

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992315 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.04

(51) Int. Cl. G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.30

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЛЕГКОГО

(31) 17305382.8

(32) 2017.03.30

(33) EP

(86) PCT/EP2018/058346

(87) WO 2018/178364 2018.10.04

(71) Заявитель:
ПРОГАСТРИН Э КАНСЕР С.А Р.Л.
(LU)

(72) Изобретатель:
Приёр Александр (FR)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам для предупреждения или лечения рака легкого, где указанные композиции содержат антитело, связывающееся с прогастрином, и указанные способы включают применение антитела, связывающегося с прогастрином.

A1

201992315

201992315

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЛЕГКОГО

ВВЕДЕНИЕ

5 Настоящее изобретение относится к предупреждению и лечению рака, более конкретно, оно относится к способам и композициям для предупреждения или лечения рака легкого. Композиции согласно данному изобретению содержат молекулу, связывающую прогастрин, в частности, антитело против hPG (человеческий прогастрин), тогда как способы согласно данному изобретению
10 включают применение молекулы, связывающей прогастрин, и, в частности, антитела против hPG.

Рак легкого остается самой летальной злокачественной опухолью в мире. Несмотря на улучшения в хирургическом лечении, системной терапии и лучевой терапии, 5-летняя выживаемость для всех пациентов с диагнозом рака легкого
15 остается от 15 до 20%.

Рак легкого включает два главных типа опухолей, а именно: мелкоклеточный рак легкого (SCLC) и немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). SCLC представляет 15-18% всех случаев рака легкого, тогда как NSCLC составляет примерно от 80% до 85% случаев рака легкого. Другие типы рака легкого, такие как
20 аденокистозная карцинома, лимфомы и саркомы, а также доброкачественные опухоли легкого, являются редкими.

Мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легкого лечат по-разному. В частности, SCLC является более отвечающим на химиотерапию и лучевую терапию, чем другие типы рака легкого. Однако сложно добиться излечения, так
25 как SCLC имеет более выраженную тенденцию к широкой диссеминации ко времени постановки диагноза. К настоящему времени отсутствуют молекулярные биомаркеры, которые были переведены на широкораспространенную клиническую практику рака легкого. Способы лечения зависят от развития рака и обычно включают хирургию для маленьких локализованных опухолей или химиотерапию,
30 возможно в комбинации с лучевой терапией.

Следовательно, все еще существует потребность в новых композициях и способах для предупреждения или лечения рака легкого.

Это является целью настоящего изобретения.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению теперь предложено антитело, специфично связывающееся с прогастрином, для применения в предупреждении или лечении рака легкого. Согласно настоящему изобретению также предложены композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого, где указанная композиция содержит антитело, связывающееся с прогастрином, и способы предупреждения или лечения рака легкого, включающие применение композиции, содержащей антитело, связывающееся с прогастрином, одно или в комбинации с любыми другими известными профилактическими или терапевтическими способами против рака легкого.

Антитела против hPG, описанные в данном документе, в частности, нейтрализующие антитела против hPG, ингибируют PG-зависимую пролиферацию клеток опухоли легкого, делая их полезными терапевтическими агентами для лечения рака легкого. Соответственно, также предложены фармацевтические композиции, содержащие антитело против hPG, и способы применения антител против hPG и/или фармацевтических композиций для лечения рака легкого. Фармацевтические композиции можно готовить для любого удобного пути введения, включающего, например, парентеральную, подкожную или внутривенную инъекцию, и они типично будут включать антитело против hPG и один или более чем один приемлемый носитель, эксципиент и/или разбавитель, подходящие для желательного способа введения, и могут включать другие возможные компоненты, как будет дополнительно описано ниже. Для терапевтических применений данные композиции могут быть упакованы в стандартные лекарственные формы для легкости применения.

Способы лечения обычно включают введение субъекту, нуждающемуся в лечении, например, субъекту, у которого диагностирован рак легкого, эффективного количества антитела против PG и/или его фармацевтической композиции с получением терапевтической пользы. Терапевтическая польза, описанная ниже более подробно, включает любое уменьшение интенсивности рака легкого, например, замедление или остановку прогрессирования рака легкого, уменьшение тяжести рака легкого, ингибирование роста опухолей легкого или пролиферации клеток рака легкого, уменьшение размера опухолей легкого и/или уменьшение сывороточных уровней PG у пациентов с раком легкого. Субъект может представлять собой человека или может не являться человеком, включая домашнее животное (например, кошка, собака, корова, свинья, лошадь) или

недомашнее животное. Предпочтительно субъект, подлежащий лечению, представляет собой человека. Субъекты, у которых терапия антителом против hPG является полезной, могут представлять собой: пациентов на любой стадии прогрессирующего заболевания (например, со стадией 0, I, II, III или IV рака легкого), пациентов, которые получали терапию против рака легкого (например, химиотерапию, лучевую терапию, хирургическую резекцию), или пациентов, которые получают другую терапию против рака легкого.

Также предложены способы ингибирования роста стволовой клетки рака легкого у пациента посредством введения пациенту, нуждающемуся в ингибировании роста стволовой клетки рака легкого, антитела против PG и/или его фармацевтической композиции в эффективном количестве для ингибирования указанной стволовой клетки рака легкого.

В целом ряде воплощений антитела против PG являются эффективными в уменьшении пролиферации или увеличении дифференциации, или скорости клеточной гибели стволовых клеток рака легкого, или в уменьшении концентрации прогастрина в крови у пациентов, подвергавшихся лечению. В других воплощениях антитела против PG и/или их фармацевтическую композицию можно вводить совместно с или после второго эффективного терапевтического средства для ингибирования роста стволовых клеток колоректального рака, например, антитела, имеющего специфичность, отличную от специфичности в отношении прогастрина.

Лечение антителами против hPG в том виде, в котором оно описано в данном документе, можно объединять с или дополнять другой терапией. Неограничивающие примеры другой терапии против рака легкого включают химиотерапевтическое лечение, лучевую терапию, хирургическую резекцию и терапию антителами, как описано в данном документе. В конкретном примере антитела антитела против hPG вводятся в комбинации с химиотерапевтическими средствами. В другом конкретном примере антитела антитела против hPG вводятся дополнительно к хирургической резекции.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела против PG, предпочтительно с фармацевтически приемлемым носителем и/или эксципиентом. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит второе терапевтическое средство. В некотором воплощении второе терапевтическое средство представляет собой биологическое средство или химиотерапевтическое средство. Примеры биологических средств включают моноклональные антитела против EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) и моноклональные

антитела против VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), тогда как химиотерапевтические средства содержат такие соединения как, например, алкилирующие агенты, антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики, ингибиторы митоза, ингибиторы функции хроматина, средства против ангиогенеза, антиэстрогенные средства, антиандрогенные средства и иммуномодуляторы.

Человеческий пре-прогастрин – пептид из 101 аминокислоты (эталонная аминокислотная последовательность: AAB19304.1) – представляет собой первичный продукт трансляции гена гастрина. Прогастрин образуется отщеплением первых 21 аминокислоты (сигнальный пептид) от препрогастрина. 80-аминокислотная цепь прогастрина подвергается дальнейшему процессингу посредством отщепления и модификации ферментами до нескольких биологически активных гормональных форм гастрина: гастрин 34 (G34) и гастрин 34 с глициновым удлинением (G34-Gly), содержащих аминокислоты 38-71 прогастрина, гастрин 17 (G17) и гастрин 17 с глициновым удлинением (G17-Gly), содержащих аминокислоты 55-71 прогастрина.

Моноклональные антитела против человеческого прогастрина (антитела против hPG) и их применение для диагностики или терапии были описаны в следующих документах: WO 2011/083088 для колоректального рака, WO 2011/083090 для рака молочной железы, WO 2011/083091 для рака поджелудочной железы, WO 2011/116954 для колоректального и желудочно-кишечного рака, и WO 2012/013 609 и WO 2011/083089 для патологий печени.

Настоящее изобретение станет понятнее из подробного описания, приведенного в данном документе, и из сопровождающих графических материалов, которые приводятся лишь в качестве иллюстрации и не ограничивают намеченный объем данного изобретения.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле, связывающей прогастрин, для применения в предупреждении или лечении рака легкого. Согласно настоящему раскрытию также предложена композиция для применения в предупреждении или лечении рака простаты, где указанная композиция содержит антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент.

«Молекулой, связывающей прогастрин» в данном документе называется любая молекула, которая связывается с прогастрином, но не связывается с гастрином-17 (G17), гастрином-34 (G34), гастрином 17 с глициновым удлинением (G17-Gly) или гастрином 34 с глициновым удлинением (G34-Gly). Молекула, связывающая прогастрин, по настоящему изобретению может представлять собой

любую молекулу, связывающую прогастрин, такую как, например, молекула антитела или молекула рецептора. Предпочтительно молекула, связывающая прогастрин, представляет собой антитело против прогастрина (антитело против PG) или его антигенсвязывающий фрагмент.

5 Термин «прогастрин» обозначает пептид прогастрина млекопитающего и, в частности, человеческого прогастрина. Во избежание сомнений, без какого-либо точного определения, выражение «человеческий прогастрин» или «hPG» относится к человеческому PG последовательности SEQ ID NO 1. А именно, человеческий прогастрин содержит N-концевой и C-концевой домены, которые не присутствуют в
10 упомянутых выше формах биологически активного гормона гастрина. Предпочтительно последовательность указанного N-концевого домена представлена SEQ ID NO 2. В другом предпочтительном воплощении последовательность указанного C-концевого домена представлена SEQ ID NO 3.

Таким образом, в первом воплощении данное изобретение относится к
15 антителу, которое связывается с прогастрином, но не связывается с любым из других продуктов, происходящих от гена гастрина, для применения в лечении рака легкого.

Под терминами «связывающий», «связывается» или тому подобными подразумевается то, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент
20 образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Способы определения того, связываются ли две молекулы, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобные. В конкретном воплощении указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент
25 связывается с прогастрином с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность в отношении связывания с неспецифичной молекулой, такой как БСА (бычий сывороточный альбумин) или казеин. В более конкретном воплощении указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается только с прогастрином.

30 Выражение «рак легкого» обозначает рак, который возникает в тканях легкого, обычно в клетках, выстилающих дыхательные пути. Термин «рак легкого» в том виде, в котором он используется в данном документе, охватывает, в частности, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), включающий мелкоклеточную карциному и комбинированную мелкоклеточную карциному, и немелкоклеточные
35 раковые заболевания легкого (NSCLC), включающие плоскоклеточную карциному, крупноклеточную карциному и аденокарциному. Другие типы рака легкого, такие

как аденокистозные карциномы, лимфомы и саркомы, а также доброкачественные опухоли легкого, такие как гамартомы, также включаются в раковые заболевания легкого в том виде, в котором данный термин используется в данном документе.

В конкретном воплощении согласно данному изобретению предложено
 5 антитело против PG для применения в предупреждении или лечении рака легкого, причем указанное антитело распознает эпитоп, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности прогастрина.

В более конкретном воплощении указанное антитело против PG для
 10 применения в предупреждении или лечении рака легкого распознает эпитоп прогастрина, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина, где указанная аминокислотная последовательность может включать
 15 остатки 10-14 hPG, остатки 9-14 hPG, остатки 4-10 hPG, остатки 2-10 hPG или остатки 2-14 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO 1.

В более конкретном воплощении антитело против PG для применения в предупреждении или лечении рака легкого распознает эпитоп прогастрина, где
 20 указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности C-концевой части прогастрина, где указанная аминокислотная последовательность может включать остатки 71-74 hPG, остатки 69-73 hPG, остатки 71-80 hPG (SEQ ID NO 40), остатки 76-80 hPG или остатки 67-74 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO 1.

В более конкретном воплощении антитело против PG для применения в предупреждении или лечении рака легкого имеет аффинность в отношении
 25 прогастрина по меньшей мере 5000 нМ, по меньшей мере 500 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 7 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,1 нМ, 50 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ или по меньшей мере 0,1 пМ при определении
 30 таким способом, как вышеописанный способ.

Предпочтительно антитело против PG для применения в предупреждении или лечении рака легкого представляет собой нейтрализующее антитело против PG.

Выражение «нейтрализующее антитело против PG» обозначает антитело,
 35 которое связывается с PG и блокирует PG-зависимую сигнализацию, приводя к ингибированию PG-индуцированных ответов в опухолевых клетках и, в частности,

в клетках опухолей легкого. Ингибирование PG-индуцированных ответов клеток рака легкого может быть опосредовано репрессией дифференциации клеток, репрессией клеточной гибели и/или стимуляцией пролиферации клеток.

Подразумевается то, что термин «антитело» в том виде, в котором он
 5 используется в данном документе, включает поликлональные и моноклональные антитела. Антитело (или «иммуноглобулин») состоит из гликопротеина, содержащего по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит
 10 переменную область (или домен) тяжелой цепи (сокращенные в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенную в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен: CL. Области VH и VL могут быть дополнительно
 15 подразделены на области гипервариабельности, именуемые «областями, определяющими комплементарность» (CDR) или «гипервариабельными областями», которые, главным образом, отвечают за связывание с эпитопом антигена, и в которые вкрапляются области, которые являются более консервативными, именуемые каркасными областями (FR). Способ идентификации
 20 CDR в пределах легкой и тяжелой цепей антитела и определения их последовательности является хорошо известным специалисту. Во избежание сомнений, в отсутствие в тексте любого указания на противоположное, выражение CDR означает гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, как определено IMGT, где уникальная нумерация IMGT обеспечивает
 25 стандартизированное ограничение каркасных областей и областей, определяющих комплементарность, CDR1-IMGT: 27-38, CDR2.

Уникальная нумерация IMGT была определена для сравнения переменных доменов, каким бы ни был рецептор антигена, тип цепи или вид [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7,
 30 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. В уникальной нумерации IMGT консервативные аминокислоты всегда имеют то же самое положение, например, цистеин 23 (1-ый CYS), триптофан 41 (КОНСЕРВАТИВНЫЙ TRP), гидрофобная аминокислота 89, цистеин 104 (2-ой
 35 CYS), фенилаланин или триптофан 118 (J-PHE или J-TRP). Уникальная нумерация IMGT обеспечивает стандартизированное ограничение каркасных областей (FR1-

IMGT: положения 1-26, FR2-IMGT: 39-55, FR3-IMGT: 66-104 и FR4-IMGT: 118-128) и областей, определяющих комплементарность: CDR1-IMGT: 27-38, CDR2-IMGT: 56-65 и CDR3-IMGT: 105-117. Так как пробелы представляют собой незанятые положения, длины CDR-IMGT (показанные между скобками и разделенные точками, например [8.8.13]) становятся ключевой информацией. Уникальная нумерация IMGT используется в 2D (двумерных) графических представлениях, обозначенных как IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], и в 3D (трехмерных) структурах в IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, организованных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая разные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Антитела могут быть разных изотипов (а именно: IgA, IgD, IgE, IgG или IgM).

В конкретном воплощении указанное антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из: поликлональных антител, моноклональных антител, химерных антител, одноцепочечных антител, камелизированных антител, антител IgA1, антител IgA2, антител IgD, антител IgE, антител IgG1, антител IgG2, антител IgG3, антител IgG4 и антител IgM.

«Поликлональное антитело» представляет собой антитело, которое продуцировалось среди или в присутствии одного или более чем одного другого неидентичного антитела. В общем, поликлональные антитела продуцируются из В-лимфоцитов в присутствии нескольких других В-лимфоцитов, продуцирующих неидентичные антитела. Обычно поликлональные антитела получают непосредственно из иммунизированного животного.

Термин «моноклональное антитело» обозначает антитело, возникающее из почти гомогенной популяции антител, где данная популяция содержит идентичные антитела, за исключением нескольких возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут находиться в минимальных пропорциях. Моноклональное антитело возникает в результате роста одного клона клеток, такого как гибридома,

и отличается тяжелыми цепями одного класса и подкласса и легкими цепями одного типа.

Подразумевается то, что выражение «антигенсвязывающий фрагмент» антитела указывает любой пептид, полипептид или белок, сохраняющий способность связываться с мишенью (также обычно именуемой антигеном) указанного антитела, обычно с тем же самым эпитопом, и содержит аминокислотную последовательность из по меньшей мере 5 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 10 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 15 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 40 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 60 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 70 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 80 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 90 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 смежных аминокислотных остатков или по меньшей мере 200 смежных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности антитела.

В конкретном воплощении указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR антитела, из которого она происходит. Кроме того, в предпочтительном воплощении указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит 2, 3, 4 или 5 CDR, более предпочтительно 6 CDR антитела, из которого они происходят.

«Антигенсвязывающие фрагменты» могут быть выбраны, без ограничения, в группе, состоящей из фрагментов Fv, scFv (sc обозначает одноцепочечный), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc или диател, или слитых белков с разупорядоченными пептидами, такими как XTEN (удлинённый рекомбинантный полипептид) или мотивы PAS, или любого фрагмента время полужизни которого было бы увеличено химической модификацией, такой как добавление поли(алкилен)гликоля, такого как поли(этилен)гликоль («ПЕГи́лирование») (пэ́гилированные фрагменты называются Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG или Fab'-PEG) («PEG» обозначает полиэтиленгликоль), или посредством включения в липосому, причем указанные фрагменты имеют по меньшей мере одну из характерных CDR антитела по изобретению. Предпочтительно указанные «антигенсвязывающие фрагменты» будут составлены или будут состоять из частичной последовательности

вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела, из которого они происходят, причем указанная частичная последовательность является достаточной для сохранения такой же специфичности связывания, что и у антитела, из которого она происходит, и достаточной аффинности, 5 предпочтительно по меньшей мере равной 1/100, более предпочтительно по меньшей мере – 1/10 аффинности антитела, из которого она происходит, в отношении мишени.

В другом конкретном воплощении в способе диагностики рака легкого согласно изобретению биологический образец от субъекта приводится в контакт с 10 антителом, связывающимся с прогастрином, где указанное антитело было получено способом иммунизации, известным специалисту в данной области, где в качестве иммуногена используется пептид, аминокислотная последовательность которого содержит всю аминокислотную последовательность прогастрина или ее часть. Более конкретно, указанный иммуноген содержит пептид, выбранный среди:

- 15 • пептида, аминокислотная последовательность которого содержит или состоит из аминокислотной последовательности полноразмерного прогастрина и, в частности, полноразмерного человеческого прогастрина SEQ ID NO 1,
- 20 • пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует части аминокислотной последовательности прогастрина и, в частности, полноразмерного человеческого прогастрина SEQ ID NO 1,
- пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует части или всей аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина и, в частности, пептидам, содержащим или состоящим из 25 аминокислотной последовательности: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO 2), и
- пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует части или всей аминокислотной последовательности C-концевой части прогастрина и, в частности, пептидам, содержащим или состоящим из 30 аминокислотной последовательности: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO 3),
- пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует части аминокислотной последовательности C-концевой части прогастрина и, в частности, пептидам, содержащим аминокислотную

последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO 40), соответствующую аминокислотам 71-80 прогастрина.

Специалисту будет понятно то, что такую иммунизацию можно использовать для получения либо поликлональных, либо моноклональных антител в зависимости от того, что является желательным. Способы получения каждого из данных типов антител хорошо известны в данной области. Таким образом, специалист легко выберет и применит способ получения поликлональных и/или моноклональных антител против любого данного антигена.

Примеры моноклональных антител, которые были получены с использованием иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность "SWKPRSQQPDAPLG", соответствующую аминокислотной последовательности 1-14 человеческого прогастрина (N-концевая оконечность) включают моноклональные антитела, обозначенные как mAb3, mAb4, mAb16, mAb19 и mAb20, как описано в следующих Таблице 1 – Таблице 4, но не ограничиваются ими. Были описаны другие моноклональные антитела, хотя и не ясно, связываются ли фактически данные антитела с прогастрином (WO 2006/032980). Экспериментальные результаты картирования эпитопов показывают то, что mAb3, mAb4, mAb16, mAb19 и mAb20 действительно специфично связываются с эпитопом в пределах указанной N-концевой аминокислотной последовательности hPG. Поликлональные антитела, специфично распознающие эпитоп в пределах N-конца прогастрина, представленного SEQ ID NO 2, были описаны в данной области (см., например, WO 2011/083088).

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
6B5B11C10	mAb3	CDR 1 VH	GYIFTSYW	SEQ ID NO 4
		CDR 2 VH	FYPGNSDS	SEQ ID NO 5
		CDR 3 VH	TRRDSPQY	SEQ ID NO 6
		CDR 1 VL	QSIVHSNGNTY	SEQ ID NO 7
		CDR 2 VL	KVS	SEQ ID NO 8
		CDR 3 VL	FQGSHVPFT	SEQ ID NO 9
		mVH 3	EVQLQQSGTVLARPGASVKMS CKASGYIFTSYWVHWVKQRP QGLEWIGGFYPGNSDSRYNQ	SEQ ID NO 41

			KFKGKATLTAVTSASTAYMDLS SLTNEDSAVYFCTRRDSPQYW GQGTTLTVSS	
		mVL 3	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQ KPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRLEAED LGVYYCFQGSHVPFTFGGGTK LEIK	SEQ ID NO 42
		huVH 3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYIFTSYWVHWVRQAPG QRLEWMGGFYPGNSDSRYSQ KFQGRVTITRDTASTAYMELS SLRSEDVAVYYCTRRDSPQYW GQGTTLTVSS	SEQ ID NO 53
		huVL 3	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQSIVHSNGNTYLEWFQQ RPGQSPRRLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCFQGSHVPFTFGGGT KVEIK	SEQ ID NO 54

Таблица 1

Депони- рование гибридомы	mAb	Аминокис- лотные последова- тельности		SEQ ID NO
20D2C3G2	mAb4	CDR 1 VH	GYTFSSW	SEQ ID NO 10
		CDR 2 VH	FLPGSGST	SEQ ID NO 11
		CDR 3 VH	ATDGNVDWFAY	SEQ ID NO 12
		CDR 1 VL	QSLVHSSGVTY	SEQ ID NO 13
		CDR 2 VL	KVS	SEQ ID NO 14
		CDR 3 VL	SQSTHVPPT	SEQ ID NO 15
		mVH 4	QVQLQQSGAELMKPGASVKIS CKATGYTFSSSWIEWLKQRPG	SEQ ID NO 43

			HGLEWIGEFPLPGSGSTDYNEK FKGKATFTADTSSDTAYMLLSS LTSEDSAVYYCATDGNWDWFA YWGQGTLLTVSA	
		mVL 4	DLVMTQTPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSLVHSSGVTYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHVPPTFGSGTK LEIK	SEQ ID NO 44
		huVH 4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFSSSWMHWRQAP GQGLEWMGIFLPGSGSTDYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCATDGNWDW FAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO 55
		huVL 4	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CKSSQSLVHSSGVTYLYWYLQ KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCSQSTHVPPTFGQGT KLEIK	SEQ ID NO 56

Таблица 2

Депони- рование гибридомы	mAb	Аминокис- лотные последова- тельности		SEQ ID NO
1E9D9B6	mAb16	CDR 1 VH	GYTFTSY	SEQ ID NO 16
		CDR 2 VH	INPSNGGT	SEQ ID NO 17
		CDR 3 VH	TRGGYYPFDY	SEQ ID NO 18
		CDR 1 VL	QSLLDSDGKTY	SEQ ID NO 19
		CDR 2 VL	LVS	SEQ ID NO 20
		CDR 3 VL	WQGTHTSPYT	SEQ ID NO 21
		mVH 16	QVQLQQSGAELVKPGASVKLS	SEQ ID NO 45

			CKASGYTFTSYMYWVKQRP GQGLEWIGEINPSNGGTNFNE KFKSKATLTVDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCTRGGYYPFD YWGQGTTLTVSS	
		mVL 16	DVVMQTPLTSLVTIGRPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLYWLLQ RPGQSPKRLIYLVSELDGVPD RITGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYYCWQGTHSPYTFGGGT KLEIK	SEQ ID NO 46
		huVH 16a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMYWVRQAP GQGLEWMGIINPSNGGTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDVAVYYCTRGGYYPF DYWGQGTITVTVSS	SEQ ID NO 57
		huVH 16b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMHWRQAP GQGLEWMGIINPSNGGTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDVAVYYCTRGGYYPF DYWGQGTITVTVSS	SEQ ID NO 58
		huVH 16c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMYWVRQAP GQGLEWMGEINPSNGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCTRGGYYP FDYWGQGTITVTVSS	SEQ ID NO 59
		huVL 16a	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQSLLDSDGKTYLYWFQQ RPGQSPRRLIYLVSNRDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCWQGTHSPYTFGQG TKLEIK	SEQ ID NO 60

		huVL 16b	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQSLLDSDGKTYLNWFQQ RPGQSPRRLIYLVSNRDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCWQGTHTSPYTFGQG TKLEIK	SEQ ID NO 61
		huVL 16c	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQSLLDSDGKTYLYWFQQ RPGQSPRRLIYLVSERDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCWQGTHTSPYTFGQG TKLEIK	SEQ ID NO 62

Таблица 3

Депони- рование гибридомы	mAb	Аминокис- лотные последова- тельности		SEQ ID NO
1B3B4F11	mAb19	CDR 1 VH	GYSITSDYA	SEQ ID NO 22
		CDR 2 VH	ISFSGYT	SEQ ID NO 23
		CDR 3 VH	AREVNYGDSYHFDY	SEQ ID NO 24
		CDR 1 VL	SQHRTYT	SEQ ID NO 25
		CDR 2 VL	VKKDGS	SEQ ID NO 26
		CDR 3 VL	GVGDAIKGQSVFV	SEQ ID NO 27
		mVH 19	DVQLQESGPGLVKPSQSLST CTVTGYSITSDYAWNWRQFP GNKLEWMGYISFSGYTSYNPS LKSRISVTRDTSRNQFFLQLTS VTTEDTATYYCAREVNYGDSY HFDYWGQGTIVTVSS	SEQ ID NO 47
		mVL 19	QLALTQSSSASFSLGASAKLTC TLSSQHRTYTIEWYQQQSLKP PKYVMEVKKDGSHSTGHGIPD RFSGSSSGADRYLSISNIQPED EAIYICGVGDAIKGQSVFVFGG	SEQ ID NO 48

			GTKVTVL	
		huVH 19a	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGYISFSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGGQGLTVTVSS	SEQ ID NO 63
		huVH 19b	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGYSITSDYAWSWRQHPGKGLEWIGYISFSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGGQGLTVTVSS	SEQ ID NO 64
		huVH 19c	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGYISFSGYTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGGQGLTVTVSS	SEQ ID NO 65
		huVL 19a	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC TLSSQHRITYTIEWHQQQPEKGPRLMKVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO 66
		huVL 19b	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC TLSSQHRITYTIAWHQQQPEKGPRLMKVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO 67
		huVL 19c	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC TLSSQHRITYTIEWHQQQPEKGPRLMEVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSED	SEQ ID NO 68

			EADYYCGVGDAIKGQSVFVFG GGTKVEIK	
--	--	--	-----------------------------------	--

Таблица 4

- Примеры моноклональных антител, которые могут быть получены с использованием иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность
- 5 “QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN” (С-концевая часть прогастрина), соответствующую аминокислотной последовательности 55-80 человеческого прогастрина, включают антитела, обозначенные в следующих Таблице 5 и 6 как mAb8 и mAb13, но не ограничиваются ими. Экспериментальные результаты картирования эпитопов показывают то, что mAb13 действительно специфично
- 10 связывается с эпитопом в пределах указанной С-концевой аминокислотной последовательности hPG.

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
1C10D3B9	mAb8	CDR 1 VH	GFTFTTYA	SEQ ID NO 28
		CDR 2 VH	ISSGGTYT	SEQ ID NO 29
		CDR 3 VH	ATQGNYSLDF	SEQ ID NO 30
		CDR 1 VL	KSLRHTKGITF	SEQ ID NO 31
		CDR 2 VL	QMS	SEQ ID NO 32
		CDR 3 VL	AQNLELPLT	SEQ ID NO 33
		mVH 8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWRQA PGKGLEWVATISSGGTYTY ADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGN YSLDFWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO 49
		mVL 8	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLAGS VPDRFSSSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYCAQNLELPLTF	SEQ ID NO 50

			GGGTKVEIK	
		VH hZ8CV1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWVRQA PGKGLEWVSSISSGGTYTTY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGN YSLDFWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO 69
		VL hZ8CV1	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCAQNLELPLTF GGGTKVEIK	SEQ ID NO 70
		VH hZ8CV2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWVRQA PGKGLEWVATISSGGTYTTY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGN YSLDFWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO 71
		VL hZ8CV2	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCAQNLELPLTF GGGTKVEIK	SEQ ID NO 72
		CH hZ8CV2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWVRQA PGKGLEWVATISSGGTYTTY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGN YSLDFWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVN	SEQ ID NO 73

			HKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	
		CL hZ8CV2	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASI SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCAQNLELPLTF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLST LTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO 74

Таблица 5

Депони- рование гибридомы	mAb	Аминокис- лотные последова- тельности		SEQ ID NO
2C6C3C7	mAb13	CDR 1 VH	GFIFSSYG	SEQ ID NO 34
		CDR 2 VH	INTFGDRT	SEQ ID NO 35
		CDR 3 VH	ARGTGTY	SEQ ID NO 36
		CDR 1 VL	QSLLDSDGKTY	SEQ ID NO 37
		CDR 2 VL	LVS	SEQ ID NO 38

		CDR 3 VL	WQGTHFPQT	SEQ ID NO 39
		mVH 13	EVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFIFSSYGMSWRQS PDRRLELVASINTFGDRTYY DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MTSLKSEDTAIYYCARGTGT WGQGTTLTVSS	SEQ ID NO 51
		mVL 13	DVVLQTPLTSLVTIGQPASIS CKSSQSLLDSGKTYLNWLL QRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVE AEDLGVYYCWQGTHFPQTF GGGTKLEIK	SEQ ID NO 52
		huVH 13a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFIFSSYGMSWRQA PGKGLEWVANINTFGDRTYY VDSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGTG TYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO 75
		huVH 13b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFIFSSYGMSWRQA PGKGLEWVASINTFGDRTYY VDSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGTG TYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO 76
		huVL 13a	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCRSSQSLLDSGKTYLNWF QQRPGQSPRRLIYLVSNRDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGYYCWQGTHFP QTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO 77
		huVL 13b	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCRSSQSLLDSGKTYLNWF QQRPGQSPRRLIYLVSKRDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS	SEQ ID NO 78

			RVEAEDVGVIYCWQGTHFP QTFGGGKVEIK	
--	--	--	------------------------------------	--

Таблица 6

Другие примеры включают моноклональные и/или поликлональные антитела против hPG, полученные с использованием иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO 40.

Термины «антитела против N-конца hPG» и «антитела против C-конца hPG» обозначают антитела, связывающиеся с эпитопом, содержащим аминокислоты, расположенной в N-концевой части hPG, или с эпитопом, содержащим аминокислоты, расположенной в C-концевой части hPG, соответственно.

Предпочтительно термин «антитела против N-конца hPG» относится к антителам, связывающимся с эпитопом, расположенным в домене прогастрина, последовательность которого представлена SEQ ID NO 2. В другом предпочтительном воплощении термин «антитела против C-конца hPG» относится к антителам, связывающимся с эпитопом, расположенным в домене прогастрина, последовательность которого представлена SEQ ID NO 3.

Термин «эпитоп» относится к области антигена, с которой связывается антитело. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой поднабор структурных эпитопов, и они содержат те аминокислоты, которые непосредственно содействуют аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными. В некоторых воплощениях эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые сахарные цепи, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в некоторых воплощениях они могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Определение эпитопа, связанного антителом, может осуществляться любой методикой картирования эпитопа, известной специалисту в данной области. Эпитоп может содержать разные аминокислоты, которые расположены последовательно в пределах аминокислотной последовательности белка. Эпитоп также может содержать аминокислоты, которые не расположены последовательно в пределах аминокислотной последовательности белка.

В конкретном воплощении указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, выбранное в группе, состоящей из следующих:

- 5

по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 4, 5 и 6, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 4, 5 и 6, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно

10

по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 7, 8 и 9, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 7, 8 и 9, соответственно,

15
- 20

по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 10, 11 и 12, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 10, 11 и 12, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно

25

по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 13, 14 и 15, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 13, 14 и 15, соответственно,

30
- 35

по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 16, 17 и 18, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной

- идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 16, 17 и 18, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 19, 20 и 21, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 19, 20 и 21, соответственно,
- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 22, 23 и 24, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 22, 23 и 24, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 25, 26 и 27, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 25, 26 и 27, соответственно,
- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно по меньшей мере три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 28, 29 и 30, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 28, 29 и 30, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 31, 32 и 33, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере

80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 31, 32 и 33, соответственно, и

- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 34, 35 и 36, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 34, 35 и 36, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 37, 38 и 39, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 37, 38 и 39 соответственно.

В значении по настоящему изобретению «процентная доля идентичности» или «% идентичности» между двумя последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот означает процентную долю идентичных нуклеотидов или аминокислотных остатков между двумя последовательностями, подлежащими сравнению, полученную после оптимального выравнивания, причем данная процентная доля является чисто статистической и различия между двумя данными последовательностями распределяются по их длине случайным образом. Сравнение двух последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот традиционно проводится посредством сравнения последовательностей после их оптимального выравнивания, причем указанное сравнение возможно проводить по отрезкам или с использованием «окна выравнивания». Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может проводиться, помимо сравнения вручную, посредством способов, известных специалисту в данной области.

Для аминокислотной последовательности, демонстрирующей по меньшей мере 80%-ную, предпочтительно 85%-ную, 90%-ную, 95%-ную и 98%-ную идентичность с контрольной аминокислотной последовательностью, предпочтительные примеры включают последовательности, содержащие

эталонную последовательность, определенные модификации, а именно: делецию, присоединение или замену по меньшей мере одной аминокислоты, усечение или удлинение. В случае замены одной или более чем одной последовательной или непоследовательной аминокислоты, предпочтительными являются замены, при которых замененные аминокислоты заменяются «эквивалентными» аминокислотами. Здесь подразумевается то, что выражение «эквивалентные аминокислоты» указывает любые аминокислоты, которые вероятно подлежат замене одной из структурных аминокислот, однако, без модификации биологических активностей соответствующих антител, и данные конкретные примеры определены ниже.

Эквивалентные аминокислоты можно определять либо по их структурной гомологии с аминокислотами, которые они заменяют, либо по результатам сравнительных анализов биологической активности между разными антителами, которые вероятно будут генерированы.

В более конкретном воплощении указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, выбранное в группе, состоящей из следующих:

- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 41 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 42;
- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 43 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 44;
- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 45 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 46;
- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 47 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 48;
- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 49 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 50; и
- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 51 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 52.

В другом конкретном воплощении антитело, использованное в способе по изобретению, представляет собой гуманизированное антитело.

Выражение «гуманизированное антитело» в том виде, в котором оно используется в данном документе, означает антитело, которое содержит области CDR, происходящие из антитела, происходящего не от человека, причем другие части данной молекулы антитела происходят от одного или нескольких человеческих антител. Кроме того, некоторые из остатков скелетных сегментов (именуемых FR, что обозначает каркас) могут быть модифицированы для сохранения аффинности связывания согласно методикам, известным специалисту в данной области (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525, 1986). Целью гуманизации является уменьшение иммуногенности ксеногенного антитела, такого как мышинное антитело, для введения человеку, при сохранении полной аффинности связывания с антигеном и специфичности антитела.

Гуманизированные антитела по изобретению или их фрагменты можно получать методиками, известными специалисту в данной области (такими как, например, методики, описанные в документах Singer *et al.*, J. Immun., 150:2844-2857, 1992). Такие гуманизированные антитела являются предпочтительными для их применения в способах, включающих диагностику *in vitro* или предупредительное и/или терапевтическое лечение *in vivo*. Другие методики гуманизации также известны специалисту в данной области. В самом деле, антитела могут быть гуманизированы с использованием целого ряда методик, включая пересадку CDR (EP 0451261; EP 0682040; EP 0939127; EP 0566647; US 5530101; US 6180370; US 5585089; US 5693761; US 5639641; US 6054297; US 5886152 и US 5877293), маскировку поверхностных остатков (венирование) или изменение поверхности (EP 0592106; EP 0519596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska M.A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:969-973) и перетасовку цепей (патент США № 5565332). Человеческие антитела могут быть получены целым рядом способов, известных в данной области, включая способы фагового дисплея. См. также патенты США № 4444887, 4716111, 5545806 и 5814318; и международные патентные заявки с номерами публикации WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

В более конкретном воплощении указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело, выбранное в группе, состоящей из следующих:

- 5

10

15

20

25

30

35
- гуманизированное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 4, 5 и 6, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 4, 5 и 6, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 7, 8 и 9, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 7, 8 и 9, соответственно,
- гуманизированное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 10, 11 и 12, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 10, 11 и 12, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 13, 14 и 15, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 13, 14 и 15, соответственно,
- гуманизированное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 16, 17 и 18, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной

- идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 16, 17 и 18, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 19, 20 и 21, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 19, 20 и 21, соответственно,
- гуманизированное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 22, 23 и 24, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 22, 23 и 24, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 25, 26 и 27, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 25, 26 и 27, соответственно,
- гуманизированное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 28, 29 и 30, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 28, 29 и 30, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 31, 32 и 33, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере

80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 31, 32 и 33, соответственно, и

- гуманизированное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 34, 35 и 36, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 34, 35 и 36, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 37, 38 и 39, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 37, 38 и 39 соответственно,

где указанное антитело также содержит константные области легкой цепи и тяжелой цепи, происходящие из человеческого антитела.

В другом более конкретном воплощении указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело, выбранное в группе, состоящей из следующих:

- гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 53 и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 54;
- гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 55 и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 56;
- гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 57, 58 и 59, и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 60, 61 и 62;

- гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 63, 64 и 65, и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 66, 67 и 68;
- гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 69 и 71, и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 70 и 72; и
- гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 75 и 76, и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 77 и 78;

где указанное антитело также содержит константные области легкой цепи и тяжелой цепи, происходящие из человеческого антитела.

Более конкретно, указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 71 и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 72, причем указанное антитело также содержит константные области легкой цепи и тяжелой цепи, происходящие из человеческого антитела.

Даже более предпочтительно указанное антитело содержит тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 73 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 74.

В другом аспекте согласно данному изобретению также предложены иммуноконъюгаты (взаимозаменяемо именуемые «конъюгаты антитело-лекарственное средство» или «ADC»), содержащие антитело, связывающееся с прогастрином, как описано в данном документе, причем указанное антитело конъюгировано с одним или более чем одним цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, лекарственное средство, агент, ингибирующий рост, токсин (например, белковый токсин, ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, или их фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

Имуноконъюгаты использовали для местной доставки цитотоксических агентов, т.е. лекарственных средств, которые умерщвляют или ингибируют рост

или пролиферацию клеток, при лечении рака (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137-1146; Payne, G. (2003) i 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26:151-172; U.S. Pat. No. 4,975,278). Иммуноконъюгаты обеспечивают целевую доставку группировки лекарственного средства в опухоль и внутриклеточное накопление в ней, где системное введение неконъюгированных лекарственных средств может приводить к неприемлемым уровням токсичности для нормальных клеток, а также опухолевых клеток, которые пытаются устранить (Baldwin et al, Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (A. Pinchera et al., eds) pp. 475-506. И поликлональные антитела, и моноклональные антитела были описаны как полезные в данных стратегиях (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21 :183-87). Лекарственные средства, используемые в данных способах, включают дауномицин, доксорубицин, метотрексат и виндезин (Rowland et al., (1986) выше). Токсины, используемые в конъюгатах антитело-токсин, включают бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) и калихеамицин (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Данные токсины могут оказывать их цитотоксические эффекты посредством механизмов, включающих связывание с тубулином, связывание с ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства имеют тенденцию к тому, чтобы быть неактивными или менее активными при конъюгировании с большими антителами или лигандами рецептора белка.

В некоторых воплощениях иммуноконъюгат содержит антитело и химиотерапевтический агент или другой токсин. Полезные химиотерапевтические агенты в получении иммуноконъюгатов описываются в данном документе (например, выше). Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и

PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. См., например, WO 93/21232, опубликованную 28 октября 1993 г. Доступен целый ряд радиоизотопов для продукции радиокоњуогированных антител. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re . Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с использованием целого ряда бифункциональных агентов, связывающихся с белком, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(*p*-азидобензоил)гександиамин), бис-дiazониевые производные (такие как бис-(*p*-дiazония бензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фторные соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин ризин можно получать, как описано в Vitetta et al, Science, 238: 1098 (1987). Меченная углеродом 14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой типичный хелатор для коњуогирования радиоизотопа с антителом. См. WO94/11026.

В данном документе также рассматриваются коњуогаты антитела и одного или более чем одного низкомолекулярного токсина, такого как калихеамицин, майтанзиноиды, доластатины, ауростатины, трихотецен и CC 1065, и производные данных токсинов, которые имеют активность токсина.

Иммунокоњуогат по изобретению может дополнительно содержать линкер.

Термины «линкер», «линкерное звено» или «связка» означают химическую группировку, содержащую ковалентную связь или цепочку атомов, которая ковалентно присоединяет связывающий белок к по меньшей мере одному цитотоксическому агенту.

Линкеры могут быть получены с использованием целого ряда бифункциональных связывающихся с белком агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(*p*-азидобензоил)гександиамин), бис-дiazониевые

производные (такие как бис-(*p*-дiazония бензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фторные соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой

5 типичный хелатирующий агент для конъюгирования цитотоксических агентов с системой адресования. Другими сшивающими реактивами могут быть BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат),

10 которые имеются в продаже (например, у Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., США).

Линкер может быть «нерасщепляемым» или «расщепляемым».

В другом аспекте согласно данному изобретению предложена композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого, причем указанная

15 композиция содержит антитело, распознающее эпитоп, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности прогастрина.

В более конкретном воплощении указанная композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого содержит антитело, распознающее

20 эпитоп прогастрина, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина, где указанная аминокислотная последовательность может включать остатки 10-14 hPG, остатки 9-14 hPG, остатки 4-10 hPG, остатки 2-10 hPG или остатки 2-14 hPG, где аминокислотная последовательность hPG

25 представляет собой SEQ ID NO 1.

В более конкретном воплощении композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого содержит антитело, распознающее

эпитоп прогастрина, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности C-

30 концевой части прогастрина, где указанная аминокислотная последовательность может включать остатки 71-74 hPG, остатки 69-73 hPG, остатки 71-80 hPG (SEQ ID NO 40), остатки 76-80 hPG или остатки 67-74 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO 1.

В более конкретном воплощении композиция для применения в

35 предупреждении или лечении рака легкого содержит антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент, который имеет аффинность

в отношении прогастрина по меньшей мере 5000 нМ, по меньшей мере 500 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 7 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,1 нМ, 50 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ или по меньшей мере 0,1 пМ при определении таким способом, как описанный выше.

5 В даже более конкретном воплощении композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого содержит антитело, связывающееся с прогастрином, где указанная молекула, связывающаяся с прогастрином, или ее антигенсвязывающий фрагмент представляет собой нейтрализующее антитело.

10 В другом конкретном воплощении композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого содержит антитело, связывающееся с прогастрином, где указанная молекула, связывающаяся с прогастрином, или ее антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

В конкретном воплощении композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого содержит антитело, связывающееся с прогастрином, где 15 указанная молекула, связывающаяся с прогастрином, или ее антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с одним или более чем одним цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, лекарственное средство, агент, ингибирующий рост, токсин (например, белковый токсин, ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, 20 или их фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат), как описано выше.

В другом конкретном воплощении композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого для пациента содержит антитело, связывающееся с прогастрином, где у указанного пациента был диагностирован 25 рак легкого, где концентрация прогастрина выше в биологическом образце от указанного пациента, чем в контрольном образце. Предпочтительно у указанного пациента был диагностирован рак легкого посредством приведения в контакт антитела против PG с биологическим образцом указанного пациента.

«Биологический образец» в том виде, в котором он используется в данном документе, представляет собой образец биологической ткани или жидкости, 30 который содержит нуклеиновые кислоты или полипептиды, например, белок, полинуклеотид или транскрипт рака легкого. Такой образец должен обеспечивать определение уровней экспрессии прогастрина. Известно то, что прогастрин является секретируемым белком. Предпочтительные биологические образцы для 35 определения уровня белка прогастрина, таким образом, включают биологические жидкости. Термин «биологическая жидкость» в том виде, в котором он

используется в данном документе, означает любую жидкость, которая включает вещество биологического происхождения. Предпочтительные биологические жидкости для применения в настоящем изобретении включают жидкости организма животного, например, млекопитающего, предпочтительно человеческого субъекта.

- 5 Жидкость организма может представлять собой любую жидкость организма, включающую кровь, плазму, сыворотку, лимфу, спинномозговую жидкость (CSF), слюну, пот и мочу, но не ограничивающуюся ими. Предпочтительно указанные предпочтительные жидкие биологические образцы включают такие образцы, как образец крови, образец плазмы или образец сыворотки. Более предпочтительно, биологический образец представляет собой образец крови. В самом деле, такой образец крови может быть получен совершенно безвредным отбором крови у пациента и, таким образом, обеспечивает неинвазивную оценку рисков того, что у субъекта разовьется опухоль.

- 15 Термин «биологический образец» в том виде, в котором он используется в данном документе, также включает образец солидного рака пациента, подлежащего анализу, когда раковое заболевание представляет собой солидное раковое заболевание. Такой образец солидного рака обеспечивает проведение специалистом любого типа измерения уровня биомаркера по изобретению. В некоторых случаях способы по изобретению могут дополнительно включать предварительную стадию отбора образца солидного рака от пациента. «Образцом солидного рака» называется образец опухолевой ткани. Даже у ракового пациента ткань, которая является местом опухоли, все еще содержит неопухолевую здоровую ткань. «Образец рака», таким образом, должен ограничиваться опухолевой тканью, взятой от пациента. Указанный «раковый образец» может 25 представлять собой образец биопсии или образец, отобранный в результате хирургической резекционной терапии.

- Биологический образец типично получают из эукариотического организма, наиболее предпочтительно млекопитающего или птицы, рептилии или рыбы. В самом деле, «субъект», который может быть подвергнут способу, описанному в 30 данном документе, может представлять собой любого млекопитающего животного, включая человека, собаку, кошку, крупный рогатый скот, козу, свинью, кабана, овцу и обезьяну; или птицу; рептилию или рыбу. Предпочтительно субъект представляет собой человека; человеческий субъект может быть известен как «пациент».

- 35 Под «получением биологического образца» в данном документе подразумевается получение биологического образца для применения в способах,

описанных в данном изобретении. Чаще всего это будет осуществляться удалением образца клеток из животного, но также может осуществляться применением ранее выделенных клеток (например, выделенных другим человеком, в другое время и/или для другой цели) или осуществлением способов по изобретению *in vivo*. Особенно полезными будут архивные ткани, имеющие историю лечения или результата.

Данный образец может быть получен и, при необходимости, приготовлен согласно способам, известным специалисту в данной области. В частности, в данной области хорошо известно то, образец следует отбирать у субъекта натошак.

В более конкретном аспекте настоящее изобретение относится к композиции для применения в предупреждении или лечении рака легкого согласно изобретению, где указанное антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны среди антител против N-конца прогастрина и антител против C-конца прогастрина.

Композиции антитела для применения в способах по изобретению могут быть приготовлены в виде разных препаратов, включая водную суспензию, но не ограничиваясь ей, для введения разными путями, включающими парентеральный, подоболоочечный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, инфузию или болюсное введение, но не ограничивающимися ими. В некоторых воплощениях данную композицию готовят для парентерального введения и в некоторых конкретных воплощениях – внутривенной инъекции посредством инфузии.

В конкретном воплощении композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого согласно данному изобретению содержит эффективную дозу антител против прогастрина по изобретению в интервале от 0,001 мг/кг до примерно 250 мг/кг, которая может даваться за одно введение или за многие, отдельные введения.

В конкретном воплощении композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого согласно данному изобретению содержит антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные среди поликлональных антител, моноклональных антител, химерных антител, одноцепочечных антител, камелизированных антител, антител IgA1, антител IgA2, антител IgD, антител IgE, антител IgG1, антител IgG2, антител IgG3, антител IgG4 и антител IgM. Предпочтительно указанные антитела представляют

собой антитела, описанные выше. Более предпочтительно указанные антитела представляют собой гуманизированные антитела.

Предпочтительно настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей композицию для применения в предупреждении или
5 лечении рака легкого согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Более конкретно, фармацевтическая композиция для применения в предупреждении или лечении рака легкого согласно изобретению содержит антитело, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

В более конкретном аспекте настоящее изобретение относится к
10 фармацевтической композиции, содержащей композицию для применения в предупреждении или лечении рака легкого согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, где указанное антитело против прогастрина вводится в дозе от 0,001 мг/кг до 250 мг/кг и предпочтительно в дозе по меньшей мере 0,005 мг/кг, по меньшей мере 0,01 мг/кг, по меньшей мере 0,05
15 мг/кг, по меньшей мере 0,1 мг/кг, по меньшей мере 0,5 мг/кг, по меньшей мере 1 мг/кг, по меньшей мере 5 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, по меньшей мере 50 мг/кг или по меньшей мере 100 мг/кг. В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору частей, содержащему композицию для применения в предупреждении или лечении рака легкого согласно изобретению и
20 противораковую терапевтическую молекулу.

В самом деле, лечение моноклональными антителами против PG, как описано в данном документе, можно объединять с или использовать в качестве дополнительного с другой терапией. Неограничивающие примеры другой терапии включают химиотерапевтическое лечение, лучевую терапию, хирургическую
25 резекцию и терапию антителами.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору частей, содержащему композицию для применения в предупреждении или лечении рака легкого согласно изобретению и противораковую терапевтическую молекулу, выбранную среди следующих: химиотерапевтическая молекула, молекула
30 таргетной терапии.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к наборам частей, содержащим композицию для лечения рака легкого по изобретению и химиотерапевтическую молекулу для одновременного, последовательного или
35 раздельного введения. Полезные химиотерапевтические молекулы для данной цели включают антагонисты фолатов, антагонисты пуринов, антагонисты пиримидинов, молекулы, алкилирующие ДНК, лекарственные средства,

сшивающие ДНК, антибиотики, комплексы платины, ингибиторы протеасом, яды для митотического веретена, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы тирозинкиназы и другие, но не ограничиваются ими.

В другом конкретном воплощении настоящее изобретение относится к наборам частей, содержащим композицию согласно данному изобретению и композицию, содержащую другую молекулу таргетной терапии для одновременного, последовательного или раздельного введения. Такая молекула таргетной терапии включает антитела, которые нацелены на EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), такие как цетуксимаб или панитумумаб, антитела, которые нацелены на VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), такие как бевацизумаб, антитела, которые нацелены на HER2 (человеческий EGF-подобный рецептор 2), такие как трастузумаб или пертузумаб, антитела, которые нацелены на PD-1 и PDL-1, такие как пембролизумаб, антитела, которые нацелены на CTLA-4 (антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов), такие как ипилимумаб, низкомолекулярные лекарственные средства, которые нацелены на EGFR, такие как эрлотиниб, низкомолекулярные лекарственные средства, которые нацелены на BRAF, такие как вемурафениб или дабрафениб, рекомбинантный слитый белок, который нацелен на VEGF, такой как афлиберцепт, но не ограничивается ими.

В другом конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, связывающегося с прогастрином, или его антигенсвязывающего фрагмента для диагностики рака легкого.

В другом конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, связывающегося с прогастрином, или его антигенсвязывающего фрагмента для предупреждения или лечения рака легкого.

В более конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, связывающегося с прогастрином, или его антигенсвязывающего фрагмента для предупреждения или лечения рака легкого у пациента, где была определена концентрация прогастрина в биологическом образце указанного пациента, и она выше, чем концентрация прогастрина контрольного биологического образца.

В другом конкретном аспекте данное изобретение относится к применению фармацевтической композиции по изобретению для предупреждения рецидива рака легкого. Соответственно, согласно настоящему раскрытию предложены полезные способы и композиции для лечения рака легкого и предупреждения рецидива рака легкого у животных, включая человека. Данные способы лечения включают введение субъекту, у которого диагностирован рак легкого,

эффективного количества антитела, которое специфично связывается с прогастрином, для обеспечения терапевтической пользы. Антитело против PG может вводиться одно, в виде монотерапии, или в сочетании с или дополнительно к другим способам лечения, таким как резекция опухоли, лучевая терапия, химиотерапия, терапия другим антителом и т.д.

Солидные опухоли не обязательно представляют собой гомогенные ткани. Скорее некоторые опухоли содержат целый ряд поврежденных типов клеток, имеющих отличные фенотипические и функциональные свойства. В данном отношении такие опухоли являются аналогичными ненормальным органам. Клетки, составляющие солидные опухоли, отличаются в отношении степени, в которой они способны инициировать образование новой опухоли при пересадке в новое место у того же самого хозяина или новому хозяину того же самого или другого вида. Клетки, имеющие данное свойство, известны как клетки, инициирующие опухоль или раковое заболевание, или, в качестве альтернативы, опухолевые или раковые стволовые клетки. См., например, Hardavella et al., 2016, "Lung cancer stem cells—characteristics, phenotype," *Transl Lung Cancer Res.* 2016, 5(3): 272–279. Такие клетки являются высокоонкогенными.

В общем, раковые стволовые клетки определяются двумя свойствами: способностью к самообновлению и способностью к образованию дочерних клеток, которые дифференцируются в нестволовые клетки. Самообновление представляет собой способность подвергаться клеточному делению, при этом одна или обе дочерние клетки остаются недифференцированными, сохраняющими способность давать еще одну другую раковую стволовую клетку с аналогичной способностью к пролиферации, что и родительская клетка. Это свойство позволяет раковым стволовым клеткам в конечном счете давать большое число клеток, которые составляют растущую опухоль. Раковые стволовые клетки также имеют способность производить дочерние клетки, которые дифференцируются, давая спектр более дифференцированных нестволовых или составляющих объем опухолевых клеток, находящихся во многих солидных опухолях. Таким образом, при трансплантации раковые стволовые клетки могут восстанавливать тип опухоли, из которой они произошли, даже после многократных серийных трансплантаций. Кроме того, полагают то, что раковые стволовые клетки имеют генетические мутации и/или эпигенетические изменения, которые приводят к измененным картинам пролиферации и/или низким показателям апоптоза.

Раковые стволовые клетки могут быть идентифицированы согласно целому ряду фенотипических характеристик, которые отличают их от основной массы

опухолевых клеток. Полезные способы для оценки того, содержит ли опухоль или линия клеток раковые стволовые клетки, знакомы специалистам в данной области. Такие способы описываются, например, в Hardavella et al., 2016, "Lung cancer stem cells—characteristics, phenotype," Transl Lung Cancer Res. 2016, 5(3): 272–279, а также в WO 2012/013609. Конкретные примеры данных способов также описываются в примерах настоящей заявки.

В более конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, связывающегося с прогастрином, или его антигенсвязывающего фрагмента для предупреждения или лечения рака легкого для пациента, где у указанного пациента имеется метастаз.

В даже более конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, связывающегося с прогастрином, или его антигенсвязывающего фрагмента для предупреждения или лечения рака легкого для пациента, где у указанного пациента имеется метастаз, и где была определена концентрация прогастрина в биологическом образце указанного пациента, и она выше, чем концентрация прогастрина контрольного биологического образца.

Компоненты, из которых состоит комбинация, могут вводиться одновременно, отдельно или последовательно, таким образом, чтобы получать максимальную эффективность данной комбинации; для каждого введения возможно варьирование его продолжительности от быстрого введения до непрерывной перфузии.

Термин «одновременное введение» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к введению двух соединений композиции согласно изобретению в одной и уникальной фармацевтической форме. Термин «раздельное введение» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к введению, в то же самое время, двух соединений композиции согласно изобретению в отличных фармацевтических формах. Термин «последовательное введение» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к последовательному введению двух соединений композиции согласно изобретению, причем каждое находится в отличной фармацевтической форме.

Термин «терапевтически эффективное количество» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к минимальной концентрации или количеству соединения (или соединений), которое является эффективным для предупреждения, облегчения, ослабления или уменьшения интенсивности симптомов заболевания или для продления жизни пациента, которого лечат.

В другом аспекте согласно настоящему раскрытию предложен способ предупреждения рецидива рака простаты, включающий введение эффективного количества антитела против PG субъекту, нуждающемуся в предупреждении. Способы предупреждения рецидива рака печени согласно настоящему раскрытию
5 осуществляются посредством введения одного или более чем одного антитела против PG, способного нейтрализовать PG, описанного выше, индивидам, подверженным риску рецидива рака легкого.

Субъекты, нуждающиеся в предупреждении рецидива рака простаты, представляют собой индивидов, которых ранее лечили против рака легкого,
10 которые подвергаются риску, но у которых не был вновь диагностирован рак легкого. Подходящие субъекты включают индивидов, которых ранее лечили против рака легкого любыми способом, включающими хирургическую резекцию, химиотерапию или любую другую терапию.

Эффективное предупреждение рецидива рака легкого включает полное и
15 продолжающееся отсутствие рецидива рака легкого, но не ограничивается им. В некоторых воплощениях эффективное предупреждение измеряется по отсутствию опухолей рака легкого или стволовых клеток рака легкого, полученных от субъекта, подверженного риску рецидива рака легкого. В некоторых воплощениях эффективное предупреждение определяется по отсутствию увеличения
20 концентрации PG в крови у субъекта, подверженного риску рецидива рака легкого.

Лечение против PG может вводиться одно в виде монотерапии или в комбинации или дополнительно к одному или более чем одному другому лечению. Другие лечения включают, без ограничения, хирургическую резекцию и лечение вторым терапевтическим средством, таким как химиотерапевтическое средство
25 или антитело, как описано выше. Комбинированное лечение в том виде, в котором оно предложено в данном документе, включает введение пациенту по меньшей мере двух лечений, одно из которых представляет собой лечение против PG с использованием по меньшей мере одного антитела против PG, и другое из которых представляет собой лечение терапевтическим средством или процедуру.

30 Антитело против PG и второе средство могут вводиться одновременно, последовательно или отдельно. Указывается то, что антитело против PG и второе средство в том виде, в котором они используются в данном документе, вводятся последовательно, если они вводятся пациенту в те же самые сутки, например, на протяжении того же самого посещения пациента. Последовательное введение
35 может происходить с интервалом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 часов. В отличие от этого, указывается то, что антитело против PG и второе средство вводятся отдельно,

если они вводятся пациенту в разные сутки, например, антитело против PG и второе терапевтическое средство могут вводиться с интервалами 1 сутки, 2 суток или 3 суток, одна неделя, 2 недели или один месяц. В способах по настоящему раскрытию введение антитела против PG по раскрытию может предшествовать или следовать после введения второго средства. В качестве неограничивающего

5 примера, антитело против PG и второе средство могут вводиться сопутствующе в течение определенного периода времени, с последующим вторым периодом времени, в котором введение антитела против PG и второго средства чередуются.

Характеристики воплощений данного изобретения станут еще очевиднее из

10 следующего подробного описания примеров, приведенного ниже.

ЛЕГЕНДЫ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1:

15 Анализ пролиферации клеток: клетки NCI-H358 обрабатывали либо контрольным антителом, либо Hz против hPG 8CV2 (PG Hz) – гуманизированным антителом против C-конца hPG.

ПРИМЕРЫ

20 **Пример 1: нейтрализующая активность антител против hPG в отношении линий раковых клеток**

1.1. Нейтрализующая активность моноклональных антител против hPG

Моноклональные антитела к PG тестируются на их способность

25 ингибировать пролиферацию нескольких линий клеток, обычно используемых для исследования рака легкого, которые продуцируют и секретируют прогастрин. Выживание клеток из каждой из данных линий клеток анализируется с использованием разных моноклональных антител против hPG.

Для каждого эксперимента 50000 клеток высевают в 6-луночные планшеты в среду, содержащую фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в течение 8 часов. Клетки голодают без сыворотки в течение ночи, и, начиная в 24 часа после посева (время «T0»), клетки обрабатывают в шестикратной повторности каждые 12 ч в течение 48 часов, в отсутствие телячьей сыворотки, 1-20 мкг/мл моноклональных контрольных антител (моноклональное антитело против

30 пуромицина) (CT mAb) или 1-20 мкг/мл mAb (моноклональное антитело) против

35 пуромицина) (CT mAb) или 1-20 мкг/мл mAb (моноклональное антитело) против

hPG, где указанное mAb представляет собой моноклональное антитело против C-конца hPG или моноклональное антитело против N-конца hPG.

Указанное mAb представляет собой антитело против C-конца hPG, выбранное среди следующих:

5 - антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 28, 29 и 30, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 31, 32 и 33,

10 - антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 34, 35 и 36, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 37, 38 и 39;

 - или антитело против N-конца hPG, выбранное среди следующих:

15 - моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 4, 5 и 6, соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 7, 8 и 9,

20 - антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 10, 11 и 12, соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 13, 14 и 15, соответственно,

25 - антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 16, 17 и 18, соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 19, 20 и 21, соответственно,

 - антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 22, 23 и 24, соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 25, 26 и 27 соответственно.

30 Число клеток в T0 подсчитывается в контрольной лунке для каждого эксперимента.

 В частности, число живых клеток как в контрольных, так и в обработанных mAb против hPG лунках подсчитывается в 48 часов, затем рассчитывается разница между каждым числом клеток и числом клеток, определенным в T0. Образующееся
35 число клеток, обработанных mAb против hPG, затем выражается как процентная доля от числа клеток, обработанных контрольным mAb.

Обработка моноклональными антителами против hPG уменьшает число клеток по сравнению с контрольным антителом. Статистическая значимость определяется с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки: * - p меньше 0,05; ** - p меньше 0,01 и *** - p меньше 0,001. В каждой линии клеток антитела против hPG уменьшают выживание клеток.

1.2. Нейтрализующая активность гуманизированных антител против hPG в отношении выживания клеток

Гуманизированные антитела к PG тестируются на их способность ингибировать пролиферацию нескольких линий клеток, обычно используемых для исследования рака легкого, которые продуцируют и секретируют прогастрин. Выживание клеток из каждой из данных линий клеток анализируется с использованием разных моноклональных антител против hPG.

Для каждого эксперимента 50000 клеток высевают в 6-луночные планшеты в среду, содержащую фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в течение 8 часов. Клетки голодают без сыворотки в течение ночи, и, начиная в 24 часа после посева (время «T0»), клетки обрабатывают в шестикратной повторности каждые 12 ч в течение 48 часов, в отсутствие фетальной телячьей сыворотки, 1-20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (антитело против человеческого FcG1, от BioXCell) (CT Hz) или 1-20 мкг/мл Hz (гуманизированное антитело) против hPG, где указанное Hz представляет собой гуманизированное антитело против C-конца hPG или гуманизированное антитело против N-конца hPG. Число клеток в T0 подсчитывается в контрольной лунке для каждого эксперимента.

В частности, число живых клеток как в контрольных, так и в обработанных Hz против hPG лунках подсчитывается в 48 часов, затем рассчитывается разница между каждым числом клеток и числом клеток, определенным в T0. Образующееся число клеток, обработанных Hz против hPG, затем выражается как процентная доля от числа клеток, обработанных контрольным mAb.

Обработка Hz антителами против hPG уменьшает число клеток по сравнению с обработкой контрольным антителом. Статистическая значимость определяется с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки: * - p меньше 0,05; ** - p меньше 0,01 и *** - p меньше 0,001. В каждой линии клеток антитела против hPG уменьшают выживание клеток.

1.3. Нейтрализующая активность моноклональных антител против hPG в отношении частоты раковых стволовых клеток

Моноклональные антитела к PG тестируются на их способность уменьшать частоту раковых стволовых клеток (CSC) с использованием анализа предельного разведения (ELDA) в нескольких линиях клеток, обычно используемых для исследования рака легкого, которые продуцируют и секретируют прогастрин. Частота CSC от каждой из данных линий клеток анализируется с использованием разных моноклональных антител против hPG.

Для каждого эксперимента клетки высевают в P96 с ультраслабым прикреплением (ULA) (96-луночные планшеты) при фиксированных клеточных концентрациях на лунку с использованием проточного цитометра FACS Aria, и используется интервал концентраций от одной до 500 клеток на лунку. Клетки культивируются в течение вплоть до 11 суток в планшетах ULA со средой M11 (Macari et al, Oncogene, 2015) и каждые 3 или 4 суток обрабатываются 1-20 мкг/мл моноклональных контрольных антител (моноклональное антитело против пурамицина) (CT mAb) или 1-20 мкг/мл mAb против hPG, где указанное mAb представляет собой моноклональное антитело против C-конца hPG или моноклональное антитело против N-конца hPG.

В частности, в конце фазы инкубации планшеты наблюдают с использованием фазово-контрастного микроскопа, и оценивается число позитивных лунок на клеточную концентрацию. Наконец, используется доступное в интернете программное средство для ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) для расчета частот CSC каждой группы обработки и анализа любого статистического различия между группами (модифицированный критерий хи-квадрат).

Обработка моноклональными антителами против hPG уменьшает частоту CSC по сравнению с обработкой контрольным антителом.

1.4. Нейтрализующая активность гуманизированных антител против hPG в отношении частоты раковых стволовых клеток

- Анализ образования сфер

Гуманизированные антитела к PG тестируются на их способность уменьшать частоту раковых стволовых клеток (CSC) с использованием анализа образования сфер в нескольких линиях клеток, обычно используемых для исследования рака легкого, которые продуцируют и секретируют прогастрин.

Для каждого эксперимента 700 клеток высевают в 24-луночные планшеты с ультраслабым прикреплением (ULA). Клетки культивируются в течение вплоть до 7 суток в планшетах ULA со средой M11 (Macari et al, Oncogene, 2015) и каждые 3 или 4 суток обрабатываются 20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (против человеческого FcG1, от BioXCell) (CT Hz) или 20 мкг/мл Hz против hPG (PG Hz), где указанное Hz представляет собой гуманизированное антитело против C-конца hPG или гуманизированное антитело против N-конца hPG.

В частности, в конце фазы инкубации лунки фотографируют посредством микроскопии в режиме светлого поля, анализируют изображения, и подсчитывают сферы со средним диаметром больше 25 мкм.

Обработка гуманизированными антителами против hPG уменьшает частоту CSC по сравнению с обработкой контрольным антителом.

- Анализ предельного разведения

Гуманизированные антитела к PG тестируются на их способность уменьшать частоту раковых стволовых клеток (CSC) с использованием анализа предельного разведения (ELDA) в нескольких линиях клеток, обычно используемых для исследования рака легкого, которые продуцируют и секретируют прогастрин. Частота CSC от каждой из данных линий клеток анализируется с использованием разных гуманизированных антител против hPG.

Для каждого эксперимента клетки высевают в P96 с ультраслабым прикреплением (ULA) (96-луночные планшеты) при фиксированных клеточных концентрациях на лунку с использованием проточного цитометра FACS Aria, и используется интервал концентраций от одной до 500 клеток на лунку. Клетки культивируются в течение вплоть до 11 суток в планшетах ULA со средой M11 (Macari et al, Oncogene, 2015) и каждые 3 или 4 суток обрабатываются 1-20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (антитело против человеческого FcG1, от BioXCell) (CT Hz) или 1-20 мкг/мл Hz против hPG, где указанное Hz представляет собой гуманизированное антитело против C-конца hPG или гуманизированное антитело против N-конца hPG.

В частности, в конце фазы инкубации планшеты наблюдают с использованием фазово-контрастного микроскопа, и оценивается число позитивных лунок на клеточную концентрацию. Наконец, используется доступное в интернете программное средство для ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) для расчета частот CSC каждой группы обработки и анализа любого статистического различия между группами (модифицированный критерий хи-квадрат).

Обработка гуманизированными антителами против hPG уменьшает частоту CSC по сравнению с обработкой контрольным антителом.

1.5. Нейтрализующая активность моноклональных антител против hPG в отношении пути WNT/ β -катенина

Моноклональные антитела к PG тестируются на их способность ингибировать путь WNT/ β -катенина у нескольких линий клеток, обычно используемых для исследования рака легкого, которые продуцируют и секретируют прогастрин, с использованием экспрессии белка сурвивина – хорошо известного гена-мишени пути WNT/ β -катенина – в качестве показателя. Экспрессия сурвивина из каждой из данных линий клеток анализируется с использованием разных моноклональных антител против hPG.

Для каждого эксперимента 50000 клеток высевают в 6-луночные планшеты в среду, содержащую фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в течение 8 часов. Клетки голодают без сыворотки в течение ночи, и, начиная через 24 часа после посева, клетки обрабатывают в шестикратной повторности каждые 12 ч в течение 72 часов, в отсутствие фетальной телячьей сыворотки, 1-20 мкг/мл моноклональных контрольных антител (моноклональное антитело против пурамицина) (CT mAb) или 1-20 мкг/мл mAb против hPG, где указанное mAb представляет собой моноклональное антитело против C-конца hPG или моноклональное антитело против N-конца hPG.

В частности, после 72 часов обработки клетки отбирают, и общий белок экстрагируют с использованием буфера RIPA (радиоиммунопреципитационный анализ). Равное количество белка от клеток, обработанных CT mAb или mAb против hPG, затем подвергают вестерн-блоттингу с использованием антитела против сурвивина (моноклональное антитело, #2802 от Cell Signaling) и антитела против актина в качестве контроля загрузки (моноклональное антитело, #A4700 от SIGMA). Количественное измерение проводится с использованием хемисистемы GBOX от Syngene.

Обработка моноклональными антителами против hPG уменьшает экспрессию сурвивина по сравнению с обработкой контрольным антителом. Статистическая значимость определяется с использованием непарного Т-критерия Стьюдента: * - p меньше 0,05; ** - p меньше 0,01 и *** - p меньше 0,001.

1.6. Нейтрализующая активность гуманизированных антител против hPG в отношении пути WNT/ β -катенина

Гуманизированные антитела к PG тестируются на их способность ингибировать путь WNT/ β -катенина у нескольких линий клеток, обычно используемых для исследования рака легкого, которые продуцируют и секретируют прогастрин, с использованием экспрессии белка сурвивина – хорошо известного гена-мишени пути WNT/ β -катенина – в качестве показателя. Экспрессия сурвивина из каждой из данных линий клеток анализируется с использованием разных гуманизированных антител против hPG.

Для каждого эксперимента 50000 клеток высевают в 6-луночные планшеты в среду, содержащую фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в течение 8 часов. Клетки голодают без сыворотки в течение ночи, и, начиная через 24 часа после посева, клетки обрабатывают в шестикратной повторности каждые 12 ч в течение 72 часов, в отсутствие телячьей сыворотки, 1-20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (антитело против человеческого FcG1, от BioXCell) (CT Hz) или 1-20 мкг/мл Hz против hPG, где указанное Hz представляет собой гуманизированное антитело против C-конца hPG или гуманизированное антитело против N-конца hPG.

В частности, после 72 часов обработки клетки отбирают, и общий белок экстрагируют с использованием буфера RIPA. Равное количество белка из клеток, обработанных CT Hz или Hz против hPG, затем подвергают вестерн-блоттингу с использованием антитела против сурвивина (моноклональное антитело, #2802 от Cell Signaling) и антитела против актина в качестве контроля загрузки (моноклональное антитело, #A4700 от SIGMA). Количественное измерение проводится с использованием хемисистемы GBOX от Syngene.

Обработка гуманизированными антителами против hPG уменьшает экспрессию сурвивина по сравнению с обработкой контрольным антителом. Статистическая значимость определяется с использованием непарного Т-критерия Стьюдента: * - p меньше 0,05; ** - p меньше 0,01 и *** - p меньше 0,001.

Пример 2: нейтрализующая активность антител против hPG в отношении линий раковых клеток

Нейтрализующая активность гуманизированных антител против hPG в отношении выживания клеток

Гуманизированные антитела к PG тестируются на их способность ингибировать пролиферацию нескольких линий клеток, обычно используемых для исследования рака легкого (т.е. NCI-H358, A549 или NCI-H460), которые продуцируют и секретируют прогастрин. Выживание клеток из каждой из данных

5 линий клеток анализировали с использованием разных моноклональных антител против hPG.

200000 клеток NCI-H358 высевали в 6-луночные планшеты в среду, содержащую фетальную телячью сыворотку, и инкубировали в течение 8 часов. Клетки голодали без сыворотки в течение ночи. С 24 часов после посева (время

10 «T0»), клетки обрабатывали каждые 12 ч в течение 48 часов, в отсутствие фетальной телячьей сыворотки, 20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (антитело против человеческого FcG1, от BioXCell) (CT Hz) или 20 мкг/мл Hz против hPG 8CV2 (PG Hz), где указанное Hz представляет собой гуманизированное антитело против С-конца PG. Число клеток в T0 подсчитывали в контрольной лунке

15 для каждого эксперимента.

В частности, число живых клеток как в контрольных, так и в обработанных Hz против hPG лунках подсчитывали в 48 часов. Затем рассчитывали разницу между каждым числом клеток и числом клеток, определенным в T0.

Обработка Hz антителами против hPG уменьшала число клеток по сравнению с обработкой контрольным антителом. Статистическую значимость определяли с использованием t-критерия: ** - p меньше 0,01. В каждой линии клеток антитела против hPG уменьшали выживание клеток (см. Фиг. 1).

20

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

- 25
- Yanaoka *et al*, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(4)
 - Pepe *et al*, J Natl Cancer Inst, 2008, Oct., 100(20)
 - Leja *et al*, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2014, Dec., 28(6)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в предупреждении или лечении рака легкого.

2. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 1, где указанное антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано среди одноцепочечных антител, камелизированных антител, антител IgA1, антител IgA2, антител IgD, антител IgE, антител IgG1, антител IgG2, антител IgG3, антител IgG4 и антител IgM.

3. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 1 или 2, где указанное антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано среди антител против N-конца прогастрина и антител против C-конца прогастрина.

4. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 1-3, где указанное антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой нейтрализующее антитело.

5. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 1-4, где указанное антитело выбрано в группе, состоящей из следующих:

- антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 4, 5 и 6, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 7, 8 и 9, соответственно,

- антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 10, 11 и 12, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 13, 14 и 15, соответственно,

- антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2

и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 16, 17 и 18, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 19, 20 и 21, соответственно,

- антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 22, 23 и 24, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 25, 26 и 27, соответственно,

- антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 28, 29 и 30, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 31, 32 и 33, соответственно, и

- антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 34, 35 и 36, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 37, 38 и 39, соответственно.

6. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 1-5, где указанное антитело выбрано в группе, состоящей из следующих:

- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 41 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 42;
- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 43 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 44;

- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 45 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 46;
- 5 • моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 47 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 48;
- моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 49 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 50; и
- 10 • моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 51 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 52.

7. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 1-5, где указанное антитело
15 представляет собой гуманизированное антитело.

8. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п. 7, где указанное антитело выбрано в группе, состоящей из следующих:

- 20 • гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 53 и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 54;
- гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 55 и
25 переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 56;
- гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 57, 58 и 59, и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO
30 60, 61 и 62;
- гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 63, 64 и 65, и переменную область легкой цепи

аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 66, 67 и 68;

- 5 • гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 69 и 71, и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 70 и 72; и
- 10 • гуманизированное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 75 и 76, и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности, выбранной между SEQ ID NO 77 и 78;

где указанное антитело также содержит константные области легкой цепи и тяжелой цепи, происходящие из человеческого антитела.

- 15 9. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 7 или 8, где указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 71 и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 72, причем указанное антитело
- 20 также содержит константные области легкой цепи и тяжелой цепи, происходящие из человеческого антитела.

10. Антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп. 7-9, где указанное антитело содержит тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 73 и легкую цепь
- 25 аминокислотной последовательности SEQ ID NO 74.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, и фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент для предупреждения или лечения рака легкого.

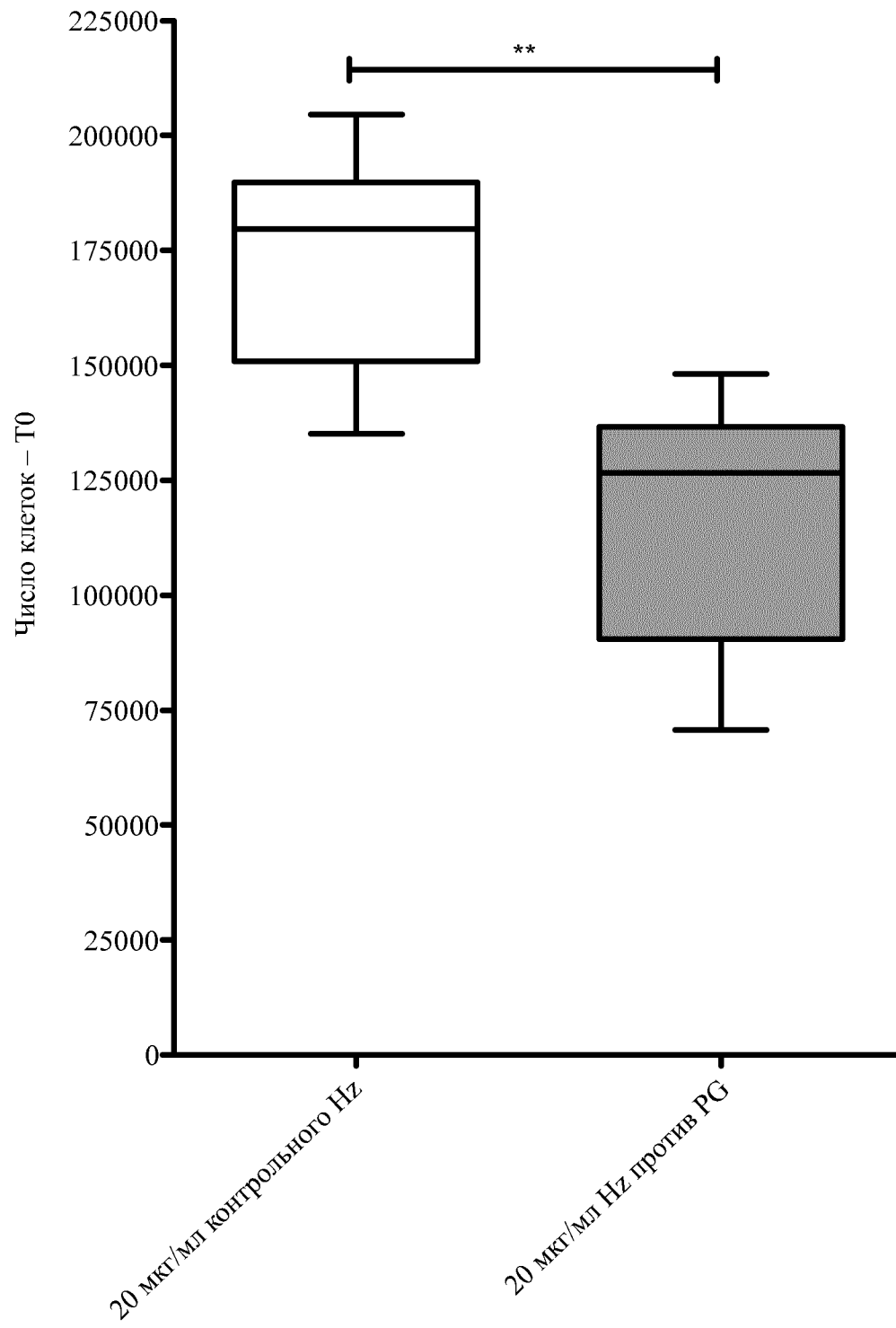
- 30 12. Фармацевтическая композиция для применения по п. 11, дополнительно содержащая второе терапевтическое средство.

13. Фармацевтическая композиция для применения по п. 12, в которой указанное средство представляет собой биологическое средство или химиотерапевтическое средство.

- 35 14. Фармацевтическая композиция для применения по п. 13, в которой указанное биологическое средство представляет собой моноклональное антитело

против EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) или моноклональное антитело против VEGF (фактор роста эндотелия сосудов).

- 5 15. Фармацевтическая композиция для применения по п. 14, в которой указанное химиотерапевтическое средство выбрано в группе алкилирующих агентов, антиметаболитов, противоопухолевых антибиотиков, ингибиторов митоза, ингибиторов функции хроматина, средств против ангиогенеза, антиэстрогенных средств, антиандрогенных средств и иммуномодуляторов.



ФИГ. 1