

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992317** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.03.05**

(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 ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКИХ**

---

(31) **17305382.8**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.03.30**

**Приёр Александр (FR)**

(33) **EP**

(74) Представитель:

(86) **PCT/EP2018/058332**

**Хмара М.В. (RU)**

(87) **WO 2018/178354 2018.10.04**

(71) Заявитель:

**ЭСС-ПРОГАСТРИН СА (CH)**

---

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

**201992317**  
**A1**

**201992317**  
**A1**

# КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКИХ

## ВВЕДЕНИЕ

5 Настоящее изобретение относится к диагностике *in vitro* рака, более конкретно, оно относится к способам диагностики *in vitro* рака легкого. Композиции согласно данному изобретению содержат молекулу, связывающую прогастрин, в частности, антитело против hPG (человеческий прогастрин), тогда как способы согласно данному изобретению включают применение молекулы, связывающей прогастрин, и, в частности, антитела против hPG.

10 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 остается от 15 до 20%.

15 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 аденокистозные карциномы, лимфомы и саркомы, а также доброкачественные опухоли легкого, такие как гамартомы, являются редкими.

20 Мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легкого лечат по-разному. В частности, SCLC является более отвечающим на химиотерапию и лучевую терапию, чем другие клеточные типы рака легкого. Однако сложно добиться излечения, так 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, возможно в комбинации с лучевой терапией.

25 Следовательно, все еще существует потребность в способах, обеспечивающих быструю, надежную и рентабельную диагностику рака легкого.

30 Это является целью настоящего изобретения.

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению теперь предложены способы диагностики *in vitro* рака легкого, где указанные способы включают выявление прогастрина в биологическом образце от субъекта. Предпочтительно определяется количество прогастрина в указанном образце, таким образом, обеспечивая количественное измерение прогастрина.

Человеческий пре-прогастрин – пептид из 101 аминокислоты (эталонная аминокислотная последовательность: AAB19304.1) – представляет собой первичный продукт трансляции гена гастрина. Прогастрин образуется отщеплением первых 21 аминокислот (сигнальный пептид) от препрогастрина. 80-аминокислотная цепь прогастрина подвергается дальнейшему процессингу отщепляющими и модифицирующими 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 и 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 способу оценки *in vitro* риска присутствия рака легкого, где указанный способ включает стадию выявления прогастрина в биологическом образце от субъекта. Присутствие прогастрина в образце указывает на то, что есть риск присутствия рака легкого.

Таким образом, в первом воплощении данное изобретение относится к способу оценки *in vitro* риска присутствия рака легкого у субъекта, причем указанный способ включает следующие стадии:

а) приведение в контакт биологического образца от указанного субъекта с по меньшей мере одной молекулой, связывающей прогастрин, и

б) выявление связывания указанной молекулы, связывающей прогастрин, с прогастрином в указанном образце, где указанное связывание указывает на риск присутствия рака легкого.

5 Связывание молекулы, связывающей прогастрин, может выявляться разными анализами, доступными специалисту. Несмотря на то, что в данное изобретение включаются любые подходящие способы проведения анализов, можно упомянуть, в частности, FACS (флуоресцентная сортировка клеток), ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), RIA (радиоиммуноанализ), вестерн-блоттинг и ИНС (иммуногистохимия).

10 В предпочтительном воплощении способ по изобретению для оценки *in vitro* риска присутствия рака легкого у субъекта включает следующие стадии:

а) приведение в контакт указанного биологического образца от указанного субъекта с по меньшей мере одной молекулой, связывающей прогастрин,

15 б) определение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце, где концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пМ в указанном биологическом образце указывает на риск присутствия рака легкого.

20 Как только определяется концентрация прогастрина, присутствующего в образце, данный результат можно сравнивать с результатами контрольного(ных) образца(цов), который(рые) получают аналогичным способом с опытными образцами, но от индивида(дов), для которого(рых) известно то, что он(они) не страдает(ют) от рака легкого. Если концентрация прогастрина значимо более высокая в опытном образце, можно сделать заключение о том, что имеется повышенная вероятность того, что субъект, от которого он был получен, имеет рак легкого.

25 Таким образом, в более предпочтительном воплощении способ по изобретению включает следующие дополнительные стадии:

в) определение контрольной концентрации прогастрина в контрольном образце,

30 г) сравнение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце с указанной контрольной концентрацией прогастрина,

д) оценка из сравнения стадии г) риска присутствия рака легкого.

Согласно другому аспекту данное изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака легкого у субъекта, причем указанный способ включает следующие стадии:

35 а) приведение в контакт биологического образца от указанного субъекта с по меньшей мере одной молекулой, связывающей прогастрин, и

б) выявление связывания указанной молекулы, связывающей прогастрин, с прогастрином в указанном образце, где указанное связывание указывает на присутствие рака легкого у указанного субъекта.

В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака легкого у субъекта, включающему следующие стадии:

а) приведение в контакт указанного биологического образца от указанного субъекта с по меньшей мере одной молекулой, связывающей прогастрин,

б) определение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце, где концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пМ в указанном биологическом образце указывает на присутствие рака легкого у указанного субъекта.

В более конкретном воплощении способа по изобретению концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пМ, по меньшей мере 20 пМ, по меньшей мере 30 пМ в указанном биологическом образце указывает на присутствие рака легкого у указанного субъекта.

В более предпочтительном воплощении способ по изобретению включает следующие дополнительные стадии:

а) определение контрольной концентрации прогастрина в контрольном образце,

б) сравнение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце с указанным контрольным уровнем или концентрацией прогастрина,

в) осуществление диагностики из сравнения по стадии г) присутствия рака легкого.

Согласно другому аспекту данное изобретение относится к способу осуществления диагностики *in vitro* метастазирующего рака легкого у субъекта, причем указанный способ включает следующие стадии:

а) приведение в контакт биологического образца от указанного субъекта с по меньшей мере одной молекулой, связывающей прогастрин, и

б) выявление связывания указанной молекулы, связывающей прогастрин, с прогастрином в указанном образце, где указанное связывание указывает на присутствие метастазирующего рака легкого у указанного субъекта.

В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* метастазирующего рака легкого у субъекта, от биологического образца указанного субъекта, включающему следующие стадии:

а) приведение в контакт указанного биологического образца с по меньшей мере одной молекулой, связывающей прогастрин,

б) определение посредством биохимического анализа уровня или концентрации прогастрина в указанном биологическом образце, где концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пМ или выше в указанном биологическом образце указывает на присутствие метастазирующего рака легкого у указанного субъекта.

В более конкретном воплощении способа по изобретению концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пМ, по меньшей мере 20 пМ, по меньшей мере 30 пМ, по меньшей мере 40 пМ или по меньшей мере 50 пМ в указанном биологическом образце указывает на присутствие метастазирующего рака легкого у указанного субъекта.

В более предпочтительном воплощении способ по изобретению включает следующие дополнительные стадии:

а) определение контрольной концентрации прогастрина в контрольном образце,

б) сравнение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце с указанной контрольной концентрацией прогастрина,

в) осуществление диагностики из сравнения по стадии г) присутствия метастазирующего рака легкого.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака легкого у субъекта, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце и сравнение указанного полученного значения с концентрацией прогастрина в контрольном образце.

В более конкретном воплощении в способе диагностики рака легкого согласно настоящему изобретению биологический образец указанного субъекта приводится в контакт с по меньшей мере одной молекулой, связывающей прогастрин, где указанная молекула, связывающая прогастрин, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Выражение «оценка риска присутствия рака легкого у субъекта» обозначает определение относительной вероятности для данного субъекта страдания от рака легкого по сравнению с контрольным субъектом или значением. Согласно способу по изобретению представлено средство в оценке указанного риска, в комбинации с другими способами или индикаторами, такими как клиническое обследование, биопсия и определение уровня известного биомаркера рака легкого.

Выражение «диагностика *in vitro*» означает определение того, страдает ли субъект от конкретного заболевания. Известно то, что постановка диагноза рака легкого включает по меньшей мере клиническое наблюдение симптомов указанного субъекта, такое как, например, сканирование низкодозовой спиральной компьютерной томографией (СТ). Хотя некоторые биомаркеры и были идентифицированы в фазе открытия, важным вызовом все еще является их перенос в клиническую практику, главным образом, из-за отсутствия способа систематической оценки (Li et al, Neoplasma. 2012, 59(5): 500-507).

Следовательно, способ диагностики *in vitro* рака легкого согласно настоящему изобретению может считаться средством в пределах процесса диагностики.

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 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.

Термин «прогастрин» обозначает пептид прогастрина млекопитающего и, в частности, человеческого прогастрина. Во избежание сомнений, без какого-либо точного определения, выражение «человеческий прогастрин» относится к человеческому PG (прогастрин) последовательности SEQ ID NO 1. А именно, человеческий прогастрин содержит N-концевой и C-концевой домены, которые не присутствуют в упомянутых выше биологически активных формах 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.

Определение концентрации прогастрина в способе по изобретению осуществляется любым способом, известным специалисту в области биохимии.

Предпочтительно определение уровней прогастрина в образце включает приведение в контакт указанного образца с молекулой, связывающей прогастрин, и измерение связывания указанной молекулы, связывающей прогастрин, с прогастрином.

При измерении уровней экспрессии на уровне белка оно может, в частности, осуществляться с использованием специфичных молекул, связывающих проагстрин, таких как, например, антитела, в частности, с использованием хорошо известных технологий, таких как окрашивание клеточной мембраны с использованием биотинилирования или других эквивалентных методик, с последующим иммуноосаждением специфичными антителами, вестерн-блоттинг, ELISA или ELISPOT (метод иммуноферментных пятен), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), радиоиммуноанализы (RIA), иммуногистохимия (IHC), иммунофлуоресценция (IF), биочипы с антителами или тканевые микрочипы в сочетании с иммуногистохимией. Другие подходящие методики включают FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции) или BRET (резонансный перенос энергии биолюминисценции), микроскопические или гистохимические способы на одиночных клетках с использованием одиночных или многих длин волн возбуждения и применение любого из адаптированных оптических способов, таких как электрохимические способы (методики вольтамперметрии и амперометрии), атомно-силовая микроскопия и радиочастотные способы, например, мультиполярная резонансная спектроскопия, конфокальная и неконфокальная микроскопия, выявление флуоресценции, люминисценции, хемилюминисценции, поглощения, отражательной способности, коэффициента пропускания и двойного лучепреломления или коэффициента преломления (например, поверхностный плазмонный резонанс, эллипсометрия, способ резонирующего зеркала, способ интерферометрии со световодом с решеточным выводом), клеточный ELISA, проточная цитометрия, радиоизотопная, магнитно-резонансная визуализация, анализ посредством гель-электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия); ВЭЖХ(высокоэффективная жидкостная хроматография)-масс-спектрометрия; жидкостная хроматография/масс-спектрометрия/масс-спектрометрия (ЖХ-МС/МС). Все данные методики хорошо известны в данной области, и их не нужно здесь дополнительно подробно описывать. Данные разные методики можно использовать для измерения уровней проагстрина.

Указанный способ может, в частности, быть выбран среди следующих: способ, основанный на иммуновыявлении, способ на основе вестерн-блоттинга, способ на основе масс-спектрометрии, способ на основе хроматографии и способ на основе проточной цитометрии. Хотя в пределы данного изобретения и включаются любые подходящие способы для осуществления анализов, особенно

полезными для проведения способа по изобретению являются такие способы, как FACS, ELISA, RIA, вестерн-блоттинг и IHC.

В более конкретном воплощении способ диагностики *in vitro* рака легкого по изобретению включает приведение в контакт биологического образца от субъекта с молекулой, связывающей прогастрин, с использованием иммуноферментного анализа, предпочтительно основанного на методиках, выбранных среди RIA и ELISA.

«Биологический образец» в том виде, в котором он используется в данном документе, представляет собой образец биологической ткани или жидкости, 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 секретлируемым белком. Предпочтительные биологические образцы для 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. 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.

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. «Раковый образец», таким образом, должен ограничиваться опухолевой тканью, взятой от пациента. Указанный «раковый образец» может 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 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».

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 натоцк.

Определение концентрации прогастрина относится к определению количества прогастрина в известном объеме образца. Концентрация прогастрина может быть выражена относительно контрольного образца, например, как отношение или процентная доля. Данная концентрация также может быть выражена как интенсивность или локализация сигнала, в зависимости от способа, использованного для определения указанной концентрации. Предпочтительно концентрация соединения в образце выражается после нормирования общей концентрации родственных соединений в указанном образце, например, уровень или концентрация белка выражается после нормирования общей концентрации белков в образце.

Предпочтительно риск того, что указанный субъект страдает от рака легкого, определяется сравнением уровня прогастрина, измеренного в указанном биологическом образце, с контрольным уровнем.

5 Термин «контрольный уровень» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к уровню экспрессии рассматриваемого маркера рака легкого, т.е. прогастрина, в контрольном образце. «Контрольный образец» в том виде, в котором данный термин используется в данном документе, означает образец, полученный от субъектов, предпочтительно двух или более чем двух субъектов, для которых известно то, что они не имеют заболевания или, в качестве альтернативы, происходят из общей популяции. Подходящие контрольные уровни экспрессии прогастрина могут быть определены измерением уровней экспрессии указанного маркера у нескольких подходящих субъектов, и такие контрольные уровни могут быть скорректированы по отношению к конкретным популяциям субъектов. Контрольное значение или контрольный уровень может представлять собой абсолютное значение; относительное значение; значение, которое имеет верхнюю или нижнюю границу; интервал значений; среднее значение; медианное значение; усредненное значение или значение, которое сравнивается с конкретным контрольным или исходным значением. Контрольное значение может быть основано на значении индивидуального образца таком как, например, значение, полученное от образца от анализируемого субъекта, но в более ранний момент времени. Контрольное значение может быть основано на большом числе образцов, как, например, из популяции субъектов хронологической соответствующей по возрасту группы или основано на объединении образцов, включающем или исключаящем образец, подлежащий анализу.

25 Преимущественно «контрольный уровень» представляет собой заданный уровень прогастрина, полученный от биологического образца от субъекта с известным конкретным статусом в отношении рака. В конкретных воплощениях контрольный уровень, использованный для сравнения с опытным образцом на стадии (б), возможно был получен от биологического образца от здорового субъекта или от биологического образца от субъекта, страдающего от рака; понятно то, что контрольный профиль экспрессии также может быть получен из объединения биологических образцов здоровых субъектов или из объединения биологических образцов здоровых субъектов, или из объединения образцов от субъектов, имеющих раковое заболевание.

35 В конкретном воплощении способа по изобретению контрольный образец отбирают от субъектов, не имеющих какого-либо ракового заболевания и

предпочтительно какой-либо патологии. Следует понимать то, что согласно природе биологического образца, отобранного у пациента, контрольный образец будет представлять собой биологический образец той же самой природы, что и указанный биологический образец.

5           Уровень прогастрина определяется в настоящем способе определением количества прогастрина, которое связывается молекулой, связывающей прогастрин, предпочтительно антителом, распознающим прогастрин.

          «Молекулой, связывающей прогастрин» в данном документе называется любая молекула, которая связывается с прогастрином, но не связывается с гастрин-17 (G17), гастрин-34 (G34), гастрин 17 с глициновым удлинением (G17-Gly) или гастрин 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 или его антигенсвязывающий фрагмент.

          Согласно конкретному воплощению настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака легкого, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце от субъекта, где указанный субъект демонстрирует по меньшей мере один клинический симптом рака легкого.

          Согласно другому конкретному воплощению настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака легкого, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце от субъекта, где указанный субъект демонстрирует по меньшей мере один клинический симптом рака и/или метастаза.

          Под терминами «связывающий», «связывается» или тому подобными подразумевается то, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент 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 связывается с прогастрином с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность в отношении связывания с неспецифичной молекулой, такой как BSA (бычий сывороточный альбумин) или казеин. В более

конкретном воплощении указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается только с прогастрином.

В конкретном воплощении в способе диагностики рака легкого по изобретению биологический образец от субъекта приводится в контакт с по  
5 меньшей мере одной молекулой, связывающей прогастрин, где аффинность указанной молекулы в отношении прогастрина составляет по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 90 нМ, по меньшей мере 80 нМ, по меньшей мере 70 нМ, по меньшей мере 60 нМ, по меньшей мере 50 нМ, по меньшей мере 40 нМ, по меньшей мере 30 нМ, по меньшей мере 20 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по  
10 меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 1 нМ, по меньшей мере 100 пМ, по меньшей мере 10 пМ или по меньшей мере 1 пМ при определении таким способом, как вышеописанный способ.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к способу диагностики рака легкого, включающему выявление концентрации прогастрина в  
15 биологическом образце от субъекта, где указанный биологический образец приводится в контакт с антителом против hPG или его антигенсвязывающим фрагментом.

Подразумевается то, что термин «антитело» в том виде, в котором он используется в данном документе, включает поликлональные и моноклональные  
20 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 переменную область (или домен) тяжелой цепи (сокращенные в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная  
25 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 подразделены на области гипервариабельности, именуемые «областями,  
30 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 CDR в пределах легкой и тяжелой цепей антитела и определения их  
35 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 стандартизированное ограничение каркасных областей и областей, определяющих комплементарность, CDR1-IMGT: 27-38, CDR2.

- 5           Уникальная нумерация IMGT была определена для сравнения  
вариабельных 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,  
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)].
- 10 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  
CYS), фенилаланин или триптофан 118 (J-PHE или J-TRP). Уникальная нумерация  
IMGT обеспечивает стандартизированное ограничение каркасных областей (FR1-  
15 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  
20 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.*  
25 *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  
30 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  
35 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.

5 «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.

10 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, 15 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) 20 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. 30

В конкретном воплощении указанный антигенсвязывающий фрагмент 35 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')<sub>2</sub>, 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 («ПЭГи́лирование») (пэгилированные фрагменты называются Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-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 переменной 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, 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 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:

- пептида, аминокислотная последовательность которого содержит или состоит из аминокислотной последовательности полноразмерного прогастрина и, в частности, полноразмерного человеческого прогастрина SEQ ID NO 1,
- 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 аминокислотной последовательности: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO 2),  
5 и
- пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует части или всей аминокислотной последовательности C-концевой части прогастрина и, в частности, пептидам, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности:  
10 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  
15 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,  
20 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-  
25 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).  
30 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  
35 (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 CKASGYIFTSYWVHWVKQRPG QGLEWIGGFYPGNSDSRYNQ KFKGKATLTAVTSASTAYMDLS SLTNEDSAVYFCTRRDSPQYW GQGTTLVSS	SEQ ID NO 41
		mVL 3	DVLMQTPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQ KPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRLEAED LGVYYCFQGSHVPFTFGGGTK LEIK	SEQ ID NO 42
		huVH 3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYIFTSYWVHWVRQAPG QRLEWMGGFYPGNSDSRYSQ KFQGRVTITRDTSASTAYMELS SLRSEDVAVYYCTRRDSPQYW GQGTLVTVSS	SEQ ID NO 53
		huVL 3	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQSIVHSNGNTYLEWFQQ RPGQSPRRLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCFQGSHVPFTFGGGT KVEIK	SEQ ID NO 54

Таблица 1

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
20D2C3G2	mAb4	CDR 1 VH	GYTFSSW	SEQ ID NO 10
		CDR 2 VH	FLPGSGST	SEQ ID NO 11
		CDR 3 VH	ATDGNYDWFAY	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 HGLEWIGEFLLPGSGSTDYNEK FKGKATFTADTSSDTAYMLLSS LTSEDSAVYYCATDGNYDWFAY YWGQGTLLTVSA	SEQ ID NO 43
		mVL 4	DLVMTQTPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSLVHSSGVTYLHWYLQ KPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHVPPTFGSGTK LEIK	SEQ ID NO 44
		huVH 4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFSSSWMHWRQAP GQGLEWMGIFLLPGSGSTDYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCATDGNYDWFAY FAYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO 55
		huVL 4	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CKSSQSLVHSSGVTYLYWYLQ KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCSQSTHVPPTFGQGT KLEIK	SEQ ID NO 56

Таблица 2

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности	SEQ ID NO	
1E9D9B6	mAb16	CDR 1 VH	GYTFTSY Y	SEQ ID NO 16
		CDR 2 VH	INPSNGGT	SEQ ID NO 17
		CDR 3 VH	TRGGYYPFDY	SEQ ID NO 18
		CDR 1 VL	QSLDSDGKTY	SEQ ID NO 19
		CDR 2 VL	LVS	SEQ ID NO 20
		CDR 3 VL	WQGT HSPYT	SEQ ID NO 21
		mVH 16	QVQLQQSGAELVKPGASVKLS CKASGYTFTSYMYWVKQRP GQGLEWIGEINPSNGGTNFNE KFKSKATLTVDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCTRGGYYPFD YWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO 45
		mVL 16	DVVMQTPLTSLVTIGRPASIS CKSSQSLDSDGKTYLYWLLQ RPGQSPKRLIYLVSELD SGVPD RITGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYYCWQGT HSPYTFGGGT KLEIK	SEQ ID NO 46
		huVH 16a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMYWVRQAP GQGLEWMGIINPSNGGTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCTRGGYYPF DYWGQGT TTVTVSS	SEQ ID NO 57
		huVH 16b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMHWRQAP GQGLEWMGIINPSNGGTSYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCTRGGYYPF	SEQ ID NO 58

			DYWGQGTTVTVSS	
		huVH 16c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMYWVRQAP GQGLEWMGEINPSNGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCTRGGYYP FDYWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO 59
		huVL 16a	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQSLLDSDGKTYLYWFQQ RPGQSPRRLIYLVSNRDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHSPYTFGQG TKLEIK	SEQ ID NO 60
		huVL 16b	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQSLLDSDGKTYLNWFQQ RPGQSPRRLIYLVSNRDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHSPYTFGQG TKLEIK	SEQ ID NO 61
		huVL 16c	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQSLLDSDGKTYLYWFQQ RPGQSPRRLIYLVSERDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHSPYTFGQG TKLEIK	SEQ ID NO 62

Таблица 3

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		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	SQHRITYT	SEQ ID NO 25

	CDR 2 VL	VKKDGS	SEQ ID NO 26
	CDR 3 VL	GVGDAIKGQSVFV	SEQ ID NO 27
	mVH 19	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLT CTVTGYSITSDYAWNWRQFP GNKLEWMGYISFSGYTSYNPS LKSRI SVTRDTSRNQFFLQLTS VTTEDTATYYCAREVNYGDSY HFDYWGQGTIVTVSS	SEQ ID NO 47
	mVL 19	QLALTQSSSASFSLGASAKLTC TLSSQHRITYIEWYQQQLKP PKYVMEVKKDGSSTGHGIPD RFGSSSGADRYLSISNIQPED EAIYICGVGDAIKGQSVFVFGG GTKVTVL	SEQ ID NO 48
	huVH 19a	QVQLQESGPGLVKPSQTLST CTVSGYSITSDYAWNWRQHP GKGLEWIGYISFSGYTYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREVNYGDSYH FDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO 63
	huVH 19b	QVQLQESGPGLVKPSQTLST CTVSGYSITSDYAWSWRQHP GKGLEWIGYISFSGYTYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREVNYGDSYH FDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO 64
	huVH 19c	QVQLQESGPGLVKPSQTLST CTVSGYSITSDYAWNWRQHP GKGLEWIGYISFSGYTSYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREVNYGDSYH FDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO 65
	huVL 19a	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC TLSSQHRITYIEWHQQQPEKG PRYLMKVKKDGSHTSKGDGIPD	SEQ ID NO 66

			RFSGSSSSGAERYLTISSLQSED EADYYCGVGDAIKGQSVFVFG GGTKVEIK	
		huVL 19b	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC TLSSQHRITYTIAWHQQQPEKG PRYLMKVKKDGSHSKGDGIPD RFSGSSSSGAERYLTISSLQSED EADYYCGVGDAIKGQSVFVFG GGTKVEIK	SEQ ID NO 67
		huVL 19c	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC TLSSQHRITYTIEWHQQQPEKG PRYLMEVKKDGSHSKGDGIPD RFSGSSSSGAERYLTISSLQSED EADYYCGVGDAIKGQSVFVFG GGTKVEIK	SEQ ID NO 68

Таблица 4

Примеры моноклональных антител, которые могут быть получены с использованием иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность “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 связывается с эпитопом в пределах указанной С-концевой аминокислотной последовательности hPG. Другим примером моноклонального антитела, которое может быть получено таким образом, является антитело Mab14, продуцируемое гибридомой 2H9F4B7, описанной в WO 2011/083088. Гибридома 2H9F4B7 была депонирована согласно Будапештскому соглашению в CNCM, Институт Пастера, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Париж CEDEX 15, Франция, 27 декабря 2016 г., согласно ссылке I-5158 (см. WO 2017/114973).

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последова-		SEQ ID NO
-------------------------	-----	---------------------------	--	-----------

		тельности		
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	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLSG VPDRFSSSGSGTDFTLKISR EAEDVGVYYCAQNLELPLTF GGGTKVEIK	SEQ ID NO 50
		VH hZ8CV1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWRQA PGKGLEWVSSISSGGTYTY ADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGN YSLDFWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO 69
VL hZ8CV1	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISR EAEDVGVYYCAQNLELPLTF GGGTKVEIK	SEQ ID NO 70		
VH hZ8CV2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWRQA PGKGLEWVATISSGGTYTY ADSVKGRFTISRDNKNSLYL	SEQ ID NO 71		

		QMNSLRAEDTAVYYCATQGN YSLDFWGQGTTVTVSS	
	VL hZ8CV2	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASI SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCAQNLELPLTF GGGTKVEIK	SEQ ID NO 72
	CH hZ8CV2	EVQLVESGGGLVPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWRQA PGKGLEWVATISSGGTYTY ADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGN YSLDFWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	SEQ ID NO 73
	CL hZ8CV2	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASI SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRV	SEQ ID NO 74

			EAEDVGVVYCAQNLELPLTF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSST LTLKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	
--	--	--	--	--

Таблица 5

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		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 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MTSLKSEDTAIYYCARGTGTY WGQGTTLTVSS	SEQ ID NO 51
		mVL 13	DVLTQTPLTSLVTIGQPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWLL QRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVE AEDLGVYYCWQGTHFPQTF GGGKLEIK	SEQ ID NO 52
		huVH 13a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFIFSSYGMSWRQA PGKGLEWANINTFGDRTYY VDSVKGRFTISRDNKNSLYL	SEQ ID NO 75

			QMNSLRAEDTAVYYCARGTG TYWGQGTLVTVSS	
		huVH 13b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFIFSSYGMSWRQA PGKGLEWVASINTFGDRYY VDSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGTG TYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO 76
		huVL 13a	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCRSSQSLLDSDGKTYLNWF QQRPGQSPRRLIYLVSNRDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCWQGTHFP QTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO 77
		huVL 13b	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCRSSQSLLDSDGKTYLNWF QQRPGQSPRRLIYLVSKRDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCWQGTHFP QTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO 78

Таблица 6

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

В более конкретном воплощении в способе по изобретению указанный биологический образец приводится в контакт с антителом против hPG или его антигенсвязывающим фрагментом, где указанное антитело против hPG выбрано среди антител против N-конца hPG и антител против C-конца hPG.

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 С-конца hPG» относится к антителам, связывающимся с эпитопом, расположенным в домене прогастрина, последовательность которого представлена SEQ ID NO 3.

5 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  
10 представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые сахарые 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  
15 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.

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

- 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 4, 5 и 6,  
25 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,  
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 7, 8 и 9, соответственно,  
35

- 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 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,
- 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 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,
- 5
- 10
- 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
- 15
- 20
- 25
- 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
- 30
- 35

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 другом воплощении антитело представляет собой моноклональное антитело, продуцируемое гибридомой, депонированной в CNCM, Институт Пастера, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Париж CEDEX 15, Франция, 27 декабря 2016 г., согласно ссылке I-5158 (см. WO 2017/114973).

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.

5 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;
- 10 • 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;
- 15 • 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
- 20 • моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 51 и легкую цепь аминокислотной последовательности SEQ ID NO 52.

25 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  
30 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  
35 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:

- 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,

- 5 • 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  
10 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 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,
- 20 • 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  
25 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  
30 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,
- 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 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,
- гуманизованное 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
  - гуманизованное 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 гуманизованное антитело, выбранное в группе, состоящей из следующих:

- гуманизованное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 53 и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 54;
- гуманизованное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 55 и переменную область легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO 56;
- гуманизованное 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;
- гуманизованное 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;
- гуманизованное 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
- гуманизованное 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;

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

В первом воплощении способ по изобретению включает приведение в контакт биологического образца с антителом против hPG, связывающимся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп располагается в пределах С-концевой части hPG, или с эпитопом, расположенным в пределах N-концевой части hPG.

10 В более конкретном воплощении способ по изобретению включает приведение в контакт биологического образца с антителом против hPG, связывающимся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина, выбранной среди аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 10-14 hPG, аминокислотам 9-14 hPG, аминокислотам 4-10 hPG, аминокислотам 2-10 hPG и аминокислотам 2-14 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO 1.

20 В более конкретном воплощении способ по изобретению включает приведение в контакт биологического образца с антителом против hPG, связывающимся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности С-концевой части прогастрина, выбранной среди аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 71-74 hPG, аминокислотам 69-73 hPG, аминокислотам 71-80 hPG (SEQ ID NO 40), аминокислотам 76-80 hPG и аминокислотам 67-74 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO 1.

30 В первом воплощении композиция согласно изобретению содержит антитело, распознающее эпитоп, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности прогастрина.

В более конкретном воплощении композиция по изобретению содержит антитело, распознающее 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 представляет собой SEQ ID NO 1.

5 В более конкретном воплощении композиция по изобретению содержит антитело, распознающее эпитоп прогастрина, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности С-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.

10 В конкретном воплощении способа диагностики *in vitro* рака легкого по изобретению указанный способ включает стадию приведения в контакт биологического образца от субъекта с первой молекулой, которая связывается с первой частью прогастрина, и со второй молекулой, которая связывается со второй частью прогастрина. В более конкретном воплощении, в котором указанная молекула, связывающая прогастрин, представляет собой антитело, биологический образец от субъекта приводится в контакт с антителом, которое связывается с первым эпитопом прогастрина, и со вторым антителом, которое связывается со вторым эпитопом прогастрина.

20 В конкретном воплощении способа по изобретению указанный способ включает стадию приведения в контакт биологического образца от субъекта с первым агентом, который связывается с первой частью прогастрина, и со вторым агентом, который связывается со второй частью прогастрина. В более конкретном воплощении, в котором указанная молекула, связывающая прогастрин, представляет собой антитело, биологический образец от субъекта приводится в контакт с антителом, которое связывается с первым эпитопом прогастрина, и со вторым антителом, которое связывается со вторым эпитопом прогастрина.

30 Согласно предпочтительному воплощению указанное первое антитело связывается с нерастворимым или частично растворимым носителем. Связывание прогастрина указанным первым антителом приводит к захвату прогастрина из указанного биологического образца. Предпочтительно указанное первое антитело представляет собой антитело, связывающееся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности С-концевой части прогастрина, как описано выше. Более предпочтительно указанное первое антитело представляет собой 35 моноклональное антитело Mab14, продуцируемое гибридомой 2H9F4B7, описанное в WO 2011/083088. Гибридома 2H9F4B7 была депонирована согласно

Будапештскому соглашению в CNCM, Институт Пастера, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Париж CEDEX 15, Франция, 27 декабря 2016 г., согласно ссылке I-5158 (см. WO 2017/114973).

Согласно другому предпочтительному воплощению указанное второе  
5 антитело метится выявляемой группировкой, как описано ниже. Связывание прогастрина вторым антителом обеспечивает выявление молекул прогастрина, которые присутствовали в биологическом образце. Кроме того, связывание прогастрина вторым антителом обеспечивает количественное измерение молекул прогастрина, которые присутствовали в биологическом образце. Предпочтительно  
10 указанное второе антитело представляет собой антитело, связывающееся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина, как описано выше. Более предпочтительно указанное антитело к N-концу представляет собой поликлональное антитело, как описано  
15 выше. В качестве альтернативы, также можно применять моноклональное антитело, связывающееся с эпитопом в пределах N-конца прогастрина, такое как, например, моноклональные антитела к N-концу, описанные выше, а именно: моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 16, 17 и 18,  
20 соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 19, 20 и 21.

В особенно предпочтительном воплощении первое антитело связывается с нерастворимым или частично растворимым носителем, и второе антитело метится выявляемой группировкой.

25 В предпочтительном воплощении способ по настоящему изобретению для диагностики рака легкого включает выявление прогастрина в биологическом образце от человеческого субъекта.

В более предпочтительном воплощении способ по настоящему изобретению для диагностики рака легкого включает определение концентрации  
30 прогастрина в биологическом образце от человеческого субъекта.

В другом конкретном воплощении способ по настоящему изобретению для диагностики рака легкого включает определение концентрации прогастрина в биологическом образце от человеческого субъекта, где указанный биологический образец выбран из крови, сыворотки и плазмы.

35 В другом предпочтительном воплощении способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с

антителом против hPG, как описано выше, где связывание указанного антитела против hPG в образце указывает на присутствие у указанного субъекта рака легкого.

5 В более конкретном воплощении способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с антителом против hPG, как описано выше, где концентрация прогастрина выше 10 пМ в указанной плазме указывает на присутствие у указанного субъекта рака легкого.

10 Более предпочтительно способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с антителом против hPG, как описано выше, где концентрация прогастрина выше 10 пМ, 20 пМ, 30 пМ или 40 пМ в указанном образце указывает на присутствие у указанного субъекта рака легкого.

15 Еще более предпочтительно способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с антителом против hPG, как описано выше, где концентрация прогастрина выше 10 пМ, предпочтительно выше 20 пМ, более предпочтительно выше 30 пМ, еще более предпочтительно выше 40 пМ, даже более предпочтительно выше 50 пМ в указанном образце указывает на присутствие у указанного субъекта метастазирующего рака легкого.

20 Настоящее изобретение также относится к способам отслеживания эффективности лечения рака легкого у пациента, такого как химиотерапия, биологическая терапия, иммунотерапия или терапия антителами, посредством определения концентрации прогастрина в первом образце, таком как жидкость организма или биопсия рака легкого, полученная от пациента до лечения рака легкого, и затем сравнения концентрации прогастрина в первом образце с концентрацией во втором образце, полученном от того же самого пациента после  
25 лечения, где уменьшение концентрации прогастрина в указанном втором образце по сравнению с указанным первым образцом указывает на то, что лечение было эффективным.

30 В конкретном воплощении способ по изобретению включает сравнение концентрации прогастрина в биологическом образце, полученном от пациента, с заданным значением концентрации прогастрина в образце, в более конкретном воплощении указанное заданное значение выбрано среди: среднего или усредненного значений образца на основе среднего или усредненного определения значения в популяции не имеющих рака легкого, значения концентрации прогастрина, полученной, когда было известно то, что пациент не  
35 имеет рака легкого.

В конкретном воплощении способ по изобретению для диагностики *in vitro* рака легкого включает определение концентрации прогастрина в образце от указанного пациента и второй диагностический анализ рака легкого. В более конкретном воплощении способ по изобретению для диагностики *in vitro* рака легкого включает определение концентрации прогастрина в образце от указанного пациента и второй диагностический анализ рака легкого, где указанный второй диагностический анализ включает выявление конкретного биомаркера, выбранного среди следующих: карциноэмбриональный антиген (CEA), нейронспецифичная енолаза (NSE), цитокератин 19 (CYFRA-21-1), альфа-фетопротеин, углеводный антиген-125 (CA-125), углеводный антиген-19.9 (CA-19.9) и ферритин, независимо или в комбинации (Li et al, 2012).

В конкретном воплощении изобретения способ по настоящему изобретению включает определение уровня прогастрина с течением времени в образцах от пациента, которого лечили или лечат от рака легкого.

Характеристики воплощений данного изобретения станут очевиднее из следующего подробного описания приведенных ниже примеров.

## ЛЕГЕНДЫ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**Фиг. 1:**

Концентрацию прогастрина измеряли в 40 образцах плазмы от пациентов с раком легкого и в 119 образцах плазмы от здоровых доноров с использованием набора ELISA DECODE Lab (захватывающее антитело: Mab14, выявляющее антитело: поликлональное против hPG).

## ПРИМЕРЫ

**Пример 1: определение плазматической концентрации прогастрина с использованием поликлональных антител**

Плазматические уровни прогастрина количественно измеряли ELISA посредством применения двух специфичных антител против прогастрина: захватывающими антителами покрывают лунки планшета, тогда как обнаруживающие антитела используются для выявления прогастрина и опосредуют обнаружение сигнала.

В настоящем примере количественное измерение основывается на способе ELISA, который обеспечивает, посредством применения субстрата, реакция

которого испускает свет, приписывание значения, пропорционального люминисценции, количеству антител, связавшихся с антигеном, удерживаемым захватывающими антителами.

Материал

5 Реактивы и прибор перечисляются в Таблице 7:

Обозначение	Продавец	Ссылка
Белые планшеты MaxiSORP Nunc, 96 лунок	Dutscher	# 055221
Карбонат/бикарбонат натрия	Sigma	# 21851
DPBS 1×	Lonza	# P04-36500
Tween-20	Biosolve	# 20452335
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
Стрептавидин-HRP(пероксидаза хрена)	Pierce (Thermo)	# 21130
Субстрат для максимальной чувствительности SuperSignal ELISA Femto	Pierce (Thermo)	# 37074
Поликлональное антитело против прогастрина	Eurogentec	/

Таблица 7

Поликлональные антитела получали иммунизированием кролика N-концом прогастрина (SEQ ID NO 2) или C-концом прогастрина, соответствующим аминокислотам 71-80 hPG и имеющим последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO 40), согласно стандартным протоколам.

Характеристики связывания поликлональных антител против прогастрина, используемых в данном анализе, являются следующими: отсутствие связывания с G34-Gly, G34, G17-Gly, G17, связывание с полноразмерным прогастрином.

15 96-Луночные планшеты покрывают получением 50 мМ раствора карбоната-бикарбоната натрия, pH 9,6, растворением содержимого одной капсулы в 100 мл воды MilliQ. Раствор захватывающего антитела (3 мкг/мл), соответствующего поликлональным антителам, полученным с использованием C-конца прогастрина FGRRSAEDEN (SEQ ID NO 40), готовят в карбонатном буфере. 100 микролитров  
20 раствора антител добавляют в каждую лунку и инкубируют при 4°C в течение 16 часов (1 ночь). Планшеты затем блокируют устранением раствора антител и промывкой 3 раза 300 мкл 1× PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) / 0,1% Tween-20, затем добавлением 200 мкл блокирующего буфера (1× PBS / 0,1% Tween-20 / 0,1% BSA) на лунку и инкубированием 2 часа при 22°C. Блокирующий  
25 буфер затем устраняют, лунки промывают 3 раза 300 мкл 1× PBS / 0,1% Tween-20.

Разведение плазмы проводится следующим образом: плазма используется в чистом виде, разведенной 1/2, 1/5 и 1/10. Разведения проводятся из чистой плазмы в 1× PBS / 0,1% Tween-20 / 0,1% BSA.

Для контрольного анализа проводится ELISA в присутствии известной концентрации прогастрина, разведение прогастрина получают следующим образом: маточный рекомбинантный PG (полноразмерный человеческий прогастрин, продуцированный в *E. coli* и аффинно очищенный с использованием глутатиона-агарозы/удаления метки (Tev)/очистки на IMAC Counter/диализа, от Института Пастера, Париж, Франция) готовят в концентрации 0,45 мг/мл (45 микроМ) в тройной повторности. Интервалы концентраций прогастрина получали следующим образом:

- раствор А: предварительное разведение 1/10, 2 мкл маточного раствора плюс 18 мкл буфера
- раствор В: предварительное разведение 1/100, 10 мкл А плюс 90 мкл буфера
- раствор С: предварительное разведение 1/1000, 10 мкл В плюс 90 мкл буфера
- раствор D: 500 пМ, 5,55 мкл С плюс 494,5 мкл разбавителя
- раствор E: 250 пМ, 250 мкл D плюс 250 мкл разбавителя
- раствор F: 100 пМ, 200 мкл E плюс 300 мкл разбавителя
- раствор G: 50 пМ, 250 мкл F плюс 250 мкл разбавителя
- раствор H: 25 пМ, 200 мкл G плюс 200 мкл разбавителя
- раствор I: 10 пМ, 100 мкл H плюс 150 мкл разбавителя

Интервал концентрации рекомбинантного PG является линейным и, следовательно, может быть более или менее широким согласно используемому антителу.

Для получения опытных образцов приблизительно 500 мкл каждого образца откладывают и хранят до анализа (и подтверждения, если это необходимо) результатов. 100 мкл каждой точки интервала и/или плазмы анализируют в чистом виде, разведенными 1/2, 1/5 и 1/10, и инкубируют в течение 2 часов при 22°C на планшетах.

Для обнаружения результатов анализа планшеты 3 раза промывают 300 мкл 1× PBS / 0,1% Tween-20. Раствор поликлонального кроличьего антитела против прогастрина, где указанные антитела получали с использованием N-концевой части прогастрина в качестве иммуногена, связанного с биотином, в

концентрации 0,5 мкг/мл получали разведением в 1× PBS / 0,1% Tween-20 / 0,1% BSA. 100 мкл данного раствора добавляют в каждую лунку. Инкубация происходит в течение 1 часа при 22°C. Обнаружение стрептавидин-HRP осуществляется удалением выявляющего антитела и промывкой 3 раза 300 мкл 1× PBS / 0,1% Tween-20, затем получением раствора стрептавидин-HRP в концентрации 20 нг/мл, разведенного в 1× PBS / 0,1% Tween-20 / 0,1% BSA, где 100 мкл данного раствора добавляют в каждую лунку перед инкубацией в течение 1 часа при 22°C.

Выявление заключается в устранении стрептавидин-HRP и промывке 3 раза 300 мкл 1× PBS / 0,1% Tween-20, затем добавлении 100 мкл раствора хемилюминисцентного субстрата на лунку. Раствор субстрата получают смешиванием равных объемов двух растворов набора SuperSignal ELISA Femto, 20 мл плюс 20 мл, за 30 минут до применения, и хранят его при комнатной температуре в темноте. Люминисценция считывается после 5 минут инкубации при комнатной температуре в темноте.

Для каждого условия анализ проводится в тройной повторности, и результаты по интервалам будут представлены в виде графика, показывающего изменение люминисценции, в зависимости от концентрации прогастрина. Для каждого разведения плазмы определяется концентрация прогастрина с использованием уравнения прямой линейной регрессии соответствующего интервала (интервал 1/10-ой для образца, разведенного до 1/10-ой).

#### Способы и результаты

Медианная плазматическая концентрация прогастрина составляет 0 пМ у контрольных пациентов (n равно 103), тогда как у пациентов, имеющих рак легкого, может быть выявлена значимая плазматическая концентрация прогастрина. Таким образом, пациенты с раком легкого имеют более высокие уровни прогастрина в их плазме по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

#### **Пример 2: выявление концентрации прогастрина с использованием моноклональных антител против прогастрина**

Лунки 96-луночных планшетов Nunc MaxiSORP покрывают первым прогастринспецифичным антителом следующим образом. Моноклональные антитела против прогастрина, специфичные в отношении карбоксиконцевой области прогастрина, разводят до концентрации 3 мкг/мл в растворе 50 мМ натрий карбонатного/бикарбонатного буфера, pH 9,6, в воде MilliQ.

Всего 100 мкл раствора антитела затем добавляют в каждую лунку 96-луночных планшетов и инкубируют в течение ночи при 4°C. После связывания раствор антитела удаляют из лунок, которые затем три раза промывают 100 мкл промывочного буфера (1× PBS / 0,1% Tween-20). Затем в каждую лунку добавляют  
5 всего 100 мкл блокирующего буфера (1× PBS / 0,1% Tween-20 / 0,1% BSA) и инкубируют в течение 2 часов при 22°C. Блокирующий буфер затем удаляют, и лунки три раза промывают промывочным буфером. Затем добавляют в лунки образцы плазмы или сыворотки, выделенные от пациентов, в объеме 100 мкл в серии разведения – типично разведениях 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10 – и затем инкубируют в  
10 течение 2 часов при 22°C. Образцы плазмы или сыворотки анализируются в двойной повторности.

Анализы также включают две стандартные кривые. Первую стандартную кривую получают с использованием разведений рекомбинантного прогастрина до конечного количества 1 нг, 0,5 нг, 0,25 нг, 0,1 нг, 0,05 нг, 0,01 нг и 0 нг на лунку.  
15 Вторую стандартную кривую, которая служит в качестве негативного контроля, получают из негативной в отношении прогастрина человеческой сыворотки, разведенной в блокирующем буфере в таких же разведениях, что и опытные образцы, т.е. 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10. В качестве альтернативы, при анализе образцов плазмы, вторую стандартную кривую, которая служит в качестве негативного  
20 контроля, получают из негативной в отношении прогастрина человеческой плазмы, разведенной в блокирующем буфере в таких же разведениях, что и опытные образцы, т.е. 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10.

После завершения инкубации с образцами плазмы или сыворотки содержимое лунок удаляют, и лунки три раза промывают промывочным буфером,  
25 100 мкл/лунку, после чего прогастрин, связавшийся с первым антителом, выявляют с использованием второго антитела, специфичного в отношении прогастрина, следующим образом.

Связанные с биотином моноклональные антитела против прогастрина, специфичные в отношении аминоконцевой области прогастрина, разводят в  
30 блокирующем буфере до концентрации от 0,1 до 10 мкг/мл, в зависимости от антитела. В каждую лунку затем добавляют всего 100 мкл раствора антитела и инкубируют в течение 1 часа при 22°C.

После завершения связывания вторичного антитела планшеты три раза промывают промывочным буфером, 100 мкл/лунку, после чего в каждую лунку  
35 добавляют 100 мкл раствора стрептавидин-HRP (25 нг/мл в блокирующем буфере)

и инкубируют в течение 1 часа при 22°C. После завершения инкубации с раствором стрептавидин-HRP планшеты три раза промывают промывочным буфером, 100 мкл/лунку. Затем добавляют на лунку 100 мкл хемилюминисцентного субстрата, приготовленного с использованием набора хемилюминисцентного субстрата для максимальной чувствительности Pierce SuperSignal ELISA Femto, инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте и затем считывают на люминометре.

На основе показаний люминометра для получения уравнения прямых, соответствующих данным стандартной кривой, используют линейный регрессионный анализ. С использованием данного уравнения затем рассчитывается концентрация прогастрина в разных образцах пациентов.

Медианная плазматическая концентрация прогастрина рассчитывается у пациентов, имеющих рак легкого, и сравнивается с медианной плазматической концентрацией прогастрина в плазме контрольных пациентов. Пациенты с раком легкого имеют повышенные уровни прогастрина в их плазме по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

### **Пример 3: выявление плазматической концентрации прогастрина с использованием комбинации поликлональных антител и моноклональных антител**

В настоящем примере плазматические уровни прогастрина количественно измеряются ELISA посредством применения антитела, специфичного в отношении человеческого прогастрина (hPG), которым покрыт 96-луночный планшет. Стандарты и образцы добавляют в лунки, и любой присутствующий hPG связывается с иммобилизованным захватывающим антителом. Лунки промывают, и добавляют конъюгат выявляющего антитела против hPG с пероксидазой хрена (HRP), получая «сэндвич» антитело-антиген-антитело. После второй промывки добавляют раствор субстрата TMB (тетраметилбензидин), который дает синее окрашивание в прямой пропорции количеству hPG, присутствующего в исходном образце. Останавливающий раствор изменяет окраску от синей до желтой, и лунки считываются при 450 нм с использованием микропланшет-ридера.

Поликлональные антитела получают иммунизированием кролика N-концом прогастрина (SEQ ID NO 2) или C-концом прогастрина, соответствующим аминокислотам 71-80 hPG и имеющим последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO 40), согласно стандартным протоколам.

Моноклональные антитела получают с использованием гибридом, продуцирующих антитела против N-конца прогастрина (SEQ ID NO 2) или против C-конца прогастрина, соответствующего аминокислотам 71-80 hPG и имеющего последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO 40), согласно стандартным протоколам.

Характеристики связывания поликлональных и моноклональных антител против прогастрина, использованных в данном анализе, являются следующими: отсутствие связывания с G34-Gly, G34, G17-Gly, G17, связывание с полноразмерным прогастрином.

Для контрольного анализа проводится ELISA в присутствии известной концентрации прогастрина, разведение прогастрина получают следующим образом: маточный рекомбинантный PG (полноразмерный человеческий прогастрин, продуцированный в *E. coli* и аффинно очищенный с использованием глутатиона-агарозы/удаления метки (Tev)/очистки на IMAC Counter/диализа, от Института Пастера, Париж, Франция) готовят в концентрации 0,45 мг/мл (45 микроМ) в тройной повторности. Интервалы концентраций прогастрина получают следующим образом:

- раствор А: предварительное разведение 1/10, 2 мкл маточного раствора плюс 18 мкл буфера
- раствор В: предварительное разведение 1/100, 10 мкл А плюс 90 мкл буфера
- раствор С: предварительное разведение 1/1000, 10 мкл В плюс 90 мкл буфера
- раствор D: 500 пМ, 5,55 мкл С плюс 494,5 мкл разбавителя
- раствор E: 250 пМ, 250 мкл D плюс 250 мкл разбавителя
- раствор F: 100 пМ, 200 мкл E плюс 300 мкл разбавителя
- раствор G: 50 пМ, 250 мкл F плюс 250 мкл разбавителя
- раствор H: 25 пМ, 200 мкл G плюс 200 мкл разбавителя
- раствор I: 10 пМ, 100 мкл H плюс 150 мкл разбавителя

Интервал концентрации рекомбинантного PG является линейным и, следовательно, может быть более или менее широким согласно используемому антителу.

#### Способы и результаты

Уровни прогастрина определяются в образцах плазмы от субъектов, для которых позднее стало известно, что у них развился рак легкого. Прогастрин

захватывается моноклональным антителом mAb 14 против С-конца, продуцируемым гибридомой 2H9F4B7, описанной в WO 2011/083088 (гибридома 2H9F4B7 депонируется согласно Будапештскому соглашению в CNCM, Институт Пастера, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Париж CEDEX 15, Франция, 27 декабря 5 2016 г., согласно ссылке I-5158). Выявление осуществляется мечеными поликлональными антителами, специфичными в отношении N-конца.

Контроль составлен образцами плазмы из общей популяции.

Данные демонстрируют то, что пациенты с раком легкого имеют выявляемые уровни прогастрина в их плазме, тогда как здоровые контрольные 10 индивиды не имеют его.

#### **Пример 4: выявление плазматической концентрации прогастрина с использованием набора DECODE Lab**

Данный анализ обеспечивает измерение hPG в плазме-EDTA 15 (этилендиаминтетрауксусная кислота) посредством ELISA.

В данном наборе используется захватывающее антитело, специфичное в отношении hPG, которым предварительно покрыт 96-луночный планшет. hPG, присутствующий в стандартах и образцах, добавленных в лунки, связывается с иммобилизованным захватывающим антителом. Данные лунки промывают, и 20 добавляют конъюгат выявляющего антитела против hPG с пероксидазой хрена (HRP), приводя к образованию комплекса антитело-антиген-антитело. После второй промывки в лунку добавляют раствор субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB), получая синее окрашивание в прямой пропорции 25 количества hPG, присутствующему в исходном образце. Цвет останавливающего раствора изменяется от синего до желтого, и лунки считывают при 450 нм с использованием микропланшет-ридера.

#### Способы и результаты

Для измерения концентрации прогастрина использовали 40 образцов 30 плазмы от пациентов с раком легкого и 119 образцов плазмы от здоровых доноров с использованием набора ELISA DECODE Lab (захватывающее антитело: Mab14, выявляющее антитело: поликлональное против hPG), следуя рекомендации изготовителя.

#### **Вкратце:**

35 1. Приготовить все реактивы, контроли и образцы, как указано в предыдущем разделе, за исключением 1× конъюгата.

2. Удалить избыточную полоску из рамки планшета для микротитрования, вернуть его в упаковку для планшета и хранить при 2-8°C.

3. Образцы и контроли должны анализироваться в двойных повторностях. Приготовить предварительную загрузку контролей и образцов добавлением 65 мкл/повторность в лунки 96-луночных глубоколоночных полипропиленовых микропланшетов.

4. Добавить 50 мкл буфера для разведения образцов во все лунки, которые будут использоваться, из полосок предварительно покрытого 96-луночного планшета, включенного в набор.

5. Перенести 50 мкл контролей и образцов многоканальной пипеткой (8 каналов) из предварительно загруженных 96-луночных глубоколоночных полипропиленовых микропланшетов в полоски предварительно покрытого 96-луночного планшета, включенного в набор. Время загрузки не должно превышать 10 минут.

6. Покрыть планшет пластичным парафином и инкубировать в течение 3 ч плюс/минус 5 мин при 37°C (плюс/минус 2°C).

7. Приготовить 1× конъюгат, как описано в разделе 10.2.

8. В конце стадии инкубации отбросить всю жидкость из лунок посредством переворачивания планшета. Перейти к стадии тщательной промывки добавлением 300 мкл на лунку 1× промывочного раствора. Отбросить 1× промывочный раствор посредством переворачивания планшета и тщательно промокнуть рамку планшета для микротитрования на поглощающей бумаге, перевернув его вверх дном. Повторить стадию промывки 6 раз. В конце стадий промывки убедиться в полном удалении жидкости из лунок: вся жидкость была успешно удалена, когда на бумажном полотенце не остается признаков жидкости. Процедура промывки является критически важной. Недостаточная промывка может приводить к плохой точности и ложно повышенным показателям поглощения.

9. Добавить 100 мкл 1× конъюгата в каждую лунку.

10. Покрыть планшет пластичным парафином и инкубировать 30 мин плюс/минус 3 мин при 21°C (плюс/минус 5°C).

11. В конце стадии инкубации отбросить всю жидкость из лунок посредством переворачивания планшета. Перейти к стадии тщательной промывки посредством добавления 300 мкл на лунку 1× промывочного раствора. Отбросить 1× промывочный раствор посредством переворачивания планшета и тщательно промокнуть рамку планшета для микротитрования на поглощающей бумаге,

перевернув его вверх дном. Повторить стадию промывки 6 раз. В конце стадий промывки убедиться в полном удалении жидкости из лунок: вся жидкость была успешно удалена, когда на бумажном полотенце не остается признаков жидкости. Процедура промывки является критически важной. Недостаточная промывка будет

5 приводить к плохой точности и ложно повышенным показателям поглощения.

12. Добавить 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку. При добавлении раствора субстрата содержимое лунок позитивного контроля 1 и позитивного контроля 2 должно стать синим.

10 13. Инкубировать в течение 15 мин плюс/минус 2 мин при 21°C (плюс/минус 5°C) в темноте.

14. Без удаления содержимого лунок добавить 100 мкл останавливающего раствора в каждую лунку для того, чтобы остановить реакцию. При добавлении останавливающего раствора содержимое лунок позитивного контроля 1 и позитивного контроля 2 должно стать желтым.

15 15. Считать и записать ОП (оптическая плотность) при 450 нм.

Как показано на Фиг. 1, медианная плазматическая концентрация прогастрина составляла 0 пМ у контрольных пациентов (n равно 119), тогда как у пациентов, имеющих рак легкого (n равно 40), могла быть выявлена значимая плазматическая концентрация прогастрина. Таким образом, пациенты с раком

20 легкого имеют более высокие уровни прогастрина в их плазме по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

#### **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. Способ диагностики *in vitro* рака легкого у субъекта, включающий стадии, на которых:

5 а) приводят в контакт биологический образец от указанного субъекта с по меньшей мере одной молекулой, связывающей прогастрин,

б) выявляют связывание указанной молекулы, связывающей прогастрин, с прогастрином в указанном образце, где указанное связывание указывает на наличие рака легкого у указанного субъекта.

10 2. Способ по п. 1, в котором на стадии б) дополнительно определяют концентрацию прогастрина, и где концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пМ в указанном биологическом образце указывает на наличие рака легкого у указанного субъекта.

3. Способ по п. 2, включающий дополнительные стадии, на которых:

15 в) определяют контрольную концентрацию прогастрина в контрольном образце,

г) сравнивают концентрации прогастрина в указанном биологическом образце с указанной контрольной концентрацией прогастрина,

д) определяют из сравнения стадии г) наличие рака легкого.

20 4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная молекула, связывающая прогастрин, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны среди моноклональных антител против N-конца прогастрина и моноклональных антител против C-конца прогастрина.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором указанное антитело, связывающееся с прогастрином, представляет собой моноклональное антитело, выбранное в группе, состоящей из следующих:

30 - 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 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,

35 - 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 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,

- 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 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,

- 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, 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,

- 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 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,

- 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, 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, и

- моноклональное антитело, продуцированное гибридомой, депонированной в CNCM, Институт Пастера, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Париж CEDEX 15, Франция, 27 декабря 2016 г., согласно ссылке I-5158.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором определение по стадии а) включает следующее:

(i) приводят в контакт указанный образец с первой молекулой, связывающей прогастрин, которая связывается с первой частью прогастрина, и

5 (ii) приводят в контакт указанный образец со второй молекулой, связывающей прогастрин, которая связывается со второй частью прогастрина.

8. Способ по п. 7, в котором первая молекула, связывающая прогастрин, связывается с эпитопом в пределах С-конца прогастрина.

9. Способ по любому из пп. 7 или 8, в котором указанная молекула, связывающая прогастрин, представляет собой моноклональное антитело, продуцированное гибридомой, депонированной в CNCM, Институт Пастера, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Париж CEDEX 15, Франция, 27 декабря 2016 г., согласно ссылке I-5158.

10. Способ по любому из пп. 7-9, в котором вторая молекула, связывающая прогастрин, связывается с эпитопом в пределах N-конца прогастрина.

11. Способ по любому из пп. 7-10, в котором указанная вторая молекула, связывающая прогастрин, представляет собой поликлональное антитело, связывающееся с эпитопом в пределах N-конца прогастрина, или моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую следующие три CDR: CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 16, 17 и 18, соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три CDR: CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 19, 20 и 21 соответственно.

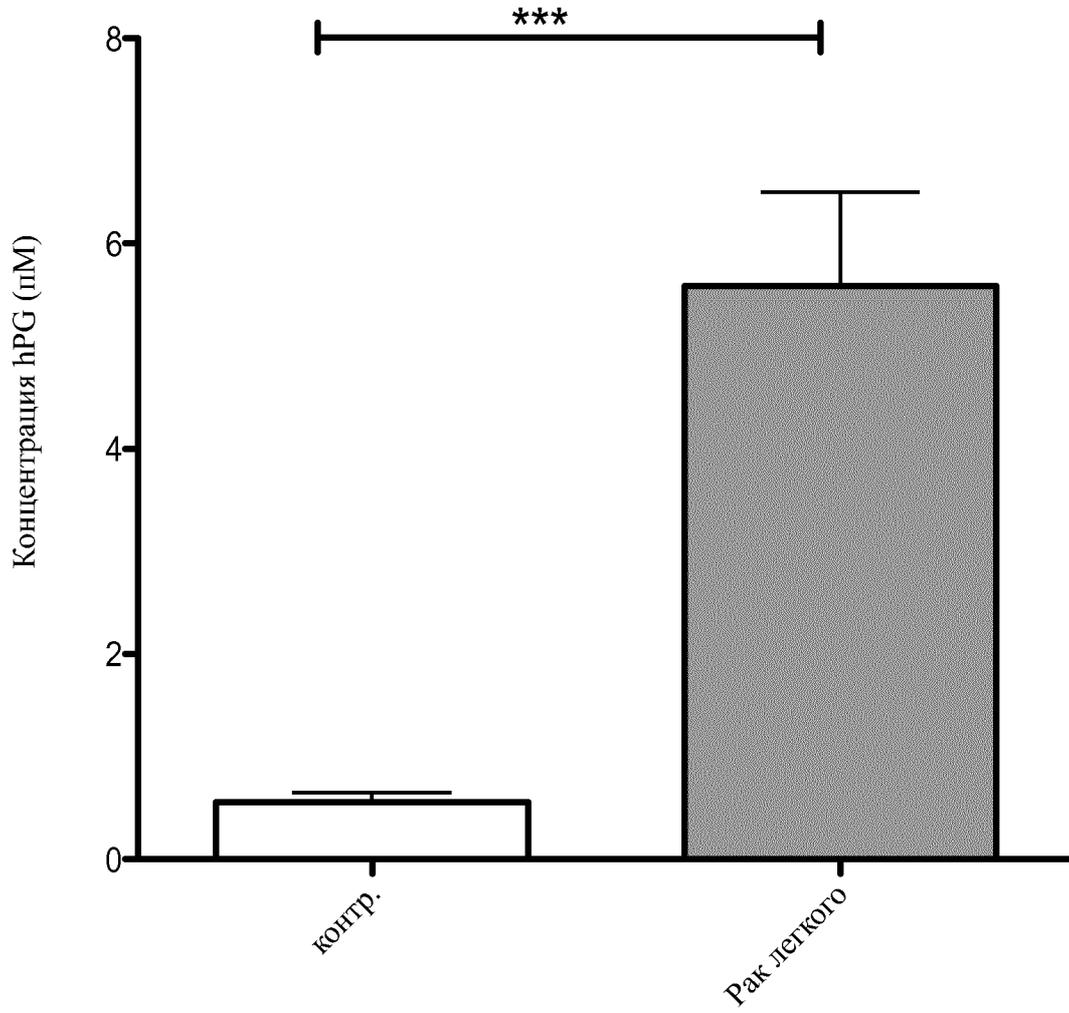
12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором уровень прогастрина определяется на стадии а) с использованием ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ).

13. Способ по любому из пп. 1-6, в котором указанный биологический образец приводят в контакт с первой молекулой, которая связывается с первой частью прогастрина, и со второй молекулой, которая связывается со второй частью прогастрина.

14. Способ по любому из пп. 1-7, в котором указанный биологический образец выбран среди: крови, сыворотки и плазмы.

15. Способ по любому из пп. 1-8, в котором указанный биологический образец представляет собой плазму, и в котором концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пМ указывает на наличие рака легкого у указанного субъекта.

16. Применение антитела, связывающегося с прогастрином, или его антигенсвязывающего фрагмента, таких же, как в любом из пп. 10-14, для диагностики *in vitro* рака легкого.



ФИГ. 1