридом, или 1,8%, которые были позитивными для прогастрина, но не для используемого иммуногена. Только 12 гибридом из 1920 высеянных обеспечивали получение антител, которые специфически связываются с прогастрином, но не с другими продуктами гена гастрин (0,6% от общего количества гибридом, 3,6% клонов, которые были позитивными для пептида и/или прогастрина в первом скрининге). Из 12 отобранных клонов только 2 были достаточно стабильными для того, чтобы развивать перманентные клоны, их замораживали для долгосрочного хранения. Таким образом, в этом втором эксперименте было высеяно почти 2000 гибридом, было восстановлено только 2 клон, 6B5B11C10 (вырабатывающий анти-hPG Mab 3) и 20D2C3G2 (вырабатывающий анти-hPG Mab 4), вырабатывающие анти-hPG Mab 3 и Mab 4 соответственно, которые экспрессируют моноклональные антитела, способные к связыванию hPG и иммунизирующего пептида, а также обладающие специфичностью к прогастрину по сравнению с другими продуктами гастринного гена и высокой аффинностью к hPG. Оба типичных антитела были такими IgG1 изотипа.

В третьем эксперименте мышей инокулировали с помощью того же иммуногена, что и во втором эксперименте. Слияния с Sp2 миеломными клетками осуществляли при использовании спленоцитов, полученных от двух мышей с самым сильным иммунным ответом. Гибридомы высевали из этих слияний

(3840 гибридомы из одного слияния каждая, на мышь) и супернатанты анализировали на связывание PG и иммуногена, а также на PG-специфичность. Из каждого слияния 6 гибридом продемонстрировали PG-специфичность, из которых 3 субклона были отобраны как такие, которые соответствуют требованиям проведения дальнейшего отбора на рост, моноклональность, секрецию антитела, относительную аффинность. Таким образом, в общей сложности 2,9% гибридом, исследованных после посева (220/7680), были позитивными для PG и иммуногена, из которых 0,15% представляли собой позитивные клоны (12/7680), высевали восстановленные заключительные субклоны, составляющие 0,15% от исходных гибридом (6/7680). Этот эксперимент обеспечивал гибридомы 1E9A4A4 (вырабатывающая анти-hPG MAб 15), 1E9D9B6 (вырабатывающая анти-hPG MAб 16), 1C8D10F5 (вырабатывающая анти-hPG MAб 17), 1A7C3F11 (вырабатывающая анти-hPG MAб 18), 1B3B4F11 (вырабатывающая анти-hPG MAб 19) и 1C11F5E8 (вырабатывающая анти-hPG MAб 20).

Таблица, приведенная ниже, показывает количество клонов, посеянных для каждого эксперимента, используемый иммуноген, а также количество и процентное соотношение гибридом, вырабатывающих моноклональные антитела, которые узнают как иммуноген, так и прогастрин полной длины.

Таблица 3

Эксперимент	Иммуноген	Высеянные клоны	PG ⁺ гибридомные супернатанты	Специфические для PG клоны	Специфические для PG, вырабатывающие IgG субклоны
1	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-BSA	2304	17 (0,74%)	9 (0,39%)	2 (0,087%)
2	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	1920	124 (6,5%)	12 (0,6%)	2 (0,1%)
3	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	7680	220 (2,9%)	12 (0,15%)	6 (0,1%)

С-терминальные моноклональные антитела против прогастрина.

С-терминальные моноклональные антитела получали против антигена, содержащего остатки 55-80 hPG, связанного либо с KLH, либо с DT, с помощью Cys-Ahx-Ahx линкера на N-терминальном конце антигена, содержащего 26 остатков (Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 96)). Попытки получить гибридомы с меньшим антигеном, содержащим только остатки 70-80 hPG, Cys-Ahx-Ahx-FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 97), конъюгированным либо с BSA, либо с KLH, не обеспечивали получения какого-либо клона.

Осуществляли три эксперимента. В первых двух экспериментах, в которых использовали более короткий пептид, было восстановлено 0 субклонов. Специфически в первом эксперименте 4 мышей инъецировали с помощью С-терминального пептида, соответствующего SEQ ID NO: 97, связанного с BSA. Ни одно из полученных слияний не обеспечивало получение вырабатывающих IgG гибридом. Во втором эксперименте 6 мышей инъецировали, по 3 для каждого из указанных вариантов, с помощью пептида, соответствующего SEQ ID NO: 97, связанного с KLH на своем N-терминальном конце, или пептида, соответствующего SEQ ID NO: 97, связанного с KLH на своем С-терминальном конце. Для первого иммуногена осуществляли слияния и восстанавливали гибридомы, но не было изолировано никаких субклонов, позитивных в отношении связывания PG и PG-специфичности. Для второго иммуногена ни одна из мышей не развивала иммунный ответ и никаких слияний не осуществляли.

В третьем эксперименте использовали пептид из 26 аминокислот, включая С-терминальные последовательности, которые не являются уникальными для hPG. Инъецировали мышей иммуногеном, который включает пептид, соответствующий SEQ ID NO: 96 и связанный либо с KLH, либо с DT. Слияния с Sp2 миеломными клетками осуществляли при использовании спленоцитов, полученных от двух мышей с самым сильным иммунным ответом. При этом высевали 3840 гибридом из одного слияния на мышь. В общей сложности из 7680 гибридом, подвергнутых скринингу, из которых 382 (5%) были PG-позитивными и специфическими для PG, 13 (0,17%) были стабильными, восстанавливали позитивные субклоны: 1B4A11D11 (вырабатывающий анти-hPG MAб 5), 1B6A11F2 (вырабатывающий анти-hPG MAб 6), 1B11E4B11 (вырабатывающий анти-hPG MAб 7), 1C10D3B9 (вырабатывающий анти-hPG MAб 8), D8F5B3 (вырабатывающий анти-hPG MAб 9), 1E1C7B4 (вырабатывающий анти-hPG MAб 10), 2B4C8C8 (вырабатывающий анти-hPG MAб 11), 2B11E6G4 (вырабатывающий анти-hPG MAб 12), 2C6C3C7 (вырабатывающий анти-hPG MAб 13), 2H9F4B7 (вырабатывающий анти-hPG MAб 14), 1F11F5E10 (вырабатывающий анти-hPG MAб 21), 1F11F5G9 (вырабатывающий анти-hPG MAб 22) и 1A11F2C9 (вырабатывающий анти-hPG MAб 23).

Таблица, приведенная ниже, показывает количество клонов, посеянных для каждого эксперимента, используемый иммуноген, а также количество и процентное соотношение гибридом, вырабатывающих моноклональные антитела, связывающие PG и иммуноген, которые являются PG-специфическими и соответствуют критериям отбора (рост, моноклональность, относительная аффинность и т.п.) после трех циклов субклонирования.

Таблица 4

Эксперимент	Иммуноген	Высеянные клоны	PG ⁺ гибридные супернатанты	Специфические для PG клоны	Специфические для PG, вырабатывающие IgG, субклоны
1	BSA-линкер-(SEQ ID NO:97)	3072	10 (0,32%)	9 (0,29%)	0
2	KLH-линкер-(SEQ ID NO:97) (SEQ ID NO:97)-линкер-KLH	1920	27 (0,47%) 0	4 (0,07%) 0	0 0
3	KLH-линкер-(SEQ ID NO:96) DT-линкер-(SEQ ID NO:96)	3840 3840	192 (5%) 190 (4,95%)	17 (0,44%) 13 (0,34%)	10 (0,26%) 3 (0,08%)

Моноклональные антитела и стабильные гибридомы, из которых они получены, подробно представлены в таблице, приведенной ниже.

Таблица 5

Моноклональное антитело	Гибридома	Мышиный Ig
MAb 1	43B9G11	IgG1
MAb 2	WE5H2G7	IgG1
MAb 3	6B5B11C10	IgG1
MAb 4	20D2C3G2	IgG1
MAb 5	1B4A11D11	IgG1
MAb 6	1B6A11F2	IgG1
MAb 7	1B11E4B11	IgG1
MAb 8	1C10D3B9	IgG1
MAb 9	1D8F5B3	IgG1
MAb 10	1E1C7B4	IgG1
MAb 11	2B4C8C8	IgG1
MAb 12	2B11E6G4	IgG1
MAb 13	2C6C3C7	IgG1
MAb 14	2H9F4B7	IgG1
MAb 15	1E9A4A4	IgG1
MAb 16	1E9D9B6	IgG1
MAb 17	1C8D10F5	H/O
MAb 18	1A7C3F11	IgG2
MAb 19	1B3B4F11	IgG2
MAb 20	1C11F5E8	IgG2
MAb 21	1F11F5E10	IgG2
MAb 22	1F11F5G9	IgG2
MAb 23	1A11F2C9	IgG2

Гибридомные линии клеток 1B4A11D11 (MAb 5, регистрационный номер CNCM I-4371), 1B6A11F2 (MAb 6, регистрационный номер CNCM I-4372), 1B11E4B11 (MAb 7, регистрационный номер CNCM I-4373), 2B4C8C8 (MAb 11, регистрационный номер CNCM I-4374), 2B11E6G4 (MAb 12, регистрационный номер CNCM I-4375) и 1E9A4A4 (MAb 15, регистрационный номер и CNCM I-4376) были депонированы в соответствии с Будапештским договором и получены 6 октября 2010 г. Национальной коллекцией культур микроорганизмов (CNCM), Институт Пастера, Париж, Франция.

Клонирование анти-hPG моноклональных антител.

Моноклональные антитела, полученные с помощью гибридом, могут быть клонированы и секвенированы при использовании методик, известных специалисту в данной области техники. Моноклональные антитела из гибридом, приведенных в табл. 5, приведенной выше, были секвенированы так, как описано ниже.

Последовательности, кодирующие моноклональные антитела, полученные при использовании гибридом 6B5B11C10 и 20D2C3G2, клонировали и секвенировали при использовании стандартных методик. Кратко, общую РНК изолировали из замороженных осадков клеток при использовании реагента RNABee, AMSBio каталожный номер CS-104B, которые использовали в соответствии с инструкциями производителя. кДНК для V-участков получали из мРНК при использовании полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-ПЦР), после чего осуществляли быструю 5' амплификацию концов кДНК (RACE). Синтез кДНК осуществляли при использовании специфических для константного участка праймеров, после чего очищали продукт первой цепочки и использовали терминальную дезоксирибонуклеотид трансферазу для присоединения гомополимерных концов к 3' концам кДНК. "Наращенные" последовательности кДНК потом амплифицировали с помощью ПЦР при использовании пар праймеров (один праймер для каждого гомополимерного хвоста) и либо V_H, либо V_L участка соответственно. Варибель-

ный участок тяжелой и легкой цепи продуктов ПЦР потом клонировали в "ТА" клонирующий вектор (p-GEM-T easy, Promega кат. номер А 1360) и секвенировали при использовании стандартных методик. См. фиг. 2А, 2В (MAb 3), фиг. 2С, 2D (MAb 4).

Последовательности, кодирующие моноклональные антитела, которые вырабатываются гибридомами 1C10D3B9, 2C6C3C7, 1B3B4F1 и 1E9D9B61, определяли так, как описано ниже. Общую РНК изолировали из замороженных осадков клеток при использовании набора RNAqueous®-4PCR (Ambion кат. номер AM1914) при использовании инструкций производителя. мРНК V-участка тяжелой цепи амплифицировали при использовании набора из шести пулов вырожденных праймеров (от HA до HF), а РНК V-участка легкой цепи амплифицировали при использовании набора из восьми пулов вырожденных праймеров, семь для кластера (от KA до KG) и один для λ кластера (LA). кДНК для переменных участков получали из мРНК при использовании RT-ПЦР. Синтез кДНК осуществляли при использовании праймеров, специфических для константного участка, после чего проводили ПЦР при использовании пулов вырожденных праймеров для 5' мышиной сигнальной последовательности и праймеров для 3' константных участков для каждого из IgGVH, IgkVL и Ig λ VL. (Jones и др., 1991, Rapid PCR cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions, Bio/Technology, 9:88-89). ПЦР продукты переменного участка тяжелой и легкой цепей потом клонировали в "ТА" клонирующий вектор (p-GEM-T easy, Promega кат. номер А 1360) и секвенировали при использовании стандартных методик. См. фиг. 2Е, 2F (MAb 8), 2G, 2H (MAb 13), 2I, 2J (MAb 16) и 2K, 2L (MAb 19).

Пример 2. Связывающая аффинность для анти-hPG антитела.

А. Относительная аффинность.

Относительную аффинность типичных моноклональных антител измеряли при использовании способа ELISA, описанного выше, в котором ячейки покрывали с помощью раствора пептида, содержащего 50 нг прогастрина, и потом инкубировали в присутствии повышающихся концентраций каждого моноклонального антитела, как представлено ниже.

Моноклональное антитело	Исследуемый интервал концентраций
N-терминальные анти-hPG моноклональные антитела MAbs 1-4	0,001-1 мкг/мл
N-терминальные анти-hPG моноклональные антитела MAbs 3, 15-20	0,1-100 нг/мл
C-терминальные анти-hPG моноклональные антитела MAbs 5-14, 21-23	0,03-30 нг/мл

Фиг. 3А показывает относительную аффинность четырех анти-hPG моноклональных антител, MAbs 1-4, исследуемых при концентрациях антитела от 1 нг/мл до 1 мкг/мл. Фиг. 3В показывает относительную аффинность N-терминальных анти-hPG моноклональных антител MAbs 3 и 15-20, исследуемых при концентрациях антитела 0,1-100 нг/мл. Фиг. 3С показывает относительную аффинность C-терминальных анти-hPG моноклональных антител MAbs 5-14 и 21-23, исследуемых при концентрациях антитела 0,03-30 нг/мл.

В. Измерение константы аффинности.

Для обеспечения более абсолютной количественной оценки аффинности для моноклональных антител измеряли константы аффинности при использовании методики Proteon (BioRad) в соответствии с Nahshol и др., 2008, Analytical Biochemistry, 383:52-60, данный источник является введенным в данную заявку в качестве ссылки в своей целостности. Кратко, анти-мышинное IgG антитело (50 мкг/мл) сначала наносили на сенсорный чип, убеждаясь, что сигнал, определяемый чипом, после инъекции снижается до 10000-11500 RU (единиц ответа). Потом вводили мышинное моноклональное антитело, которое подвергается анализу (типичная концентрация: 30 мкг/мл). Достаточное связывание антитела, которое подвергается анализу, определяли на основе дополнительного сигнала, который составляет по крайней мере 500 RU на сенсорном чипе. Потом измеряли зависимое от времени взаимодействие моноклонального анти-прогастринового антитела и прогастрина путем инъекции варьирующих концентраций прогастрина, например 200, 100, 50, 25 и 12,5 нМ, и определяли уровень диссоциации. Типично несколько каналов были доступны для тестирования множества антител параллельно в одном эксперименте, создавая возможность оценивать связывание исследуемого антитела при варьирующих концентрациях PG параллельно. Типично один канал резервировали для мышинного моноклонального антитела, которое не является специфическим для PG, в качестве контроля неспецифического связывания, а в другой канал инъецировали при использовании буфера для разведения вместе с базовой линией для фонового сигнала. В общем случае не определяли никакого связывания в каналах, инъецированных с помощью неспецифического мышинного антитела. Антитела, демонстрирующие высокий уровень ассоциации в этом наборе, что может приводить к насыщению захваченного моноклонального антитела прогастрином, могут анализироваться против более низких концентраций прогастрина (50, 25, 12,5, 6,25 и 3,125 нМ), позволяя осуществлять более точное измерение.

Константы аффинности (KD) подсчитывали как соотношение между константой диссоциации (kd) и

константой ассоциации (K_a). Экспериментальные значения подтверждали путем анализа статистически релевантного подобию между экспериментальными кривыми на основе измерений связывания и теоретических профилей. Математическая модель, используемая в Proteon экспериментах выбора подгонки какой-либо из экспериментальных кривых к теоретической модели, представляла собой модель Ленгмюра, основанную на 1:1 взаимодействии между молекулами прогастрина и анти-прогастриновыми моноклональными антителами.

Таблица 6

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

Пример 3. Агрегация анти-hPG антител.

Агрегация антител может снижать терапевтическую эффективность путем снижения количества антител, доступных для связывания с целевым белком. Антитела с очень низкими уровнями агрегации являются предпочтительными для терапевтических применений. Каждая партия антитела будет варьировать по сравнению с другими партиями того же моноклонального антитела. В общем случае является желательным использовать партии с низкой агрегацией. Для количественной оценки агрегации антитела растворы антитела помещали в спектрофлуориметр (Photon Technology International) и облучали при 280 нм. Рассеивание измеряли при 280 нм, в то время как эмиссию благодаря ароматическим кислотам (в основном триптофану) измеряли при 330 нм.

Уровень агрегации потом количественно оценивали путем подсчета соотношения между значениями OD, измеренными при 280 нм против 330 нм, как описывается у Nominé и др., 2003, Biochemistry, 42:4909-4917. Более высокое соотношение 280/330 нм свидетельствует о более высокой агрегации. Концентрация используемого антитела составляла 15 мкг/мл и была в 5-15 раз выше, чем та, которая используется для *in vitro* способов лечения.

Результаты являются представленными в табл. 7, представленной ниже и на фиг. 4.

Таблица 7

Образец	Соотношение 280/330 нм
Бычий сывороточный альбумин (n=1)	6,4
Анти-hPG MAb 1 (n=1)	15,42
Анти-hPG MAb 2 (n=2)	9,81
Анти-hPG MAb 3 (n=2)	3,08
Анти-hPG MAb 4 (n=2)	1,94

Пример 4. Связывающая специфичность анти-hPG моноклональных антител.

PG представляет собой только один из пептидных продуктов гена гастрин. Другие продукты гастринного гена играют определенную роль в нормальном гомеостазе, но роль PG в CRC делает его полезной мишенью для терапевтических и диагностических целей. Моноклональные антитела, описанные в данной заявке, являются специфическими для прогастрина полной длины по сравнению с другими пептидами, возникающими в результате экспрессии и процессинга гена гастрин, такими как удлинённый с помощью глицина гастрин (G17-gly), амидированные (гастрин 17) гастрины и С-терминальный фланкирующий пептид (CTFP). Эти пептиды являются присутствующими в циркулирующей крови. Связывающая специфичность анти-hPG моноклональных антител определяется путем анализа антител против прогастрина человека и других пептидов, имеющих происхождение от гена гастрин, при использовании анализа ELISA, описанного выше в примере 1.

В частности, ячейки покрывали с помощью раствора, содержащего один из следующих пептидов при указанных количествах: прогастрин, гемоцианин лимфы улитки (KLH), амидированный гастрин-17 (G17), удлинённый глицином гастрин 17 (Ggly) или С-терминальный фланкирующий пептид (CTFP).

Пептиды скрининга	Исследуемое количество
Рекомбинантный прогастрин	50 нг (экспер. 1) 25 нг (экспер. 2)
Человеческий амидированный гастрин I (G-17)	50 и 250 нг
Удлинённый глицином гастрин 17 (G17-Gly)	50 и 250 нг
KLH	50 и 250 нг
С-терминальный фланкирующий пептид (CTFP)	50 и 250 нг

В первом эксперименте использовали 3 нг/мл (0,3 нг) анти-hPG MAb 3 и 1 мкг/мл (0,1 мкг) каждого из анти-hPG MAb 1, 2 и 4. См. фиг. 5A. В втором эксперименте связывающую специфичность анти-hPG MAb 5-14 и 21-23 определяли при концентрации 0,3 нг/мл (см. фиг. 5B), а связывающую специфичность анти-hPG MAb 3, 15-20 анализировали при концентрации 1 нг/мл (см. фиг. 5C).

Антитела, которые демонстрируют слабую реакцию на высокие количества KLH, который является слитым с антигенным пептидом, использовали в некоторых иммуногенах для иммунизации мышей в примере 1, представленном выше. Не существовало определяемого влияния BSA на связывание PG каким-либо антителом, включая те, которые возникали против иммуногенов, которые включали BSA в качестве носителя.

Все антитела продемонстрировали высокую специфичность для связывания с hPG полной длины (анализировали при концентрации 50, а потом 25 нг) по сравнению с другими пептидами, которые имеют происхождение от гастринного гена, такими, как амидированный гастрин-17, удлинённый глицином гастрин 17 (Ggly) и С-терминальный фланкирующий пептид, пептид из 5 аминокислот, который отщепляется от прогастрина во время нормального процессинга полипептида с образованием гастрина. Типичные антитела не продемонстрировали определяемого связывания (сигнал выше "только PBS" фона) с любым из пептидов, имеющих происхождение от гастринного гена, отличных от hPG.

Пример 5. Конкурентный анализ.

Способность анти-hPG моноклонального антитела конкурировать с анти-hPG поликлональным антителом за связывание с прогастрином определяли при использовании ELISA с "иммобилизованным" анти-hPG антителом и анти-hPG антителом для определения. Анти-hPG MAb 3 подвергали анализу так, как описано ниже: планшеты на 96 ячеек предварительно покрывали с помощью С-терминального поликлонального антитела к прогастрину, полученного против пептида, содержащего остатки 71-80 hPG. Потом планшеты инкубировали с 100 пМ прогастрина, после чего прибавляли 10 мкг/мл биотинилированного N-терминального анти-hPG поликлонального антитела, образованного против пептида, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, и повышающиеся концентрации анти-hPG MAb 3 моноклонального антитела. Связывание биотинилированного N-терминального анти-hPG поликлонального антитела определяли путем инкубации планшетов с стрептавидин-HRP, после чего обрабатывали OPD в соответствии со стандартными прописями. Связывание измеряли с помощью количественной люминисценции.

Результаты показывают, что повышающиеся концентрации (мкг/мл) анти-hPG MAb 3 снижали спо-

способность анти-hPG антитела связываться с прогастрином, демонстрируя тот факт, что моноклональное антитело конкурирует с поликлональным антителом (см. фиг. 6).

Пример 6. Картирование эпитопов.

Специфические эпитопы, связываемые типичными моноклональными антителами картировали при использовании SPOT методики и аланинового сканирования, как описывается у Laune, D. и др., 2002, J. Immunol. Methods, 267:53-70; и Laune, D., 1997, J. Biol. Chem., 272:30937-30944 соответственно. В SPOT методике пептидные последовательности из 15 аминокислот, включающие путативный эпитоп, получали и наносили на нитроцеллюлозные мембраны, которые потом зондировали при использовании исследуемого антитела для определения минимальной последовательности эпитопа, которая узнается антителом. Аланиновое сканирование использовали для определения остатков в пределах эпитопа, которые являются критическими для связывания антитела: каждый остаток в пределах путативного эпитопа подвергают мутированию один за другим на остаток аланина и содержащие аланин пептиды потом зондируют с помощью исследуемого антитела.

Семейства эпитопов идентифицировали для типичного антитела в соответствии с данной заявкой. Для N-терминального моноклонального антитела к hPG MAb 1-4 и 15-20 эпитопы включают, по крайней мере, следующие последовательности: DAPLG (SEQ ID NO: 28), PDAPLG (SEQ ID NO: 29), PRSQQPD (SEQ ID NO: 30), WKPRSQQPD (SEQ ID NO: 31) или WKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 32), как показано в табл. 8, представленной ниже.

Таблица 8

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

Для C-терминальных моноклональных антител к hPG MAb 5-7, 9-12, 14 и 21-23 эпитопы включают, по крайней мере, следующие последовательности: FGRR (SEQ ID NO: 33), MDFGR (SEQ ID NO: 34), AEDEN (SEQ ID NO: 35) и GWMDFGRR (SEQ ID NO: 36), как показано в табл. 9, представленной ниже.

Таблица 9

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

Пример 7. Нейтрализующая активность анти-hPG антитела в отношении раковых линиях клеток.

(А) Нейтрализующая активность анти-hPG моноклональных антител.

Анти-hPG моноклональные антитела снижают выживание клеток в эталонных клеточных линиях колоректального рака. Приемлемые клеточные линии колоректального рака являются известными в области техники. Например, HCT116, LS174T, SW480 и SW620 представляют собой линии клеток, которые обычно используются для изучения рака толстого кишечника, которые при этом вырабатывают и секретируют прогастрин. Моноклональные антитела к PG подвергали анализу на их способность ингибировать пролиферацию в этих различных линиях клеток. Выживание клеток каждой из HCT116, LST174T, SW480 и SW620 подвергали анализу при использовании различных анти-hPG моноклональных антител.

Для каждого эксперимента 50000 клеток высевали в планшеты на 6 ячеек в среде, содержащей фетальную сыворотку теленка, и инкубировали в течение 8 ч. Клетки подвергали истощению сыворотки в течение ночи и через 24 ч после высевания (время "T0") клетки обрабатывали в двукратной повторности каждые 12 ч в течение 48 ч при отсутствии фетальной сыворотки теленка с помощью 1 мкг/мл моноклонального контрольного антитела (мышинный анти-человеческий IgG1, Calbiochem, кат. номер #411451) (CT mAb) или с помощью 1 мкг/мл анти-hPG MAb 1-4, как указано. При дальнейшей количественной оценке моноклональных антител антитела определяли как такие, которые используются при концентрации приблизительно 3-5 мкг/мл. Количество клеток при T0 подсчитывали в контрольной ячейке для каждого эксперимента. Для HCT116 клеток эксперименты осуществляли в присутствии 0,5% фетальной сы-

воротки теленка. Через 48 ч после начала обработки количество выживших клеток в каждой ячейке трижды подсчитывали в слепом эксперименте. Снижение клеточной пролиферации или выживания CRC определяли путем подсчета выживших клеток, обработанных анти-hPG MAb, как процент от клеток, обработанных контрольным MAb. Количество клеток в начале обработки (T0) отнимали от значения количества исследуемых и контрольных клеток, измеренного через 48 ч. В частности, количество живых клеток в ячейках как с контрольными, так и с обработанными анти-hPG MAb клетками, подсчитывали через 48 ч, потом подсчитывали разность между каждым количеством клеток и количеством клеток, определенных в T0. Полученное количество обработанных анти-hPG MAb клеток потом выражали как процент от количества клеток, обработанных с помощью контрольного MAb.

Фиг. 7A-7C показывают эффект анти-hPG MAb 3 и анти-hPG MAb 4 на выживание SW480 клеток, LS174T клеток и HCT116 клеток из эталонных экспериментов. Результаты представляют собой среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего из четырех ячеек, полученных из двух независимых экспериментов. Лечение с помощью анти-hPG моноклональных антител значительно снижало количество клеток по сравнению с лечением с помощью контрольного антитела. Статистическую значимость определяли при использовании критерия Стьюдента: $*=p<0,05$, $**=p<0,01$ и $***=p<0,001$. В каждой линии клеток анти-hPG антитела снижали выживание клеток. В одной клеточной линии, LST174T, количество клеток к концу 48-часовой обработки с помощью анти-hPG антител было ниже, чем количество клеток в начале эксперимента, что дает возможность предположить, что антитела вызывают гибель клеток в дополнение к ингибированию клеточной пролиферации.

Табл. 10 показывает процент выживания SW480 клеток колоректального рака, обработанных с помощью каждого из четырех моноклональных анти-hPG антител по сравнению с контрольным моноклональным антителом (мышинный анти-человеческий IgG1, Calbiochem, кат. номер #411451) (CT mAb).

Таблица 10

SW480 (T0 = 26 667)	Количество клеток – T0	% от контроля	P (обработанные против контрольных) двухвыборочный критерий Манна-Уитни
Контрольное mAb	36050 $\pm$ 3228		
Анти-hPG MAb 1	30425 $\pm$ 3098	84,4	0,3556
Анти-hPG MAb 2	28925 $\pm$ 2757	80,2	0,0476
Анти-hPG MAb 3	6050 $\pm$ 1788	16,8	< 0,0001
Анти-hPG MAb 4	17560 $\pm$ 3439	48,7	0,0002

По сравнению с контролем лечение с помощью анти-hPG моноклональных антител снижало выживание раковых клеток на 83,2% (анти-hPG MAb 3), 51,3% (анти-hPG MAb 4), 19,8% (анти-hPG MAb 2) и 15,6% (анти-hPG MAb 1).

Таблицы, приведенные ниже, показывают процент выживания LS174T и HCT-116 клеток, обработанных с помощью анти-hPG MAb 3 и 4 по сравнению с контрольным моноклональным антителом. Данные представлены графически в соответствующих блоках фиг. 7.

Таблица 11

HCT-116 (T0 = 42 750)	Количество клеток –T0	% от контроля	P (обработанные против контрольных) двухвыборочный критерий Манна-Уитни
Контрольное MAb	151 250 $\pm$ 9071		
MAb3	62 750 $\pm$ 9194	41,5 %	< 0,0001
MAb4	82 250 $\pm$ 7435	54,4 %	<0,0001

Таблица 12

LS 174T (T0 = 51 666)	Количество клеток –T0	% от контроля	P (обработанные против контрольных) двухвыборочный критерий Манна-Уитни
Контрольное MAb	85 334 $\pm$ 7520		
MAb3	-6666 $\pm$ 5000	- 8 %	0,0084
MAb4	+8334 $\pm$ 2500	7 %	0,0085

При условиях анализа *in vitro* полное ингибирование роста клеток не предполагается. В клеточной культуре проагстрин постоянно секретируется раковыми клетками и аккумулируется в среде для культуры клеток. Как предполагается, уровни проагстрина будут повышаться в течение времени более, чем возникало бы в циркулирующей крови в организме, повышая соотношение целевого белка к антителу и разбавляя нейтрализующий эффект антитела. Таким образом, нейтрализующий эффект, наблюдаемый при использовании антител *in vitro*, как предполагается, будет более сильным, чем *in vivo*, где проагстрин, секретируемый опухолевыми клетками выносится потоком крови, снижая его аккумуляцию *in situ*.

Ингибирование клеточной пролиферации с помощью анти-hPG MAb 5-23 определяли в одной или

более CRC линий клеток SW620, HCT116 и LS47T. Анализы осуществляли в планшетах на 6 ячеек так, как описано выше, при использовании 5 мкг/мл контрольных исследуемых (анти-hPG) моноклональных антител. Высевали 50000 клеток на ячейку для HCT116 и LS174T и 100000 для SW620 клеток. Таблицы, приведенные ниже, обеспечивают процент выживших обработанных клеток относительно контрольной обработки из репрезентативных экспериментов. Усредненные результаты графически представлены на фиг. 7G-7I для клеточных линий SW620, LS174T и HCT-116 соответственно.

Таблица 13

	Количество клеток –T0	% от контроля	Р (обработанные против контрольных) двухвыборочный критерий Манна- Уитни
Эксперимент 1			
SW 620 (T0 = 103 067)			
Контрольное MAb	82 100 +/- 15489	-	
MAb 5	54 511 +/-8292	66 %	< 0,0001
MAb 6	44367 +/- 9321	54 %	< 0,0001
MAb 7	49279 +/- 8009	60 %	< 0,0001
MAb 8	32673 +/- 4680	40 %	< 0,0001
MAb 9	73283 +/- 3835	89%	0,1305
MAb 10	70178 +/- 4173	85 %	0,0618
Эксперимент 2			
SW 620 (T0 = 118 553)			
Контрольное MAb	81 347 +/-6062		
MAb 11	46 974 +/-7422	58 %	0,0003
MAb 12	52 980 +/- 10529	65 %	0,0002
MAb 13	38 933 +/- 5284	48 %	0,0003
MAb 14	83 767 +/- 9484	103 %	0,21
MAb 21	59 497 +/- 2828	73 %	0,0002
MAb 22	64 227 +/- 7123	79 %	0,0013
MAb 23	83 914 +/- 5629	103 %	0,82
Эксперимент 3			
SW 620 (T0 = 116 283)			
Контрольное MAb	101 333 +/- 17 626	-	
MAb 15	66 052 +/-7739	65 %	< 0,0001
MAb 16	58 883 +/- 9950	58 %	< 0,0001
MAb 17	76 688 +/- 5578	75,5 %	0,0014
MAb 18	75 874 +/- 10129	75 %	0,0005
MAb 19	70 242 +/- 10 851	69 %	< 0,0001
MAb 20	66 470 +/- 7557	66 %	< 0,0001

Таблица 14

	Количество клеток –T0	% от контроля	Р (обработанные против контрольных) двухвыборочный критерий Манна- Уитни
Эксперимент 1			
LS 174T (T0 = 60 944)			
Контрольное MAb	107 956 +/- 5859		
MAb 13	62 341 +/- 10 683	58 %	0,0003
MAb 16	65 389 +/- 8185	61 %	0,0002
Эксперимент 2			
LS 174T (T0 = 86 389)			
Контрольное MAb	241 711 +/- 11 620		
MAb 14	246 444 +/- 19563	102 %	незнач.
MAb 19	204 433 +/- 8946	84,5 %	0,0005
Эксперимент 3			
LS 174T (T0 = 79 667)			
Контрольное MAb	135 800 +/- 18 338		
MAb 8	57 333 +/- 12657	42 %	< 0,001

Таблица 15

	Количество клеток –T0	% от контроля	P (обработанные против контрольных) двухвыборочный критерий Манна- Уитни
Эксперимент 1			
НСТ-116 (T0 = 49 286)			
Контрольное MAb	78 214 +/- 6230		
MAb 13	28 805 +/- 3477	36 %	< 0,0001
MAb 16	56 484 +/- 8333	72 %	< 0,0001
MAb 19	68 945 +/- 8795	88 %	0,0302
Эксперимент 2			
НСТ-116 (T0 = 60 944)			
Контрольное MAb	122 456 +/- 1697		
MAb 8	75 867 +/- 15627	62 %	< 0,0001
MAb 16	87011 +/- 5091	71 %	< 0,0001

(B) Нейтрализующая активность анти-hPG поликлонального антитела.

Анализы проводили так, как описано выше, со следующими модификациями. Использовали N-терминальное анти-hPG поликлональное антитело, как описывается в примере 5. В качестве контроля использовали 3 мкг/мл поликлонального антитела (поликлональный кроличий анти-человеческий IgG, Affinity BioReagents, ссылочный номер #SA1-600) (CT pAb). Для анти-PG обработок использовали 3 мкг/мл анти-hPG поликлонального антитела для всех линий клеток. SW480 и LS174T обрабатывали с помощью контрольного или N- терминального анти-hPG поликлонального антитела в течение 24-48 ч в DMEM без FCS, в то время как НСТ116 обрабатывали с помощью анти-hPG поликлонального антитела в течение 48 ч в DMEM с 0,5% FCS. Выжившие клетки потом подвергали трипсинизации и подсчитывали по сравнению с клетками, обработанными при использовании эквивалентной концентрации контроля (анти-человеческий IgG) поликлонального антитела.

Результаты репрезентативных экспериментов показаны в таблицах, представленных ниже и на фиг. 7D-7F. Обработка с помощью анти-hPG поликлонального антитела значительно снижала количество клеток по сравнению с обработкой при использовании контрольного антитела. Статистическую значимость определяли при использовании критерия Стьюдента: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$. Количество клеток выражали по отношению к количеству клеток в культуре в начале эксперимента (T0). Для каждого эксперимента клетки в каждой из 4 ячеек подсчитывали трижды. Как и при использовании анти-hPG моноклональных антител пролиферация клеток колоректального рака ингибировалась с помощью анти-hPG поликлонального антитела, демонстрируя, что противоопухолевые эффекты, которые наблюдаются с поликлональными антителами к прогастрину, являются достаточно прогнозируемыми для активности моноклонального антитела в отношении блокирования эффектов прогастрина на опухолевых клетках.

Таблица 16

	Количество клеток –T0	% от контроля	P (обработанные против контрольных) двухвыборочный критерий Манна- Уитни
Эксперимент 1			
SW 480 (T0 = 26 667)			
Контрольное PAb	37 580 +/- 4233		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	0,0001
Эксперимент 2			
НСТ-116 (T0 = 58 750)			
Контрольное PAb	105 350 +/- 8660		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	< 0,05
Эксперимент 3			
LS174T (T0 = 112 500)			
Контрольное PAb	207 500 +/- 10 000		
PG PAb	102 500 +/- 5000	49.5 %	< 0,01

Пример 8. Нейтрализующий эффект анти-hPG моноклональных антител устраняется, когда антитела предварительно инкубируют с очищенным hPG.

Для демонстрации того, что нейтрализующий эффект анти-hPG моноклональных антител опосредуется путем связывания с hPG, LS174T клетки культивировали в присутствии типичного антитела - анти-

hPG MAb 8, - которое предварительно инкубировали с и без hPG. В качестве позитивного и негативного контролей клетки культивировали только с hPG, только с контрольным антителом и контрольным анти-телом, предварительно проинкубированным с hPG.

В частности, 33,3 нМ (5 мкг/мл) анти-hPG MAb 8 предварительно инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с 20-кратным молярным избытком рекомбинантного hPG, или 667 нМ (6,67 мкг/мл). Использовали рекомбинантный человеческий прогастрин, приготовленный так, как описывается в примере 1. Параллельно 33,3 нМ (5 мкг/мл) мышиногo анти-человеческого IgG1 (General Bio-Science, ссылочный номер AB23420) подобным образом предварительно инкубировали с и без hPG.

5000 LS174T клеток высевали в каждую ячейку планшетов на 96 ячеек в среду, содержащую 10% фетальной сыворотки телят и инкубировали в течение 8 ч, после чего клетки переносили на среду, не содержащую сыворотки, и выращивали в течение последующих 12 ч. После выращивания в среде, не содержащей сыворотки, в течение 12 ч, клетки обрабатывали с помощью одного из следующих агентов каждые 12 ч: контрольное антитело, контрольное антитело, предварительно проинкубированное с hPG, только анти-hPG MAb 8, анти-hPG MAb 8, предварительно проинкубированное с hPG, и только hPG. Через 48 ч после первой обработки оставшиеся жизнеспособные клетки количественно оценивали путем инкубирования планшетов с Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution и регистрировали поглощение при 490 нм. Поглощение измеренное для клеток, обработанных с помощью контрольного моноклонального антитела ("контрольное MAb"), считали за 100% и все другие экспериментальные условия измеряли по сравнению с поглощением клеток, обработанных при использовании контрольного MAb. Результаты показаны в таблице, приведенной ниже, а также на фиг. 8.

Таблица 17

	Поглощение	% от контроля	P (обработанные против контрольных) двухвыборочный критерий Манна-Уитни
Обработка только PG	0,244 +/- 0,088	132,5%	0,099 (не знач.)
Контрольное MAb	0,184 +/- 0,084	100%	не применимо
Анти-hPG MAb 8	0,057 +/- 0,06	31%	0,001
Контрольное MAb +hPG	0,321 +/- 0,079	174,5%	0,002
Анти-hPG MAb8 + hPG	0,271 +/- 0,076	147,6%	0,0229

Прибавление или инкубация антитела с hPG повышает количество живых клеток в культуре. В противовес этому обработка клеток с помощью анти-hPG MAb 8, взятого отдельно, вызывает значительное снижение количества жизнеспособных клеток. Таким образом, способность анти-hPG моноклональных антител к нейтрализации активности PG устраняется путем прибавления hPG, который, как предполагается, связывается с антителом и насыщает антитело. Этот результат подтверждает специфичность нейт-рализующей активности анти-hPG моноклональных антител.

Пример 9. In vivo противоопухолевая активность анти-hPG антитела.

Был разработан ряд экспериментальных in vivo моделей для изучения колоректального рака. Были разработаны анализы ксенотрансплантатов мыши, в которых опухолевая ткань или клетки из линий клеток человека трансплантируют дефектной по иммунитету (так называемой "голой"(бестимусной)) мыши. Roscard M. и др., In vivo (1996), 10(5):463-469. Было также разработано несколько моделей трансгенных мышей. Мышинные модели включают гетерозиготные мутации в гене аденоматозного полипоза толстой кишки (APC), такие как Apc^{Min} , $Apc1638N$, $Apc716$ или $Apc\Delta14$. Ген супрессор APC опухоли кодирует цитозольный белок, APC, который при взаимодействии связывается с β -катенином и блокирует его в цитозоле в пределах многобелкового комплекса, нацеливающего β -катенин на протеосому для деградации, предотвращая таким образом активацию β -катенином транскрипционного фактора Tcf-4 в ядре. Neuber и др., Oncogene, 18:5325-5333 (1999). APC $\Delta14$ мыши несут гетерозиготную делецию экзона 14 в рамках гена аденоматозного полипоза толстой кишки (APC). Подобно тому что возникает у более 70% пациентов со sporadическим колоректальным раком, соматическая потеря гетерозиготности (LOH) во втором аллеле Apc возникает в клетках кишечника, приводя к конститутивной активации транскрипционного комплекса β -катенин/Tcf-4 и к спонтанному развитию опухолей кишечника у этих животных. Молекулярное происхождение этих аденом и карцином, а также опухолевая морфология (включая васкуляризацию, воспалительный ответ и присутствие иммунных клеток) с намного большей подобностью к таковым опухолей человека по сравнению с мышинными ксенотрансплантатными моделями делает APC $\Delta14$ в высокой степени релевантной моделью для исследования терапии колоректального рака человека. Colnot и др., 2004, Lab. Invest., 84:1619-1630. Другие модели трансгенных мышей основываются на мутациях в генах, таких как MSH2, MSH6, CDX2, K-RAS, а также линии, сочетающие мутации в APC с мутациями в других онкогенах. Neuber и др., 1999, Oncogene, 18:5325-5333, Janssen KP и др., 2002, Gastroenterology, 123:492-504. Эти модели широко используются для изучения колоректального рака и иссле-

дуют гипотезы, касающиеся лечения колоректального рака.

Трансгенные мыши, которые несут гетерозиготную делецию 14 с геном аденоматозного полипоза толстой кишки (APCΔ14), служат в качестве моделей для колоректального рака, развивая опухоли, подобные тем, которые обнаруживают при раке толстого кишечника человека. В первом эксперименте APCΔ14 мышей обрабатывали с помощью препарата, содержащего равные количества анти-hPG поликлональных антител, образованных против (1) пептида, соответствующего SEQ ID NO: 25 и (2) С-терминального пептида, как описывается у Hollande и др., WO 07/135542. Мышей в возрасте 3,5 месяцев обрабатывали в течение 5 недель либо с помощью контрольного поликлонального антитела, либо с помощью анти-hPG поликлонального антитела (две мыши на обработку). Антитела вводили путем интраперитонеальной инъекции два раза в неделю при дозе 10 мг/кг (объем инъекции 150 мкл). В конце обработки мышей забивали и промывали кишки с помощью PBS, расчленили кишечник для получения цифровых фотографий и фиксировали в 4% пара-формальдегиде для иммуногистохимического анализа. Регистрировали количество опухолей и изображения колоректальной ткани.

Морфологическая оценка ткани кишечника продемонстрировала, что анти-hPG антитела не влияют на восстановление здорового эпителия кишечника мышей. Подсчитывали опухоли в группах обработки и контрольных группах. Общее количество опухолей для мышей, обработанных при использовании контрольного антитела, составляло 27 по сравнению с 4 у мышей, обработанных при использовании анти-hPG антитела. Таким образом, анти-hPG антитела снижают количество опухолей более чем в 6,5 раз по сравнению с контрольными антителами, но не влияют при этом на восстановление здорового эпителия кишечника мышей.

Во втором эксперименте исследовали эффект анти-hPG антитела у APCΔ14 мышей и нормальных (контрольных) мышей (C57BL6J). Мышей в возрасте 4 месяцев обрабатывали два раза в неделю в течение 6 недель либо с помощью контрольного поликлонального антитела - кроличья анти-античеловеческая IgG антисыворотка (Jackson ImmunoResearch (ссылочный номер 309-005-0089), либо с помощью анти-hPG поликлонального антитела путем интраперитонеальной инъекции два раза в неделю при дозе 9 мг/кг (объем инъекции 150 мкл). Через 6 недель обработки за два часа до умерщвления мышам вводили бромдезоксисуридин (BrdU) (2 мг на мыш, интраперитонеальная инъекция). 6 APCΔ14 мышей обрабатывали с помощью анти-hPG поликлонального антитела и 4 с помощью контрольного поликлонального антитела. Контрольное антитело и анти-hPG антитело вводили 6 нормальным мышам (C57BL6J) каждое. Не определяли никаких кишечных патологий у любой из мышей из любой группы, что дополнительно демонстрировало безопасность и отсутствие побочного влияния анти-hPG антитела на нормальную ткань кишечника.

Исследовали количество опухолей и размер (высота и длина) в обработанной группе против контрольной группы APCΔ14 мышей. Определяли размер опухоли путем измерения изображений, взятых из кишечника каждого животного, подготовленного так, как описано ниже. Кишечники промывали так, как описано выше, иссекали кишечники вдоль, заключали в парафин и подготавливали для иммуногистохимии при использовании методики "Swiss roll". Измерение длины и высоты опухолей осуществляли при использовании программного обеспечения Image J.

Результаты являются представленными в табл. 18 и на фиг. 8А и 8В. Результаты для размера опухолей показывают статистически значимое различие между группами, обработанными контролем и анти-hPG. Статистическую значимость определяли при использовании критерия Манна-Уитни: $*=p<0,05$, $**=p<0,01$ и $***=p<0,001$. Мыши, обработанные с помощью контрольного антитела, продемонстрировали в общей сложности 125 опухолей с 31,25 опухолями в среднем на мыш. Обработанные анти-hPG мыши продемонстрировали 46 опухолей или в среднем 7,6 опухолей на мыш. Это отличие является статистически значимым (критерий Манна-Уитни, $P=0,0095$), демонстрируя, что анти-hPG антитела значительно снижают количество опухолей колоректального рака *in vivo*.

Таблица 18

Обработка (количество мышей)	Количество опухолей на мыш					
	23	48	28	26		
Контрольное PAb (4)						
Анти-hPG PAb (6)	2	16	15	9	2	2

Анти-hPG антитела значительно снижали опухоли колоректального рака *in vivo*, как измерено путем уменьшения количества и размера опухолей в мышинной модели колоректального рака, без каких-либо видимых побочных эффектов на нормальный колоректальный эпителий. Таким образом, лечение опухолей колоректального рака при использовании анти-hPG обеспечивает терапевтическое преимущество *in vivo*.

Пример 10. Конструирование гуманизированных анти-hPG антител.

Гуманизированные антитела конструировали "in silico" (путем компьютерного моделирования) из мышинных анти-hPG моноклональных антител MAб 3, 4, 8, 13, 16 и 19. Конструирование гуманизирован-

ных антител осуществляли в соответствии с методикой, описанной у Lefranc и др., 2003, Dev. Comp. Immunol., 27:55-77; Lefranc и др., 2009, Nucl. Acids Res., 37:D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol., 40:101-111. Для каждого из мышинных моноклональных антител соответствующие гуманизированные V_H и V_L пептидные последовательности определяли путем идентификации участков CDR и каркасных участков в мышинных последовательностях при использовании IMGT-ONTOLOGY базы данных (Duroux и др., 2008, Biochimie, 90:570-583; Giudicelli и Lefranc, 1999, Bioinformatics, 15:1047-1054) и IMGT® базы данных и соответствующих инструментов (Ehrenmann и др., 2010, Nucl. Acids. Res., 38:D301-307; Brochet и др., 2008, Nucl. Acids. Res., 36:W503-508), после чего проводили идентификацию аминокислотной последовательности наиболее близкой последовательности каркасного участка человека в IMGT/GENE-DB (Giudicelli и др., 2005, Nucl. Acids. Res., 33:D256-261) и прививания CDR последовательностей на каркасные участки человека. В частности, нуклеотидные и аминокислотные последовательности мышинных V_H и V_L доменов подвергали анализу при использовании IMGT/V-QUEST и IMGT/DomainGapAlign для определения границ CDR и каркасных участков, определяли длину CDR и идентифицировали якорные аминокислоты. Якорные аминокислоты представляют собой остатки в положении 26, 39, 55, 66, 104 и 118 IMGT "Collier de Perles", которые поддерживают CDR 1-IMGT, CDR 2-IMGT, CDR 3-IMGT (Kaas и Lefranc, 2007, Current Bioinformatics, 2:21-30; Kaas и др., Brief. Funct. Genomic Proteomic, 2007, 6:253-264). Ближайшие V (вариабельные) и J (соединяющие) гены для мышинных последовательностей были идентифицированы и выбраны наиболее приемлемые гены. Индивидуальные аминокислоты в мышинных каркасных участках поддерживали в том случае, если они рассматривались как такие, которые вносят возможный вклад в специфичность антитела, путем сравнения с известными 3D структурами (Kaas и др., 2004, Nucl. Acids. Res., 32:208-210) при использовании IMGT Collier de Perles на двух слоях.

CDR V_H для MAb 3 определяли как такие, которые имеют длину 8, 8 и 8 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинного участка V_H MAb 3, IGHV1-5*01 отличался 10 остатками, 3 из которых были картированы до CDR и были оставлены в конструкции гуманизированного анти-hPG моноклонального антитела (I29 в CDR 1, F56 и S65 в CDR 2). Кроме того, V39, G55 и R66 рассматривались как потенциально важные для сохранения специфичности и их оставляли в конструкции. Самый близкий эмбриональный ген человека представлял собой IGHV1-3*01 (63,3% идентичности на аминокислотном уровне на основе IMGT/DGapAlign). 27 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 треонин-123 и лейцин-124 были заменены на лейцин-123 и валин-124, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGHJ1*01. В общем случае гуманизированный участок V_H для MAb 3 является на 87,8% идентичным вариабельному участку для IGHV1-46*03 и 88 из 91 аминокислоты в четырех каркасных участках являются идентичными.

CDR V_L для MAb 3 определяли как такие, которые имеют длину 11, 3 и 9 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинного участка V_L MAb 3, IGKV1-117*01, отличался одним остатком, который был картирован до каркасного участка. Самый близкий эмбриональный ген человека представлял собой IGKV2-30*02 (81% идентичности на аминокислотном уровне на основе IMGT/DomainGapAlign). 14 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. Остатки E40 и F68 поддерживали в сконструированной гуманизированной последовательности. В каркасном участке 4 лейцин-124 был заменен на валин-124, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGKJ4*01. В общем случае гуманизированная V_L последовательность для MAb 3 является на 93% идентичной IGKV2D-29*02, и 87 из 89 аминокислот в четырех каркасных участках являются идентичными.

Сконструированные V_H и V_L последовательности обеспечиваются в таблице, приведенной ниже.

Таблица 19

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	V цепочка
21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTSYVHWVRQAP GQRLEWMGGFYPGNSDSRYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMEL SSLRSED TAVYYCTRRDSPQYWGQGT LVT VSS	hV_H3
22	DVVMTQSP LSLPVT L GQPASI SCRSSQSI VHSNGNTYLEWFQ QRPQGSP RRLIYKVS NRFS GVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIK	hV_L3

CDR V_H для MAb 4 определяли как такие, которые имеют длину 8, 8 и 11 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинного участка MAb 4 V_H , IGHV1-9*01, отличался в 11 остатках, 4 из которых были картированы до каркасного участка CDR и сохранялись в конструкции гуманизированных анти-hPG моноклональных антител (S35, S36 и S37 в CDR 1, F56 в CDR 2). Кроме того, D66 рассматривался как потенциально важный для сохранения специфичности и сохранялся в конструкции. Самый близкий эмбриональный ген человека представлял собой IGHV1-46*03 (64,9% идентичности на аминокислотном уровне на основе IMGT/DomainGapAlign). 27 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены

между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 аланин-128 был заменен на серин-128, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGHJ5*01. В общем случае гуманизированная V_H последовательность для MAb 4 является на 91,8% идентичной варибельному участку для IGHV1-46*03 и 90 из 91 аминокислоты в четырех каркасных участках являются идентичными.

CDR V_L для MAb 4 определяли как такие, которые имеют длину 11, 3 и 9 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинового участка V_L MAb 4, IGKV1-110*01, отличался в 3 остатках, 2 из которых были картированы до CDR 1 (серин-34 и валин-36) и сохранялись в конструкции гуманизированных анти-hPG моноклональных антител. Самый близкий эмбриональный ген человека представлял собой IGKV2D-29*02 (81% идентичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign). 11 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 серин-120 был заменен на глутамин-120, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGKJ2*01. В общем случае гуманизированная V_K последовательность для MAb 4 является на 92% идентичной IGKV2D-29*02 и на 100% идентичной четырем каркасным участкам.

Сконструированные V_H и V_K последовательности обеспечиваются в таблице, приведенной ниже.

Таблица 20

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	V цепочка
23	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSSWMHVVRQAPG QGLEWMGI FLPGSGSTDYAQKFQGRVTMTSDTSTSTVYMELS SLRSED TAVYYCATDGN YDWFAYWGQGT LVT VSS	hV _H 4
24	DIVMTQTPLSLSVTPGQFASISCKSSQSLVHSSGVTYLYWYL QKPGQSPQLLIYKVS N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E AEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTLEIK	hV _K 4

CDR V_H для MAb 8 определяли как такие, которые имеют длину 8, 8 и 10 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинового участка MAb 8 V_H , IGHV5-9-3*01, отличался в 5 остатках, 4 из которых были картированы до каркасного участка CDR и сохранялись в конструкции гуманизированных анти-hPG моноклональных антител. Самые близкие гены эмбриональной линии человека представляли собой IGHV3-21*01 и *02 (80,4% идентичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign). 12 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 серин-123 и лейцин-124 были заменены на треонин-123 и валин-124 соответственно, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGHJ6*01. В общем случае гуманизированный участок V_H для MAb 8 является на 92,8% идентичным варибельному участку для IGHV3-21*01 и *02 и на 100% идентичным четырем каркасным участкам. Существует потенциальный сайт N-гликозилирования в мышинном CDR 3 V_H для MAb 8.

CDR V_L для MAb 8 определяли как такие, которые имеют длину 11, 3 и 9 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинового участка V_L MAb 8, IGKV2-109*01, отличался в 6 остатках, 4 из которых были картированы до CDR 1 и сохранялись в конструкции гуманизированных анти-hPG моноклональных антител. Самые близкие гены эмбриональной линии человека представляли собой IGKV2-28*01 и IGKV2D-28*01 (75% идентичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign). 12 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 аланин-120, лейцин-124 и лейцин-126 были заменены на глицин-120, валин-124 и изолейцин-126 соответственно, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGKJ4*01. В общем случае гуманизированная V_K последовательность для MAb 8 является на 87% идентичной IGKV2-28*01 и IGKV2D-28*01 и на 100% идентичной четырем каркасным участкам.

Сконструированные V_H и V_K последовательности обеспечиваются в таблице, приведенной ниже.

Таблица 21

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	V цепочка
75	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FTTYAMNWRQAPGKGLEWVSSISSGGT YTTYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGT TVTVSS	hV _H 8a
76	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SISCRSSKSLRHTKGITFLD WYLQKPGQSPQLLIYQMSNRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVG VYYCAQNLELPLTFGGGTKEIK	hV _K 8a
77	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVS SISSGGTYTYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCATQGNYSLDFWGQGTTVTVSS	hV _H 8b
78	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA RSSKSLRHTKGITFLYWLQKPG QSPQLLIYQMSNRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKI SRVEAED VGYYCAQNLELPLTFGGGTKEIK	hV _K 8b
79	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF FTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSG GTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGT TVTVSS	hV _H 8b

CDR V_H для MAb 13 определяли как такие, которые имеют длину 8, 8 и 7 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинового участка V_H MAb 13, IGHV5-6-3*01, отличался в 10 остатках, 5 из которых были картированы до каркасного участка CDR и сохранялись в конструкции гуманизированных анти-hPG моноклональных антител. Самые близкие гены эмбриональной линии человека представляли собой IGHV3-7*01 и *02 (78,6% идентичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign). 13 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 треонин-123 и лейцин-124 были заменены на лейцин-123 и валин-124 соответственно, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGHJ4*01. В общем случае гуманизированный участок V_H для MAb 13 является на 91,8% идентичным вариабельному участку для IGHV3-7*01 и *02 и на 100% идентичным четырем каркасным участкам.

CDR V_L для MAb 13 определяли как такие, которые имеют длину 11, 3 и 9 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинового участка MAb 13 V_L, IGKV1-135*01, отличался одним остатком, расположенным в каркасном участке. Самые близкие гены эмбриональной линии человека представляли собой IGKV2-30*01 и *02 (81% идентичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign). 13 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 лейцин-124 был заменен на валин-124, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGKJ4*01. В общем случае гуманизированная V_K последовательность для MAb 13 является на 94% идентичной IGKV2-30*01 и *02 и на 100% идентичной четырем каркасным участкам.

Сконструированные V_H и V_K последовательности обеспечиваются в таблице, приведенной ниже.

Таблица 22

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	V цепочка
80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYGMWVRQAP GKGLEWVANINTEGDRITYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGTGTYWGQGLTVTVSS	hV _H .13a
81	DVMTQSPLSLPVTGLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWFQ QRPQGSPRRILIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVE AEDVGYYCQWQTHFPQTFGGGTKEIK	hV _K 13a
82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYGMWVRQ APGKGLEWVASINTEGDRITYYVDSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNLSLRAEDTAVYYCARGTGTYWGQGLTVTVSS	hV _H 13b
83	DVMTQSPLSLPVTGLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNW FQQRPGQSPRRILIYLVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI S RVEAEDVGYYCQWQTHFPQTFGGGTKEIK	hV _K 13b

V_H CDR для MAb 16 определяли как такие, которые имеют длину 8, 8 и 10 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинового участка V_H MAb 16, IGHV1-53*01, отличался в 7 остатках, 2 которых были картированы до каркасного участка CDR и сохранялись в конструкции гуманизированных анти-hPG моноклональных антител. Самые близкие гены эмбриональной линии человека представляли собой IGHV1-46*01 и *03 (71,4% иден-

тичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign). 25 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 лейцин-124 был заменен на валин-124, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGHJ6*01. В общем случае гуманизированная последовательность V_H для MAb 16 является на 96,9% идентичной вариабельному участку для IGHV1-46*01 и *03 и на 100% идентичной четырем каркасным участкам.

CDR V_L для MAb 16 определяли как такие, которые имеют длину 11, 3 и 9 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинного участка V_L MAb 16, IGKV1-135*01, отличался в 4 остатках, расположенных в каркасном участке. Самые близкие гены эмбриональной линии человека представляли собой IGKV2-30*01 и *02 (79% идентичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign), что отличается одной аминокислотой в CDR 1. 15 различий последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 глицин-120 был заменен на глутамин-120, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGKJ2*01. В общем случае гуманизированная V_K последовательность для MAb 16 является на 94% идентичной IGKV2-30*01 и *02 и на 100% идентичной четырем каркасным участкам.

Сконструированные V_H и V_K последовательности обеспечиваются в таблице, приведенной ниже.

Таблица 23

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	V цепочка
84	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTTSYIMHWVRQAPG QGLEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCTRGGYFPDYWGQGTTTVTVSS	hV_H16a
85	DVVMTQSPSLPVTLGQFPASISCRSSQSLDSDGKTYLWNFQQ RPGQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAE DVGYYCWQGTHTSPYTFGGQGTKLEIK	hV_K16a
86	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTTSYIMHWVRQAPGQG LEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCTRGGYFPDYWGQGTTTVTVSS	hV_H16b
87	DVVMTQSPSLPVTLGQFPASISCRSSQSLDSDGKTYLYWFQQR GQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTSPYTFGGQGTKLEIK	hV_K16b
88	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTTSYIMHWVRQAPGQGL EWMGEINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE TAVYYCTRGGYFPDYWGQGTTTVTVSS	hV_H16c
89	DVVMTQSPSLPVTLGQFPASISCRSSQSLDSDGKTYLYWFQQR GQSPRRLIYLVSESDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTSPYTFGGQGTKLEIK	hV_K16c

CDR V_H для MAb 19 определяли как такие, которые имеют длину 9, 7 и 14 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинного участка V_H MAb 19, IGHV3-2*01, отличался в 5 остатках, 2 из которых были картированы до CDR каркасного участка и сохранялись в конструкции гуманизированных анти-hPG моноклональных антител. Самый близкий эмбриональный ген человека представлял собой IGHV4-30-4*01 (72,4% идентичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign). Однако поскольку этот ген является полиморфным, выбирали IGHV4-31*02 и *03 (71,4% идентичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign). 21 различие последовательности в каркасных участках 1-3 было обнаружено между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 изолейцин-123 был заменен на лейцин-123, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGHJ4*01. В общем случае гуманизированная последовательность V_H для MAb 19 является на 91,9% идентичной вариабельному участку для IGHV4-31*02 и *03 и на 100% идентичной четырем каркасным участкам.

CDR V_L для MAb 19 определяли как такие, которые имеют длину 7, 7 и 13 аминокислот для CDR 1, 2 и 3 соответственно. Самый близкий эмбриональный мышинный ген к последовательности мышинного участка V_L MAb 19, IGLV3*01, отличался в 8 остатках, 5 из которых размещаются в CDR. Самые близкие гены эмбриональной линии человека представляли собой IGLV4-69*01 и *02 (69,9% идентичности на аминокислотном уровне на основе IGMT/DomainGapAlign). 23 различия последовательности в каркасных участках 1-3 были обнаружены между мышинными и человеческими эмбриональными генами. В каркасном участке 4 валин-124 был заменен на лейцин-124, для того чтобы соответствовать человеческому гену IGLJ3*01. Альтернативно ген IGJK4*01 может использоваться для 4 каркасных участков. В общем случае гуманизированная V_K последовательность для MAb 19 является на 92,4% идентичной IGLV4-69*01 и *02 и на 100% идентичной четырем каркасным участкам.

Сконструированные V_H и V_K последовательности обеспечиваются в таблице, приведенной ниже.

Таблица 24

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	V цепочка
90	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWSWIRQH PGKGLEWIGYISFSGYTYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGGTLTVTVSS	V _H 19a
91	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSQHRITYTIAWHQQQPEK GPRYLMKVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSE DEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	V _K 19a
92	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRQHP GKGLEWIGYISFSGYTYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGGTLTVTVSS	V _H 19b
93	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSQHRITYTIEWHQQQPEKG PRYLMKVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSE EADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	V _K 19b
94	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGK GLEWIGYISFSGYTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGGTLTVTVSS	V _H 19c
95	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSQHRITYTIEWHQQQPEKGP RYLMEVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDE ADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	V _K 19c

Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, упомянутые в этой заявке, являются введенными в качестве ссылки в своей целостности для всех целей до той степени, как если бы каждая индивидуальная публикация, патент, патентная заявка или другой документ был индивидуально указан для того, чтобы быть введенным в качестве ссылки для всех целей. В то время как различные специфические воплощения были проиллюстрированы и описаны, будет понятным, что различные изменения могут быть сделаны без отступления от духа и объема в соответствии с данным(и) изобретением(ями).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое специфически связывает N-терминальный участок проагрина человека (hPG), причем это антитело включает V_L и V_H CDRs, имеющие последовательности, выбранные из одной из следующих групп V_L и V_H CDR последовательностей:

(i) V_H CDR 1.3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, V_H CDR 2.3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, V_H CDR 3.3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, V_L CDR 1.3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, V_L CDR 2.3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и V_L CDR 3.3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

(ii) V_H CDR 1.4, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, V_H CDR 2.4, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, V_H CDR 3.4, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, V_L CDR 1.4, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, V_L CDR 2.4, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и V_L CDR 3.4, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;

(iii) V_H CDR 1.16, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, V_H CDR 2.16, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, V_H CDR 3.16, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, V_L CDR 1.16, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, V_L CDR 2.16, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и V_L CDR 3.16, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и

(iv) V_H CDR 1.19, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, V_H CDR 2.19, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, V_H CDR 3.19, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, V_L CDR 1.19, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, V_L CDR 2.19, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и V_L CDR 3.19, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

2. Моноклональное антитело по п.1, которое включает V_H и V_L цепи, имеющие последовательности, выбранные из одной из следующих групп V_H и V_L последовательностей:

(i) mV_H 3 (SEQ ID NO: 12) и mV_L 3 (SEQ ID NO: 13);

(ii) mV_H 4 (SEQ ID NO: 14) и mV_L 4 (SEQ ID NO: 15);

(iii) mV_H 16 (SEQ ID NO: 61) и mV_L 16 (SEQ ID NO: 65); и

(iv) mV_H 19 (SEQ ID NO: 62) и mV_L 119 (SEQ ID NO: 66).

3. Моноклональное антитело по п.1, которое является гуманизированным.

4. Моноклональное антитело по п.3, которое включает V_H и V_L цепи, имеющие последовательности, выбранные из одной из следующих групп V_H и V_L последовательностей:

(i) hV_H 3 (SEQ ID NO: 21) и hV_L 3 (SEQ ID NO: 22);

(ii) hV_H 4 (SEQ ID NO: 23) и hV_L 4 (SEQ ID NO: 24);

- (iii) hV_H 16a (SEQ ID NO: 84) и hV_L 16a (SEQ ID NO: 85);
 - (iv) hV_H 16b (SEQ ID NO: 86) и hV_L 16b (SEQ ID NO: 87);
 - (v) hV_H 16c (SEQ ID NO: 88) и hV_L 16c (SEQ ID NO: 89);
 - (vi) hV_H 19a (SEQ ID NO: 90) и hV_L 19a (SEQ ID NO: 91);
 - (vii) hV_H 19b (SEQ ID NO: 92) и hV_L 19b (SEQ ID NO: 93); и
 - (viii) hV_H 19c (SEQ ID NO: 94) и hV_L 19c (SEQ ID NO: 95).
5. Моноклональное антитело по любому из пп.1-4, которое имеет аффинность в интервале от приблизительно 1 пМ до приблизительно 7 нМ.
6. Моноклональное антитело по любому из пп.1-5, которое нейтрализует активность hPG в анализе *in vitro*, который осуществляют при использовании LS174Т клеток.
7. Моноклональное антитело по любому из пп.1-6, которое связывается с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31 и 32.
8. Фармацевтическая композиция предназначена для лечения рака, где указанная композиция включает моноклональное антитело по любому из пп.1-7 и наполнитель, носитель и/или разбавитель.
9. Полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи (V_L) анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.1-7.
10. Полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи (V_H) анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.1-7.
11. Полинуклеотид, кодирующий V_L анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.1-7 и V_H анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.1-7.
12. Экспрессионный вектор, включающий полинуклеотид по п.9 и полинуклеотид по п.10; или полинуклеотид по п.11.
13. Клетка-хозяин для получения анти-hPG моноклонального антитела, трансформированная с помощью экспрессионного вектора по п.12.
14. Способ получения анти-hPG моноклонального антитела, включающий
- (а) культивирование клетки-хозяина по п.13 в приемлемых условиях; и
 - (б) выделение анти-hPG моноклонального антитела из культуральной среды или гибридомных клеток.
15. Моноклональное антитело, которое специфически связывает С-терминальный участок проаггрина человека (hPG), причем это антитело включает CDRs V_L и V_H, имеющие последовательности, выбранные из одной из следующих групп CDR V_L и V_H последовательностей:
- (i) V_H CDR 1.13, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, V_H CDR 2.13, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, V_H CDR 3.13, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, V_L CDR 1.13, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, V_L CDR 2.13, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и V_L CDR 3.13, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56.
16. Моноклональное антитело по п.15, которое содержит V_H и V_L цепи, имеющие последовательности, выбранные из одной из следующих групп V_H и V_L последовательностей:
- (i) mV_H 13 (SEQ ID NO: 60) и mV_L 13 (SEQ ID NO: 64).
17. Моноклональное антитело по п.15, которое является гуманизированным.
18. Моноклональное антитело по п.17, которое включает V_L и V_H цепи, имеющие последовательности, выбранные из одной из следующих групп V_L и V_H последовательностей:
- (i) hV_H 13a (SEQ ID NO: 80) и hV_L 13a (SEQ ID NO: 81); и
 - (ii) hV_H 13b (SEQ ID NO: 82) и hV_L 13b (SEQ ID NO: 83).
19. Моноклональное антитело по любому из пп.15-18, которое имеет аффинность в интервале от приблизительно 1 пМ до приблизительно 7 нМ.
20. Моноклональное антитело по любому из пп.15-19, которое нейтрализует активность hPG в анализе *in vitro*, который осуществляют при использовании LS174Т клеток.
21. Моноклональное антитело по любому из пп.15-20, которое связывается с эпитопом, включающим аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 33, 34, 35 и 36.
22. Фармацевтическая композиция, предназначенная для лечения рака, причем указанная композиция включает моноклональное антитело по любому из пп.15-21 и наполнитель, носитель и/или разбавитель.
23. Полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи (V_L) анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.15-21.
24. Полинуклеотид, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи (V_H) анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.15-21.
25. Полинуклеотид, кодирующий V_L анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.15-21 и V_H анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.15-21.

26. Экспрессионный вектор для получения анти-hPG моноклонального антитела, включающий полинуклеотид по п.23 и полинуклеотид по п.24; или полинуклеотид по п.25.
27. Клетка-хозяин для получения анти-hPG моноклонального антитела, трансформированная с помощью экспрессионного вектора по п.26.
28. Способ получения анти-hPG моноклонального антитела, включающий
- (a) культивирование клетки-хозяина по п.27 в приемлемых условиях; и
 - (b) выделение анти-hPG моноклонального антитела из культуральной среды или гибридомных клеток.
29. Применение анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.1-7 или 15-21 для получения лекарственного средства для лечения колоректального рака.
30. Применение анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.1-7 или 15-21 для получения лекарственного средства для ингибирования пролиферации клеток колоректального рака.
31. Применение анти-hPG моноклонального антитела по любому из пп.1-7 или 15-21 для получения лекарственного средства для ингибирования зависимого от прогастрина каскада сигнальной трансдукции в клетке.
32. Способ диагностики колоректального рака у субъекта *in vitro*, включающий количественную оценку прогастрина в образце сыворотки субъекта с использованием моноклонального антитела по любому из пп.1-7 или 15-21, где количество прогастрина в пределах от приблизительно 20 до 400 пМ свидетельствует о колоректальном раке.
33. Способ отбора пациента *in vitro*, пригодного для анти-hPG терапии, включающий количественную оценку прогастрина в образце сыворотки пациента с колоректальным раком с использованием моноклонального антитела по любому из пп.1-7 или 15-21, где количество прогастрина в пределах от приблизительно 20 до 400 пМ свидетельствует о пригодности анти-hPG терапии.
34. Способ мониторинга эффективности лечения колоректального рака *in vitro*, включающий количественную оценку уровня прогастрина в крови субъекта, который лечился от колоректального рака, как функцию времени с использованием моноклонального антитела по любому из пп.1-7 или 15-21, где зависящее от времени снижение уровня прогастрина в сыворотке субъекта указывает на эффективность лечения.
35. Способ ингибирования зависимого от прогастрина каскада сигнальной трансдукции в клетке *in vitro*, включающий воздействие на клетку, которая секретирует hPG, с помощью эффективного для ингибирования зависимого от прогастрина каскада сигнальной трансдукции количества нейтрализующего анти-PG моноклонального антитела по любому из пп.1-7 или 15-21.
36. Набор для определения hPG, включающий
- (i) N-терминальное анти-hPG моноклональное антитело по любому из пп.1-7 и антитело, которое специфически связывает C-терминальный участок hPG; или
 - (ii) C-терминальное анти-hPG моноклональное антитело по любому из пп.15-21 и антитело, которое специфически связывает N-терминальный участок hPG.
37. Набор по п.36, где
- антитело, которое специфически связывает C-терминальный участок hPG (i), представляет собой поликлональное антитело; или
 - антитело, которое специфически связывает N-терминальный участок hPG (ii), представляет собой поликлональное антитело.
38. Гибридома, способная секретировать анти-hPG моноклональное антитело по любому из пп.15-21, где указанная гибридома является гибридомой CNCM I-4371, которая была депонирована в соответствии с Будапештским договором 6 октября 2010 г. Национальной коллекцией культур микроорганизмов (CNCM), Институт Пастера, Париж, Франция.
39. Гибридома, способная секретировать анти-hPG моноклональное антитело по любому из пп.15-21, где указанная гибридома является гибридомой CNCM I-4372, которая была депонирована в соответствии с Будапештским договором 6 октября 2010 г. Национальной коллекцией культур микроорганизмов (CNCM), Институт Пастера, Париж, Франция.
40. Гибридома, способная секретировать анти-hPG моноклональное антитело по любому из пп.15-21, где указанная гибридома является гибридомой CNCM I-4373, которая была депонирована в соответствии с Будапештским договором 6 октября 2010 г. Национальной коллекцией культур микроорганизмов (CNCM), Институт Пастера, Париж, Франция.
41. Гибридома, способная секретировать анти-hPG моноклональное антитело по любому из пп.15-21, где указанная гибридома является гибридомой CNCM I-4374, которая была депонирована в соответствии с Будапештским договором 6 октября 2010 г. Национальной коллекцией культур микроорганизмов (CNCM), Институт Пастера, Париж, Франция.
42. Гибридома, способная секретировать анти-hPG моноклональное антитело по любому из пп.15-21, где указанная гибридома является гибридомой CNCM I-4375, которая была депонирована в соответствии с Будапештским договором 6 октября 2010 г. Национальной коллекцией культур микроорганизмов

(CNCM), Институт Пастера, Париж, Франция.

43. Гибридома, способная секретировать анти-hPG моноклональное антитело по любому из пп.1-7 или 15-21, где указанная гибридома является гибридомой CNCM I-4376, которая была депонирована в соответствии с Будапештским договором 6 октября 2010 г. Национальной коллекцией культур микроорганизмов (CNCM), Институт Пастера, Париж, Франция.

Препрогастрин: M QRLCVYVLIF ALALAAFSEA SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG
 -21 -11 -1 1 11 21
 PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN
 31 41 51 61 71

Прогастрин: SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG
 1 11 21
 PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN
 31 41 51 61 71

G34: QLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD F-NH₂
 41 51 61 71

G34-Gly: QLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FG
 41 51 61 71

G17: EGPWLE EEEEAYGWMD F-NH₂
 61 71

G17-Gly: EGPWLE EEEEAYGWMD FG
 61 71

CTFP: SAEDEN
 75

Фиг. 1

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTTCCAGTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCCAAGGCTGGGGCTTCGGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTTACCAGCTACTGGG
 E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y I F T S Y W

mV_HCDR 1.3

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TACACTGGGTTAAACAGAGGCTGGACAGGGTCTAGAATGGATTGGTGGTTTTATCCTGGAAATAGTGATTCTAGGTACAACAGAAATCAAGGSCAA
 V H W V K Q R P G Q G L E W I G G F Y P G N S D S R Y N Q K F K G K

mV_HCDR 2.3

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGCCACACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGTACTGCCATGAGACCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTACAAGAAGAGAT
 A T L T A V T S A S T A Y M D L S S L T N E D S A V Y F C T R R D

mV_HCDR 3.3

310 320 330 340
 AGTCCCCAGTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAGTCTCCTCA
 S P Q Y W G Q G T T L T V S S

mV_HCDR 3.3

Фиг. 2A

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATG
 D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N

mV_LCDR 1.3

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTCAAAAGTTTCCAACCGATTCTTGGGGTCCAGACAGGTT
 G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F

mV_LCDR 1.3

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGACTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCCG
 S G S G S G T D F T L K I S R L E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P

mV_LCDR 3.3

310 320 330
 TTCACGTTTCGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA
 F T F G G G T K L E I K

mV_LCDR 3.3

Фиг. 2B

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAGGTTGAGTTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCAGGGGCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTGAGTCTCTGGA
Q V Q L Q Q S G A E L M K P G A S V K I S C K A T G Y T F S S S W
                                     mVHCDR 1.4
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TAGAGTGGTTAAACACAGGCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGTTTTTACCTGGAAGTGGTAGTACAGACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAA
I E W L K Q R P G H G L E W I G E F L P G S G S T D Y N E K F K G K
                                     mVHCDR 2.4
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCACATTCACTGCAGACACATCCTCCGACACAGCCTACATGCTACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAACTSATGGT
A T F T A D T S S D T A Y M L L S S L T S E D S A V Y Y C A T D G
                                     mVHCDR 3.4
      310     320     330     340     350
AATTATGACTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
N Y D W F A Y W G Q G T L V T V S A
mVHCDR 3.4

```

Фиг. 2C

```

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

```

Фиг. 2D

```

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

```

Фиг. 2E

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GACATTGTGATGACGAGGCTGCATCCTCTAATCCAGTCACTCTTGAACATCCGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCGACATACTAAAG
D I V M T Q A A S S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L R H T K
                                     mVLCDR 1.8
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GCATCACTTTTTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGTCTCTGATTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTT
G I T F L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F
mVLCDR 1.8                                     mVLCDR 2.8
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTAGCAGTGGGTGAGGAAGTATTCACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGGGTGTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAAGTTCCG
S S S G S G T D F T L R I S R V E A E D L G V Y Y C A Q N L E L P
                                     mVLCDR 3.8
      310     320     330
CTCACGTTTCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
L T F G A G T K L E L K
mVLCDR 3.8

```

Фиг. 2F

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAATTTTCAGTAGCTATGGCA
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F I F S S Y G
                                     mVHCDR 1.13

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTCCTGGGTTCGCGAGTCTCCAGACAGGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAGTATTAATACTTTTGGTGATAGAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCG
M S W V R Q S P D R R L E L V A S I N T F G D R T Y Y P D S V K G R
                                     mVHCDR 2.13
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCAACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAATGACCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATTATTACTGTGCAAGAGGGACC
F T I S R D N A K N T L Y L Q M T S L K S E D T A I Y Y C A R G T
                                     mVHCDR 3.13

      310     320     330     340
GGAACCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
G T Y W G Q G T T L T V S S
mVHCDR 3.13

```

Фиг. 2G

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTGTGCTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGCGTTAACATTGGACAACCGCCTCCATCTCCTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATG
D V V L T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D
                                     mVLCDR 1.13

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGATT
G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F
mVLCDR 1.13                                     mVLCDR 2.13
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGATGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCT
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P
                                     mVLCDR 3.13

      310     320     330
CAGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA
Q T F G G G T K L E I K
mVLCDR 3.13

```

Фиг. 2H

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAGGTCCAACCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGGTACACCTTCACACAGCTACTATA
Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y Y
                                     mVHCDR 1.16

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTACTGGGTGAAGCAGAGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGAGAGATTAAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGCAA
M Y W V K Q R P G Q G L E W I G E I N P S N G G T N F N E K F K S K
                                     mVHCDR 2.16
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCACACTGACTGTAGACAATCCTCCAGCACAGCATACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAGGCGGT
A T L T V D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C T R G G
                                     mVHCDR 3.16

      310     320     330     340     350
TACTACCCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
Y Y P F D Y W G Q G T T L T V S S
mVHCDR 3.16

```

Фиг. 2I

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGCGTTACCATTGGGCGCCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGACAGTGATG
D V V M T Q T P L T L S V T I G R P A S I S C K S S Q S L L D S D
                                     mVLCDR 1.16

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAAGACATATTTGTATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTGAGCTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGAT
G K T Y L Y W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S E L D S G V P D R I
mVLCDR 1.16                                     mVLCDR 2.16
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CACTGGCAGTGGGTCCGGGACAGATTTCACACTGAAGATCAGCAGATGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGAACACATTCTCCG
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H S P
                                     mVLCDR 3.16

      310     320     330
TACAGGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
Y T F G G G T K L E I K
mVLCDR 3.16

```

Фиг. 2J

```

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

```

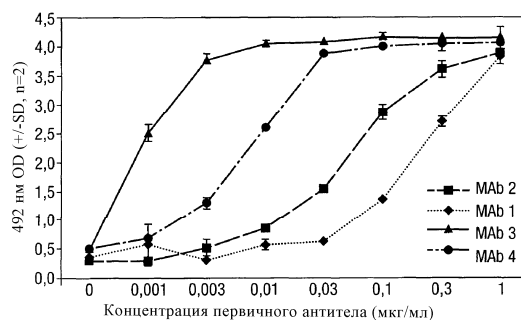
Фиг. 2K

```

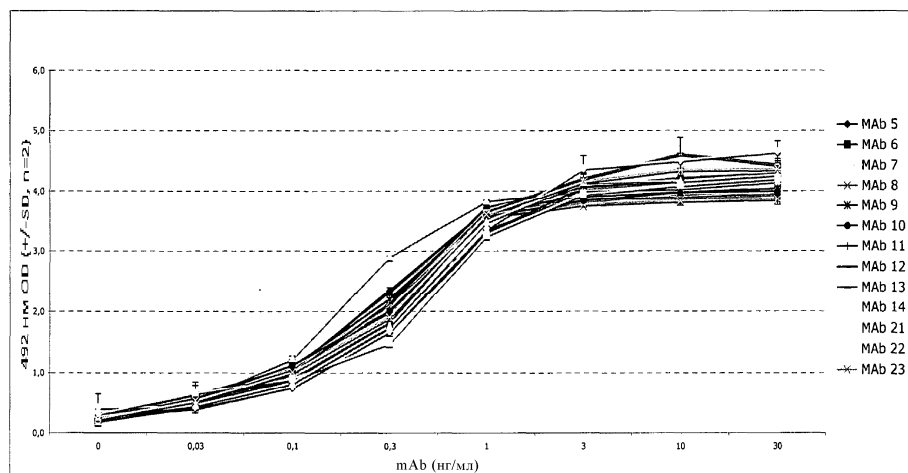
      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAACTTGGCTCACTCAGTCATCTTCAGCTCTTCTCCCTGGGAGCCTCAGCAAACTAACGTGCAGTTTGAGTAGTCAACACAGAACGTACACCATTG
Q L A L T Q S S S A S F S L G A S A K L T C T L S S Q H R T Y T I
                                     mVLCDR 1.19
      110    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

```

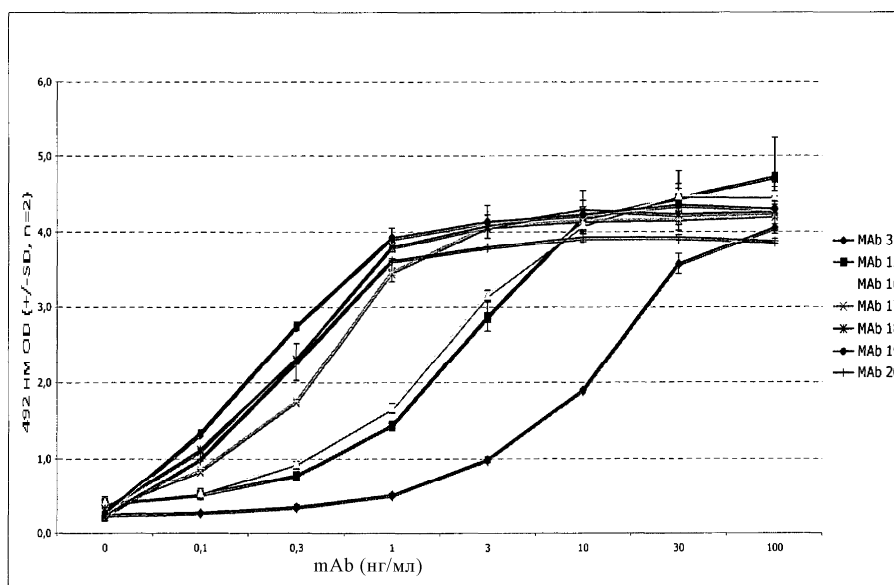
Фиг. 2L



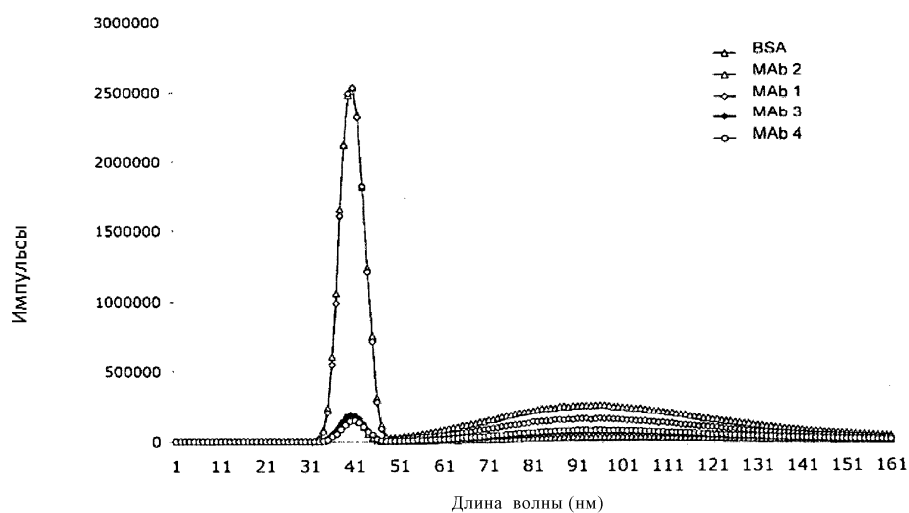
Фиг. 3A



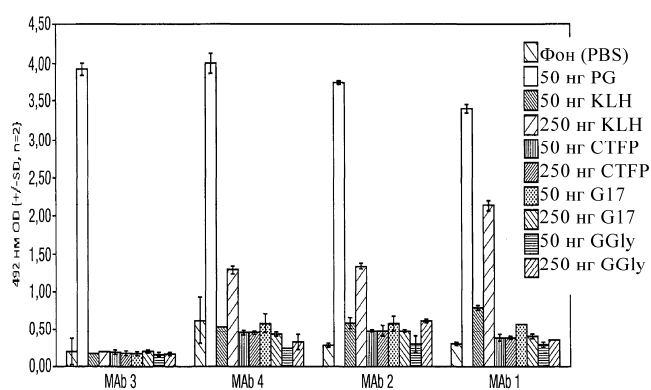
Фиг. 3B



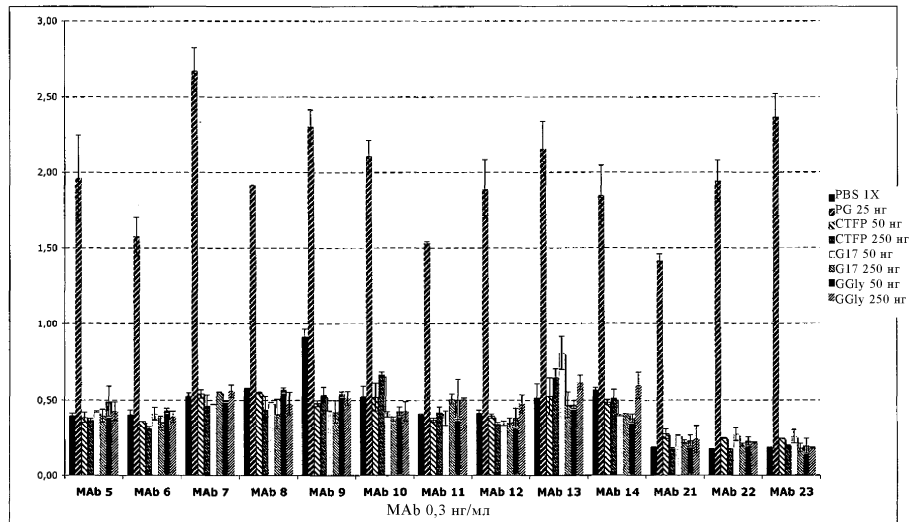
Фиг. 3С



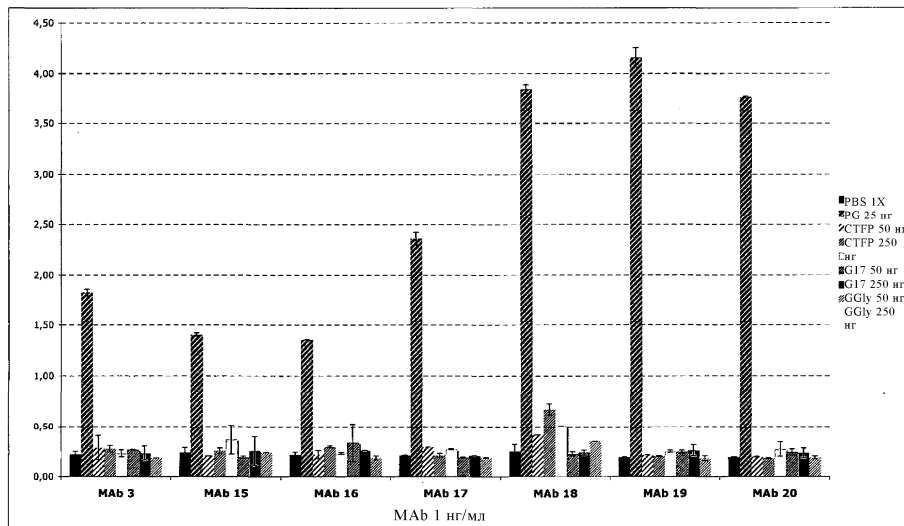
Фиг. 4



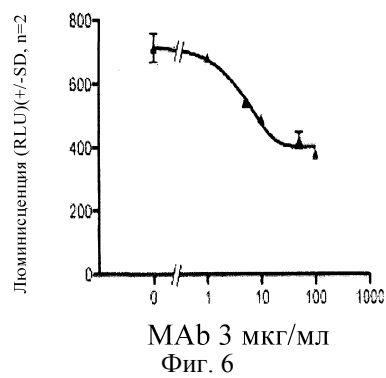
Фиг. 5А



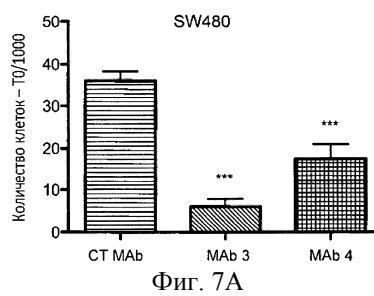
Фиг. 5В



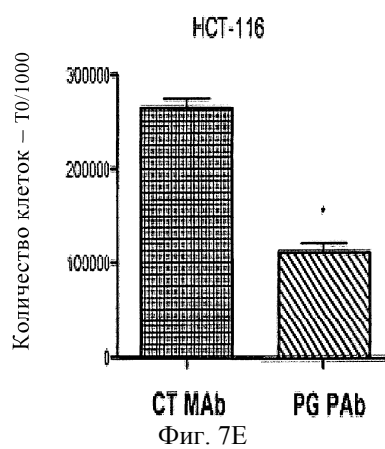
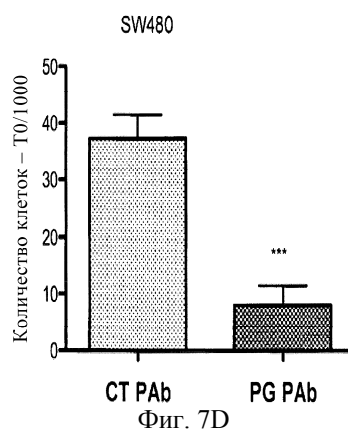
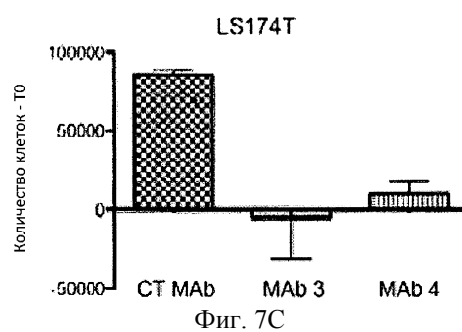
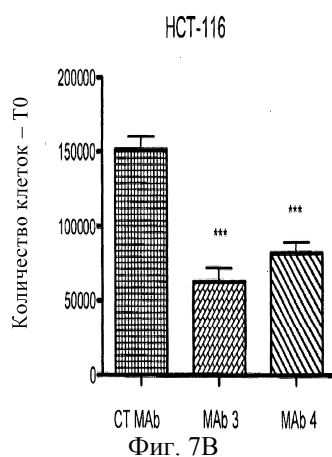
Фиг. 5С



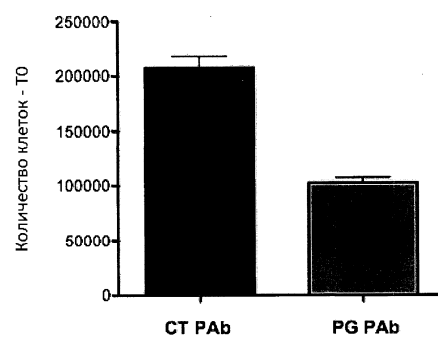
Фиг. 6



Фиг. 7А

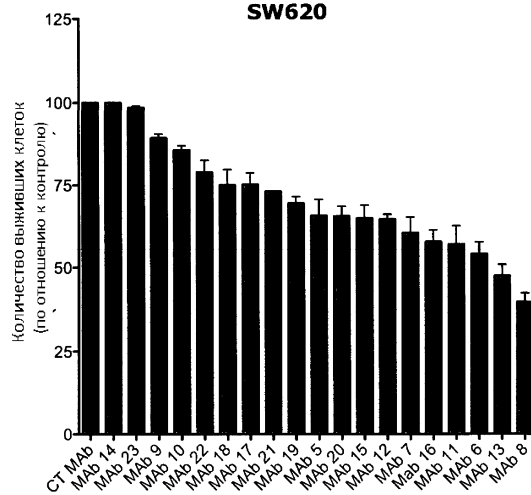


LS174T



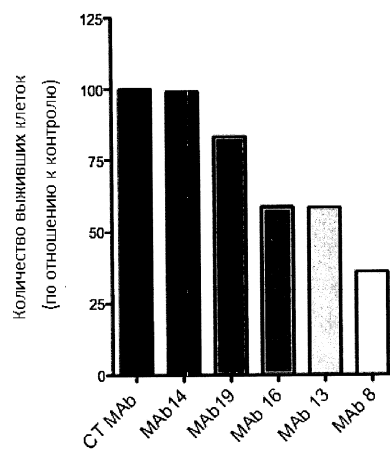
Фиг. 7F

SW620

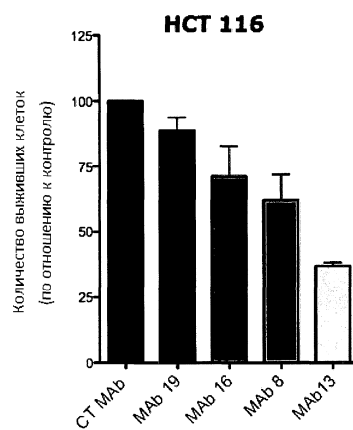


Фиг. 7G

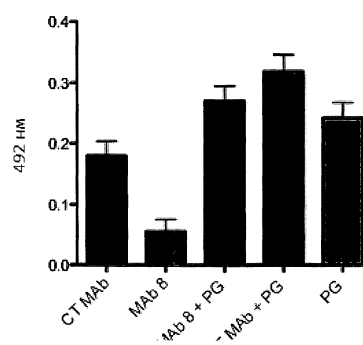
LS174T



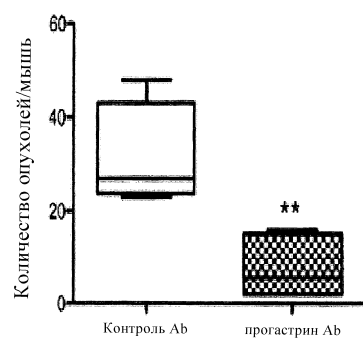
Фиг. 7H



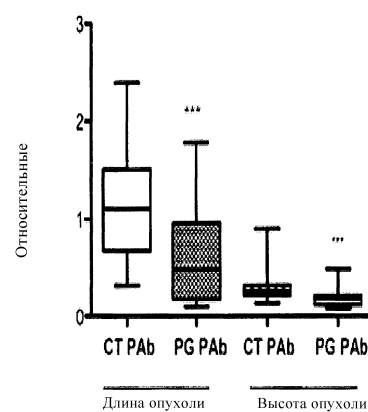
Фиг. 7I



Фиг. 8



Фиг. 9А



Фиг. 9В

