



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.30

(21) Номер заявки
201692071

(22) Дата подачи заявки
2015.04.14

(51) Int. Cl. **G01N 33/577** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) ИММУНОАНАЛИЗ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ХРОМОГРАНИНА А

(31) **14164809.7**

(32) **2014.04.15**

(33) **EP**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/EP2015/058045**

(87) **WO 2015/158701 2015.10.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЗАНН С.А.С. (FR)

(72) Изобретатель:
**Карюэль Паскалин, Риго Валери,
Герен Надин (FR)**

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

(56) US-B1-6632624
Robert Bernard Hogg: "A processing independent analyses of chromogranin A" In: "PhD Thesis", 1 January 1998 (1998-01-01), Queen's University of Belfast, Belfast (united Kindgom), XP055145976, abstract

ROBERT B. HOGG ET AL.: "Immunological studies employing antisera generated to residues 120-143 of bovine chromogranin A", REGULATORY PEPTIDES, vol. 64, no. 1-3, 15 July 1996 (1996-07-15), page 71, XP055146014, abstract

P. NORLEN ET AL.: "Cell-specific Processing of Chromogranin A in Endocrine Cells of the Rat Stomach", JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY, vol. 49, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 9-18, XP055140076, ISSN: 0022-1554, DOI: 10.1177/002215540104900102 page 11, right-hand column, paragraph 2; tables 1-3

G. M. PORTELA-GOMES ET AL.: "Selective Processing of Chromogranin A in the Different Islet Cells in Human Pancreas", JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY, vol. 49, no. 4, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 483-490, XP055140080, ISSN: 0022-1554, DOI: 10.1177/002215540104900408 tables 1,2

STRIDSBERG M. ET AL.: "Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours", JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, SOCIETY FOR ENDOCRINOLOGY, GB, vol. 144, no. 1, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 49-59, XP009130179, ISSN: 0022-0795 page 50, left-hand column, paragraph 3

LEON A. ET AL.: "Comparison between two methods in the determination of circulating chromogranin A in neuroendocrine tumors (NETs): Results of a prospective multicenter observational study", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MARKERS, WICHTIG EDITORE, MILAN, IT, vol. 20, no. 3 1 July 2005 (2005-07-01), pages 156-168, XP008172090, ISSN: 0393-6155 Retrieved from the Internet: URL: <http://www.biological-markers.com/article/comparison-between-two-methods-in-the-determination-of-circulating-chromogranin-a-in-neuroendocrine-tumors--nets---results-of-a-prospective-multicente-art005283> the whole document

THEODORA POPOVICI ET AL.: "Automated two-site immunofluorescent assay for the measurement of serum chromogranin A", CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 47, no. 1-2, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 87-91, XP055140864, ISSN: 0009-9120, DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.10.029 the whole document

O'DORISIO THOMAS M. ET AL.: "Development of a Highly Sensitive and Specific Carboxy-Terminal Human Pancreastatin Assay to Monitor Neuroendocrine Tumor Behavior", PANCREAS, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 39, no. 5, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 611-616, XP008172097, ISSN: 0885-3177, DOI: 10.1097/MPA.0B013E3181C68D7A the whole document

DILLEN L. ET AL.: "Enzyme-linked immunosorbent assay for chromogranin A", CLINICAL CHEMISTRY 1989 US, vol. 35, no. 9, 1989, pages 1934-1938, XP008172099, ISSN: 0009-9147 the whole document

KIMURA N.: "Immunohistochemical Localization of Chromostatin and Pancreastatin, Chromogranin A-Derived Bioactive Peptides, in Normal and Neoplastic Neuroendocrine Tissues", ENDOCRINE PATHOLOGY, HUMANA PRESS, TOTOWA, NJ, US, vol. 6, no. 1, 1 February 1995 (1995-02-01), pages 35-43, XP008172084, ISSN: 1046-3976, DOI: 10.1007/BF02914987 the whole document

EP-A1-2383293

-
- (57) В патенте описан способ иммуноанализа для обнаружения хромогранина А или его фрагмента(ов), заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых приводят в контакт образец, который предположительно содержит хромогранин А, с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А, и вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А, в условияхобеспечивающих образование тройного комплекса между хромограгином А и двумя антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, и проводят обнаружение связывания двух антител или их антигенсвязывающих фрагментов с хромограгином А. Описаны также антитела к аминокислотным остаткам 124-144 и 280-301 хромогранина А и их применение в способе иммуноанализа.

Предпосылки создания изобретения

Хромогранин А (CgA) представляет собой белок, идентифицированный и выделенный в 1965 г. из хромоаффинных клеток мозгового слоя бычьих надпочечников (Banks и др., *Biochem J* 97, 1965, 40С-41С; Taupenot и др., *New Eng J Med.* 348, 2010, сс. 1134-1149). Хромоаффинные клетки представляют собой нейроэндокринные клетки, которые присутствуют в основном в мозговом слое надпочечных желез у млекопитающих. Хромогранин А является широко известным опухолевым маркером различных нейроэндокринных опухолей, гетерогенной группы редко встречающихся неоплазм из нейроэндокринных клеток, включающей множественную эндокринную неоплазию типа 1 и типа 2 (MEN1/MEN2), медулярную карциному щитовидной железы, карциноидные опухоли, опухоли островковых клеток, феохромоцитому/паранглиому, низкодифференцированный/мелкоклеточный/атипичный легочный карциноид, мелкоклеточную карциному легкого, карциному клеток Меркеля (Deftos и др., *Endocr. Rev.* 12, 1991, сс. 181-187; Corti и др., *Br J Cancer* 73, 1996, сс. 924-932) и он упоминается в ряде руководств (Ramage и др., *Gut* 61, 2012, сс. 6-32; Vinik и др., *NANETS Pancreas* 39(6), 2010, сс. 713-734; Pape и др., *ENETS* 95, 2012, сс. 135-156).

Человеческий хромогранин А имеет состоящую из 439 аминокислотных остатков последовательность (см. SEQ ID NO: 1), он представляет собой кислый гликопротеин с молекулярной массой 49 кДа, который запасается и высвобождается из хромоаффинных гранул эндокринных клеток, нейронов и нейроэндокринных клеток наряду с соответствующими гормонами, нейротрансмиттерами и нейропептидами (Kim и др., *Cell* 106, 2001, сс. 499-509).

Хромогранин А является основным представителем семейства хромогранинов/секретогранинов, состоящего из группы белков, которые происходят из различных генов, но которые обладают рядом общих характеристик, а именно, присутствием большого количества кислых аминокислотных остатков и многочисленных пар основных аминокислот, представляющих собой возможные положения для посттрансляционного процессинга (Metz-Boutigue и др., *Eur. J. Biochem* 217, 1993, сс. 247-257) и расщепления.

CgA является предшественником нескольких биологически активных пептидных фрагментов, которые были описаны для человека и других видов, таких как: вазостатины (Drees и др., *Endocrinology* 129, 1991, сс. 3381-3387), хромостатин (Galindo и др., *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1991, сс. 1426-1430), хромацины (Strub и др., *J Biol Chem* 272, 1997, сс. 11928-11936), панкреастатин (Tatemoto и др., *Nature* 324, 1986, сс. 476-478), WE-14 (Curry и др., *FEBS Lett* 301, 1992, сс. 319-321), катестатин (Mahata и др., *J Clin Invest* 100, 1997, сс. 1623-1633), парастатин (Fasciotti и др., *Endocrinology* 133, 1993, сс. 461-466) и GE-25 (Kirchmair и др., *Biochem J* 310 (часть 1), 1995, сс. 331-336). В базе данных UniProt указаны дополнительные пептиды для человеческого хромогранина А (регистрационный номер: P 10645) на основе сайтов расщепления, позволяющие предсказать пептиды, которые будут высвобождаться: вазостатин-1, содержащий аминокислотную последовательность 1-76, вазостатин-2, содержащий аминокислотную последовательность 1-113, EA-92, содержащий аминокислотную последовательность 116-207, ES-43, содержащий аминокислотную последовательность 210-242, панкреастатин, содержащий аминокислотную последовательность 254-301, SS-18, содержащий аминокислотную последовательность 304-321, WE-14, содержащий аминокислотную последовательность 324-337, WA-8, содержащий аминокислотную последовательность 324-331, LF-19, содержащий аминокислотную последовательность 340-358, AL-11, содержащий аминокислотную последовательность 362-372, GV-19, содержащий аминокислотную последовательность 375-393, GR-44, содержащий аминокислотную последовательность 395-438 и ER-37, содержащий аминокислотную последовательность 402-438. Кроме того, было продемонстрировано, что в различных нейроэндокринных клетках процессинг молекулы может происходить по-разному (Portela-Gomes и др., *J Histochem Cytochem* 4, 2001, сс. 483-490).

Было установлено, что хромогранин А является биомаркером целого ряда заболеваний и состояний, включая рак, например, рак предстательной железы (WO 2013/070088 A1; WO 2013/070089 A1; US 6238877 B1; WO 2012/065025 A2).

В настоящее время существует четыре соответствующих европейским стандартам (СЕ) нерадиоактивных анализа для обнаружения хромогранина А, которые осуществляют на коммерческой основе: в анализе Cis-Bio ELISA (фирма Cisbio Bioassays, Кодоле, Франция) применяют два моноклональных антитела к эпитопам, соответствующим аминокислотам 145-197 и 219-234, в анализе DAKO ELISA (фирма Dako Denmark A/S, Глоструп, Дания) применяют кроличьи поликлональные антитела к С-концевому фрагменту с молекулярной массой 23 кДа, в сэндвич-анализе ELISA Euro-Diagnostica NEOLISA™ (фирма Euro Diagnostica AB, Мальмё, Швеция) применяют два моноклональных антитела к эпитопам, соответствующим аминокислотам 236-251 и 264-279 (см. также WO 2011/135035 A1 и WO 99/58980 A1).

Единственный доступный полностью автоматизированный анализ для обнаружения хромогранина А представляет собой анализ хромогранина А KRYPTOR (фирма Thermo Fisher Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Хеннингсдорф, Германия), в котором применяют два моноклональных антитела, из которых одно моноклональное антитело связывается с эпитопом, соответствующим аминокислотам 250-301 (Popovici и др., *Clin Biochem* 47, 2014, сс. 87-91).

Вследствие высокого уровня протеолиза молекулы измеренная с помощью указанного анализа концентрация может варьироваться в широких пределах с течением времени в зависимости от хранения соб-

ранного образца и в зависимости от фрагмента, измеряемого с использованием антител, поэтому улучшенный анализ хромогранина А должен быть ориентирован на наиболее стабильные фрагменты молекулы и его следует оценивать с позиций стабильности образца в различных условиях хранения.

В ряде публикаций обсуждалось влияние эпитопов, распознаваемых антителами, и схемы анализа на характеристики иммуноанализов хромогранина А с точки зрения клинического применения (Corti и др., Eur J. Biochem 235, 1996, сс. 275-280, Stridsberg и др., J Endocrinol 177, 2003, сс. 337-341).

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящей заявке раскрыта новая схема анализа для обнаружения хромогранин А или его фрагментов. В этом анализе применяют одно или несколько антител, которые связываются с эпитопами, ранее охарактеризованными как антигенные сайты, обладающие слабой способностью или отсутствием способности к связыванию (Corti и др., Eur J. Biochem 235, 1996, сс. 275-280). При создании способа неожиданно было установлено, что анализ, предлагаемый в настоящей заявке, характеризуется более высокой стабильностью аналита в образце по сравнению с существующим полностью автоматизированным анализом хромогранина А KRYPTOR (фирма B.R.A.H.M.S GmbH, Хеннингсдорф, Германия). Кроме того, иммуноанализ, представленный в настоящем описании, характеризуется широким диапазоном обнаружения, т.е. можно осуществлять обнаружение белка-мишени по меньшей мере в диапазоне концентраций от примерно 9 нг/мл до примерно 3 мг/мл. Широкий диапазон обнаружения дает преимущество с экономической точки зрения, поскольку требуется разводить меньшее количество образцов. Поэтому анализ, предлагаемый в настоящей заявке, можно применять, например, в качестве исследовательского инструмента и в клинических условиях для обнаружения хромогранина А в широком диапазоне концентраций и с высокой специфичностью. В клинических условиях анализ, предлагаемый в настоящей заявке, можно применять для обнаружения хромогранина А в образцах, взятых у пациентов, для установления диагноза, прогноза, оценки риска, стратификации риска, терапевтического контроля и/или послеоперационного контроля нарушения или медицинского состояния.

В частности, в настоящей заявке предложен способ иммуноанализа для обнаружения хромогранина А или его фрагмента, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых:

- а) приводят в контакт образец, предположительно содержащий хромогранин А, с
 - (i) первым антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А, где первое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к эпитопу, содержащиеся в последовательности, простирающейся от аминокислотного остатка 124 до 144 аминокислотного остатка SEQ ID NO:1, и
 - (ii) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А, где второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к эпитопу, содержащемуся в последовательности, простирающейся от аминокислотного остатка 280 до 301 аминокислотного остатка SEQ ID NO:1, в условиях, обеспечивающих образование тройного комплекса между хромогранин А и двумя антителами или их антигенсвязывающими фрагментами или производными, и
- б) обнаруживают связывание двух антител или их антигенсвязывающих фрагментов с хромогранин А.

Способ иммуноанализа, раскрытый в заявке, можно применять в контексте диагностических методов. Кроме того, способ относится к наборам и их применениям в контексте диагностических методов.

Описание чертежей

На чертежах показано:

- на фиг. 1 - стандартная кривая, построенная для различных концентраций хромогранина А с использованием способа иммуноанализа, описанного в примере 4;
- на фиг. 2 - профиль точности иммуноанализа, предлагаемого в настоящей заявке, в сравнении с известным из существующего уровня техники анализом хромогранина А KRYPTOR (фирма Thermo Fisher Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Хеннингсдорф, Германия) (пример 5).

Подробное описание

В настоящей заявке также раскрыт способ иммуноанализа, предназначенный для обнаружения хромогранина А или его фрагментов. Способ иммуноанализа основан на обнаружении хромогранина с использованием одного или нескольких антител, предпочтительно моноклональных антител, обладающих специфичностью в отношении хромогранина А. Предпочтительно иммуноанализ позволяет обнаруживать эпитопы в последовательности, простирающейся от аминокислотного остатка 124 до аминокислотного остатка 144 и/или от аминокислотного остатка 280 до аминокислотного остатка 301 последовательности хромогранина А, представленной в SEQ ID NO: 1. Таким образом, с помощью представленного в настоящем описании иммуноанализа можно обнаруживать также фрагменты хромогранина, включающие аминокислотные остатки с 124 по 144 и/или с 280 по 301 последовательности хромогранина А. Таким образом, в контексте настоящего описания понятия "хромогранин А или его фрагмент" или "хромогранин или его фрагмент(ы)" включают хромогранин А и все его фрагменты, которые содержат эпитоп(ы), обнаруживаемый(ые) с помощью иммуноанализа описан(ы) далее. Предпочтительно в анализе используют по меньшей мере одно антитело, которое обнаруживает эпитоп в последовательности, про-

стирающейся от аминокислотного остатка 124 до аминокислотного остатка 144 последовательности хромогранина А, представленной в SEQ ID NO: 1. Хромогранин А или, как это имеет место в некоторых случаях, его фрагмент(ы) можно обнаруживать качественно и/или количественно на основе связывания одного или предпочтительно двух антител с хромогранин(ами) А или его фрагмент(ами). В случае сэндвич-иммуноанализа (т.е. с применением двух антител) считается, что обнаружено присутствие хромогранина А или его фрагмента, если оба антитела связываются с хромогранин(ами) А или его фрагмент(ами). Иными словами, один из аспектов данного описания относится к иммуноанализу, предназначенному для обнаружения хромогранина А или его фрагмента в образце, который заключается в том, что осуществляют стадии, на которых приводят в контакт указанный образец с первым антителом к хромогранину А (или его антигенсвязывающим фрагментом или производным) и вторым антителом к хромогранину А (или его антигенсвязывающим фрагментом или производным) и производят обнаружение присутствия тройных иммунных комплексов, включающих указанные антитела и хромогранин А (или его фрагмент(ы)). Иммунные комплексы могут формироваться в условиях, которые дают возможность осуществляться иммунной реакции между указанным/указанными антителом(ами) и указанным образцом (т.е. в условиях, в которых происходит связывание антитела/антител с хромогранин(ами) А или его фрагмент(ами), т.е. может происходить образование тройного комплекса в случае сэндвич-анализа). В иммуноанализе предпочтительно следует применять комбинацию двух антител, например, в сэндвич-формате (см. ниже). Таким образом, в настоящей заявке раскрыт способ иммуноанализа, предназначенный для обнаружения хромогранина А (или его фрагмента), который заключается в том, что осуществляют стадии, на которых:

а) приводят в контакт образец, который предположительно содержит хромогранин А (или его фрагмент), с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или производным, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А или его фрагмента, и вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или производным, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А или его фрагмента, и

б) проводят обнаружение связывания двух антител или их антигенсвязывающих фрагментов или производных с хромогранин(ами) А или его фрагмент(ами). В способе иммуноанализа описанном в данной заявке, указанное первое антитело предпочтительно обладает специфичностью в отношении эпитопа в последовательности хромогранина А (SEQ ID NO: 1), предпочтительно в последовательности, простирающейся с аминокислоты 124 до аминокислоты 144 SEQ ID NO: 1. Первое антитело предпочтительно представляет собой моноклональное антитело.

В настоящей заявке также раскрыт способ иммуноанализа, предназначенный для обнаружения хромогранина А (или его фрагмента), который заключается в том, что осуществляют стадии, на которых:

а) приводят в контакт образец, который предположительно содержит хромогранин А (или его фрагмент), с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или производным, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А или его фрагмента, и вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или производным, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А или его фрагмента, в условиях, в которых может происходить образование тройного комплекса между хромогранин(ами) А или его фрагмент(ами) и двумя антителами или их антигенсвязывающими фрагментами или производными, и

б) проводят обнаружение связывания двух антител или их антигенсвязывающих фрагментов или производных с хромогранин(ами) А или его фрагмент(ами). В способе иммуноанализа согласно описанию указанное первое антитело предпочтительно обладает специфичностью в отношении эпитопа в последовательности хромогранина А (SEQ ID NO: 1), предпочтительно в последовательности, простирающейся с аминокислоты 124 до аминокислоты 144 SEQ ID NO: 1. Первое антитело предпочтительно представляет собой моноклональное антитело.

В заявке так же раскрыт способ иммуноанализа, предназначенный для обнаружения хромогранина А (или его фрагментов), который заключается в том, что осуществляют стадии, на которых:

а) приводят в контакт образец, который предположительно содержит хромогранин А, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или производным, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А или его фрагмента, в условиях, в которых может происходить образование иммунного комплекса между хромогранин(ами) А и антителом или его антигенсвязывающими фрагментами или производными, где указанное первое антитело обладает специфичностью в отношении эпитопа, простирающегося с аминокислоты 124 до аминокислоты 144 последовательности хромогранина А (SEQ ID NO: 1). Антитело, обладающее специфичностью в отношении эпитопа, простирающегося от аминокислоты 124 до аминокислоты 144 последовательности хромогранина А, предпочтительно представляет собой антитело, продуцируемое линией клеток гибридомы 537/H2, которая депонирована в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур института Лейбница (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124, Брауншвейг, Германия, 20 февраля 2014 г. под регистрационным номером DSM ACC3231.

Ниже в настоящем описании понятие "антитело" включает также его антигенсвязывающие фрагменты или производные, если не указано иное.

Понятие "антитело" в целом включает моноклональные и поликлональные антитела и их связывающие фрагменты, прежде всего, Fc-фрагменты, а также так называемые "одноцепочечные антитела"

(Bird R. E. и др., Science 242, 1988, сс. 423-426), химерные, гуманизированные антитела, прежде всего антитела с трансплантированными CDR, и димерные или тетрамерные антитела (диа- или тетрабоды) (Holliger P. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 1993, сс. 6444-6448). Понятие относится также к иммуноглобулинподобным белкам, которые отбирают с помощью методов, включающих, например, метод фагового дисплея на основе специфического связывания с представляющей интерес молекулой, содержащейся в образце. В этом контексте понятия "специфический" и "специфически связывающийся" относятся к антителам к представляющей интерес молекуле или ее фрагменту. Считается, что антитело обладает специфичностью, если его аффинность к представляющей интерес молекуле (в данном случае: хромогранин А) или к указанному выше ее фрагменту по меньшей мере в 50 раз выше, предпочтительно в 100 раз выше, наиболее предпочтительно по меньшей мере в 1000 раз выше, чем к другим молекулам, присутствующим в образце, который содержит представляющую интерес молекулу. В данной области хорошо известно, каким образом можно создавать и отбирать антитела, обладающие указанной специфичностью. Как указано выше, предпочтительными являются моноклональные антитела.

Как будет более подробно обсуждено ниже в настоящем описании, (первое и/или второе) антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или производные, применяемые в представленном в настоящем описании способе иммуноанализа, могут представлять собой, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела или моноклональные антитела, созданные методами генетической инженерии.

В способе иммуноанализа, согласно описанию указанное первое антитело может обладать специфичностью в отношении эпитопа в последовательности хромогранина А (SEQ ID NO: 1), предпочтительно в последовательности, простирающейся от аминокислоты 124 до аминокислоты 144 SEQ ID NO: 1. Первое антитело предпочтительно представляет собой моноклональное антитело.

В способе иммуноанализа, согласно описанию указанное второе антитело может обладать специфичностью в отношении эпитопа в последовательности хромогранина А (SEQ ID NO: 1), предпочтительно в последовательности, простирающейся от аминокислоты 280 до аминокислоты 301 SEQ ID NO: 1. Второе антитело предпочтительно представляет собой моноклональное антитело.

В конкретном варианте иммуноанализа, согласно описанию первое антитело обладает специфичностью в отношении эпитопа в последовательности хромогранина А (SEQ ID NO: 1), предпочтительно в последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 124-144 SEQ ID NO: 1, и второе антитело обладает специфичностью в отношении эпитопа в последовательности хромогранина А (SEQ ID NO: 1), предпочтительно в последовательности, состоящей из аминокислотных остатков 280-301 SEQ ID NO: 1. Первое и второе антитела предпочтительно представляют собой моноклональные антитела.

Первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или производное может продуцироваться, например, линией клеток гибридомы 537/H2, которая депонирована в DSMZ (Inhoffenstraße 7B, 38124, Брауншвейг, Германия) 20 февраля 2014 г. под регистрационным номером DSM ACC3231. Антитело, продуцируемое линией клеток гибридомы 537/H2, специфически связывается с аминокислотными остатками 124-144 последовательности хромогранина А (SEQ ID NO: 1), т.е. с SEQ ID NO: 2. Оно направлено против антигенного пептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 4.

Второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или производное может продуцироваться, например, линией клеток гибридомы 541/E2, которая депонирована в DSMZ (Inhoffenstraße 7B, 38124, Брауншвейг, Германия), 20 февраля 2014 г. под регистрационным номером DSM ACC3232. Антитело, продуцируемое линией клеток гибридомы 541/E2, специфически связывается с аминокислотными остатками 280-301 последовательности хромогранина А (SEQ ID NO: 1), т.е. с SEQ ID NO: 3. Оно направлено против антигенного пептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 5.

В конкретном варианте иммуноанализа, предлагаемого в заявке, первое антитело продуцируется линией клеток гибридомы 537/H2, которая депонирована в DSMZ (Inhoffenstraße 7B, 38124, Брауншвейг, Германия) 20 февраля 2014 г. под регистрационным номером DSM ACC3231, а второе антитело продуцируется линией клеток гибридомы 541/E2, которая депонирована в DSMZ (Inhoffenstraße 7B, 38124, Брауншвейг, Германия), 20 февраля 2014 г. под регистрационным номером DSM ACC3232.

Связывание антител с хромогранинном А (или его фрагментом) имеет место в пригодных условиях (т.е. в условиях, в которых могут происходить иммунные реакции, т.е. связывание антител с хромогранинном А и образование иммунных комплексов). Такие условия известны специалисту в данной области, и можно применять стандартные форматы иммуноанализа, например, описанные ниже. Такие условия предпочтительно включают физиологические температуру, значение pH и ионную силу и они могут иметь место, например, в таких средах как забуференный фосфатом физиологический раствор (ЗФР).

Предпочтительные методы обнаружения включают иммуноанализы в различных форматах, такие, например, как радиоиммуноанализ (РИА), хемилюминесцентный и флуоресцентный иммунные анализы, ферментный иммуноанализ (EIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), анализы на основе массивов (матриц) гранул Luminex, белковых микромассивов, быстрые тест-форматы, такие, например, как иммунохроматографические стрип-тесты, и мониторинг выбранных/множественных реакций (SRM/MRM).

Анализы могут представлять собой гомогенные или гетерогенные анализы, анализы в условиях конкуренции (конкурентные) и неконкурентные анализы. В наиболее предпочтительном аспекте в каче-

стве анализа применяют формат сэндвич-анализа, представляющий собой неконкурентный иммуноанализ, в котором подлежащую обнаружению и/или количественной оценке молекулу связывают с первым антителом и со вторым антителом. Первое антитело может быть связано с твердой фазой, например, гранулой, поверхностью лунки или иного контейнера, чипом или полоской (стрипом), а второе антитело представляет собой антитело, меченное, например, красителем, радиоизотопом или реакционноспособным или каталитически активным фрагментом, или наоборот. Затем с помощью пригодного метода измеряют количество меченого антитела, связанного с аналитом. Общие условия и процедуры, применяемые в "сэндвич-анализах", хорошо зарекомендовали себя и известны специалисту в данной области (см. *The Immunoassay Handbook*, под ред David Wild, изд-во Elsevier LTD, Oxford; 3-е изд., май 2005 г., ISBN-13: 978-0080445267; Hultschig C. и др., *Curr Opin Chem Biol.*, 10(1), февраль 2006 г., сс. 4-10. PMID: 16376134).

В наиболее предпочтительном аспекте в анализе применяют два антитела, которые оба присутствуют в диспергированной форме в жидкой реакционной смеси, где первый служащий в качестве метки компонент присоединяют к первому антителу, при этом указанный первый служащий в качестве метки компонент представляет собой часть системы мечения на основе гашения или усиления флуоресценции или хемилюминесценции, а второй служащий в качестве метки компонент указанной системы маркировки присоединяют ко второму антителу, в результате чего после связывания обеих захватывающих молекул с аналитом генерируется измеряемый сигнал, который позволяет обнаруживать образовавшиеся сэндвич-комплексы в растворе, содержащем образец.

В еще более предпочтительном аспекте указанная система мечения может содержать криптаты редкоземельных металлов или хелаты редкоземельных металлов в комбинации с флуоресцентным красителем или хемилюминесцентным красителем, прежде всего, с красителем цианинового типа.

В контексте настоящего описания в анализах на основе флуоресценции можно применять красители, которые можно выбирать, например, из группы, включающей FAM (5- или 6-карбоксифлуоресцеин), VIC, NED, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), IRD-700/800, цианиновые красители, такие как CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, ксантен, 6-карбокси-2',4',7',4,7-гексахлорфлуоресцеин (HEX), TET, 6-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметодилфлуоресцеин (JOE), N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA), 6-карбокси-X-родамин (ROX), 5-карбоксиродамин-6G (R6G5), 6-карбоксиродамин-6G (RG6), родамин, родамин зеленый, родамин красный, родамин 110, BODIPY-красители, такие как BODIPY TMR, орегоновый зеленый, кумарины, такие как умбеллиферон, бензимидазы, такие как Hoechst 33258; фенантридины, такие как тexasовый красный, Yakima желтый, Alexa Fluor, PET, этидия бромид, акридиновые красители, карбазольные красители, феноксазиновые красители, порфириновые красители, полиметиновые красители и т.п.

В контексте настоящего описания основанные на применении хемилюминисценции анализы предусматривают применение красителей, основанных на физических принципах, которые описаны для хемилюминисцентных материалов (Kirk-Othmer, *Encyclopedia of chemical technology*, 4-ое изд., исполнительный редактор J. I. Kroschwitz; под. ред. M. Howe-Grant, изд-во John Wiley & Sons, т.15, 1993, сс. 518-562, публикация, включая цитаты, приведены на сс. 551-562). Предпочтительными хемилюминисцентными красителями являются акридининовые сложные эфиры. Хромогранин А можно обнаруживать, например, с помощью полностью автоматизированных систем для сэндвич-иммуноанализа с использованием устройства B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact PLUS (фирма Thermo Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Хеннингсдорф/Берлин, Германия). В этом анализаторе, работающем по принципу случайного доступа, используется чувствительная технология Time Resolved Amplified Cryptate Emmission (TRACE, усиленное излучение криптата с временным разрешением), основанная на нерадиоактивном переносе энергии между двумя флуорофорами.

В конкретных аспектах метят одно из антител (например, первое антитело), а другое антитело (например, второе антитело) связывают с твердой фазой или оно может избирательно связываться с твердой фазой. Однако, как указано выше, в контексте способов, предлагаемых в заявке, предпочтительно, чтобы первое и второе антитела присутствовали в диспергированной форме в жидкой реакционной смеси и чтобы первый служащий для мечения компонент, который является частью системы мечения на основе экстинкции или усиления флуоресценции или хемилюминесценции, связывался с первым антителом, а второй служащий для мечения компонент указанной системы мечения связывался со вторым антителом, так, чтобы после связывания обоих антител с хромогранинном А (или его фрагментом(ами)), генерировался измеряемый сигнал, позволяющий обнаруживать образовавшиеся сэндвич-комплексы.

В контексте настоящего описания "анализ" или "диагностический анализ" может представлять собой любой тип анализа, применяемого в области диагностики. Такой анализ может быть основан на связывании аналита, подлежащего обнаружению, с одним или несколькими обеспечивающими "захват" зондами с определенной аффинностью. С точки зрения взаимодействия между антителами и молекулами-мишенями или представляющими интерес молекулами константа аффинности предпочтительно превышает 10^8M^{-1} .

Способ иммуноанализа, раскрытый в данной заявке, можно применять в контексте диагностических и/или прогностических методов, в которых производят обнаружение присутствия и/или отсутствия, или

уровня хромогранина А (или его фрагмента(ов)) в образце, взятом из организма индивидуума, подлежащего диагностированию. Хромогранин А участвует в целом ряде заболеваний и состояний, включая карциноидные опухоли, нейроэндокринные опухоли, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, гастрит, легочное заболевание, инфаркт миокарда, гипертензию, сердечную недостаточность, легочные заболевания, тромболизис, ожирение и диабет. Таким образом, иммуноанализ, раскрытый в данной заявке, можно применять для диагностирования заболевания или состояния, выбранного из группы, включающей рак (включая карциноидные опухоли, нейроэндокринные опухоли, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря), гастрит, легочное заболевание, инфаркт миокарда, гипертензию, сердечную недостаточность, тромболизис, ожирение и диабет.

Понятие "чувствительность" анализа относится к пропорции действительно (истинно) положительных результатов, которые правильно идентифицированы как таковые, т.е. она характеризует способность идентифицировать положительные результаты (истинно положительные результаты/количество положительных результатов). Следовательно, чем ниже концентрации аналита, которые могут быть обнаружены с помощью анализа, тем выше чувствительность анализ. Понятие "специфичность" анализа относится к пропорции отрицательных результатов, которые правильно идентифицированы как таковые, т.е. она характеризует способность идентифицировать отрицательные результаты (истинно отрицательные результаты/отрицательные результаты). Для антитела "специфичность" определяют, как способность индивидуального антигенсвязывающего сайта взаимодействовать только с одним антигенным эпитопом. Связывающую способность антитела можно характеризовать также в терминах его "аффинности" и "авидности". "Аффинность" антитела представляет собой меру силы взаимодействия между одним антигенным эпитопом и одним антигенсвязывающим сайтом. "Авидность" антитела представляет собой меру общей силы связывания антигена с несколькими эпитопами и мультиспецифичными антителами.

Чувствительность и специфичность диагностического и/или прогностического теста зависит не только от аналитического "качества" теста, а зависит также от того, что рассматривается в качестве неправильного результата. На практике, как правило, рассчитывают кривые операционных характеристик приемника (ROC-кривые), строя график зависимости значения переменной величины от ее частоты встречаемости в "нормальной" (т.е. у кажущихся здоровыми индивидуумов, не имевших пренатальных осложнений или состояний) и "больной" популяций. Для любого конкретного маркера уровни распределения маркеров у больных и не имеющих заболевания индивидуумов, вероятно, должны перекрываться. В таких условиях тест не позволяет осуществлять абсолютное разделение "нормы" и "болезни" с 100%-ной точностью, и площадь перекрывания указывает, в каких случаях тест не позволяет различать "нормальное состояние" и "болезнь". Выбирают порог, ниже которого результат теста рассматривается как патологический и выше которого результат теста рассматривается как нормальный. Площадь под кривой ROC является мерой вероятности того, что полученные результаты измерения могут позволить правильно идентифицировать состояние. ROC-кривые можно применять даже тогда, когда результаты теста не обязательно дают точное число. Если есть возможность ранжировать результаты, то можно создавать ROC-кривую. Например, результаты теста, проведенного на полученных из "больной" популяции образцах, можно ранжировать (упорядочивать!!!) в соответствии со степенью (например, 1 обозначает низкую, 2 обозначает нормальную и 3 обозначает высокую степень). Можно устанавливать корреляцию этого ранжирования (упорядочивания!!!) с результатами для "нормальной" популяции и создавать ROC-кривую. Эти методы хорошо известны в данной области (см., например, Hanley и др., Radiology 143, 1982, стр. 29-36). Предпочтительно порог выбирают так, чтобы получать площадь под ROC-кривой, превышающую примерно 0,5, более предпочтительно превышающую примерно 0,7, еще более предпочтительно превышающую примерно 0,8, еще более предпочтительно превышающую примерно 0,85, и наиболее предпочтительно превышающую примерно 0,9. Понятие "примерно" в этом контексте обозначает +/- 5% от конкретной величины.

По горизонтальной оси ROC-кривой откладывают величину (1-специфичность), которая увеличивается по мере увеличения уровня ложных положительных оценок. По вертикальной оси кривой откладывают величину чувствительности, которая увеличивается по мере увеличения уровня истинных положительных оценок. Таким образом, для конкретного выбранного уровня отсечки можно определять величину (1-специфичность) и можно получать соответствующую чувствительность. Площадь под кривой ROC является мерой вероятности того, что измеренный уровень маркера должен позволять правильно идентифицировать заболевание или состояние. Таким образом, площадь под ROC-кривой можно применять для определения эффективности теста.

В других аспектах в качестве меры для оценки способности теста прогнозировать риск или диагностировать заболевание или состояние ("больная группа") применяют отношение правдоподобности положительного результата исследования (т.е. отношение вероятности получения истинно положительного результата к вероятности получения ложно положительного результата), отношение правдоподобности отрицательного результата исследования (т.е. отношение вероятности получения истинно отрицательного результата к вероятности получения ложно отрицательного результата), отношение шансов (вероятностей) или отношение рисков. В случае применения отношения правдоподобности положительного результата величина, равная 1, свидетельствует о том, что получение положительного результата равнове-

роятно у индивидуумов как в "больной" группе, так и в "контрольной" группе; величина, превышающая 1, свидетельствует о том, что получение положительного результата более вероятно в "больной" группе; а величина меньше 1 свидетельствует о том, что получение положительного результата более вероятно в "контрольной" группе. В случае применения отношения правдоподобности отрицательного результата величина, равная 1, свидетельствует о том, что получение отрицательного результата равновероятно у индивидуумов как в "больной" группе, так и в "контрольной" группе; величина, превышающая 1, свидетельствует о том, что получение отрицательного результата более вероятно в "больной" группе; а величина меньше 1 свидетельствует о том, что получение отрицательного результата более вероятно в "контрольной" группе.

В случае применения отношения вероятностей величина, равная 1, свидетельствует о том, что получение положительного результата равновероятно у индивидуумов как в "больной" группе, так и в "контрольной" группе; величина, превышающая 1, свидетельствует о том, что получение положительного результата более вероятно в "больной" группе; а величина меньше 1 свидетельствует о том, что получение положительного результата более вероятно в "контрольной" группе.

В случае применения отношения рисков величина, равная 1, свидетельствует о том, что относительная величина риска достижения конечной точки (например, смерти) одинакова как в "больной" группе, так и в "контрольной" группе; величина, превышающая 1, свидетельствует о том, что риск больше в "больной" группе; а величина меньше 1 свидетельствует о том, что риск больше в "контрольной" группе.

Специалисту в данной области должно быть очевидно, что для установления ассоциации диагностического или прогностического индикатора с диагнозом или прогностическим риском достижения в будущем клинического исхода требуется статистический анализ. Например, если уровень маркера меньше X , то это может указывать на то, что у пациента с большей вероятностью может наступить неблагоприятный исход, чем у пациентов, у которых уровень превышает или равен X , о чем свидетельствует уровень статистической значимости. Кроме того, изменение концентрации маркера по сравнению с исходным уровнем может отражать прогноз для пациента, а степень изменения уровня маркера может быть связана с серьезностью нежелательных явлений. Статистическую значимость часто определяют путем сравнения двух или большего количества популяций и определения доверительного интервала и/или p -значения (см., например, Dowdy и Wearden, *Statistics for Research*, изд-во John Wiley & Sons, New York, 1983). Предпочтительными доверительными интервалами являются 90, 95, 97,5, 98, 99, 99,5, 99,9 и 99,99%, тогда как предпочтительными p -значениями являются 0,1, 0,05, 0,025, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 и 0,0001.

В заявке также раскрыт набор для обнаружения хромогранина А, содержащий

(I) первое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или производное, обладающее/обладающий специфичностью в отношении хромогранина А или его фрагмента; и

(II) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или производное, обладающее/обладающий специфичностью в отношении хромогранина А или его фрагмента.

Первое и второе антитела, входящие в набор, предпочтительно обладают специфичностью в отношении одного и того же фрагмента или одних и тех же фрагментов хромогранина А.

Например, (I) первое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или производное обладает специфичностью в отношении эпитопа, содержащегося в последовательности SEQ ID NO: 1; и/или (II) второе антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или производное обладает специфичностью в отношении эпитопа, содержащегося в последовательности SEQ ID NO: 1. Предпочтительно первое антитело, входящее в набор, представляет собой моноклональное антитело к хромогранину А, продуцируемое клеточной линией гибридомы 537/H2, депонированной под регистрационным номером DSM ACC3231, и/или второе антитело, входящее в набор, представляет собой моноклональное антитело к хромогранину А, продуцируемое клеточной линией гибридомы 541/E2, депонированной под регистрационным номером DSM ACC3232.

В заявке также раскрыта клеточная линия гибридомы, выбранная из клеточной линии 537/H2, депонированной под регистрационным номером DSM ACC3231, и клеточной линии 541/E2, депонированной под регистрационным номером DSM ACC3232.

В ней также описано применение набора в формате сэндвич-иммуноанализа для обнаружения и/или количественной оценки хромогранина А или его фрагмента в биологическом образце, взятом из общей воды организма. В одном из аспектов такой фрагмент содержит по меньшей мере последовательность, охватывающую два эпитопа, против которых направлены два антитела, например, набор можно применять для обнаружения и/или количественной оценки хромогранина А.

Понятие "образец" предпочтительно обозначает биологический образец. В контексте настоящего описания понятие "образец" может, например, относиться к образцу общей воды организма или ткани, полученному для цели установления диагноза, прогноза или оценки состояния представляющего интерес индивидуума, такого как пациент.

Для целей данного описания понятие "пациент" или "индивидуум" включает как людей, так и других животных, прежде всего млекопитающих, и другие организмы. Таким образом, способы можно при-

менять как для диагностики человека, так и в ветеринарии. В предпочтительном аспекте пациент представляет собой млекопитающее, а в наиболее предпочтительном варианте -индивидуум представляет собой человека.

В контексте настоящего описания образец предпочтительно представляет собой образец общей воды организма или ткани индивидуума. Предпочтительным является образец общей воды организма. Предпочтительными анализируемыми образцами являются кровь, сыворотка, плазма, спинномозговая жидкость, моча, слюна, мокрота и плевральные выпоты. Кроме того, специалисту в данной области должно быть известно, что некоторые анализируемые образцы более легко анализировать после процедуры фракционирования или очистки, например, разделения цельной крови на компоненты, представляющие собой сыворотку или плазму.

Так, в предпочтительном аспекте данной заявки образец выбирают из группы, включающей образец крови, образец сыворотки, образец плазмы, образец спинномозговой жидкости, образец слюны и образец мочи или экстракт любого из указанных выше образцов. Предпочтительно образец представляет собой образец крови, более предпочтительно образец сыворотки или образец плазмы. Образцы сыворотки являются наиболее предпочтительными образцами в контексте настоящего описания.

"Плазма" в контексте настоящего описания представляет собой полученный после центрифугирования практически бесклеточный супернатант крови, содержащей антикоагулянт. Примеры антикоагулянтов включают связывающие ионы кальция соединения, такие как ЭДТК или цитрат, и ингибиторы тромбина, такие как гепаринаты или гирудин. Бесклеточную плазму можно получать центрифугированием обработанной антикоагулянтами крови (например, цитрированной, обработанной ЭДТК или гепаринизированной крови) в течение по меньшей мере 15 мин при 2000-3000 g.

"Сыворотка" представляет собой жидкую фракцию цельной крови, которую собирают после того, как крови дали возможность свернуться. После центрифугирования коагулированной крови (свернувшаяся кровь) сыворотку получают в виде супернатанта. Она не содержит фибриногена, хотя в ней остаются некоторые факторы свертываемости.

В определенных обстоятельствах может оказаться необходимым гомогенизировать образец или экстрагировать растворителем для получения жидкого образца. При этом жидкий образец может представлять собой раствор или суспензию. Жидкие образцы можно подвергать одной или нескольким предварительным обработкам. Такими предварительными обработками могут служить (но, не ограничиваясь только ими) разведение, фильтрация, центрифугирование, концентрирование, седиментация, преципитация, диализ. Предварительные обработки могут включать также добавление к раствору химических или биохимических субстанций, таких как кислоты, основания, буферы, соли, растворители, реакционноспособные красители, детергенты, эмульгаторы, хелаторы.

Способ, раскрытый в заявке, можно применять также для определения уровня хромогранина А (или его фрагмента(ов)) в образце для установления диагноза или прогноза или оценки риска, или скрининга, или терапевтического контроля или послеоперационного контроля медицинских состояний.

Следовательно, иммуноанализируют набор раскрытый в заявке можно применять для установления диагноза или прогноза или оценки риска, или скрининга, или терапевтического контроля или послеоперационного контроля медицинского состояния индивидуума.

Таким образом, в контексте настоящего описания иммуноанализ или набор можно применять для терапевтического контроля или послеоперационного контроля нарушения, где нарушение может представлять собой различные типы рака.

Как указано выше, в контексте настоящего описания нарушение или медицинское состояние индивидуума предпочтительно можно выбирать из рака (включая карциноидные опухоли, нейроэндокринные опухоли, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря), гастрит, легочное заболевание, инфаркт миокарда, гипертензию, сердечную недостаточность, легочные заболевания, тромболизис, ожирение и диабет.

В контексте настоящего описания нарушение или медицинское состояние индивидуума предпочтительно выбирают из нейроэндокринных опухолей (НЭО), включая феохромоцитомы, панкреатические НЭО, желудочно-кишечные НЭО, нейробластом, медуллярных тиреоидных карцином, мелкоклеточного рака легких, синдромов множественной эндокринной неоплазии типа 1 и множественной эндокринной неоплазии типа 2, рака предстательной железы, сердечно-сосудистых заболеваний, состояний, связанных с инфекциями и сепсисом.

Понятие "биомаркер" (биологический маркер) относится к поддающимся измерению и количественной оценке биологическим параметрам (например, к концентрации специфического фермента, концентрации специфического гормона, распределению определяющего специфический фенотип гена в популяции, присутствию биологических субстанций), которые служат в качестве индикаторов для оценок, связанных с состоянием здоровья и физиологией, таких как риск развития заболевания, психиатрические нарушения, факторы окружающей среды и их воздействия, для установления диагноза заболевания, оценки метаболических процессов, злоупотребления алкоголем или наркотиками, беременности, развития клеточных линий, эпидемиологических исследований и т.д. Кроме того, понятие "биомаркер" определяют как характеристику, которую можно объективно измерять и оценивать в качестве индикатора нор-

мальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на применение терапевтических средств. Биомаркер можно измерять в биообразце (путем анализа крови, мочи или ткани), данные могут представлять собой результаты измерений для индивидуума (кровенное давление, ЭКГ или суточный мониторинг ЭКГ (Holter) или могут представлять собой результаты анализа путем визуализации (доплеровское ультразвуковое обследование матки и плаценты или ширина шейной прозрачности (Conde-Agudelo и др., *Obstet Gynecol* 104, 2004, сс. 1367-1391; Bindra и др., *Ultrasound Obstet Gynecol* 20, 2002, сс. 219-225)). Биомаркеры могут являться индикаторами различных характеристик состояния здоровья или болезненного состояния, включая уровень или тип воздействия факторов окружающей среды, генетическую восприимчивость, генетические ответы на воздействия, биомаркерами субклинической или клинической фазы заболевания или индикаторами ответа на терапию. Таким образом, упрощенно рассматривать биомаркеры только как индикаторы признаков заболевания (биомаркер фактора риска или риска), состояния заболевания (доклиническая или клиническая фаза) или скорости развития (прогрессирования) заболевания. Следовательно, биомаркеры можно классифицировать как продромальные биомаркеры (позволяющие идентифицировать риск развития болезни), скрининговые биомаркеры (для скрининга субклинической фазы заболевания), диагностические биомаркеры (позволяющие распознавать имеющееся заболевание), биомаркеры стадий заболевания (позволяющие классифицировать серьезность заболевания) или прогностические биомаркеры (позволяющие прогнозировать дальнейшее течение заболевания, включая рецидив и ответ на терапию, и осуществлять мониторинг эффективности терапии). Биомаркеры могут служить также в качестве суррогатных конечных точек. Суррогатная конечная точка представляет собой точку, которую можно рассматривать в качестве исходя в клинических опытах для оценки безопасности и эффективности терапий вместо оценки истинного представляющего интерес исхода. В основе этого лежит принцип, заключающийся в том, что изменения суррогатной конечной точки тесно связаны с изменениями представляющего интерес исхода. Суррогатные конечные точки имеют преимущество, заключающееся в том, что их можно достигать за более короткие промежутки времени и с меньшими затратами по сравнению с такими конечными точками как заболеваемость и смертность, которые требуют крупномасштабных клинических опытов для оценки. Дополнительная ценность суррогатных конечных точек обусловлена тем фактом, что они более близки к моменту представляющего интерес воздействия/вмешательства и для них легче выявлять причинную связь, чем для более отдаленных клинических событий. Важным недостатком суррогатных конечных точек является то, что, если на представляющий интерес клинический исход влияют многочисленные факторы (в дополнение к суррогатной конечной точке), то остальные взаимодействия могут снижать валидность суррогатной конечной точки. Было сделано предположение, что валидность суррогатной конечной точки повышается, если она позволяет объяснить по меньшей мере 50% от эффекта воздействия или вмешательства на представляющий интерес исход. Биомаркер может представлять собой, например, белок, пептид или молекулу нуклеиновой кислоты.

В контексте настоящего описания понятие "хромогранин А" относится к человеческому хромогранину А. Аминокислотная последовательность человеческого хромогранина А представлена в SEQ ID NO: 1. Полипептиды или производные хромогранина А могут иметь также посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, липидирование или дериватизация.

В контексте настоящего описания понятие "диагноз" относится к распознаванию и (раннему) обнаружению заболевания или клинического состояния у индивидуума, и оно может включать также дифференциальный диагноз. В некоторых аспектах под понятие "диагноз" может подпадать также оценка серьезности заболевания или клинического состояния.

Понятие "прогноз" относится к прогнозированию исхода или специфического риска для индивидуума, страдающего конкретным заболеванием или клиническим состоянием. Оно может включать оценку шанса выздоровления или шанса неблагоприятного исхода для указанного индивидуума.

В контексте настоящего описания понятие "оценка риска" или "стратификация риска" относится к группировке индивидуумов на различные группы риска в соответствии с их прогнозом на будущее. Стратификация риска относится также к стратификации в отношении применяемых профилактических и/или терапевтических мер.

В контексте настоящего описания понятие "терапевтический контроль" относится к мониторингу и/или регулированию терапевтического лечения указанного пациента.

Понятие "послеоперационный контроль" в контексте настоящего описания относится к мониторингу состояния указанного пациента после подвергания указанного пациента хирургической процедуре.

Понятие "скрининг" в контексте настоящего описания относится к процессу изучения популяции с использованием специфического маркера или специфических маркеров и определенных для целей скрининга отсекающих уровней для идентификации индивидуумов в популяции, которые имеют более высокий риск конкретного нарушения. Скрининг можно применять для популяции, диагностирование применяют на уровне индивидуального пациента.

Последовательности:

Последовательность 1 (SEQ ID NO: 1): Человеческий хромогранин А (CGA) без сигнального пептида (UniProt Accession № P10645); антигенные эпитопы подчеркнуты:

1	11	21	31	41
LPVNSPMNKG	DTEVMKCIVE	VISDTLSKPS	PMPVSQECFE	TLRGDERILS
51	61	71	81	91
ILRHQNLLKE	LQDLALQGAK	ERAHQQKKHS	GFEDELSEVL	ENQSSQAEK
101	111	121	131	141
EAVEEPSSKD	VMEKREDSKE	AEKSGEATDG	ARPQALPEPM	QESKAEGNNQ
151	161	171	181	191
APGEEEEEEE	EATNTHPPAS	LPSQKYPGPQ	AEGDSEGLSQ	GLVDREKGLS
201	211	221	231	241
AEPGWQAKRE	EEEEEEEEAE	AGEEAVPEEE	GPTVVLNPHP	SLGYKEIRKG
251	261	271	281	291
ESRSEALAVD	GAGKPGAEAA	QDPEGKGEQE	HSQQKEEEEE	MAVVPQGLFR
301	311	321	331	341
GGKSGELEQE	EERLSKEWED	SKRWSKMDQL	AKELTAEKRL	EGQEEEEEDNR
351	361	371	381	391
DSSMKLSFRA	RAYGFRGPGP	QLRRGWRPSS	REDSLEAGLP	LQVRGYPEEK
401	411	421	431	
KEEEGSANRR	PEDQELESLS	AIEAELEKVA	HQLQALRRG	

Последовательность 2 (SEQ ID NO: 2): Эпитоп 1 человеческого хромогранина А (CGA) (соответствующий остаткам 124-144 SEQ ID NO: 1):

1	11	21
SGEATDGARP	QALPEPMQES	K

Последовательность 3 (SEQ ID NO: 3): Эпитоп 2 человеческого хромогранина А (CGA) (соответствующий остаткам 280-301 SEQ ID NO: 1):

1	11	21
EHSQQKEEEEE	EMAVVPQGLF	RG

Последовательность 4 (SEQ ID NO: 4): Фрагмент антигенного пептида человеческого хромогранина А (CGA) (соответствующий остаткам 124-144 SEQ ID NO: 1, плюс дополнительный остаток цистеина на N-конце):

1	11	21
CSGEATDGAR	PQALPEPMQE	SK

Последовательность 5 (SEQ ID NO: 5): Фрагмент антигенного пептида человеческого хромогранина А (CGA) (соответствующий остаткам 280-301 SEQ ID NO: 1, плюс дополнительный остаток цистеина на N-конце):

1	11	21
CEHSQQKEEEE	EEMAVVPQGL	FRG

Примеры

Пример 1. Создание антител.

Конструирование моноклональных антител.

Иммуногены получали следующим образом: пептид CSGEATDGARPQALPEPMQESK (SEQ ID NO: 4), который соответствует области молекулы хромогранина А, содержащей аминокислоты 124-144, с дополнительным остатком цистеина на ее N-конце, ковалентно перекрестно сшивали с применяемым в качестве носителя бычьим сывороточным альбумином (БСА). Пептид CEHSQQKEEEEE-MAVVPQGLFRG (SEQ ID NO: 5), который соответствует области молекулы хромогранина А, содержащей аминокислоты 280-301, дополнительным остатком цистеина на ее N-конце, перекрестно сшивали с применяемым в качестве носителя БСА.

Моноклональные антитела к пептидам хромогранина А 124-144 и 280-301 создавали согласно стандартным процедурам (Harlow E, Lane D., Antibodies - A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Lane, Journal of Immunology Methods 81, 1985, сс. 223-228).

Самок мышей линии Balb/c 8-недельного возраста иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции 100 мкг пептида 124-144 или пептида 280-301 соответственно, разведенного в полном адъюванте Фрейнда. Последующие инъекции осуществляли с использованием дозы 50 мкг в неполном адъюванте Фрейнда в течение 61 дня с различными интервалами времени.

Перед осуществлением слияния выявляли присутствие требуемого антитела в сыворотке реципиентов с помощью ELISA с использованием иммобилизованного пептида 124-144 или 280-301. Затем осуществляли скрининг в отношении клонов 537/H2 и 541/E2 с помощью ELISA с использованием иммобилизованного рекомбинантного (rec.) CGA (рекомбинантный хромогранин А приготавливали на фирме French National of Scientific Research, "Plate-forme de Production de Protéines Recombinantes" CRBM UMR 5237 CNRS, Монтпелье).

Для характеристики изотипа применяли набор для изотипирования мышиных моноклональных антител (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit, фирма Roche).

Антитела очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке Fast Flow с белком А (фирма GE Healthcare Life Sciences) согласно инструкциям производителя.

Мечение антител.

При проведении конечного анализа антитело 537/H2 сшивали с криптоатом европия (фирма CisBio Bioassays, Маркуль, Франция), а антитело 541/E2 сшивали с Alexa Fluor 647® (фирма Life Technologies, в настоящее время филиал фирмы Thermo Fisher Scientific). Реакции сочетания осуществляли согласно протоколам производителей.

Пример 2. Разработка анализа хромогранина А с использованием антител, мишенью которых являются области, содержащие аминокислоты 124-144/280-301.

Для обнаружения стабильного фрагмента хромогранина А был разработан гомогенный флуоресцентный сэндвич-иммуноанализ с использованием технологии усиленного излучения криптоата с временным разрешением (TRACE) (Mathis, Clin Chem 39(9), 1993, сс. 1953-1959).

Перед применением маточные конъюгированное с криптоатом антитело 537/H2 и конъюгированное с Alexa Fluor® антитело 541/E2 разводили до концентраций 0,265 мкг/мл и 2,94 мкг/мл соответственно буфером для анализа (100мМ фосфат, pH 7, 422мМ KF, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,15 мг/мл мышиного Ig и 0,07 мг/мл бычьего Ig).

Рекомбинантный хромогранин А разводили в лошадиной сыворотке с получением стандартов хромогранина А. Иммуноанализ проводили путем инкубации 14 мкл образца/стандарта, 68 мкл раствора конъюгированного с Alexa Fluor® антитела 541/E2 и 68 мкл раствора конъюгированного с криптоатом антитела 537/H2 при 37°C в устройстве B.R.A.H.M.S KRYPTOR (фирма Thermo Fisher Scientific B.R.A.H.M.S GmbH, Хеннингсдорф, Берлин) согласно инструкциям производителя. Время реакции при проведении анализа составляло 29 мин. Относительный уровень флуоресценции (RFU) получали путем одновременного измерения при двух длинах волн 665 нм и 620 нм с использованием устройства B.R.A.H.M.S KRYPTOR. Было установлено, что диапазон измерений с непосредственным отсчетом показаний составлял вплоть до 3000 нг/мл, а оценка функциональной чувствительности анализа показала, что она составляла 13,1 нг/мл.

Пример 3. Стабильность после объединения образцов хромогранина А в сыворотке по данным CgA II-анализа.

Для исследования применяли три пула образцов сыворотки, замороженные при $\leq -16^{\circ}\text{C}$ сразу после сбора.

Один пул состоял из образцов сыворотки здоровых индивидуумов (пул 1), а два других состояли из образцов патологической сыворотки (пулы 2 и 3, патологические пулы).

Измерения проводили в следующие моменты времени: через 1, 2 и 3 дня хранения при 2-8°C; через 1, 2 и 3 дня хранения при 18-25°C; после 1, 2 и 3 циклов замораживания/оттаивания.

Измерения проводили с помощью устройства KRYPTOR с использованием описанных выше реагентов и условий.

Принятым критерием того, что стабильность образца можно рассматривать как приемлемую, является ее снижение $\leq 10\%$ в различных условиях.

Полученные результаты (табл. 1) свидетельствуют о том, что чувствительность KRYPTOR-анализа (537/H2-криптит; 541/E2-Alexa Fluor®) не изменяется при осуществлении вплоть до 3 циклов замораживания/оттаивания, при выдерживании в течение одного дня при 2-8°C или при 18-25°C. Стабильность 2 патологических пулов оказалась выше, чем стабильность пула образцов, взятых у здоровых доноров, поскольку было выявлено лишь незначительное снижение концентрации по истечении 3 дней выдерживания при 2-8°C или при 18-25°C ($\leq 11\%$).

Таблица 1. Результаты мониторинга стабильности 3 пулов образцов сыворотки по данным KRYPTOR-анализа с использованием 537/H2-Cryptate; 541/E2-Alexa Fluor®

Условия	Пул 1		Пул 2		Пул 3	
	Конц. (нг/мл)	Относительная величина	Конц. (нг/мл)	Относительная величина	Конц. (нг/мл)	Относительная величина
Эталон	85,5	-	880	-	2153	-
3 дня при 2-8°C	65,7	-23%	786	-11%	1981	-8%
2 дня при 2-8°C	62,9	-26%	797	-9%	2011	-7%
1 день при 2-8°C	79,8	-7%	825	-6%	2096	-3%
3 дня при 18-25°C	69,9	-18%	789	-10%	1976	-8%
2 дня при 18-25°C	71,2	-17%	798	-9%	2047	-5%
1 день при 18-25°C	78,5	-8%	816	-7%	2070	-4%
3 цикла замораж./оттаивания	82,8	-3%	851	-3%	2131	-1%
2 цикла замораж./оттаивания	90,4	6%	862	-2%	2137	-1%
1 цикл замораж./оттаивания	85,4	0%	875	-1%	2153	0%

Пример 4. Калибровочная кривая.

На фиг. 1 представлена кривая зависимости ответа от дозы для KRYPTOR-анализа (537/H2-криптит; 541/E2-Alexa Fluor647®) с использованием технологии усиленного излучения криптиата с временным разрешением (TRACE).

На основе калибровочной кривой было установлено, что диапазон измерений с непосредственным отсчетом показаний для KRYPTOR-анализа (537/H2-криптит; 541/E2-Alexa Fluor647®) составлял вплоть до 3000 нг/мл.

Пример 5. Профиль точности и чувствительность.

Были проведены параллельные измерения на 91 образце (24 образца были получены от здоровых доноров, а 67 представляли собой патологические образцы) с использованием антител 537/H2 и 541/E2 в описанных выше условиях и с помощью известного из существующего уровня техники KRYPTOR-анализа хромогранина А (фирма Thermo Fisher Scientific B.R.A.N.M.S GmbH, Хеннингсдорф, Германия). Измерения проводили с дублированием и на одном и том же графике откладывали коэффициент вариации для каждого дубликата в зависимости от концентрации хромогранина А. Профили точности оказались одинаковыми для обоих анализов. Функциональная чувствительность анализа, заявленная для KRYPTOR-анализа хромогранина А составляла 9,04 нг/мл; оценка показала, что функциональная чувствительность KRYPTOR-анализа (537/H2-криптит; 541/E2-Alexa Fluor647®) для 10% CV составляла 13,1 нг/мл.

Перечень последовательностей

```

<110> СЕЗАНН С.А.С.

<120> ИММУНОАНАЛИЗ И АНТИТЕЛА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ХРОМОГРАНИНА А

<130> X1439 PCT BLN

<150> EP 14 16 4809.7

<151> 15.04.2014

<160> 5

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1
<211> 439
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> человеческий хромогранин А без сигнального пептида

<400> 1
Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val Met Lys
1          5          10          15
Cys Ile Val Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met
20          25          30
Pro Val Ser Gln Glu Cys Phe Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu Arg Ile
35          40          45
Leu Ser Ile Leu Arg His Gln Asn Leu Leu Lys Glu Leu Gln Asp Leu
50          55          60
Ala Leu Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His Gln Gln Lys Lys His Ser
65          70          75          80
Gly Phe Glu Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn Gln Ser Ser Gln
85          90          95
Ala Glu Leu Lys Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp Val Met
100         105         110
Glu Lys Arg Glu Asp Ser Lys Glu Ala Glu Lys Ser Gly Glu Ala Thr
115         120         125
Asp Gly Ala Arg Pro Gln Ala Leu Pro Glu Pro Met Gln Glu Ser Lys
130         135         140
Ala Glu Gly Asn Asn Gln Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu
145         150         155         160
Glu Ala Thr Asn Thr His Pro Pro Ala Ser Leu Pro Ser Gln Lys Tyr
165         170         175

```

Pro Gly Pro Gln Ala Glu Gly Asp Ser Glu Gly Leu Ser Gln Gly Leu
 180 185 190
 Val Asp Arg Glu Lys Gly Leu Ser Ala Glu Pro Gly Trp Gln Ala Lys
 195 200 205
 Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Glu Ala Gly Glu Glu
 210 215 220
 Ala Val Pro Glu Glu Glu Gly Pro Thr Val Val Leu Asn Pro His Pro
 225 230 235 240
 Ser Leu Gly Tyr Lys Glu Ile Arg Lys Gly Glu Ser Arg Ser Glu Ala
 245 250 255
 Leu Ala Val Asp Gly Ala Gly Lys Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gln Asp
 260 265 270
 Pro Glu Gly Lys Gly Glu Gln Glu His Ser Gln Gln Lys Glu Glu Glu
 275 280 285
 Glu Glu Met Ala Val Val Pro Gln Gly Leu Phe Arg Gly Gly Lys Ser
 290 295 300
 Gly Glu Leu Glu Gln Glu Glu Glu Arg Leu Ser Lys Glu Trp Glu Asp
 305 310 315 320
 Ser Lys Arg Trp Ser Lys Met Asp Gln Leu Ala Lys Glu Leu Thr Ala
 325 330 335
 Glu Lys Arg Leu Glu Gly Gln Glu Glu Glu Glu Asp Asn Arg Asp Ser
 340 345 350
 Ser Met Lys Leu Ser Phe Arg Ala Arg Ala Tyr Gly Phe Arg Gly Pro
 355 360 365
 Gly Pro Gln Leu Arg Arg Gly Trp Arg Pro Ser Ser Arg Glu Asp Ser
 370 375 380
 Leu Glu Ala Gly Leu Pro Leu Gln Val Arg Gly Tyr Pro Glu Glu Lys
 385 390 395 400
 Lys Glu Glu Glu Gly Ser Ala Asn Arg Arg Pro Glu Asp Gln Glu Leu
 405 410 415
 Glu Ser Leu Ser Ala Ile Glu Ala Glu Leu Glu Lys Val Ala His Gln
 420 425 430
 Leu Gln Ala Leu Arg Arg Gly
 435

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> остатки 124-144 человеческого хромогранина А

<400> 2

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

20

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> остатки 280–301 человеческого хромогранина А

<400> 3

Glu His Ser Gln Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Met Ala Val Val Pro

1 5 10 15

Gln Gly Leu Phe Arg Gly

20

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> антигенный пептидный фрагмент человеческого хромогранина А

<400> 4

Cys Ser Gly Glu Ala Thr Asp Gly Ala Arg Pro Gln Ala Leu Pro Glu

1 5 10 15

Pro Met Gln Glu Ser Lys

20

<210> 5

<211> 23

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> антигенный пептидный фрагмент человеческого хромогранина А

<400> 5

Cys Glu His Ser Gln Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Met Ala Val Val

1 5 10 15

Pro Gln Gly Leu Phe Arg Gly

20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ иммуноанализа для обнаружения хромогранина А или его фрагмента, включающий стадии, на которых:

а) приводят в контакт образец, который предположительно содержит хромогранин А, с

(I) первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает специфичностью в отношении эпитопа, содержащегося в последовательности, простирающейся от аминокислотного остатка 124 до аминокислотного остатка 144 SEQ ID NO: 1 и

(II) вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, обладающим специфичностью в отношении хромогранина А, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает специфичностью в отношении эпитопа, содержащегося в последовательности, простирающейся от аминокислотного остатка 280 до аминокислотного остатка 301 SEQ ID NO: 1,

в условиях, обеспечивающих образование тройного комплекса между хромогранинном А и двумя

антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, и

б) обнаруживают связывание двух антител или их антигенсвязывающих фрагментов с хромогранин-ом А.

2. Способ иммуноанализа по п.1, в котором первое антитело получают с использованием клеточной линии гибридомы 537/H2, депонированной под регистрационным номером DSM ACC3231.

3. Способ иммуноанализа по п.1, в котором второе антитело получают с использованием клеточной линии гибридомы 541/E2, депонированной под регистрационным номером DSM ACC3232.

4. Способ иммуноанализа по одному из пп.1-3, в котором образец получают из общей воды организма или ткани индивидуума, например из общей воды организма, выбранной из крови, сыворотки, плазмы и мочи.

5. Способ иммуноанализа по одному из пп.1-4, где анализ осуществляют в гомогенной фазе или в гетерогенной фазе.

6. Способ иммуноанализа по одному из пп.1-5, в котором одно из антител метят, а другое антитело связывают с твердой фазой, или оно может обладать способностью избирательно связываться с твердой фазой.

7. Способ иммуноанализа по одному из пп.1-5, в котором первое антитело и второе антитело присутствуют в диспергированном виде в жидкой реакционной смеси и в котором первый служащий для мечения компонент, который представляет собой часть системы мечения на основе затухания или усиления флуоресценции или хемилюминесценции, связывают с первым антителом, а второй служащий для мечения компонент указанной системы мечения связывают со вторым антителом, в результате чего после связывания обоих антител с подлежащим обнаружению хромогранин-ом А генерируется измеряемый сигнал, обеспечивающий обнаружение образовавшихся сэндвич-комплексов в растворе, в котором проводят измерения.

8. Способ иммуноанализа по п.7, отличающийся тем, что система мечения содержит крипаты или хелаты редкоземельных металлов в комбинации с флуоресцентным или хемилюминесцентным красителем, прежде всего цианинового типа.

9. Набор для обнаружения хромогранина А, содержащий

(I) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью в отношении хромогранина А, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает специфичностью в отношении эпитопа, содержащегося в последовательности, простирающейся от аминокислотного остатка 124 до аминокислотного остатка 144 SEQ ID NO: 1 и

(II) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью в отношении хромогранина А, где второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает специфичностью в отношении эпитопа, содержащегося в последовательности, простирающейся от аминокислотного остатка 280 до аминокислотного остатка 301 SEQ ID NO: 1 хромогранина А.

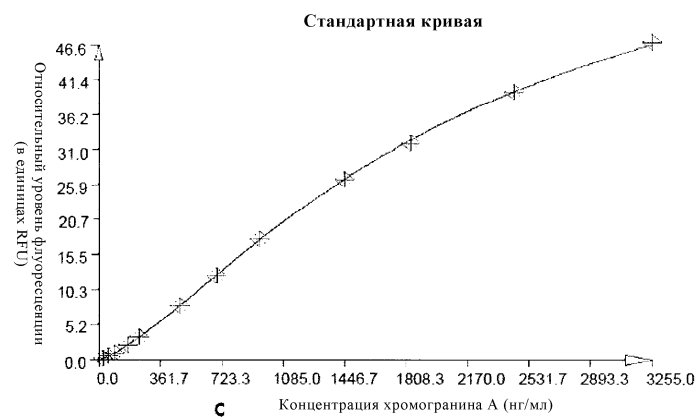
10. Набор по п.9, в котором

(I) первое антитело выбрано из антител, продуцируемых клеточной линией 537/H2, которая депонирована под регистрационным номером DSM ACC3231,

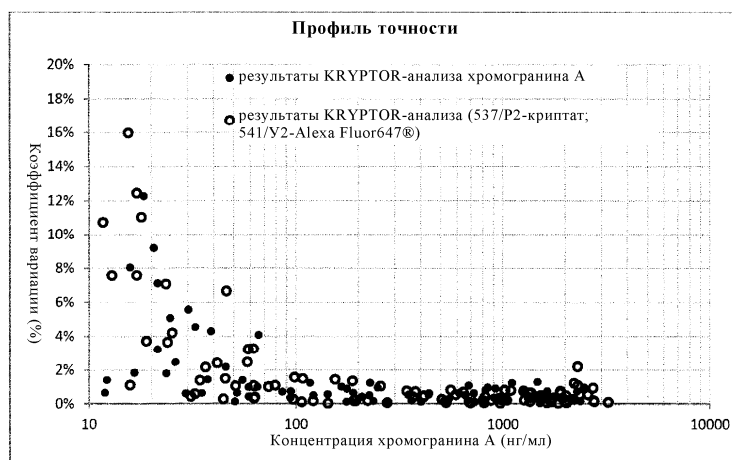
(II) второе антитело выбрано из антител, продуцируемых клеточной линией 541/E2, которая депонирована под регистрационным номером DSM ACC3232.

11. Применение способа иммуноанализа по одному из пп.1-8 для установления диагноза, прогноза, оценки риска, стратификации риска, терапевтического контроля и/или послеоперационного контроля нарушения или медицинского состояния у индивидуума, где медицинское состояние выбирают из группы, включающей рак, гастрит, инфаркт миокарда, гипертензию, сердечную недостаточность, легочные заболевания, тромболизис, ожирение и диабет.

12. Применение набора по пп.9 или 10 для установления диагноза, прогноза, оценки риска, стратификации риска, терапевтического контроля и/или послеоперационного контроля нарушения или медицинского состояния у индивидуума, где медицинское состояние выбирают из группы, включающей рак, гастрит, инфаркт миокарда, гипертензию, сердечную недостаточность, легочные заболевания, тромболизис, ожирение и диабет.



Фиг. 1



Фиг. 2

