

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037015**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.27

(21) Номер заявки
201891529

(22) Дата подачи заявки
2017.01.02

(51) Int. Cl. **G01N 33/574** (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ И СПОСОБ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ РАКА
ЯИЧНИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ
ПРОГАСТРИНСВЯЗЫВАЮЩЕЕ АНТИТЕЛО**

(31) 15307192.3; 16305138.6

(32) 2015.12.31; 2016.02.05

(33) EP

(43) 2019.01.31

(86) PCT/EP2017/050033

(87) WO 2017/114972 2017.07.06

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

(72) Изобретатель:
Приёр Александр (FR)

(74) Представитель:
Осипов К.В., Хмара М.В., Липатова
И.И., Новоселова С.В., Дощечкина
В.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев А.С.
(RU)

(56) Wouter W. Van Solinge ET AL.:
"Ovarian Cancers Express and Process Progastrin1",
CANCER RESEARCH, 15 April 1993 (1993-04-15),
pages 1823-1828, XP055284344, Retrieved from
the Internet: URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/53/8/1823.long>, abstract; p. 1823, col. 1, para
bridging col. 2; table 1; p. 1823, col. 2, para bridging
p. 1824

WO-A1-2008076454

WO-A2- 2011083091

AYAKO KIM ET AL.: "Therapeutic
strategies in epithelial ovarian cancer", JOURNAL
OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER
RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON
UK, vol. 31, no. 1, 13 February 2012 (2012-02-13),
page 14, XP021119397, ISSN: 1756-9966, DOI:
10.1186/1756-9966-31-14, abstract, Table 4-6; p. 6,
col. 1, para 2 - col. 2, para 3

US-A1-2010272635

(57) Изобретение относится к применению композиции для получения лекарственного средства для профилактики или лечения рака яичников, где композиция содержит прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, а также к способу профилактики или лечения рака яичников с использованием указанной композиции.

B1**037015****037015 B1**

Введение

Настоящее изобретение относится к *in vitro* диагностике, профилактике и лечению рака, в частности изобретение относится к способам *in vitro* диагностики рака яичников, а также к способам и композициям для профилактики или лечения рака яичников. Композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат прогастринсвязывающую молекулу, в частности антитело к прогастрину человека (hPG, от англ. human progastrin), а способы в соответствии с изобретением включают применение прогастринсвязывающей молекулы и, в частности, анти-hPG антитела.

Рак яичников возникает в клетках яичников, в тракте между горлом и желудком, и описан как восьмой по распространенности рак, поражающий в большей степени мужчин, чем женщин, с темпами, варьирующимися в широком диапазоне в зависимости от стран.

К двум наиболее распространенным типам рака яичников относятся плоскоклеточная карцинома яичников и аденокарцинома яичников. Известен также ряд более редких подтипов. Плоскоклеточная карцинома возникает в эпителиальных клетках пищевода, тогда как аденокарцинома образуется в glanduloцитах, присутствующих в нижней части пищевода.

Клиническая диагностика основана на биопсии, обычно осуществляемой с помощью компьютерной томографии или ультразвука. Неблагоприятный исход данного заболевания является результатом, в частности, поздней диагностики, обусловленной в свою очередь, в частности, отсутствием ранних признаков и симптомов. На сегодняшний день отсутствуют молекулярные биомаркеры, которые бы применялись в широкой клинической практике рака яичников (Kaz et al, Cancer Letters, 2014). Лечение зависит от развития рака и обычно включает хирургическое вмешательство в случае небольших локализованных опухолей или химиотерапию, зачастую в сочетании с лучевой терапией.

Таким образом, все еще сохраняется потребность в способах, позволяющих осуществлять быструю, надежную и экономически эффективную диагностику рака яичников, поскольку по-прежнему существует необходимость в новых композициях и способах, предназначенных для профилактики или лечения рака яичников.

Описание

Это является целью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение предлагает способы диагностики *in vitro* рака яичников, где указанный способ включает определение прогастрина в биологическом образце, взятом у субъекта. Предпочтительно определяют количество прогастрина в указанном образце, что позволяет количественно оценить прогастрин. Настоящее изобретение также предлагает композицию для применения для профилактики или лечения рака яичников, где указанная композиция содержит антитело, связывающееся с прогастрином, и способы профилактики или лечения рака яичников, включающие использование композиции, содержащей антитело, связывающееся с прогастрином, самостоятельно или в сочетании с любыми другими известными способами лечения или профилактики рака яичников.

Человеческий препрогастрин, представляющий собой пептид, состоящий из 101 аминокислоты (референсная аминокислотная последовательность: AAB19304.1), является первичным продуктом трансляции гена гастрин. Прогастрин образуется путем расщепления первых 21 аминокислот (сигнальный пептид) из препрогастрина. Состоящая из 80 аминокислот цепь прогастрина далее процессирует с помощью расщепляющих и модифицирующих ферментов с образованием нескольких биологически активных гормонов гастрин: гастрин 34 (G34) и удлиненного глицином гастрин 34 (G34-Gly), содержащих аминокислоты 38-71 прогастрина, гастрин 17 (G17) и удлиненного глицином гастрин 17 (G17-Gly), содержащих аминокислоты с 55 по 71 прогастрина.

Моноклональные антитела человека к прогастрину (анти-hPG) и их использование для диагностики или терапии описаны в следующих документах: в патентном документе WO 2011/083088 для колоректального рака (рака толстой и прямой кишки), в WO 2011/083090 для рака молочной железы, в WO 2011/083091 для рака поджелудочной железы, в WO 2011/116954 для рака толстой и прямой кишки и желудочно-кишечного тракта и в WO 2012/013609 и WO 2011/083089 для патологий печени.

Настоящее изобретение станет более понятным из приведенного подробного описания и прилагаемых графических материалов, представленных исключительно для иллюстрации и не ограничивающих предполагаемый объем изобретения.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к способу оценки *in vitro* риска наличия рака яичников, где указанный способ включает стадию определения прогастрина в биологическом образце от субъекта. Присутствие прогестина в образце указывает на то, что существует риск наличия рака яичников. Авторы настоящего изобретения впервые показали, что уровни прогастрина у пациентов, имеющих рак яичников, являются более высокими, чем у здоровых субъектов. Напротив, авторы предыдущих исследований пришли к выводу, что физиологическое значение экспрессии гастрина яичника трудно поддается оценке (von Solinge et al., Cancer Res., 1993, 53(8): 1823-1828).

Таким образом, согласно первому варианту осуществления изобретение относится к *in vitro* способу оценки риска наличия у субъекта рака яичников, при этом способ включает стадии:

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

б) обнаружение связывания прогастринсвязывающей молекулы с прогастрином в указанном образце, где связывание является показателем риска наличия рака яичников.

Связывание прогастринсвязывающей молекулы может быть обнаружено с помощью различных методов анализа, доступных специалисту в данной области техники. И хотя любые подходящие средства проведения анализов включены в объем изобретения, можно, в частности, упомянуть FACS (англ. Fluorescence Activated Cell Sorting - сортировка клеток с активированной флуоресценцией), ИФА (англ. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ферментносвязанный иммуносорбентный анализ), RIA (англ. Radioimmunoassay - радиоиммунный анализ), вестерн-блоттинг и ИНС (англ. Immunohistochemistry - иммуногистохимическое исследование).

Согласно предпочтительному варианту осуществления способ согласно изобретению для оценки *in vitro* риска наличия у субъекта рака яичников включает следующие стадии:

а) приведение в контакт биологического образца по меньшей мере с одной прогастринсвязывающей молекулой,

б) определение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце, где концентрация прогастрина в биологическом образце по меньшей мере 5 пмоль/л является показателем риска наличия рака яичников.

После определения концентрации прогастрина, присутствующего в образце, результат можно сравнить с результатом для контрольного образца (образцов), полученным (полученными) по аналогии с испытываемыми образцами, но взятым (взятыми) у людей, относительно которых известно, что они не страдают раком яичников. Если концентрация прогастрина в испытываемом образце оказывается значительно выше, можно сделать вывод, что существует повышенная вероятность того, что субъект, от которого получен этот образец, страдает раком яичников.

Таким образом, согласно более предпочтительному варианту осуществления способ по изобретению включает следующие дополнительные стадии:

с) определения референсной концентрации прогастрина в контрольном образце,

д) сравнения концентрации прогастрина в биологическом образце с референсной концентрацией прогастрина,

е) оценка на основании сравнения стадии д) риска наличия рака яичников.

Согласно другому аспекту изобретение относится к способу *in vitro* диагностики рака яичников у субъекта, при этом указанный способ включает стадии:

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

б) обнаружение связывания прогастринсвязывающей молекулы с прогастрином в указанном образце, где связывание является показателем наличия у субъекта рака яичников.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу *in vitro* диагностики рака яичников у субъекта, включающему стадии:

а) приведение в контакт биологического образца по меньшей мере с одной прогастринсвязывающей молекулой,

б) определение уровня или концентрации прогастрина в указанном биологическом образце, где концентрация прогастрина в биологическом образце по меньшей мере 5 пмоль/л является показателем наличия у субъекта рака яичников.

Согласно более конкретному варианту осуществления способа в соответствии с изобретением, концентрация прогастрина в указанном биологическом образце по меньшей мере 5, 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30 пмоль/л является показателем наличия у субъекта рака яичников.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления, способ по изобретению включает следующие дополнительные стадии:

с) определения референсной концентрации прогастрина в контрольном образце,

д) сравнения концентрации прогастрина в биологическом образце с референсным уровнем или референсной концентрацией прогастрина,

е) диагностики на основании сравнения стадии д) наличия рака яичников.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к способу *in vitro* диагностики метастазированного рака яичников у субъекта, при этом способ включает стадии:

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

б) обнаружение связывания прогастринсвязывающей молекулы с прогастрином в указанном образце, где связывание является показателем наличия у субъекта метастазированного рака яичников.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, настоящее изобретение относится к способу *in vitro* диагностики метастазированного рака яичников у субъекта на основании биологического образца от указанного субъекта, включающему стадии:

а) приведение в контакт биологического образца по меньшей мере с одной прогастринсвязывающей молекулой,

б) определение с помощью биохимического метода анализа уровня или концентрации прогастрина

в указанном биологическом образце, где концентрация прогастрина в биологическом образце по меньшей мере выше 5 пмоль/л является показателем наличия у субъекта метастазированного рака яичников.

Согласно более конкретному варианту осуществления способа в соответствии с изобретением, концентрация прогастрина в указанном биологическом образце по меньшей мере 5, 10 пмоль/л, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 пмоль/л является показателем наличия у субъекта метастазированного рака яичников.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления способ по изобретению включает следующие дополнительные стадии:

- c) определения референсной концентрации прогастрина в контрольном образце,
- d) сравнения концентрации прогастрина в указанном биологическом образце с референсным уровнем или референсной концентрацией прогастрина,
- e) диагностики на основании сравнения стадии d) наличия метастазированного рака яичников.

Согласно частному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу *in vitro* диагностики рака яичников у субъекта, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце и сравнение полученной величины с концентрацией прогастрина в контрольном образце.

Согласно более конкретному варианту осуществления в способе диагностики рака яичников в соответствии с настоящим изобретением биологический образец от указанного субъекта приводят в контакт по меньшей мере с одной прогастринсвязывающей молекулой, где прогастринсвязывающая молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Выражение "оценка риска наличия у субъекта рака яичников" означает определение относительной вероятности того, что данный субъект страдает раком яичников по сравнению с контрольным субъектом или значением. Способ в соответствии с изобретением представляет собой инструмент для оценки такого риска в сочетании с другими способами или показателями, такими как клиническое исследование, биопсия и определение уровня известного биомаркера рака яичников.

Согласно частному варианту осуществления, настоящее изобретение относится к способу *in vitro* диагностики рака яичников, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце от субъекта, где указанный субъект имеет по меньшей мере один клинический симптом рака яичников. Клинические симптомы рака яичников включают потерю веса, болезненное или затрудненное глотание, кашель, нарушение пищеварения и изжогу.

Согласно другому частному варианту осуществления, настоящее изобретение относится к способу *in vitro* диагностики рака яичников, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце от субъекта, где указанный субъект имеет по меньшей мере один клинический симптом рака или метастазирования.

Выражение "*in vitro* диагностика" означает определение того, страдает ли субъект тем или иным заболеванием.

Таким образом, способ *in vitro* диагностики рака яичников в соответствии с настоящим изобретением можно рассматривать как инструмент в ходе процесса диагностики.

Согласно более конкретному варианту осуществления, настоящее изобретение относится к способу *in vitro* диагностики рака яичников у субъекта, при этом способ включает определение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце и определение известного биомаркера рака яичников.

Термин "прогастрин" означает прогастриновый пептид млекопитающих и, в частности, прогастрин человека. Во избежание неопределенности, без каких-либо конкретизаций, выражение "прогастрин человека" относится к человеческому PG последовательности SEQ ID NO: 1. Прогастрин человека содержит, в частности, N-концевые и C-концевые домены, отсутствующие в биологически активных формах гормона гастрин, упоминавшихся выше. Предпочтительно, последовательность указанного N-концевого домена представлена с помощью SEQ ID NO: 2. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, последовательность указанного C-концевого домена представлена с помощью SEQ ID NO: 3.

Определение концентрации прогастрина согласно способу в соответствии с изобретением осуществляют с помощью любого способа, известного специалисту в области биохимии.

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

Измерение уровней экспрессии на уровне белка можно осуществлять с помощью прогастринсвязывающих молекул, таких как, например, антитела, в частности, с использованием хорошо известных технологий, таких как окрашивание мембраны с помощью биотинилирования или других эквивалентных способов с последующей иммунопреципитацией со специфическими антителами, вестерн-блоттинг, иммуноферментный анализ (ИФА, или ELISA) или метод иммуноферментных пятен (ELISPOT), твердофазный иммуносорбентный ферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA), иммуногистохимия (ИHC), иммунофлуоресценция (IF), микроципы антител или тканевые микроципы в сочетании с иммуногистохимией. Другие подходящие способы включают FRET (англ. Fluorescence Resonance Energy Transfer - метод резонансного переноса энергии флуоресценции) или BRET (англ. Bioluminescence Reso-

nance Energy Transfer - метод резонансного переноса энергии билюминесценции), микроскопические или гистохимические методы с использованием отдельных клеток и одной или нескольких длин волны возбуждения и с применением любого из адаптированных оптических методов, таких как электрохимические методы (методы вольтометрии и амперометрии), атомно-силовая микроскопия и радиоволновые методы, например многополюсная резонансная спектроскопия, конфокальная и неконфокальная, улавливание флуоресценции, люминесценции, хемилюминесценции, коэффициентов поглощения, отражения, пропускания и двойного лучепреломления или коэффициента преломления (например, поверхностный плазмонный резонанс, эллисометрия, метод резонансных зеркал, или интерферометрия), клеточный ИФА, проточная цитометрия, радиоизотопный анализ, магнитно-резонансная томография, анализ с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE); ВЭЖХ (англ. HPLC)-масс-спектрометрия; жидкостная хроматография/масс-спектрометрия/масс-спектрометрия (ЖХ-МС/МС (англ. LC-MS/MS)). Все эти способы хорошо известны в данной области техники и не нуждаются в дальнейшем подробном описании. Все они могут быть использованы для измерения уровней проагстрина.

Указанный способ, в частности, может быть выбран из способа, основанного на иммунодетектировании, способа, основанного на вестерн-блоттинге, способа, основанного на масс-спектрометрии, способа, основанного на хроматографии, и способа, основанного на проточной цитометрии. И хотя любое подходящее средство включено в объем изобретения, такие методы, как FACS, ИФА, RIA, вестерн-блоттинг и ИНС являются особенно полезными для осуществления способа по изобретению.

Согласно более конкретному варианту осуществления способ *in vitro* диагностики рака яичников в соответствии с изобретением включает приведение в контакт биологического образца от субъекта с проагстринсвязывающей молекулой с использованием иммуноферментного анализа, предпочтительно основанного на методах, выбранных из RIA и ИФА.

"Биологический образец" при использовании в данном контексте представляет собой образец биологической ткани или жидкости, содержащий нуклеиновые кислоты или полипептиды, например белок, полинуклеотид или транскрипт рака яичников. Такой образец должен давать возможность определять уровни экспрессии проагстрина. Известно, что проагстрин является секретируемым белком. Таким образом, предпочтительные биологические образцы для определения уровня белка проагстрина включают биологические жидкости. "Биологическая жидкость" при использовании в данном контексте означает любую жидкость, содержащую материал биологического происхождения. Предпочтительные биологические жидкости для использования в настоящем изобретении включают физиологические жидкости животного, например млекопитающего, предпочтительно человека. Физиологическая жидкость может быть любой физиологической жидкостью, включая, но не ограничиваясь перечнем, кровь, плазму крови, сыворотку крови, лимфу, цереброспинальную жидкость (CSF), слюни, пот и мочу. Предпочтительно, указанные предпочтительные жидкие биологические образцы включают образцы, такие как образец крови, образец плазмы или образец сыворотки крови. Более предпочтительно биологический образец представляет собой образец крови. Фактически, такой образец крови может быть получен с помощью полностью безопасного взятия крови у пациента и, таким образом, позволяет осуществлять неинвазивную оценку рисков того, что у субъекта будет развиваться опухоль.

"Биологический образец" при использовании в данном контексте также включает образец солидного рака обследуемого пациента, когда рак представляет собой солидный рак. Такой образец солидного рака позволяет специалисту в данной области техники осуществлять любой тип измерений уровня биомаркера по изобретению. В некоторых случаях способы в соответствии с изобретением могут дополнительно включать предварительную стадию взятия образца солидного рака у пациента. Под "образцом солидного рака" подразумевается образец опухолевой ткани. Даже у больного раком ткань, являющаяся локализацией опухоли, содержит также и неопухолевую здоровую ткань. Таким образом, "образец раковой опухоли" должен быть ограничен опухолевой тканью, взятой у пациента. Указанный "образец раковой опухоли" может быть биопсийным образцом или образцом, взятым при лечении с помощью хирургического удаления.

Биологический образец обычно получают из эукариотного организма, наиболее предпочтительно млекопитающего или птицы, рептилии или рыбы. Фактически "субъект", который может быть подвергнут воздействию описанного в данном контексте способа, может быть любым из млекопитающих животных, включая человека, собаку, кошку, крупный рогатый скот, коз, свиней, кабанов, овец и обезьян; или птицу; рептилию; или рыбу. Предпочтительно субъект является человеком; человек может именоваться "пациентом".

Под "получением биологического образца" в данном контексте подразумевается получение биологического образца для использования в способах, описанных в данном изобретении. Чаще всего это будет сделано путем взятия образца клеток у животного, но также может быть осуществлено с использованием ранее выделенных клеток (например, выделенных другим человеком, в другое время и/или для другой цели) либо путем осуществления способов по изобретению *in vivo*. Особенно полезными будут архивные образцы тканей, обработанные или имеющие историю результатов лечения.

Такой образец может быть получен и, при необходимости, приготовлен в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. В частности, в данной области техники известно, что

образец следует брать у субъекта натошак.

Определение концентрации прогастрина относится к определению количества прогастрина в известном объеме образца. Концентрация прогастрина может быть выражена относительно контрольного образца, например, в виде отношения или в процентах. Концентрация также может быть выражена как интенсивность или локализация сигнала в зависимости от способа, используемого для определения данной концентрации. Предпочтительно, концентрацию соединения в образце выражают после нормализации общей концентрации родственных соединений в указанном образце, например уровень или концентрацию белка выражают после нормализации общей концентрации белков в образце.

Предпочтительно, риск того, что указанный субъект страдает раком яичников, определяют путем сравнения уровня прогастрина, измеренного в указанном биологическом образце, с референсным уровнем.

Термин "референсный уровень" при использовании в данном контексте относится к уровню экспрессии рассматриваемого маркера рака яичников, то есть прогастрина, в контрольном образце. "Контрольный образец" при использовании в данном контексте означает образец, полученный у субъектов, предпочтительно у двух или более субъектов, относительно которых известно, что они не страдают данным заболеванием, или, в качестве альтернативы, от общей совокупности населения. Приемлемые референсные уровни экспрессии прогастрина могут быть определены с помощью измерения уровней экспрессии указанного маркера у нескольких подходящих субъектов, и такие референсные уровни могут быть скорректированы для конкретных групп субъектов. Референсная величина или референсный уровень может быть абсолютной величиной; относительной величиной; величиной, имеющей верхний или нижний предел; диапазоном величин; средней величиной; структурной средней величиной (медианным значением), усредненной величиной или величиной по сравнению с конкретным референсным или базисным значением. Референсная величина может быть основана на отдельном выборочном значении, таком как, например, величина, полученная для образца, взятого у испытываемого субъекта, но в более ранний момент времени. Референсная величина может быть основана на большом количестве образцов, например от группы субъектов из идентичной группы субъектов хронологического возраста, или основана на совокупности образцов, содержащей или не содержащей испытываемый образец.

Предпочтительно "референсный уровень" представляет собой заданный уровень прогастрина, полученный на основании биологического образца от субъекта с известным конкретным статусом в отношении рака. Согласно частным вариантам осуществления, референсный уровень, используемый для сравнения с испытываемым образцом на стадии (b), может быть получен на основании биологического образца от здорового субъекта или на основании биологического образца от субъекта, страдающего раком; следует понимать, что референсный профиль экспрессии может быть получен на основании совокупности биологических образцов от здоровых субъектов или на основании совокупности образцов от субъектов, страдающих раком.

Согласно частному варианту осуществления способа по изобретению контрольный образец отбирают у субъектов, у которых исключены какие-либо формы рака и предпочтительно какие-либо патологии вообще. Следует понимать, что в соответствии с природой биологического образца, взятого у пациента, контрольный образец будет представлять собой биологический образец той же природы, что и указанный биологический образец.

Уровень прогастрина по настоящему способу определяют путем определения количества прогастрина, связанного прогастринсвязывающей молекулой, предпочтительно антителом, распознающим прогастрин.

"Прогастринсвязывающая молекула" в данном контексте относится к любой молекуле, которая связывает прогастрин, но не связывает гастрин-17 (G17), гастрин-34 (G34), удлинённый глицином гастрин-17 (G17-Gly) или удлинённый глицином гастрин-34 (G34-Gly). Прогастринсвязывающая молекула по настоящему изобретению может быть любой прогастринсвязывающей молекулой, такой как, например, молекула антитела или рецепторная молекула. Предпочтительно, прогастринсвязывающая молекула представляет собой антитело к прогастрину или его антигенсвязывающий фрагмент.

"Связывающий", "связывает" или тому подобное подразумевает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который в физиологических условиях является относительно стабильным. Способы определения связывания двух молекул известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Согласно частному варианту осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с прогастрином с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза превышает его аффинность к связыванию с неспецифической молекулой, такой как бычий сывороточный альбумин (BCA или BSA, от англ. - bovine serum albumin) или казеин. Согласно более конкретному варианту осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются только с прогастрином.

Согласно частному варианту осуществления в способе диагностики рака яичников в соответствии с изобретением биологический образец, взятый у субъекта, приводят в контакт по меньшей мере с одной прогастринсвязывающей молекулой, где аффинность указанной молекулы к прогастрину составляет по

меньшей мере 100, по меньшей мере 90, по меньшей мере 80, по меньшей мере 70, по меньшей мере 60, по меньшей мере 50, по меньшей мере 40, по меньшей мере 30, по меньшей мере 20, по меньшей мере 10, по меньшей мере 5, по меньшей мере 1 нмоль/л, по меньшей мере 100, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 1 пмоль/л, при определении с помощью способа, такого как описан выше.

Согласно частному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу диагностики рака яичников, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце от субъекта, где биологический образец приводят в контакт с анти-hPG антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Термин "антитело" при использовании в данном контексте подразумевают как включающий в себя поликлональные и моноклональные антитела. Антитело (или "иммуноглобулин") состоит из гликопротеина, содержащего по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом посредством дисульфидных связей. Каждая тяжелая цепь содержит переменный участок тяжелой цепи (или домен) (в данной работе сокращенно обозначаемый как HCVR или VH) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи (в данной работе сокращенно обозначаемый как LCVR или VL) и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи содержит один домен, CL. Участки VH и VL могут в свою очередь подразделяться на участки гипервариабельности, называемые "участками, определяющими комплементарность" (CDR) или "гипервариабельными участками", которые в первую очередь ответственны за связывание эпитопа антигена, и которые перемежаются с участками, являющимися более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Способ идентификации CDR внутри легких и тяжелых цепей антитела и определение их последовательности хорошо известны специалистам. Во избежание неопределенности, при отсутствии в тексте каких-либо указаний об обратном, выражение CDR означает гипервариабельные участки тяжелых и легких цепей антитела в соответствии с базой данных IMGT (англ. International Immuno-Genetics Database - Международная база данных по иммуногенетике), где уникальная нумерация IMGT обеспечивает стандартизированное разграничение каркасных участков и участков, определяющих комплементарность, CDR1-IMGT: от 27 до 38, CDR2.

Уникальная нумерация IMGT определяет сравнение переменных доменов независимо от антигенного рецептора, типа цепи или видов [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. В уникальной нумерации IMGT консервативные аминокислоты всегда имеют одинаковое положение, например цистеин 23 (1st-CYS), триптофан 41 (CONSERVED-TRP), гидрофобная аминокислота 89, цистеин 104 (2nd-CYS), фенилаланин или триптофан 118 (J-PHE или J-TRP). Уникальная нумерация IMGT обеспечивает стандартизированное разграничение каркасных участков (FR1-IMGT: положения от 1 до 26, FR2-IMGT: от 39 до 55, FR3-IMGT: от 66 до 104 и FR4-IMGT: от 118 до 128) и участков, определяющих комплементарность: CDR1-IMGT: от 27 до 38, CDR2-IMGT: от 56 до 65 и CDR3-IMGT: от 105 до 117. Поскольку пробелы представляют собой незанятые положения, длины CDR-IMGT (показанные в скобках и разделенные точками, например, [8.8.13]) становятся важной информацией. Уникальную нумерацию IMGT используют в 2D графических представлениях, обозначаемых как IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M., Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q., Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], и в 3D структурах в IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M., Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, которые распределены от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные участки тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Антитела могут быть различных изотипов (а именно IgA, IgD, IgE, IgG или IgM).

Согласно более конкретному варианту осуществления указанное прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из поликлональных антител, моноклональных антител, химерных антител, одноцепочечных антител, камелизированных антител, IgA1-антител, IgA2-антител, IgD-антител, IgE-антител, IgG1-антител, IgG2-антител, IgG3-антител, IgG4-антител и IgM-антител.

"Поликлональное антитело" представляет собой антитело, которое было получено наряду с или в присутствии одного или более другого, неидентичного антитела. Вообще говоря, поликлональные антитела получают из В-лимфоцита в присутствии нескольких других В-лимфоцитов, продуцирующих неидентичные антитела. Как правило, поликлональные антитела получают непосредственно у иммунизированного животного.

Термин "моноклональное антитело" означает антитело, происходящее из популяции почти гомогенных антител, где популяция включает идентичные антитела, за исключением нескольких возможных

естественных мутаций, которые могут быть обнаружены в минимальных долях. Моноклональное антитело является результатом роста одноклеточного клона, такого как гибридома, и характеризуется тяжелыми цепями одного класса и подкласса и легкими цепями одного типа.

Выражение "антигенсвязывающий фрагмент" антитела означает любой пептид, полипептид или протеин, сохраняющий способность связываться с мишенью, также обычно называемой антигеном, указанного антитела, как правило, того же эпитопа, и содержащий аминокислотную последовательность 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.

Согласно частному варианту осуществления указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере один CDR антитела, из которого он получен. Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит 2, 3, 4 или 5 CDR, более предпочтительно 6 CDR антитела, из которого он получен.

"Антигенсвязывающие фрагменты" могут быть выбраны без ограничения из группы, состоящей из Fv, scFv (sc для одной цепи), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc фрагментов или диател, или гибридных белков с неупорядоченными пептидами, такими как XTEN (удлиненный рекомбинантный полипептид) или PAS мотивы, или любого фрагмента, время полужизни которого может быть увеличено с помощью химической модификации, такой как добавление полиалкиленгликоля, такого как полиэтиленгликоль ("пегилирование") (пегилированные фрагменты обозначают как Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG или Fab'-PEG) ("PEG" означает полиэтиленгликоль), или путем включения в липосому, при этом указанные фрагменты имеют по меньшей мере один из характерных CDR антитела в соответствии с изобретением. Предпочтительно указанные "антигенсвязывающие фрагменты" будут представлять собой или содержать частичную последовательность тяжелой или легкой вариабельной цепи антитела, из которого они получены, при этом указанная частичная последовательность является достаточной для сохранения такой же специфичности связывания, как у антитела, из которого она происходит, и достаточной аффинностью, предпочтительно по меньшей мере равной 1/100, более предпочтительно по меньшей мере 1/10, аффинности антитела, из которого она происходит, по отношению к мишени.

Согласно другому частному варианту осуществления в способе диагностики рака яичников в соответствии с изобретением биологический образец от субъекта приводят в контакт с антителом, связывающимся с проастроном, где указанное антитело получено с помощью способа иммунизации, известного специалисту в данной области, где в качестве иммуногена используется пептид, аминокислотная последовательность которого содержит совокупность или часть аминокислотной последовательности проастроина. Более конкретно, указанный иммуноген содержит пептид, выбранный из

пептида, чья аминокислотная последовательность содержит или состоит из аминокислотной последовательности полноразмерного проастроина и, в частности, полноразмерного проастроина человека SEQ ID NO: 1,

пептида, чья аминокислотная последовательность соответствует части аминокислотной последовательности проастроина и, в частности, полноразмерного проастроина человека SEQ ID NO: 1,

пептида, чья аминокислотная последовательность соответствует части или всей аминокислотной последовательности N-концевого участка проастроина и, в частности, пептидов, содержащих аминокислотную последовательность или состоящих из аминокислотной последовательности: SWKPRSQPDAPLG (SEQ ID NO: 2), и

пептида, чья аминокислотная последовательность соответствует части или всей аминокислотной последовательности C-концевого участка проастроина и, в частности, содержащих аминокислотную последовательность или состоящих из аминокислотной последовательности: QGPWLEEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 3),

пептида, чья аминокислотная последовательность соответствует части аминокислотной последовательности C-концевого участка проастроина и, в частности, пептидов, содержащих аминокислотную последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), соответствующую аминокислотам 71-80 проастроина.

Специалисту в данной области будет понятно, что такая иммунизация может быть использована для получения поликлональных или моноклональных антител по желанию. Способы получения антител каждого из этих типов известны в данной области техники. Таким образом, специалисту будет легко выбрать и обеспечить выполнение способа получения поликлональных и/или моноклональных антител к любому данному антигену.

Примеры моноклональных антител, полученных с использованием иммуногена, содержащего ами-

ноктислотную последовательность "SWKPRSQQPDAPLG", соответствующую аминокислотной последовательности 1-14 прогастрин человека (N-концевой участок), включают, не ограничиваясь перечнем, моноклональные антитела, обозначенные как mAb3, mAb4, mAb16 и mAb19 и mAb20, как описано в следующих табл. 1-4. Были описаны также и другие моноклональные антитела, хотя неясно, действительно ли эти антитела связывают прогастрин (WO 2006/032980). Результаты испытаний картирования эпитопа показывают, что mAb3, mAb4, mAb16 и mAb19 и mAb20 специфически связывают эпитоп в пределах указанной N-концевой аминокислотной последовательности hPG. Поликлональные антитела, специфически распознающие эпитоп в пределах N-конца прогастрина, представленные как SEQ ID NO: 2, были описаны в данной области (см., например, патентный документ WO 2011/083088).

Таблица 1

Депозитный номер гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
6B5B11C10	mAb3	VH CDR 1	GYFTSYW	SEQ ID NO 4
		VH CDR 2	FYPGNSDS	SEQ ID NO 5
		VH CDR 3	TRRDSPQY	SEQ ID NO 6
		VL CDR 1	QSIVHSNGNTY	SEQ ID NO 7
		VL CDR 2	KVS	SEQ ID NO 8
		VL CDR 3	FQGSHPVFT	SEQ ID NO 9

Таблица 2

Депозитный номер гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
20D2C3G2	mAb4	VH CDR 1	GYTFSSW	SEQ ID NO 10
		VH CDR 2	FLPGSGST	SEQ ID NO 11
		VH CDR 3	ATDGNVDWFA Y	SEQ ID NO 12
		VL CDR 1	QSLVHSSGVTY	SEQ ID NO 13
		VL CDR 2	KVS	SEQ ID NO 14
		VL CDR 3	SQSTHPVPT	SEQ ID NO 15

Таблица 3

Депозитный номер гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
1E9D9B6	mAb16	VH CDR 1	GYFTSYY	SEQ ID NO 16
		VH CDR 2	INPSNGGT	SEQ ID NO 17
		VH CDR 3	TRGGYYPFDY	SEQ ID NO 18

		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	SEQ ID NO 19
		VL CDR 2	LVS	SEQ ID NO 20
		VL CDR 3	WQGTHSPYT	SEQ ID NO 21

Таблица 4

Депозитный номер гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
1B3B4F11	mAb19	VH CDR 1	GYSITSDYA	SEQ ID NO 22
		VH CDR 2	ISFSGYT	SEQ ID NO 23
		VH CDR 3	AREVNYGDSYHFDY	SEQ ID NO 24
		VL CDR 1	SQHRITYT	SEQ ID NO 25
		VL CDR 2	VKKDGS	SEQ ID NO 26
		VL CDR 3	GVGDAIKGQSVFV	SEQ ID NO 27

Примеры моноклональных антител, которые могут быть получены с использованием иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность "QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN" (С-концевой участок прогастрина), соответствующую аминокислотной последовательности 55-80 прогастрина человека, включают, не ограничиваясь перечнем, антитела, обозначенные как mAb8 и mAb13 в следующих табл. 5 и 6. Результаты испытаний картирования эпитопа показывают, что mAb13 специфически связывает эпитоп в пределах указанной hPG С-концевой аминокислотной последовательности.

Таблица 5

Депозитный номер гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
1C10D3B9	mAb8	VH CDR 1	GFTFTTYA	SEQ ID NO 28
		VH CDR 2	ISSGGTYT	SEQ ID NO 29
		VH CDR 3	ATQGNYSLDF	SEQ ID NO 30
		VL CDR 1	KSLRHTKGITF	SEQ ID NO 31
		VL CDR 2	QMS	SEQ ID NO 32
		VL CDR 3	AQNLELPLT	SEQ ID NO 33

Таблица 6

Депозитный номер гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
2C6C3C7	mAb13	VH CDR 1	GFIFSSYG	SEQ ID NO 34
		VH CDR 2	INTFGDRT	SEQ ID NO 35
		VH CDR 3	ARGTGTY	SEQ ID NO 36
		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	SEQ ID NO 37
		VL CDR 2	LVS	SEQ ID NO 38
		VL CDR 3	WQGTHFPQT	SEQ ID NO 39

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

Согласно более конкретному варианту осуществления в способе по изобретению биологический образец приводят в контакт с анти-hPG антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, где анти-hPG антитело выбрано из N-концевых анти-hPG антител и C-концевых анти-hPG антител.

Термины "N-концевые анти-hPG антитела" и "C-концевые анти-hPG антитела" означают антитела, связывающиеся с эпитопом, содержащим аминокислоты, расположенные в N-концевого участка hPG, или с эпитопом, содержащим аминокислоты, расположенные в C-концевого участка hPG соответственно. Предпочтительно термин "N-концевые анти-hPG антитела" относится к антителам, связывающимся с эпитопом, расположенным в домене прогастрина, чья последовательность представлена с помощью SEQ ID NO: 2. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления термин "C-концевые анти-hPG антитела" относится к антителам, связывающимся с эпитопом, расположенным в домене прогастрина, чья последовательность представлена с помощью SEQ ID NO: 3.

Термин "эпитоп" относится к участку антигена, который связывается при помощи антитела. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно являются разновидностью структурных эпитопов и содержат такие аминокислоты, которые непосредственно способствуют аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными. Согласно некоторым вариантам осуществления эпитопы могут содержать детерминанты, являющиеся химически активными поверхностными группировками таких молекул, как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и согласно некоторым вариантам осуществления могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда. Определение эпитопа, связанного антителом, может быть осуществлено с помощью любого способа картирования эпитопа, известного специалисту в данной области. Эпитоп может содержать различные аминокислоты, расположенные последовательно в пределах аминокислотной последовательности белка. Эпитоп также может содержать аминокислоты, расположенные непоследовательно в пределах аминокислотной последовательности белка.

Согласно частному варианту осуществления указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из

моноклонального антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, или последовательности по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно, или последовательности по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно,

моноклонального антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих

аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно,

моноклонального антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно,

моноклонального антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно,

моноклонального антитела, включающего 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, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, и

моноклонального антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно.

При использовании в данном контексте "идентичность в процентах" или "% идентичности" между двумя последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот означает процентную долю идентичных нуклеотидов или аминокислотных остатков между двумя сравниваемыми последовательностями, полученную после оптимального выравнивания, при этом данная процентная доля является чисто статистической, и различия между двумя последовательностями распределены по их длине случайным образом. Сравнение двух последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей традиционно осуществляют сравнением последовательностей после их оптимального выравнивания, причем указанное сравнение можно проводить по отрезкам или с использованием "интервала выравнивания". Оптимальное выравнивание последовательностей может осуществляться, помимо сравнения вручную, с помощью способов, известных специалистам в данной области техники.

Для аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80%-ную, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ную идентичность с референсной аминокислотной последовательностью, предпочтительные примеры включают примеры, содержащие референсную последовательность, определенные модификации, в частности делецию, добавление или замену по меньшей мере одной аминокислоты, усе-

чение или удлинение. В случае замены одной или более последовательных или непоследовательных аминокислот предпочтительными являются замены, при которых замененные аминокислоты заменяются "эквивалентными" аминокислотами. В данном контексте выражение "эквивалентные аминокислоты" подразумевает любые аминокислоты, которые могут быть заменены на одну из структурных аминокислот без изменения при этом биологических активностей соответствующих антител и из тех конкретных примеров, которые определены ниже.

Эквивалентные аминокислоты могут быть определены либо по их структурной гомологии с аминокислотами, которыми они заменяются, либо по результатам сравнительных испытаний биологической активности между различными антителами, которые вероятно будут получены.

Согласно другому частному варианту осуществления, антитело, используемое в соответствии со способом по изобретению, представляет собой гуманизированное антитело.

При использовании в данном контексте выражение "гуманизированное антитело" означает антитело, содержащее CDR-участки, полученные из антитела нечеловеческого происхождения, при этом другие части молекулы антитела получены из одного или нескольких человеческих антител. Кроме того, некоторые из остатков каркасного сегмента (называемые FR для каркасного участка) могут быть модифицированы для сохранения аффинности связывания в соответствии с известными способами (Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986). Целью гуманизации является снижение иммуногенности ксеногенного антитела, такого как мышиное антитело, для введения человеку, с сохранением при этом полной антигенсвязывающей аффинности и специфичности антитела.

Гуманизированные антитела по изобретению или их фрагменты могут быть получены способами, известными специалистам в данной области (такими как, например, описанные в работах Singer et al., *J. Immunol.*, 150:2844-2857, 1992). Такие гуманизированные антитела являются предпочтительными для использования их в способах, включающих *in vitro* диагностику или профилактическое и/или терапевтическое лечение *in vivo*. Специалистам в данной области известны также и другие способы гуманизации. Фактически, антитела могут быть гуманизированы при помощи целого ряда способов, включая CDR-трансплантацию (патентные документы 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), рекомбинацию поверхностных остатков или изменение поверхности (патентные документы EP 0592106; EP 0519596; работы 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 (патентный документ U.S. Pat. No. 5565332). Человеческие антитела могут быть приготовлены с помощью целого ряда способов, известных специалистам в данной области, включая способы фагового дисплея; см. также патентные документы U.S. Pat. No. 4444887 4716111 5545806 и 5814318; и публикации международных заявок на патент WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

Согласно более конкретному варианту осуществления указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело, выбранное из группы, состоящей из

гуманизированного антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно,

гуманизированного антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO 10, 11 и 12 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно,

гуманизированного антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1,

CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно,

гуманизированного антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно,

гуманизированного антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, и

гуманизированного антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно, или последовательностей по меньшей мере с 80%-ной, предпочтительно 85, 90, 95 и 98%-ной идентичностью, после оптимального выравнивания, с последовательностями SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно,

где указанное антитело также содержит константные участки легкой цепи и тяжелой цепи, полученные из человеческого антитела.

Согласно первому варианту осуществления способ в соответствии с изобретением включает приведение в контакт биологического образца с анти-hPG антителом, связывающимся с эпитопом hPG, где эпитоп расположен в пределах С-концевого участка hPG, или с эпитопом, расположенным в пределах N-концевого участка hPG.

Согласно более конкретному варианту осуществления способ в соответствии с изобретением включает приведение в контакт биологического образца с анти-hPG антителом, связывающимся с эпитопом hPG, где эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевого участка прогастрина выбранной из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам с 10 по 14 hPG, аминокислотам с 9 по 14 hPG, аминокислотам с 4 по 10 hPG, аминокислотам со 2 по 10 hPG и аминокислотам со 2 по 14 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO: 1.

Согласно более конкретному варианту осуществления способ в соответствии с изобретением включает приведение в контакт биологического образца с анти-hPG антителом, связывающимся с эпитопом hPG, где эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности С-концевого участка прогастрина, выбранной из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам с 71 по 74 hPG, аминокислотам с 69 по 73 hPG, аминокислотам с 71 по 80 hPG (SEQ ID NO: 40), аминокислотам с 76 по 80 hPG и аминокислотам с 67 по 74 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO: 1.

Согласно первому варианту осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит антитело, распознающее эпитоп, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности прогастрина.

Согласно более конкретному варианту осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит антитело, распознающее эпитоп прогастрина, где эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевого участка прогастрина, где аминокислотная последовательность может включать остатки с 10 по 14 hPG, остатки с 9 по 14 hPG, остатки с 4 по 10 hPG, остатки с 2 по 10 hPG или остатки 2 по 14 hPG, где аминокислотная последова-

тельность hPG представляет собой SEQ ID NO: 1.

Согласно более конкретному варианту осуществления композиция в соответствии с изобретением содержит антитело, распознающее эпитоп прогастрина, где эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности С-концевого участка прогастрина, где аминокислотная последовательность может включать остатки с 71 по 74 hPG, остатки с 69 по 73 hPG, остатки с 71 по 80 hPG (SEQ ID NO: 40), остатки с 76 по 80 hPG или остатки с 67 по 74 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO: 1.

Согласно частному варианту осуществления способа *in vitro* диагностики рака яичников в соответствии с изобретением, указанный способ включает стадию приведения в контакт биологического образца от субъекта с первой молекулой, которая связывается с первым участком прогастрина, и со второй молекулой, которая связывается со вторым участком прогастрина. Согласно более конкретному варианту осуществления, где указанная прогастринсвязывающая молекула представляет собой антитело, биологический образец от субъекта приводят в контакт с антителом, которое связывается с первым эпитопом прогастрина, и со вторым антителом, которое связывается со вторым эпитопом прогастрина.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, способ по настоящему изобретению для диагностики рака яичников включает определение прогастрина в биологическом образце человека.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления, способ по настоящему изобретению для диагностики рака яичников включает определение концентрации прогастрина в биологическом образце человека.

Согласно другому частному варианту осуществления способ по настоящему изобретению для диагностики рака яичников включает определение концентрации прогастрина в биологическом образце человека, где биологический образец выбирают из крови, сыворотки и плазмы крови.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с анти-hPG антителом, как описано выше, где связывание анти-hPG антитела в образце является показателем наличия у субъекта рака яичников.

Согласно более конкретному варианту осуществления способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с анти-hPG антителом, как описано выше, где концентрация прогастрина в образце выше 5 пмоль/л является показателем наличия у субъекта рака яичников.

Более предпочтительно способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с анти-hPG антителом, как описано выше, где концентрация прогастрина в образце выше 5, 10, 20, 30 или 40 пмоль/л является показателем наличия у субъекта рака яичников.

Еще более предпочтительно способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с анти-hPG антителом, как описано выше, где концентрация прогастрина в плазме выше 5, 10, 20, 30, 40 пмоль/л является показателем наличия у субъекта метастазированного рака яичников.

Настоящее изобретение также относится к способам контроля эффективности лечения рака яичников у пациента, такого как химиотерапия, биологическая терапия, иммунотерапия или терапия антителами, с помощью определения концентрации прогастрина в первом образце, таком как физиологическая жидкость или биопсия рака яичников, полученном у пациента перед лечением рака яичников, и последующего сравнения концентрации прогастрина в первом образце с концентрацией во втором образце, полученном у того же пациента после лечения, где уменьшение концентрации прогастрина во втором образце по сравнению с первым образцом указывает на то, что лечение было эффективным.

Согласно частному варианту осуществления способ в соответствии с изобретением включает сравнения концентрации прогастрина в биологическом образце, полученном от пациента, с заданной величиной концентрации прогастрина в образце, согласно более конкретному варианту осуществления, указанную заданную величину выбирают из усредненных или средних значений выборки, основанных на усредненном или среднем определении значения в группе без рака яичников, из величины концентрации прогастрина, полученной, когда известно, что у пациента нет рака яичников.

Согласно частному варианту осуществления способ в соответствии с изобретением *in vitro* диагностики рака яичников включает определение концентрации прогастрина в образце от указанного пациента и второй диагностический тест на наличие рака яичников. Согласно более конкретному варианту осуществления способ в соответствии с изобретением *in vitro* диагностики рака яичников включает определение концентрации прогастрина в образце от указанного пациента и второй диагностический тест на наличие рака яичников, где

согласно частному варианту осуществления изобретения способ в соответствии с настоящим изобретением включает определение уровня прогастрина в течение некоторого периода времени в образцах от пациента, который проходил или проходит лечение от рака яичников;

согласно другому аспекту предмет настоящего изобретения относится к композиции для применения для профилактики или лечения рака яичников, где указанная композиция содержит прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Композиции антитела для использования в способах по изобретению могут быть приготовлены в виде различных составов, включая, но не ограничиваясь перечнем, водную суспензию, для введения различными способами, включая, но не ограничиваясь перечнем, парентеральное, интратекальное, подкожное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, инфузионное или струйное введение. Согласно некоторым вариантам осуществления, композицию готовят для парентерального введения, и согласно некоторым конкретным вариантам осуществления, для внутривенного введения путем инфузии.

Согласно частному варианту осуществления композиция для применения для профилактики или лечения рака яичников в соответствии с изобретением содержит эффективную дозу антител к прогастрину по изобретению в диапазоне от 0,001 до приблизительно 250 мг/кг, которая может применяться однократно или многократно с определенными интервалами.

Согласно частному варианту осуществления композиция для применения для профилактики или лечения рака яичников в соответствии с изобретением содержит прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные из поликлональных антител, моноклональных антител, химерных антител, одноцепочечных антител, камелизированных антител, IgA1-антител, IgA2-антител, IgD-антител, IgE-антител, IgG1-антител, IgG2-антител, IgG3-антител, IgG4-антител и IgM-антител. Предпочтительно антитела являются такими, как описаны выше. Более предпочтительно антитела представляют собой гуманизированные антитела.

Согласно более конкретному варианту осуществления композиция для применения для профилактики или лечения рака яичников в соответствии с изобретением содержит прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие аффинность в отношении прогастрина по меньшей мере 5000 нмоль/л, по меньшей мере 500, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 7, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1 нмоль, 50, 10, 5, 1 или по меньшей мере 0,1 пмоль/л, при определении с помощью способа, такого как описан выше.

Согласно еще более конкретному варианту осуществления композиция для применения для профилактики или лечения рака яичников содержит прогастринсвязывающее антитело, где указанная прогастринсвязывающая молекула или ее антигенсвязывающий фрагмент представляет собой нейтрализующее антитело.

Выражение "нейтрализующее анти-PG антитело" означает антитело, которое связывает PG и блокирует PG-зависимую сигнализацию, что приводит к ингибированию PG-индуцированных ответов в опухолевых клетках и, в частности, в клетках опухолей яичников. Ингибирование PG-индуцированных ответов клеток яичников может быть опосредовано репрессией дифференцировки клеток, репрессией гибели клеток и/или стимулированием пролиферации клеток.

Согласно другому частному варианту осуществления композиция для применения для профилактики или лечения рака яичников содержит прогастринсвязывающее антитело, где прогастринсвязывающая молекула или ее антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

Согласно частному варианту осуществления композиция для применения для профилактики или лечения рака яичников содержит прогастринсвязывающее антитело, где указанное прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксическим агентом.

Согласно другому частному варианту осуществления композиция для применения для профилактики или лечения рака яичников у пациента содержит прогастринсвязывающее антитело, где указанному пациенту был поставлен диагноз рак яичников при помощи способа в соответствии с настоящим изобретением, где концентрация прогастрина в биологическом образце от указанного пациента выше, чем в контрольном образце.

Согласно более конкретному аспекту настоящее изобретение относится к композиции для применения для профилактики или лечения рака яичников в соответствии с изобретением, где указанное прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбирают из N-концевых антител к прогастрину и C-концевых антител к прогастрину.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей композицию для применения для профилактики или лечения рака яичников в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемый носитель. В частности, фармацевтическая композиция для применения для профилактики или лечения рака яичников в соответствии с изобретением содержит антитело, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно более конкретному аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей композицию для применения для профилактики или лечения рака яичников в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемый носитель, где антитело к прогастрину вводят в дозе от 0,001 до 250 мг/кг и предпочтительно в дозе по меньшей мере 0,005, по меньшей мере 0,01, по меньшей мере 0,05, по меньшей мере 0,1, по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 1, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100 мг/кг. Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к составному комплексу, включающему композицию для применения для профилактики или лечения рака яичников в соответствии с изобретением и противораковую терапевтическую молекулу.

Фактически, лечение с помощью анти-PG моноклональных антител, как описано в данном контек-

сте, можно комбинировать с другой терапией или дополнять ее. Неограничивающие примеры другой терапии включают химиотерапевтическое лечение, лучевую терапию, хирургическое удаление и терапию антителами.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составному комплексу, включающему композицию для применения для профилактики или лечения рака яичников в соответствии с изобретением и противораковую терапевтическую молекулу, выбранную из химиотерапевтической молекулы, молекулы таргетной (прицельной) терапии.

Согласно частному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составным комплектам, включающим предназначенные для одновременного, последовательного или раздельного введения композицию для лечения рака яичников в соответствии с изобретением и химиотерапевтическую молекулу. Подходящие для этих целей химиотерапевтические молекулы включают, не ограничиваясь перечнем, антагонисты фолатов, антагонисты пуринов, антагонисты пиримидинов, алкилирующие ДНК молекулы, лекарственные средства для сшивания ДНК, антибиотики, комплексы платины, ингибиторы протеасом, яды митотического веретена, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы тирозинкиназы и другие.

Согласно другому частному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составным комплектам, включающим предназначенные для одновременного, последовательного или раздельного введения композицию в соответствии с изобретением и композицию, содержащую другую молекулу таргетной терапии. Такая молекула таргетной терапии включает, не ограничиваясь перечнем, антитела, направленные против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), такие как цетуксимаб или панитумумаб, антитела, направленные против фактора роста эпителия сосудов (VEGF), такие как бевацизумаб, антитела, направленные против рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (HER2), такие как трастузумаб или пертузумаб, антитела, направленные против рецептора иммунной контрольной точки PD-1 и его лиганда PDL-1, такие как пембролизумаб, антитела, направленные против антигена 4 цитотоксических Т лимфоцитов (CTLA-4), такие как ипилимумаб, низкомолекулярные лекарственные средства, нацеленные на EGFR, такие как эрлотиниб, низкомолекулярные таргетные препараты против протоонкогена B-Raf (BRAF), такие как вемурафениб или дабрафениб, рекомбинантный белок слияния, нацеленный на VEGF, такой как афлиберсепт.

Согласно другому частному аспекту настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для диагностики рака яичников.

Согласно другому частному аспекту настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для профилактики или лечения рака яичников.

Согласно более конкретному аспекту настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для профилактики или лечения рака яичников у пациента, где определяют концентрацию прогастрина в биологическом образце, взятом у пациента, и она превышает концентрацию прогастрина в контрольном биологическом образце.

Согласно более конкретному аспекту настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для профилактики или лечения рака яичников у пациента, где у пациента возникает метастаз.

Согласно еще более частному аспекту настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для профилактики или лечения рака яичников у пациента, где у пациента возникает метастаз, и где определяют концентрацию прогастрина в биологическом образце, взятом у указанного пациента, и она превышает концентрацию прогастрина в контрольном биологическом образце.

Компоненты, из которых состоит комбинация, могут вводиться одновременно, по отдельности или последовательно для достижения максимальной эффективности комбинации; при этом каждое введение может варьироваться по длительности от быстрого введения до непрерывной перфузии.

При использовании в данном контексте "одновременное введение" относится к введению двух соединений композиции в виде единичной и уникальной лекарственной формы. При использовании в данном контексте "раздельное введение" относится к введению в одно и то же время двух соединений композиции в соответствии с изобретением в отдельных лекарственных формах. При использовании в данном контексте "последовательное введение" относится к последовательному введению двух соединений композиции в соответствии с изобретением, каждого - в отдельной лекарственной форме.

Термин "терапевтически эффективное количество" при использовании в данном контексте относится к минимальной концентрации или количеству соединения (или соединений), которое эффективно для профилактики, облегчения, уменьшения или улучшения симптомов заболевания или продления времени жизни пациента, подлежащего лечению.

Характеристики вариантов осуществления по изобретению станут более очевидными из последующего подробного описания приведенных ниже примеров.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - средняя концентрация прогастрина в плазме у пациентов, имеющих рак яичников (n=8), и у

пациентов контрольной группы (n=103).

Фиг. 2 - подсчет количества клеток для клеток SK-OV-3 после лечения в течение 48 ч с помощью 20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (anti-human FcG1, из BioXCell) (CT Hz) или с помощью 20 мкг/мл анти-hPG Hz (PG Hz) - двухсторонний критерий Стьюдента (англ. Two-tailed t-test), * p<0,05.

Фиг. 3 - количество сфер SK-OV-3, образовавшихся после обработки контрольным (CT Hz) или анти-PG гуманизированным антителом (PG Hz) в условиях сверхнизкой адгезии - двухсторонний критерий Стьюдента, *** p<0,001.

Описание примеров осуществления изобретения

Пример 1. Определение концентрации прогастрина в плазме с использованием поликлональных антител.

Уровни прогастрина в плазме количественно определяли с помощью ИФА при использовании двух специфических антител к прогастрину: лунки планшетов покрывают иммобилизованными антителами, а антитела обнаружения используются для определения прогастрина и опосредуют обнаружение сигнала.

В данном примере количественная оценка основана на методе ИФА, позволяющем за счет использования субстрата, реакция которого излучает свет, определить величину, пропорциональную количеству люминесценции антител, связанных с антигеном, удержанным иммобилизованными антителами.

Материал.

Реагенты и приборы представлены в табл. 7.

Таблица 7

Название	Поставщик	Ссылочный номер
Планшеты MaxiSorp белые Nunc на 96 лунок	Dutscher	# 055221
Карбонат/бикарбонат натрия	Sigma	# 21851
DPBS 1X	Lonza	# P04-36500
Tween-20	Biosolve	# 20452335
BCA	Euromedex	# 04-100-810-C
Стрептавидин-HRP	Pierce (Thermo)	# 21130
Субстрат для ИФА максимальной чувствительности SuperSignal Femto	Pierce (Thermo)	# 37074
поликлональные антитело к прогастрину	Eurogentec	/

Поликлональные антитела получали иммунизацией кролика N-концевым прогастрином (SEQ ID NO: 2) или C-концевым прогастрином, соответствующим аминокислотам с 71 по 80 hPG и имеющим последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), в соответствии со стандартными протоколами.

Поликлональные антитела против прогастрина, использованные в данном анализе, имеют следующие характеристики связывания: отсутствие связывания с G34-Gly, G34, G17-Gly, G17, связывание с полноразмерным прогастрином.

Планшеты на 96 лунок покрывают раствором карбоната - бикарбоната натрия, 50 ммоль/л, pH 9,6, приготовленным путем растворения содержимого одной капсулы в 100 мл воды MilliQ. Раствор иммобилизованного антитела (3 мкг/мл), соответствующего поликлональным антителам, полученным с использованием C-концевого прогастрина FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), готовят в карбонатном буфере. 100 мкл раствора антител добавляют в каждую лунку и инкубируют при температуре 4°C в течение 16 ч (1 ночь). После этого планшеты блокируют путем удаления раствора антител и трижды промывают 300 мкл 1X PBS/0,1% Tween-20, затем добавляют в каждую лунку по 200 мкл блокирующего буфера (1X PBS/0,1% Tween-20/0,1% BCA) и инкубируют в течение 2 ч при температуре 22°C. Затем блокирующий буфер удаляют, лунки промывают 3 раза по 300 мкл 1X PBS/0,1% Tween-20.

Разведение плазмы осуществляют следующим образом: используют чистую плазму, разведенную на 1/2, 1/5 1/10. Разведения готовят из чистой плазмы в 1X PBS/0,1 % Tween 20/0,1 % BCA.

Для контрольного теста с помощью ИФА в присутствии известной концентрации прогастрина разведение прогастрина готовят следующим образом: исходный рекомбинантный PG (полноразмерный прогастрин человека, продуцируемый в E. coli и аффинно очищенный с помощью глутатион-агарозы/удаления метки (Tev)/промежуточной очистки методом IMAC (англ. Immobilized Metal Affinity

Chromatography - аффинная хроматография с использованием иммобилизованных металлов)/диализа, из Института Пастера, Париж, Франция) готовят в концентрации 0,45 мг/мл (45 мкМ), в трех повторях. Диапазоны концентраций прогастрина получали следующим образом:

раствор А: предварительное разведение 1/10, 2 мкл исходного 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 пмоль/л, 5,55 мкл С плюс 494,5 мкл разбавителя,
 раствор E: 250 пмоль/л, 250 мкл D плюс 250 мкл разбавителя,
 раствор F: 100 пмоль/л, 200 мкл E плюс 300 мкл разбавителя,
 раствор G: 50 пмоль/л, 250 мкл F плюс 250 мкл разбавителя,
 раствор H: 25 пмоль/л, 200 мкл G плюс 200 мкл разбавителя,
 раствор I: 10 пмоль/л, 100 мкл H плюс 150 мкл разбавителя.

Диапазон рекомбинантного РG является линейным, а потому может быть более или менее обширным в зависимости от используемого антитела.

Для подготовки образцов для испытаний отбирают приблизительно по 500 мкл каждого образца и сохраняют до анализа (и, при необходимости, подтверждения) результатов. 100 мкл каждой точки диапазона и/или плазмы анализируют в чистом виде, разведенными до 1/2, 1/5 и 1/10, и инкубируют в течение 2 ч при температуре 22°C на планшетах.

Для обнаружения теста планшеты промывают 3 раза по 300 мкл 1X PBS/0,1% Tween-20. Готовят раствор поликлонального антитела к прогастрину кролика, где антитела получены с использованием N-концевого участка прогастрина в качестве иммуногена, соединенного с биотином до 0,5 мкг/мл, разведением в 1X PBS/0,1% Tween-20/0,1% БСА. В каждую лунку добавляют по 100 мкл такого раствора. Инкубируют в течение 1 ч при температуре 22°C. Для обнаружения с использованием раствора стрептавидин-HRP удаляют идентифицирующее антитело и промывают 3 раза по 300 мкл 1X PBS/0,1% Tween-20, затем готовят раствор 20 нг/мл стрептавидина-HRP, разведенного в 1X PBS/0,1% Tween-20/0,1% БСА, где 100 мкл этого раствора добавляют в каждую лунку перед инкубированием в течение 1 ч при температуре 22°C.

Идентификация включает удаление стрептавидина-HRP и промывку 3 раза по 300 мкл 1X PBS/0,1% Tween-20 с последующим добавлением 100 мкл раствора хемилюминесцентного субстрата в лунку. Раствор субстрата готовят, смешивая равные объемы двух растворов набора SuperSignal ELISA Femto kit, 20 мл плюс 20 мл, в течение 30 мин перед использованием и хранят при комнатной температуре в темноте. Люминесценцию считывают после инкубирования в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте.

Испытание проводят для каждого условия в трех повторях, полученные в результате диапазоны будут представлены в виде графика, показывающего изменение люминесценции в зависимости от концентрации прогастрина. Для каждого разведения плазмы концентрацию прогастрина определяют с помощью уравнения линейной регрессии отрезка соответствующего диапазона (диапазон 1/10 для образца, разведенного до 1/10).

Способы и результаты.

Средняя концентрация прогастрина в плазме у пациентов, имеющих рак яичников (n=8), составляет 8,45 пмоль/л, а средняя концентрация прогастрина в плазме у пациентов контрольной группы (n=103) составляет 0 пмоль/л (фиг. 1). Эти данные показывают, что пациенты, страдавшие раком яичников, имели более высокие концентрации прогастрина в плазме по сравнению с контрольной группой здоровых людей.

Эти данные показывают, что пациенты, имевшие рак яичников, имели более высокие уровни прогастрина в плазме по сравнению с контрольной группой здоровых людей.

Пример 2. Определение концентрации прогастрина с помощью моноклональных антител к прогастрину.

Лунки Nunc MaxiSORP планшетов на 96 лунок покрывают первым специфическим для прогастрина антителом следующим образом. Моноклональные антитела к прогастрину, специфические для карбокси-концевого участка прогастрина, разводят до концентрации 3 мкг/мл в растворе 50 ммоль/л, pH 9,6, буфера на основе карбоната/бикарбоната натрия в воде MilliQ.

Затем в каждую лунку 96-луночных планшетов добавляют в общей сложности 100 мкл раствора антитела и инкубируют в течение ночи при температуре 4°C. После связывания раствор антитела удаляют из лунок, лунки трижды промывают 100 мкл промывочного буфера (1X PBS/0,1% Tween-20). Затем в каждую лунку добавляют в общей сложности 100 мкл блокирующего буфера (1X PBS/0,1% Tween-20/0,1% БСА) и инкубируют в течение 2 ч при температуре 22°C. Затем блокирующий буфер удаляют, и лунки трижды промывают промывочным буфером. После этого в лунки добавляют образцы плазмы или сыворотки крови, взятые у пациентов, в объеме 100 мкл в сериях разведений, как правило, в разведениях 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10, и инкубируют в течение 2 ч при температуре 22°C. Образцы плазмы или сыворотки крови анализируют в двух повторях.

Анализ также включает две стандартные кривые. Первую стандартную кривую получают с помощью разведений рекомбинантного прогастрина до получения конечного количества 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,01 и 0 нг в лунке. Вторую стандартную кривую, служащую в качестве негативного контроля, получают на основании прогастрин-негативной человеческой сыворотки крови, разведенной в блокирующем буфере при тех же разведениях, что и испытываемые образцы, т.е. 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10. В качестве альтернативы, когда анализируют образцы плазмы, вторую стандартную кривую, служащую в качестве негативного контроля, получают на основании прогастрин-негативной человеческой плазмы, разведенной в блокирующем буфере при тех же разведениях, что и анализируемые образцы, т.е. 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10.

После завершения инкубации с образцами плазмы или сыворотки крови содержимое лунок удаляют, и лунки трижды промывают промывочным буфером, 100 мкл/лунку, после чего определяют прогастрин, связанный с первым антителом, используя второе антитело, специфичное для прогастрина, следующим образом.

Слитые с биотином моноклональные антитела к прогастрину, специфичные для аминоконцевого участка прогастрина, разводят в блокирующем буфере до концентрации от 0,1 до 10 мкл г/мл в зависимости от антитела. Затем в каждую лунку добавляют в общей сложности 100 мкл раствора антитела и инкубируют в течение 1 ч при температуре 22°C.

После завершения связывания вторичного антитела планшеты трижды промывают промывочным буфером 100 мкл/лунку, после чего в каждую лунку добавляют 100 мкл раствора стрептавидин-HRP (25 нг/мл в блокирующем буфере) и инкубируют в течение 1 ч при температуре 22°C. После завершения инкубации с раствором стрептавидин-HRP планшеты трижды промывают промывочным буфером, 100 мкл/лунку. После этого в каждую лунку добавляют 100 мкл хемилюминесцентного субстрата, приготовленного с использованием набора реактивов для ИФА с хемилюминесцентным субстратом максимальной чувствительности Pierce SuperSignal Femto, инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте и затем считывают на люминометре.

На основании результатов считывания на люминометре проводят линейный регрессионный анализ для получения уравнения отрезков, соответствующих данным стандартной кривой. Затем с помощью этого уравнения вычисляют концентрацию прогастрина в различных образцах пациентов.

Вычисляют среднюю концентрацию прогастрина в плазме пациентов, имеющих рак яичников, и сравнивают ее со средней плазматической концентрацией прогастрина в плазме пациентов контрольной группы. Эти данные показывают, что пациенты, имевшие рак яичников, имели повышенные уровни прогастрина в плазме по сравнению с контрольной группой здоровых людей.

Пример 3. Нейтрализующая активность анти-hpg антител в отношении раковых клеточных линий.

3.1. Нейтрализующая активность анти-hpg моноклональных антител.

PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 и SK-OV-3 представляют собой клеточные линии, используемые для изучения рака яичников, вырабатывающие и секретирующие прогастрин. Моноклональные антитела к PG испытывали на их способность ингибировать пролиферацию в этих различных клеточных линиях. Выживание клеток каждой из клеточных линий Caov-3, ES-2, SK-OV-3, KATO-III, AGS, и MGC-803 анализировали, используя различные анти-hPG моноклональные антитела.

Во время каждого эксперимента 50000 клеток высевают в 6-луночные планшеты в среде, содержащей фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в течение 8 ч. Клетки подвергают истощению сыворотки в течение ночи, и через 24 ч после высевания (время "ТО") клетки обрабатывают в шести параллельных опытах каждые 12 ч в течение 48 ч, при отсутствии фетальной телячьей сыворотки, с помощью от 1 до 20 мкг/мл моноклональных контрольных антител (моноклональное антитело анти-пирамицин)(CT mAb), или с помощью от 1 до 20 мкг/мл анти-hPG mAb, где mAb представляет собой C-концевое анти-hPG моноклональное антитело или N-концевое анти-hPG моноклональное антитело.

mAb представляет собой C-концевое анти-hPG антитело, выбранное из

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 29 и 30, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31, 32 и 33,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34, 35 и 36, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37, 38 и 39;

или N-концевое анти-hPG антитело, выбранное из

моноклонального антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно.

Подсчитывают количество клеток в момент времени T0 в контрольной лунке для каждого эксперимента.

В частности, подсчитывают количество живых клеток в контрольных и в обработанных анти-hPG mAb лунках через 48 ч, затем вычисляют разность между каждым количеством клеток и количеством клеток, определенным в момент времени T0. Полученное в результате количество обработанных анти-hPG mAb клеток выражают в процентах от количества контрольных клеток, обработанных mAb.

Обработка анти-hPG моноклональными антителами уменьшает количество клеток по сравнению с обработкой контрольным антителом. Статистическую значимость определяют с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с ретроспективным анализом с критерием Тьюки: * соответствует $p < 0,05$, ** соответствует $p < 0,01$ и *** соответствует $p < 0,001$. В каждой линии клеток, анти-hPG антитела снижают выживание клеток.

3.2. Нейтрализующая активность анти-hPG гуманизированных антител на выживание клеток.

Гуманизированные антитела к PG испытывали на их способность ингибировать пролиферацию клеточных линий PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 и SK-OV-3. Выживание клеток из клеточных линий PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 и SK-OV-3 изучали, используя различные анти-hPG гуманизированные антитела.

Во время каждого эксперимента 80000 клеток высевали в 6-луночные планшеты в среде, содержащей фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в течение 8 ч. Клетки подвергают истощению сыворотки в течение ночи, и через 24 ч после посева (время "T0") клетки обрабатывают в шести параллельных опытах каждые 12 ч в течение 48 ч, при отсутствии фетальной телячьей сыворотки, с помощью 20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (античеловеческие FcG1, из BioXCell)(CT Hz) или с помощью 20 мкг/мл анти-hPG Hz (PG Hz), где Hz представляет собой C-концевое анти-hPG гуманизированное антитело или N-концевое анти-hPG гуманизированное антитело. Во время каждого эксперимента подсчитывают количество клеток в момент времени T0 в контрольной лунке.

В частности, подсчитывают количество живых клеток в контрольных и в обработанных анти-hPG Hz лунках через 48 ч, затем вычисляют разность между каждым количеством клеток и количеством клеток, определенным в момент времени T0.

Обработка с помощью анти-hPG Hz антител уменьшает количество клеток по сравнению с обработкой контрольным антителом.

3.3. Нейтрализующая активность анти-hPG моноклональных антител в отношении частоты раковой стволовой клетки.

Моноклональные антитела к PG испытывали на их способность снижать частоту раковой стволовой клетки (англ. CSC) в клеточных линиях PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 и SK-OV-3, используя анализ методом предельных разведений (англ. Extreme Limiting Dilution Assay, ELDA). Частоту CSC в случае каждой из клеточных линий PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 и SK-OV-3 анализировали, используя различные анти-hPG моноклональные антитела.

Во время каждого эксперимента клетки высевали в 96-луночный планшет Ultra-Low Attachment (ULA P96) при фиксированных клеточных концентрациях с помощью проточного цитометра FACS Aria, используя при этом диапазон концентраций от 1 до 500 клеток в лунку. Клетки культивируют в течение 11 дней на планшетах ULA со средой M11 (Macari et al, Oncogene, 2015) и обрабатывают каждые 3 или 4 дня с помощью от 1 до 20 мкг/мл моноклональных контрольных антител (моноклональное антитело анти-пирамицин) (CT mAb), или с помощью от 1 до 20 мкг/мл анти-hPG mAb, где mAb представляет собой C-концевое анти-hPG моноклональное антитело или N-концевое анти-hPG моноклональное антитело.

В частности, в конце фазы инкубирования планшеты наблюдают с помощью фазово-контрастного микроскопа и оценивают количество позитивных лунок на клеточную концентрацию. И наконец, используют веб-приложение ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) для вычисления частоты CSC для каждой лечебной группы и исследуют на любое статистическое расхождение между группами (модифицированный тест хи-квадрат).

Обработка анти-hPG моноклональными антителами снижает частоту CSC по сравнению с обработкой с помощью контрольного антитела.

3.4. Нейтрализующая активность анти-hPG гуманизированных антител в отношении частоты раковой стволовой клетки.

Анализ сферообразования.

Гуманизированные антитела к PG испытывали на их способность снижать частоту раковой стволовой клетки (CSC) в клеточных линиях Caov-3, ES-2 и SK-OV-3 с помощью анализа сферообразования.

Во время каждого эксперимента 500 клетки высевает в 24-луночные планшеты Ultra-low attachment (ULA). Клетки культивируют в течение 10 дней на планшетах ULA со средой M11 (Macari et al, Oncogene, 2015) и обрабатывают каждые 3 или 4 дня с помощью 20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (античеловеческие FcG1, из BioXCell)(CT Hz) или с помощью 20 мкг/мл анти-hPG Hz (PG Hz), где Hz представляет собой C-концевое анти-hPG гуманизированное антитело или N-концевое анти-hPG гуманизированное антитело.

В частности, в конце фазы инкубирования лунки фотографируют посредством светлоразностной микроскопии, снимки анализируют и подсчитывают количество сфер со средним диаметром более 30 мкм.

Обработка с помощью анти-hPG гуманизированного антитела снижает частоту CSC по сравнению с обработкой с помощью контрольного антитела.

Анализ методом предельных разведений.

Гуманизированные антитела к PG испытывали на их способность снижать частоту раковой стволовой клетки (CSC) в клеточных линиях PA-1, Caov-3, SW626 и SK-OV-3, используя анализ методом предельных разведений (ELDA). Частоту CSC на основании каждой из клеточных линий PA-1, Caov-3, SW626 и SK-OV-3 анализировали, используя различные анти-hPG гуманизированные антитела.

Во время каждого эксперимента клетки высевает в лунку 96-луночного планшета Ultra-Low Attachment (ULA P96) при фиксированных клеточных концентрациях с помощью проточного цитометра FACS Aria, используя при этом диапазон концентраций от 1 до 500 клеток в лунку. Клетки культивируют в течение 11 дней на планшетах ULA со средой M11 (Macari et al, Oncogene, 2015) и обрабатывают каждые 3 или 4 дня с помощью от 1 до 20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (античеловеческие FcG1, from BioXCell)(CT Hz) или с помощью от 1 до 20 мкг/мл анти-hPG Hz, где Hz представляет собой C-концевое анти-hPG гуманизированное антитело или N-концевое анти-hPG гуманизированное антитело.

В частности, в конце фазы инкубирования планшеты наблюдают с помощью фазово-контрастного микроскопа и оценивают количество позитивных лунок на клеточную концентрацию. И наконец, используют веб-приложение ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) для вычисления частоты CSC для каждой лечебной группы и исследуют на любое статистическое расхождение между группами (модифицированный тест хи-квадрат).

Обработка с помощью анти-hPG гуманизированного антитела снижает частоту CSC по сравнению с обработкой с помощью контрольного антитела.

3.5. Нейтрализующая активность анти-hPG моноклональных антител на пути WNT/ β -катенин.

PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 и SK-OV-3 представляют собой клеточные линии, используемые для изучения рака яичников, вырабатывающие и секретирующие прогастрин. Моноклональные антитела к PG исследовали в отношении их способности ингибировать путь WNT/ β -катенин в этих различных клеточных линиях, используя экспрессию белка сурвинина, хорошо известного целевого гена пути WNT/ β -катенин, в качестве считывания. Экспрессию сурвинина на основании каждой из клеточных линий PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 и SK-OV-3 анализировали, используя различные анти-hPG моноклональные антитела.

Во время каждого эксперимента 50000 клеток высевает в 6-луночные планшеты в среде, содержащей фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в течение 8 ч. Клетки подвергают истощению сыворотки в течение ночи, и через 24 ч после высевания клетки обрабатывают в четырех параллельных опытах каждые 12 ч в течение 72 ч, при отсутствии фетальной телячьей сыворотки, с помощью от 1 до 20 мкг/мл моноклональных контрольных антител (моноклональные антитела анти-пиромидин)(CT mAb) или с помощью от 1 до 20 мкг/мл анти-hPG mAb, где mAb представляет собой C-концевое анти-hPG моноклональное антитело или N-концевое анти-hPG моноклональное антитело.

В частности, после 72 ч обработки клетки собирают и выделяют общий белок с помощью буфера RIPA. Затем равное количество белка из клеток, обработанных CT mAb или анти-hPG mAb, подвергают вестерн-блоттингу, используя анти-сурвинин антитело (моноклональное антитело, #2802 из Cell Signaling) и анти-актин антитело в качестве контроля для нанесения (моноклональное антитело, #A4700 из SIGMA). Количественную оценку выполняют с помощью химической системы GBOX из Syngene.

Обработка анти-hPG моноклональными антителами снижает экспрессию сурвинина по сравнению с обработкой с помощью контрольного антитела. Статистическую значимость определяют с помощью непарного критерия Стьюдента: * соответствует $p < 0,05$, ** соответствует $p < 0,01$, и *** соответствует $p < 0,001$.

3.6. Нейтрализующая активность анти-hPG гуманизированных антител на пути WNT/ β -катенин.

Гуманизированные антитела к PG испытывали на их способность ингибировать путь WNT/ β -катенин в клеточных линиях PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 и SK-OV-3, используя экспрессию белка сурвинина, хорошо известного целевого гена пути WNT/ β -катенин, в качестве считывания. Экспрессию сурвинина на основании каждой из клеточных линий PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 и SK-OV-3 анализировали, используя различные анти-hPG гуманизированные антитела.

Во время каждого эксперимента 50000 клеток высевает в 6-луночные планшеты в среде, содержа-

щей фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в течение 8 ч. Клетки подвергают истощению сыворотки в течение ночи, и через 24 ч после высевания клетки обрабатывают в четырех параллельных опытах каждые 12 ч в течение 72 ч, при отсутствии фетальной телячьей сыворотки, с помощью от 1 до 20 мкг/мл гуманизированных контрольных антител (античеловеческие FcG1, from BioXCell)(CT Hz) или с помощью от 1 до 20 мкг/мл анти-hPG Hz, где Hz представляет собой C-концевое анти-hPG гуманизированное антитело или N-концевое анти-hPG гуманизированное антитело.

В частности, после 72 ч обработки клетки собирают и выделяют общий белок с помощью буфера RIPA. Затем равное количество белка из клеток, обработанных CT Hz или анти-hPG Hz, подвергают вестерн-блоттингу, используя анти-сурвивин антитело (моноклональное антитело, #2802 из Cell Signaling) и антиактин антитело в качестве контроля для нанесения (моноклональное антитело, #A4700 из SIGMA). Количественную оценку выполняют с помощью химической системы GBOX из Syngene.

Обработка с помощью анти-hPG гуманизированного антитела снижает экспрессию сурвивина по сравнению с обработкой с помощью контрольного антитела. Статистическую значимость определяют с помощью непарного критерия Стьюдента: * соответствует $p < 0,05$, ** соответствует $p < 0,01$ и *** соответствует $p < 0,001$.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции для получения лекарственного средства для профилактики или лечения рака яичников, где композиция содержит прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

2. Применение по п.1, где прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из гуманизированных антител, химерных антител, одноцепочечных антител, камелизированных антител, IgA1-антител, IgA2-антител, IgD-антител, IgE-антител, IgG1-антител, IgG2-антител, IgG3-антител, IgG4-антител и IgM-антител.

3. Применение по п.1 или 2, где прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связывает прогастрин, но не связывает гастрин-17 (G17), гастрин-34 (G34), удлиненный глицином гастрин-17 (G17-Gly) или удлиненный глицином гастрин-34 (G34-Gly).

4. Применение по любому из пп.1-3, где прогастринсвязывающее антитело представляет собой моноклональное антитело.

5. Применение по любому из пп.1-4, где прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из N-концевых антител к прогастрину и C-концевых антител к прогастрину.

6. Применение по любому из пп.1-5, где прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой нейтрализующее антитело.

7. Применение по любому из пп.1-6, где прогастринсвязывающее антитело представляет собой гуманизированное антитело, выбранное из

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, и

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по

меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно.

8. Применение по любому из пп.1-7, где рак яичников является метастазированным.

9. Способ профилактики или лечения рака яичников у пациента, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение пациенту композиции, содержащей прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Способ по п.9, где прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из гуманизированных антител, химерных антител, одноцепочечных антител, камелизированных антител, IgA1-антител, IgA2-антител, IgD-антител, IgE-антител, IgG1-антител, IgG2-антител, IgG3-антител, IgG4-антител и IgM-антител.

11. Способ по п.9 или 10, где прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связывает прогастрин, но не связывает гастрин-17 (G17), гастрин-34 (G34), удлиненный глицином гастрин-17 (G17-Gly) или удлиненный глицином гастрин-34 (G34-Gly).

12. Способ по любому из пп.9-11, где прогастринсвязывающее антитело представляет собой моноклональное антитело.

13. Способ по любому из пп.9-12, где прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из N-концевых антител к прогастрину и C-концевых антител к прогастрину.

14. Способ по любому из пп.9-13, где прогастринсвязывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой нейтрализующее антитело.

15. Способ по любому из пп.9-14, где прогастринсвязывающее антитело представляет собой гуманизированное антитело, выбранное из

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно,

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, и

антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно.

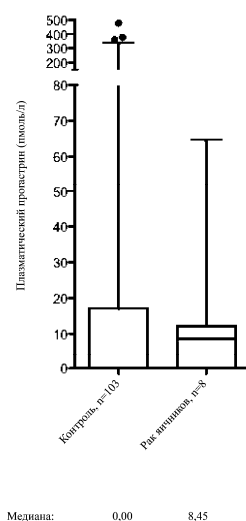
16. Способ по любому из пп.9-15, где рак яичников является метастазированным.

17. Способ по любому из пп.9-16, где композиция подлежит введению с противораковой терапевтической молекулой, выбранной из химиотерапевтической молекулы и молекулы таргетной терапии.

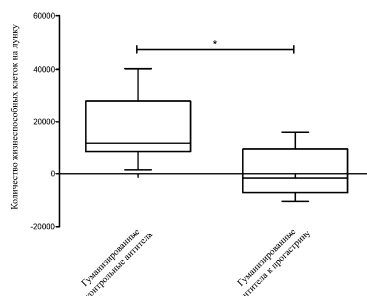
18. Способ по п.17, где композицию и противораковую терапевтическую молекулу вводят одновременно, последовательно или раздельно.

19. Способ по п.17 или 18, где химиотерапевтическая молекула выбрана из антагонистов фолатов, антагонистов пуринов, антагонистов пиримидинов, алкилирующих ДНК молекул, лекарственных средств для сшивания ДНК, антибиотиков, комплексов платины, ингибиторов протеасом, ядов митотического веретена, ингибиторов топоизомеразы и ингибиторов тирозинкиназы.

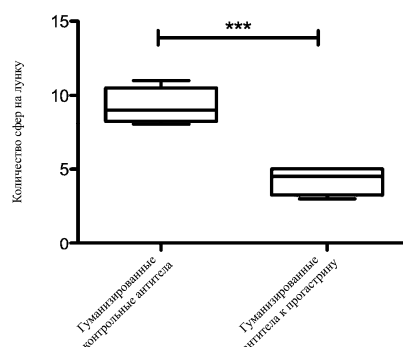
20. Способ по любому из пп.17-19, где молекула таргетной терапии выбрана из антител, направленных против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), таких как цетуксимаб или панитумумаб, антител, направленных против фактора роста эпителия сосудов (VEGF), таких как бевацизумаб, антител, направленных против рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (HER2), таких как трастузумаб или пертузумаб, антител, направленных против рецептора иммунной контрольной точки PD-1 и его лиганда PDL-1, таких как пембролизумаб, антител, направленных против антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), таких как ипилимумаб, низкомолекулярных лекарственных средств, нацеленных на EGFR, таких как эрлотиниб, низкомолекулярных таргетных препаратов против протоонкогена B-Raf (BRAF), таких как вемурафениб или дабрафениб, и рекомбинантного белка слияния, нацеленного на VEGF, такого как Афлиберсепт.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

