

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092573** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.05.31

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

(22) Дата подачи заявки
2017.01.02

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЖЕЛУДКА**

(31) **15307191.5; 16305131.1**

(72) Изобретатель:

(32) **2015.12.31; 2016.02.05**

Приёр Александр (FR)

(33) **EP**

(74) Представитель:

(62) **201891528; 2017.01.02**

Хмара М.В. (RU)

(71) Заявитель:

**ПРОГАСТРИН Э КАНСЕР С.А Р.Л.
(LU)**

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

A1

202092573

202092573

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЖЕЛУДКА

Настоящая заявка выделена из заявки № 201891528 на выдачу евразийского патента на изобретение, поданной 02.01.2017 г., с испрашиванием приоритета по
5 дате подачи заявок EP 15307191.5 и EP 16305131.1 поданных 31.12.2015 г. и 05.02.2016 г. соответственно.

Введение

Настоящее изобретение относится к диагностике *in vitro*, профилактике и лечению рака, более конкретно оно относится к способам диагностики *in vitro* рака
10 желудка и к способам и композициям профилактики или лечения рака желудка. Композиции в соответствии с изобретением содержат прогастрин-связывающую молекулу, в частности, антитело к прогастрину человека (hPG), при этом способы в соответствии с изобретением включают применение прогастрин-связывающей молекулы и, в частности, антитела к hPG.

15 Рак желудка считают пятой по значимости ведущей причиной рака и третьей по значимости ведущей причиной смерти от рака и составляет 7% случаев и 9% смертельных исходов. Как продемонстрировано в многочисленных исследованиях, наиболее распространенной причиной рака желудка является инфекция бактериями *Helicobacter pylori*, и в этих исследованиях показана связь между инфекцией
20 *Helicobacter pylori* и раком желудка.

Рак желудка развивается из выстилки желудка, впоследствии рак может распространиться на другие области организма и, в частности, печень, легкие, кости, выстилку брюшной полости и лимфатические узлы. Виды лечения обычно включают хирургическое вмешательство, химиотерапию, радиотерапию и таргетную
25 терапию, отдельно или в комбинации. Однако исходы часто неблагоприятны, и 5-летняя выживаемость на глобальном уровне составляет менее 10%. Это по большей части связано с тем, что у большинства людей обнаруживают только распространенное заболевание, что имеет прямые последствия в отношении выживаемости. Показано, что в некоторых странах Азии усилия по проведению
30 скрининга сопровождаются увеличением выживаемости.

Клиническая диагностика основана на биопсии, которую проводят под эндоскопией. Впоследствии можно использовать медицинскую визуализацию, чтобы определить, распространилось ли заболевание в другие области организма.

Поэтому сохраняется потребность в способах, позволяющих осуществлять быструю, надежную и экономически эффективную диагностику рака желудка, поскольку сохраняется потребность в новых композициях и способах предупреждения или лечения рака желудка.

5 Все это составляет объект изобретения.

Описание

В настоящем изобретении теперь предложены способы диагностики *in vitro* рака желудка, включающие обнаружение прогастрина в биологическом образце от субъекта. Предпочтительно определяют количество прогастрина в указанном образце, что, таким образом, позволяет количественно определить прогастрин. В настоящем изобретении также предложена композиция для применения в профилактике или лечении рака желудка, содержащая связывающееся с прогастрином антитело, и способы профилактики или лечения рака желудка, включающие применение композиции, содержащей связывающееся с прогастрином антитело, отдельно или в комбинации с любыми другими известными профилактическими или терапевтическими способами против рака желудка.

Препрогастрин человека, представляющий собой 101-аминокислотный пептид (ссылка на аминокислотную последовательность: AAB19304.1), является первичным продуктом трансляции гена гастринина. Прогастрин образуется путем отщепления первой 21 аминокислоты (сигнального пептида) от препрогастрина. Далее 80-аминокислотная цепь прогастрина претерпевает процессинг под действием расщепляющих и модифицирующих ферментов с образованием нескольких биологически активных форм гормона гастринина: гастрин 34 (G34) и удлиненный гастрин 34, содержащий дополнительный глицин (G34-Gly), содержащий аминокислоты 38–71 прогастрина, гастрин 17 (G17) и удлиненный гастрин 17, содержащий дополнительный глицин (G17-Gly), содержащий аминокислоты 55–71 прогастрина.

Моноклональные антитела к прогастрину человека (антитела к hPG) и их применение для диагностики или терапии описаны в следующих документах: WO 2011/083 088 для колоректального рака, WO 2011/083 090 для рака молочной железы, WO 2011/083 091 для рака поджелудочной железы, WO 2011/116 954 для колоректального и желудочно-кишечного рака и WO 2012/013 609 и WO 2011/083089 для патологий печени.

Настоящее изобретение будет более полно понято из приведенного в настоящем документе подробного описания и сопроводительных графических материалов, которые приведены только для иллюстрации и не ограничивают заданный объем изобретения.

5 В первом аспекте настоящее изобретение относится к способу оценки *in vitro* риска присутствия рака желудка, где указанный способ включает стадию обнаружения прогастрина в биологическом образце от субъекта. Присутствие прогастрина в образце указывает на риск присутствия рака желудка.

10 Таким образом, в первом воплощении изобретение относится к способу *in vitro* для оценки риска присутствия рака желудка у субъекта, где указанный способ включает стадии:

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

15 б) обнаружение связывания этой прогастрин-связывающей молекулы с прогастрином в образце, где это связывание указывает на риск присутствия рака желудка.

Связывание прогастрин-связывающей молекулы может быть обнаружено с помощью различных методик анализа, доступных специалистам в данной области техники. Хотя в объем изобретения включены любые подходящие методики проведения анализов, можно упомянуть, в частности, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунологический анализ (РИА), Вестерн-блоттинг и иммуногистохимический анализ (ИГХ).

25 В предпочтительном воплощении изобретения способ оценки *in vitro* риска присутствия рака желудка у субъекта в соответствии с изобретением включает стадии:

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

30 б) определение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце, где концентрация прогастрина в биологическом образце по меньшей мере 10 пмоль/л указывает на риск присутствия рака желудка.

Как только определена концентрация прогастрина, присутствующего в образце, этот результат можно сравнивать с результатом для контрольного (-ых) образца (-ов), который (-ые) получают таким же образом, как исследуемые образцы,

но от индивида (-ов), у которого (-ых) известно отсутствие рака желудка. Если концентрация прогастрина в исследуемом образце статистически значимо повышена, можно сделать вывод о наличии повышенной вероятности, что субъект, от которого получен образец, страдает раком желудка.

5 Таким образом, в более предпочтительном воплощении изобретения способ по изобретению включает дополнительные стадии:

c) определение референсной концентрации прогастрина в контрольном образце,

d) сравнение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце
10 с референсной концентрацией прогастрина,

e) оценка на основании сравнения стадии d) риска присутствия рака желудка.

В соответствии с другим аспектом изобретение относится к способу *in vitro* для диагностики рака желудка у субъекта, где указанный способ включает стадии:

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

b) обнаружение связывания этой прогастрин-связывающей молекулы с прогастрином в образце, где это связывание указывает на присутствие рака желудка у субъекта.

20 В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака желудка у субъекта, включающий стадии:

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

b) определение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце, где концентрация прогастрина в биологическом образце по меньшей мере
25 10 пмоль/л является показателем присутствия рака желудка у данного субъекта.

В более конкретном воплощении способа в соответствии с изобретением концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пмоль/л, по меньшей мере 20 пмоль/л, по меньшей мере 30 пмоль/л в данном биологическом образце является
30 показателем присутствия рака желудка у данного субъекта.

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

a) определение референсной концентрации прогастрина в контрольном образце,

- b) сравнение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце с референсным уровнем или концентрацией прогастрина,
- c) диагностика на основании сравнения стадии d) присутствия рака желудка.

5 В соответствии с другим аспектом изобретение относится к способу *in vitro* для диагностики рака желудка у субъекта, где указанный способ включает стадии:

- a) приведение в контакт биологического образца от указанного субъекта с по меньшей мере одной прогастрин-связывающей молекулой, и
 - b) обнаружение связывания этой прогастрин-связывающей молекулы с
- 10 прогастрином в образце, где это связывание указывает на присутствие метастазированного рака желудка у субъекта.

В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* метастазированного рака пищевода у субъекта из биологического образца данного субъекта, включающий стадии:

- a) приведение в контакт указанного биологического образца с по меньшей мере одной прогастрин-связывающей молекулой,
 - b) определение с помощью биохимического анализа уровня или
- концентрации прогастрина в указанном биологическом образце, где концентрация прогастрина в биологическом образце по меньшей мере на 10 пмоль/л выше
- 15 является показателем присутствия метастазированного рака желудка у данного субъекта.

В более конкретном воплощении способа в соответствии с изобретением концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пмоль/л, по меньшей мере 20 пмоль/л, по меньшей мере 30 пмоль/л, по меньшей мере 40 пмоль/л или по

25 меньшей мере 50 пмоль/л в данном биологическом образце является показателем метастазированного рака пищевода у данного субъекта.

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

- a) определение референсной концентрации прогастрина в контрольном
- 30 образце,
- b) сравнение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце с референсной концентрацией прогастрина,
 - c) диагностика на основании сравнения стадии d) присутствия метастазированного рака желудка.

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

5 В более конкретном воплощении изобретения в способе диагностики рака желудка в соответствии с настоящим изобретением биологический образец от субъекта приводят в контакт с по меньшей мере одной прогастрин-связывающей молекулой, представляющей собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

10 Выражение «оценка риска присутствия рака желудка у субъекта» означает определение относительной вероятности того, что данный субъект страдает раком желудка по сравнению с контрольным субъектом или значением. Способ в соответствии с изобретением представляет собой средство оценки указанного риска в комбинации с другими способами или показателями, такими как клиническое
15 обследование, биопсия и определение уровня известного биомаркера рака желудка, такого как, например, пепсиноген.

Выражение диагностика *in vitro* означает определение, страдает ли субъект конкретным поражением. Известно, что в диагностику рака желудка вовлечено по меньшей мере клиническое наблюдение симптомов у субъекта и обнаружение
20 пепсиногена. Тестирование на пепсиноген в настоящее время используют в качестве биомаркера, но точность этого теста для обнаружения рака желудка низка, и его чувствительность по оценкам находится в диапазоне от 35,8% до 62,3% (Yanaoka *et al*, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008). Хотя в фазе исследования было идентифицировано несколько биомаркеров, все еще остается значительная
25 проблема в отношении их перевода в клинику, чаще всего из-за отсутствия способа систематической оценки Pepe *et al*, J Natl Cancer Inst, 2008).

Таким образом, способ диагностики *in vitro* рака желудка в соответствии с настоящим изобретением можно рассматривать как средство в рамках процесса диагностики.

30 В более конкретном воплощении настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака желудка у субъекта, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце и определение известного биомаркера рака желудка, предпочтительно пепсиногена.

Выражение «рак желудка» также включает, в частности, «карциномы желудка», но также лимфомы и мезенхимные опухоли, которые также могут развиваться в пределах желудка. Выражение «рак желудка» также включает рак желудка, сопровождающийся метастазами, в частности, метастазами в печень, легкие, кости, брюшную полость и лимфатические узлы.

Термин «прогастрин» означает пептид прогастрин млекопитающего и, в частности, прогастрин человека. Во избежание сомнений, без какого-либо уточнения выражение «прогастрин человека» относится к PG человека последовательности SEQ ID No. 1. Прогастрин человека конкретно содержит N-концевой и C-концевой домены, которые отсутствуют в упомянутых выше биологически активных формах гормона гастрин. Предпочтительно последовательность этого N-концевого домена представлена SEQ ID NO. 2. В другом предпочтительном воплощении изобретения последовательность этого C-концевого домена представлена SEQ ID NO. 3.

Определение концентрации прогастрина в способе в соответствии с изобретением выполняют любым методом, известным специалистам в области биохимии.

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

При измерении уровней экспрессии на уровне белка это определение можно, в частности, выполнять с использованием специфичных прогастрин-связывающих молекул, таких как, например, антитела, в частности, с помощью хорошо известных технологий, таких как окрашивание клеточной мембраны с использованием биотинилирования, или других эквивалентных методов с последующей иммунопреципитацией специфичными антителами, Вестерн-блоттинга, ИФА или метода иммуноферментных пятен (ELISPOT), твердофазных иммуносорбентных ферментных анализов (ELISA), радиоиммунологических анализов (РИА), иммуногистохимии (ИГХ), иммунофлуоресценции (ИФ), микрочипов антител или тканевых микрочипов в сочетании с иммуногистохимией. Другие приемлемые методики включают метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) или метод резонансного переноса энергии биолюминесценции (BRET), микроскопические или иммуногистохимические методики с использованием отдельных клеток и одной или нескольких длин волны возбуждения и с

применением любого из адаптированных оптических методов, таких как электрохимические методы (вольтметрические и амперометрические методики), атомно-силовая микроскопия и радиочастотные методы, например, конфокальная или неконфокальная многополюсная резонансная спектроскопия, обнаружение флуоресценции, люминесценции, хемилюминесценции, оптической плотности, отражающей способности, пропускающей способности и двойного лучепреломления или индекса рефракции (например, поверхностный плазмонный резонанс, эллипсометрия, резонансный зеркальный метод или интерферометрия); клеточный ИФА; проточную цитометрию; радиоизотопный метод; магнитно-резонансную томографию; анализ с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ДНС-ПААГ-электрофореза, англ. - SDS-PAGE); ВЭЖХ-масс-спектроскопию; жидкостную хроматографию/масс-спектроскопию/масс-спектрометрию (ЖХ-МС/МС)). Все эти методы хорошо известны в данной области техники и не нуждаются в дополнительной детализации в настоящем документе. Эти различные методы можно использовать для измерения уровней прогастрина.

Указанный метод может быть, в частности, выбран из: метода на основе иммунологического детектирования, метода на основе Вестерн-блоттинга, метода на основе масс-спектрометрии, метода на основе хроматографии и метода на основе проточной цитометрии. Хотя в объем изобретения включены любые приемлемые методы проведения анализов, особенно полезными для осуществления способа по изобретению являются такие методы, как FACS, ИФА, РИА, Вестерн-блоттинг и ИГХ.

В более конкретном воплощении изобретения способ диагностики *in vitro* рака желудка в соответствии с изобретением включает приведение в контакт биологического образца от субъекта с прогастрин-связывающей молекулой с использованием иммуноферментного анализа, предпочтительно на основе методик, выбранных из РИА и ИФА.

«Биологический образец» при использовании в настоящем документе представляет собой образец биологической ткани или текучей среды, содержащий нуклеиновые кислоты или полипептиды, например, белок рака желудка, полинуклеотид или транскрипт. В таком образце должно быть возможно определение уровней экспрессии прогастрина. Показано, что прогастрин является секретлируемым белком. Предпочтительные биологические образцы для определения уровня белка прогастрина, таким образом, включают биологические

текучие среды. «Биологическая текучая среда» при использовании в настоящем документе означает любую текучую среду, включающую материал биологического происхождения. Предпочтительные биологические текучие среды для использования в настоящем изобретении включают текучие среды организма животного, например млекопитающего, предпочтительно субъекта-человека. Текучая среда организма может представлять собой любую текучую среду организма, включающую без ограничений кровь, плазму крови, сыворотку крови, лимфу, спинномозговую жидкость (СМЖ), слюну, пот и мочу. Предпочтительно указанные жидкие биологические образцы включают такие образцы, как образец крови, образец плазмы крови или образец сыворотки крови. Более предпочтительно биологический образец представляет собой образец крови. Действительно, такой образец крови может быть получен путем абсолютно безвредного забора крови у пациента и, следовательно, позволяет провести неинвазивную оценку рисков развития опухоли у субъекта.

«Биологический образец» при использовании в настоящем документе также включает образец солидного рака исследуемого пациента, когда рак представляет собой солидный рак. Такой образец солидного рака позволяет специалисту проводить измерение уровня биомаркера по изобретению любого типа. В некоторых случаях способы в соответствии с изобретением могут дополнительно включать предварительную стадию взятия образца солидного рака у пациента. Под «образцом солидного рака» подразумевают образец опухолевой ткани. Даже у пациента, страдающего раком, ткань, являющаяся местом расположения опухоли, все же содержит неопухолевую здоровую ткань. Поэтому «образец рака» следует ограничивать опухолевой тканью, взятой у пациента. Указанный «образец рака» может представлять собой образец биоптата или образец, полученный после хирургической резекционной терапии.

Биологический образец в характерном случае получают от эукариотического организма, наиболее предпочтительно млекопитающего или птицы, рептилии или рыбы. Действительно, «субъект», которого можно подвергать описанному в настоящем документе способу, может представлять собой любое из животных класса млекопитающих, включая человека, собаку, кошку, крупный рогатый скот, козу, поросенка, свинью, овцу и обезьяну; либо птицу, рептилию или рыбу. Предпочтительно субъект представляет собой человека; субъект-человек может быть известен как «пациент».

Под «получением биологического образца» в настоящем документе подразумевают получение биологического образца для использования в способах, описанных в данном изобретении. Чаще всего это осуществляют путем извлечения образца клеток у млекопитающего, но также можно осуществлять путем
5 использования ранее выделенных клеток (например, выделенных другим лицом, в другое время и/или для другой цели) или выполнения способов по изобретению *in vivo*. Особенно полезными будут архивные ткани, для которых известна история лечения или исхода.

Этот образец может быть получен и при необходимости подготовлен в
10 соответствии со способами, известными специалисту в данной области техники. В частности, в данной области техники хорошо известно, что образец следует брать у пациента натощак.

Определение концентрации прогастрина относится к определению количества прогастрина в известном объеме образца. Концентрация прогастрина
15 может быть выражена относительно контрольного образца, например, в виде отношения или доли в процентах. Концентрация может быть также выражена в виде интенсивности или локализации сигнала в зависимости от метода, используемого для определения указанной концентрации. Предпочтительно концентрацию соединения в образце выражают после нормализации относительно общей
20 концентрации родственных соединений в указанном образце, например, уровень или концентрацию белка выражают после нормализации относительно общей концентрации белков в образце.

Предпочтительно риск того, что данный субъект страдает раком желудка, определяют путем сравнения уровня прогастрина, измеренного в данном
25 биологическом образце, с референсным уровнем.

Термин «референсный уровень» при использовании в настоящем документе относится к уровню экспрессии рассматриваемого маркера рака желудка, т. е. прогастрина, в контрольном образце. «Контрольный образец» при использовании в настоящем документе означает образец, полученный от субъектов,
30 предпочтительно двух или более субъектов, у которых известно отсутствие заболевания, или альтернативно из общей популяции. Приемлемые уровни экспрессии прогастрина можно определить путем измерения уровней экспрессии указанного маркера у нескольких приемлемых субъектов, и такие референсные уровни можно скорректировать для конкретных популяций субъектов. Референсное

значение или референсный уровень может представлять собой абсолютное значение; относительное значение; значение, имеющее верхний или нижний предел; диапазон значений; среднее значение; медианное значение, среднее арифметическое значение или значение по сравнению с конкретным контрольным
5 или исходным значением. Референсное значение может быть получено на основании значения для отдельного образца, такого как, например, значение, полученное для образца от исследуемого субъекта, но в более ранний момент времени. Референсное значение может быть получено на основании большого количества образцов, например, из популяции субъектов из группы
10 соответствующего хронологического возраста, или на основании пула образцов, включающего или исключающего исследуемый образец.

Предпочтительно «референсный уровень» представляет собой заранее определенный уровень прогастрина, полученного из биологического образца от субъекта с известным конкретным статусом в отношении рака. В конкретных
15 воплощениях изобретения референсный уровень, используемый для сравнения с исследуемым образцом на стадии (b), может быть получен из биологического образца от здорового субъекта или из биологического образца от субъекта, страдающего раком; понятно, что референсный профиль экспрессии может быть также получен из пула биологических образцов от здоровых субъектов или из пула
20 образцов от субъектов, страдающих раком.

В конкретном воплощении способа по изобретению контрольный образец собирают у субъектов, у которых исключен любой рак и предпочтительно любая патология. Должно быть понятно, что в соответствии с природой биологического
образца, собранного у пациента, контрольный образец будет представлять собой
25 биологический образец той же природы, что и указанный биологический образец.

Уровень прогастрина определяют настоящим способом путем определения количества прогастрина, связанного прогастрин-связывающей молекулой, предпочтительно антителом, распознающим прогастрин.

Под прогастрин-связывающей молекулой в настоящем документе
30 подразумевают любую молекулу, которая связывает прогастрин, но не связывает гастрин-17 (G17), гастрин-34 (G34), удлинённый гастрин-17, содержащий дополнительный глицин (G17-Gly), или удлинённый гастрин-34, содержащий дополнительный глицин (G34-Gly). Прогастрин-связывающая молекула по настоящему изобретению может представлять собой любую прогастрин-

связывающую молекулу, такую как, например, молекула антитела или молекула рецептора. Предпочтительно прогастрин-связывающая молекула представляет собой антитело к прогастрину или его антигенсвязывающий фрагмент.

5 В соответствии с конкретным воплощением настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака желудка, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце от субъекта, где у данного субъекта проявляется по меньшей мере один клинический симптом рака желудка.

10 В соответствии с другим конкретным воплощением настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака желудка, включающему определение концентрации прогастрина в биологическом образце от субъекта, где у данного субъекта проявляется по меньшей мере один клинический симптом рака и/или метастаза.

15 Под терминами «связывающий», «связывает» и т. п. подразумевают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует с антигеном комплекс, который в физиологических условиях относительно стабилен. Способы определения того, связываются ли две молекулы, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т. п. В конкретном воплощении изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с прогастрином с 20 меньшей мере в два раза более высокой аффинностью по сравнению с аффинностью его связывания с неспецифической молекулой, такой как бычий сывороточный альбумин (БСА) или казеин. В более конкретном воплощении указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается только с прогастрином.

25 В конкретном воплощении изобретения в способе диагностики рака желудка в соответствии с изобретением биологический образец от субъекта приводят в контакт с по меньшей мере одной прогастрин-связывающей молекулой, где аффинность указанной молекулы к прогастрину, определяемая таким способом, как описано выше, составляет по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 90 нМ, по 30 меньшей мере 80 нМ, по меньшей мере 70 нМ, по меньшей мере 60 нМ, по меньшей мере 50 нМ, по меньшей мере 40 нМ, по меньшей мере 30 нМ, по меньшей мере 20 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 100 пМ, по меньшей мере 10 пМ или по меньшей мере 1 пМ.

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

- 5 Используемый в настоящем документе термин «антитело» подразумевают как включающий в себя поликлональные и моноклональные антитела. Антитело (или «иммуноглобулин») состоит из гликопротеина, содержащего по меньшей мере две тяжелые (H) и две легкие (L) цепи, взаимно связанные дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область (или домен)
- 10 тяжелой цепи (сокращенное обозначение в настоящем документе HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенное обозначение в настоящем документе LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один
- 15 домен CL. Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые «участками, определяющими комплементарность» (complementarity determining regions, CDR) или «гипервариабельными областями», которые в первую очередь ответственны за связывание эпитопа антигена и чередуются с областями, являющимися более
- 20 консервативными, называемыми каркасными областями (framework regions, FR). Способ идентификации CDR в пределах легких и тяжелых цепей антитела и определение их последовательности хорошо известно специалисту в данной области техники. Во избежание сомнений, в отсутствие каких-либо указаний в тексте на противоположное выражение CDR означает гипервариабельные области
- 25 тяжелых и легких цепей антитела по определению Международной базы данных по иммуногенетике (International Immuno-Genetics Database, IMGT), где уникальная нумерация IMGT обеспечивает стандартизованное определение границ каркасных областей и областей, определяющих комплементарность, CDR1-IMGT: 27 до 38, CDR2.
- 30 Уникальная нумерация IMGT определена для сравнения переменных доменов для любого рецептора антигена, типа цепи или биологического вида [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. и Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. В

уникальной нумерации IMGT консервативные аминокислоты всегда имеют одно и то же положение, например цистеин 23 (1-й CYS), триптофан 41 (КОНСЕРВАТИВНЫЙ TRP), гидрофобная аминокислота 89, цистеин 104 (2-й CYS), фенилаланин или триптофан 118 (J-PHE или J-TRP). Уникальная нумерация IMGT обеспечивает

5 стандартизованное определение границ каркасных областей (FR1-IMGT: положения 1–26, FR2-IMGT: 39–55, FR3-IMGT: 66–104 и FR4-IMGT: 118–128) и областей, определяющих комплементарность: CDR1-IMGT: 27–38, CDR2-IMGT: 56–65 и CDR3-IMGT: 105–117. Поскольку гэпы представляют собой незанятые положения, информация о длинах CDR-IMGT (показанные между скобками и разделенные

10 точками, например [8.8.13]) приобретает критическое значение. Уникальную нумерацию IMGT используют в 2D-графических представлениях, обозначаемых как «ожерелья» IMGT [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], и в 3D-структурах в IMGT/3D-структура-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell

15 receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут

20 опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Антитела могут относиться к различным изотипам (а именно IgA, IgD, IgE, IgG или IgM).

В конкретном воплощении изобретения указанное прогастрин-связывающее

25 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны 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.

30 Поликлональное антитело представляет собой антитело, продуцируемое среди одного или более других неидентичных антител или в их присутствии. Как правило, поликлональные антитела продуцирует В-лимфоцит в присутствии нескольких других В-лимфоцитов, продуцирующих неидентичные антитела. Обычно

поликлональные антитела получают непосредственно от иммунизированного животного.

5 Термин «моноклональное антитело» обозначает антитело, образующееся из почти однородной популяции антител, где популяция содержит идентичные антитела за исключением нескольких возможных встречающихся в природе мутации, которые могут быть обнаружены в минимальных соотношениях. Моноклональное антитело образуется в результате роста отдельного клона клеток, такого как гибридома, и характеризуется тяжелыми цепями одного класса или подкласса и легкими цепями одного типа.

10 Под выражением «антигенсвязывающий фрагмент» антитела подразумевают как указывающее на любой пептид, полипептид или белок, сохраняющий способность к связыванию мишени (также в целом обозначаемой как антиген) указанного антитела, обычно одного и того же эпитопа, и содержащий аминокислотную последовательность из по меньшей мере 5 смежных
15 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
20 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
25 аминокислотных остатков или по меньшей мере 200 смежных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности антитела.

В конкретном воплощении изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR антитела, из которого он получен. Еще в одном предпочтительном воплощении изобретения указанный
30 антигенсвязывающий фрагмент содержит 2, 3, 4 или 5 CDR, более предпочтительно 6 CDR антитела, из которого он получен.

Антигенсвязывающие фрагменты могут быть выбраны без ограничений из группы, состоящей из Fv, scFv (sc для одной цепи), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc фрагментов или диател, либо гибридных белков с разупорядоченными пептидами,

таких как XTEN (удлиненный рекомбинантный полипептид) или мотив транскрипционного фактора семейства PAS, или любого фрагмента, период полувыведения которого мог бы быть увеличен путем химической модификации, такой как присоединение поли(алкилен)гликоля, такого как поли(этилен)гликоль («пэгилирование») (пэгилированные фрагменты, называемые Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG или Fab'-PEG) («PEG» обозначает поли(этилен)гликоль), или путем встраивания в липосому, где указанные фрагменты имеют по меньшей мере один из характеристических CDR антитела в соответствии с изобретением. Предпочтительно указанные «антигенсвязывающие фрагменты» будут состоять из или содержать частичную последовательность тяжелой или легкой переменной цепи антитела, из которой они получены, где указанная частичная последовательность будет достаточной для сохранения такой же специфичности связывания, как у антитела, от которого она имеет происхождение, и обладать достаточной аффинностью, предпочтительно по меньшей мере равной 1/100, более предпочтительным образом по меньшей мере равной 1/10 аффинности антитела, от которого она имеет происхождение, по отношению к мишени.

В другом конкретном воплощении изобретения в способе диагностики рака желудка в соответствии с изобретением биологический образец от субъекта приводят в контакт с антителом, связывающимся с прогастрином, где указанное антитело получено методом иммунизации, известным специалисту в данной области техники, при котором в качестве иммуногена используют пептид с аминокислотной последовательностью, содержащей полную аминокислотную последовательность прогастрина или ее участок. Более конкретно указанный иммуноген содержит пептид, выбранный из:

- пептида, аминокислотная последовательность которого содержит или состоит из аминокислотной последовательности полноразмерного прогастрина и, в частности, полноразмерного прогастрина человека SEQ ID NO 1,
- пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует участку аминокислотной последовательности прогастрина и, в частности, полноразмерного прогастрина человека SEQ ID NO 1,
- пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует участку аминокислотной последовательности или полной аминокислотной последовательности N-концевого участка прогастрина, и, в частности, пептидов,

содержащих или состоящих из аминокислотной последовательности: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO 2), и

• пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует участку аминокислотной последовательности или полной аминокислотной последовательности С-концевого участка прогастрина, и, в частности, пептидов, содержащих или состоящих из аминокислотной последовательности: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO 3),

• пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует участку аминокислотной последовательности или полной аминокислотной последовательности С-концевого участка прогастрина, и, в частности, пептидов, содержащих аминокислотную последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO 40), соответствующую аминокислотам 71–80 прогастрина.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что такую иммунизацию можно использовать для получения поликлональных или моноклональных антител по мере желаяния. Способы получения каждого из типов антител хорошо известны в данной области техники. Специалист в данной области техники, таким образом, легко выберет и применит способ получения поликлональных и/или моноклональных антител к любому определенному антигену.

Примеры моноклональных антител, которые были получены путем использования иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность SWKPRSQQPDAPLG, соответствующую аминокислотной последовательности 1–14 прогастрина человека (N-концевой последовательности), включают без ограничений моноклональные антитела, обозначенные как: mAb3, mAb4, mAb16, mAb19 и mAb20, как описано в следующей таблице 1 – таблице 4. Описаны другие моноклональные антитела, хотя неясно, действительно ли эти антитела связывают прогастрин (WO 2006/032980). Экспериментальные результаты эпитопного картирования показывают, что mAb3, mAb4, mAb16, mAb19 и mAb20 действительно связывают эпитоп в пределах указанной N-концевой аминокислотной последовательности hPG. Поликлональные антитела, специфично распознающие эпитоп в пределах N-конца прогастрина, представленного SEQ ID NO. 2, описаны на уровне техники (см., например, WO 2011/083088).

Таблица 1

Депозит гибридом	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
6B5B11C10	mAb3	VH CDR 1	GYIFTSYW	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	FQGSHVPFT	SEQ ID NO 9

Таблица 2

Депозит гибридом	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	ATDGNYDWFAY	SEQ ID NO 12
		VL CDR 1	QSLVHSSGVTY	SEQ ID NO 13
		VL CDR 2	KVS	SEQ ID NO 14
		VL CDR 3	SQSTHVPPT	SEQ ID NO 15

5

Таблица 3

Депозит гибридом	mAb	Аминокислотные последовательности		SEQ ID NO
1E9D9B6	mAb16	VH CDR 1	GYTFTSY Y	SEQ ID NO 16
		VH CDR 2	INPSNGGT	SEQ ID NO

				17
		VH CDR 3	TRGGYYPFDY	SEQ ID NO 18
		VL CDR 1	QSLLDSDGKTY	SEQ ID NO 19
		VL CDR 2	LVS	SEQ ID NO 20
		VL CDR 3	WQGTHSPYT	SEQ ID NO 21

Таблица 4

Депозит гибридом	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	AREVNYGDSYHF DY	SEQ ID NO 24
		VL CDR 1	SQHRTYT	SEQ ID NO 25
		VL CDR 2	VKKDGSH	SEQ ID NO 26
		VL CDR 3	GVGDAIKGQSVF V	SEQ ID NO 27

- 5 Примеры моноклональных антител, которые были получены путем использования иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (С-концевой участок прогастрина), соответствующую аминокислотной последовательности 55–80 прогастрина человека, включают без ограничений антитела, обозначенные как: mAb8 и mAb13 в
- 10 приведенных ниже таблицах 5 и 6. Экспериментальные результаты эпитопного

картирования показывают, что mAb13 действительно связывает эпитоп в пределах указанной С-концевой аминокислотной последовательности hPG.

Таблица 5

5

Депозит гибридом	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

Депозит гибридом	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 моноклональные и/или поликлональные антитела к hPG, полученные путем использования иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO 40.

5 В более конкретном воплощении изобретения в способе в соответствии с изобретением указанный биологический образец приводят в контакт с антителом к hPG или его антигенсвязывающим фрагментом, где указанное антитело к hPG выбрано из N-концевых антител к hPG и C-концевых антител к hPG.

10 Термины «N-концевые антитела к hPG» и «C-концевые антитела к hPG» обозначают антитела, связывающиеся с эпитопом, содержащим аминокислоты, локализованные в N-концевом участке hPG, или с эпитопом, содержащим аминокислоты, локализованные в C-концевом участке hPG, соответственно. Предпочтительно термин «N-концевые антитела к hPG» относятся к антителам, связывающимся с эпитопом, локализованным в домене прогастрина, последовательность которого представлена SEQ ID NO. 2. В другом предпочтительном воплощении изобретения термин «C-концевые антитела к hPG» относятся к антителам, связывающимся с эпитопом, локализованным в домене прогастрина, последовательность которого представлена SEQ ID NO. 3.

20 Термин «эпитоп» относится к области антигена, которая связывается антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы по существу представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат аминокислоты, которые вносят непосредственный вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы могут быть также конформационными. В некоторых воплощениях изобретения эпитопы могут включать детерминанты, представляющие собой химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в некоторых воплощениях могут обладать определенными характеристиками трехмерной структуры и/или определенными характеристиками заряда. Определение эпитопа, связываемого антителом, может 25 быть выполнено в помощь любой методики эпитопного картирования, известной специалисту в данной области техники. Эпитоп может содержать различные 30

аминокислоты, локализованные последовательно в пределах аминокислотной последовательности белка. Эпитоп может также содержать аминокислоты, не локализованные последовательно в пределах аминокислотной последовательности белка.

5 В конкретном воплощении изобретения указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из:

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

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

- моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 16, 17 и 18 соответственно или последовательностей с по меньшей мере

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

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

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

• моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три

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

В значении настоящего изобретения «идентичность в процентах» или «% идентичности» между двумя последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот означает процентное содержание идентичных нуклеотидов или аминокислотных остатков между двумя сравниваемыми последовательностями,
15 полученными после оптимального выравнивания, где данное процентное содержание является исключительно статистическим, и различия между двумя последовательностями распределены вдоль их длины случайным образом. Сравнение двух последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот традиционно осуществляют путем сравнения последовательностей после их
20 оптимального выравнивания, где указанное сравнение может быть проведено последовательно по сегментам или с использованием «окна выравнивания». Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно осуществлять, помимо сравнения вручную посредством способов, известных специалисту в данной области техники.

25 Для аминокислотной последовательности, проявляющей по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, 90%, 95% и 98% идентичность с референсной аминокислотной последовательностью, предпочтительные примеры включают последовательности, содержащие референсную последовательность с некоторыми модификациями, в частности делецией, присоединением или заменой по меньшей
30 мере одной аминокислоты, укорочением или удлинением. В случае замены одной или более последовательных или непоследовательных аминокислот, предпочтительными являются замены, при которых заменяемые аминокислоты заменяются «эквивалентными» аминокислотами. В данном случае выражение «эквивалентные аминокислоты» подразумевают как обозначающее аминокислоты,

которые вероятно замещаются одной или более структурных аминокислот, при этом, однако, не модифицирующих биологическую активность соответствующих антител, и их конкретные примеры, определенные ниже.

5 Эквивалентные аминокислоты могут быть определены либо по их структурной гомологии с аминокислотами, которыми они заменяются, либо по результатам сравнительных исследований биологической активности между различными антителами, образование которых вероятно.

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

10 При использовании в настоящем документе выражение «гуманизированное антитело» означает антитело, которое содержит участки CDR, полученные из антитела не человеческого происхождения, а остальные участки молекулы антитела получены из одного или нескольких человеческих антител. Кроме того, некоторые из остатков скелетных сегментов (называемых FR или каркасными) могут быть
15 модифицированы с сохранением аффинности связывания в соответствии с методиками, известными специалисту в данной области техники (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986). Цель гуманизации состоит в снижении иммуногенности ксеногенного антитела, такого как мышинное антитело, для введения человеку с сохранением при этом полной аффинности связывания с антигеном и
20 специфичности антитела.

Гуманизированные антитела по изобретению или их фрагменты могут быть получены с помощью методик, известных специалисту в данной области техники (такие методики, например, описаны в документах Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992). Такие гуманизированные антитела предпочтительны для применения в
25 способах, вовлеченных в диагностику *in vitro* или в превентивное и/или терапевтическое лечение *in vivo*. Специалисту в данной области техники также известны другие методики гуманизации. Действительно, антитела могут быть гуманизированы с помощью разнообразных методик, включая прививание CDR (EP 0 451 261; EP 0 682 040; EP 0 939 127; EP 0 566 647; US 5,530,101; US 6,180,370; US
30 5,585,089; US 5,693,761; US 5,639,641; US 6,054,297; US 5,886,152 и US 5,877,293), венирование или рекомбинацию поверхностных остатков (EP 0 592 106; EP 0 519 596; 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 перестановку цепей (патент США. № 5,565,332).

Человеческие антитела могут быть получены разнообразными способами, известными в данной области техники, включая методы фагового дисплея. См. также патенты США №№ 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806 и 5,814,318; и публикации международных заявок на патенты WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

В более конкретном воплощении изобретения указанное антитело представляет собой гуманизованное антитело, выбранное из группы, состоящей из:

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

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

- гуманизованного антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно

- три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 16, 17 и 18 соответственно или последовательностей с по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, 90%, 95% и 98% идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 16, 17 и 18 соответственно, и
- 5 легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 19, 20 и 21 соответственно или последовательностей с по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, 90%, 95% и 98% идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями
- 10 SEQ ID NO 19, 20 и 21 соответственно,
- гуманизованного антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 22, 23 и 24 соответственно или последовательностей с по меньшей мере
- 15 80%, предпочтительно 85%, 90%, 95% и 98% идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 22, 23 и 24 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 25, 26 и 27 соответственно или
- 20 последовательностей с по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, 90%, 95% и 98% идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 25, 26 и 27 соответственно,
- гуманизованного антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно
- 25 три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 28, 29 и 30 соответственно или последовательностей с по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, 90%, 95% и 98% идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 28, 29 и 30 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей
- 30 мере два, преимущественно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 31, 32 и 33 соответственно или последовательностей с по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, 90%, 95% и 98% идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO 31, 32 и 33 соответственно,

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

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

В первом воплощении изобретения способ в соответствии с изобретением включает приведение в контакт биологического образца с антителом к hPG, связывающимся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп локализован внутри С-концевого участка hPG, или с эпитопом, локализованным внутри N-концевого участка hPG.

В более конкретном воплощении изобретения способ в соответствии с изобретением включает приведение в контакт биологического образца с антителом к hPG, связывающимся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп включает в себя аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевого участка прогастрина, выбранную из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 10–14 hPG, аминокислотам 9–14 hPG, аминокислотам 4–10 hPG, аминокислотам 2–10 hPG и аминокислотам 2–14 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO 1.

В более конкретном воплощении изобретения способ в соответствии с изобретением включает приведение в контакт биологического образца с антителом к hPG, связывающимся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп включает в себя аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности С-концевого участка прогастрина, выбранную из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 71–14 hPG,

аминокислотам 69–73 hPG, аминокислотам 71–80 hPG (SEQ ID NO 40), аминокислотам 76–80 hPG и аминокислотам 67–74 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO 1.

5 В первом воплощении изобретения композиция в соответствии с изобретением содержит антитело, распознающее эпитоп, включающий аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности прогастрина.

10 В более конкретном воплощении изобретения композиция в соответствии с изобретением содержит антитело, распознающее эпитоп прогастрина, где указанный эпитоп включает в себя аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевого участка прогастрина, где указанная аминокислотная последовательность может включать в себя остатки 10–14 hPG, остатки 9–14 hPG, остатки 4–10 hPG, остатки 2–10 hPG или
15 остатки 2–14 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO 1.

В более конкретном воплощении изобретения композиция в соответствии с изобретением содержит антитело, распознающее эпитоп прогастрина, где указанный эпитоп включает в себя аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности C-концевого участка
20 прогастрина, где указанная аминокислотная последовательность может включать в себя остатки 71–74 hPG, остатки 69–73 hPG, остатки 71–80 hPG (SEQ ID NO 40), остатки 76–80 hPG или остатки 67–74 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO 1.

25 В конкретном воплощении способа диагностики рака желудка *in vitro* 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. В более конкретном воплощении изобретения, где указанная прогастрин-связывающая молекула представляет собой
30 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.

В предпочтительном воплощении изобретения способ диагностики рака желудка по настоящему изобретению включает обнаружение прогастрина в биологическом образце от субъекта-человека.

5 В более предпочтительном воплощении изобретения способ диагностики рака желудка по настоящему изобретению включает определение концентрации прогастрина в биологическом образце от субъекта-человека.

В другом конкретном воплощении изобретения способ диагностики рака желудка по настоящему изобретению включает определение концентрации прогастрина в биологическом образце от субъекта-человека, где указанный
10 биологический образец выбран из образца крови, сыворотки крови и плазмы крови.

В дополнительном предпочтительном воплощении изобретения способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с антителом к hPG, как описано выше, где связывание указанного антитела к hPG в образце указывает на присутствие рака желудка у субъекта.

15 В более конкретном воплощении изобретения способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с антителом к hPG, как описано выше, где концентрация прогастрина, превышающая 10 пмоль/л, в указанном образце указывает на присутствие рака желудка у субъекта.

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

25 Еще более предпочтительно способ по настоящему изобретению включает приведение в контакт образца от указанного субъекта с антителом к hPG, как описано выше, где концентрация прогастрина, превышающая 10 пмоль/л, предпочтительно 20 пмоль/л, более предпочтительно 30 пмоль/л, еще более предпочтительно 40 пмоль/л, даже более предпочтительно 50 пмоль/л в указанном
30 образце указывает на присутствие метастазированного рака желудка у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способам мониторинга эффективности лечения рака желудка у пациента, такого как химиотерапия, биологическая терапия, иммунотерапия или антителотерапия, путем определения концентрации прогастрина в первом образце, таком как текучая среда организма

или биоптат рака желудка, полученного от пациента до лечения рака желудка, и последующего сравнения концентрации прогастрина в первом образце с концентрацией во втором образце, полученном от того же пациента после лечения, где снижение концентрации прогастрина во втором образце по сравнению с первым образцом указывает на то, что лечение было эффективным.

В конкретном воплощении изобретения способ в соответствии с изобретением включает сравнение концентрации прогастрина в биологическом образце, полученном от пациента с заранее определенным значением концентрации прогастрина в образце, где в более конкретном воплощении это заранее определенное значение выбрано из: среднего арифметического, среднего, значений образца в расчете на среднее арифметическое или среднее, определения значения в популяции, не страдающей раком желудка, значения концентрации прогастрина, полученного от пациента, если известно, что пациент не страдает раком желудка.

В конкретном воплощении изобретения способ диагностики рака желудка *in vitro* в соответствии с изобретением включает определение концентрации прогастрина в образце от пациента и второй диагностический тест для определения рака желудка. В более конкретном воплощении изобретения способ диагностики *in vitro* рака желудка в соответствии с изобретением включает определение концентрации прогастрина в образце от пациента и второй диагностический тест рака желудка, где второй диагностический тест включает обнаружение конкретного биомаркера, выбранного из: пепсиногена, грелина, фактор «трилистника» 3 (TFF3) и циркулирующего GC-ассоциированного антигена (MG7-Ag) (Leja *et al*, 2014).

В конкретном воплощении изобретения способ в соответствии с настоящим изобретением включает определение уровня прогастрина со временем в образцах от пациента, который получил или получает лечение рака желудка.

В другом аспекте сущность настоящего изобретения относится к композиции для применения в профилактике или лечении рака желудка, где указанная композиция содержит прогастрин-связывающее антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

Композиции антитела для применения в способах по изобретению можно готовить в виде различных лекарственных форм, включающих без ограничений водную суспензию, для введения посредством различных путей, включающих без ограничений парентеральный, подоболочечный, подкожный, внутривенный,

внутримышечный, интраперитонеальный, инфузию или болюсное введение. В некоторых воплощениях изобретения композицию включают в лекарственную форму для парентерального введения, и в некоторых конкретных воплощениях — для внутривенной инъекции путем инфузии.

5 В конкретном воплощении изобретения композиция для применения в профилактике или лечении рака желудка в соответствии с изобретением содержит эффективную дозу антител к прогастрину по изобретению, диапазон которой составляет от 0,001 мг/кг до около 250 мг/кг, которую можно вводить за одно введение или в виде множественных, разделенных по времени введений.

10 В конкретном воплощении изобретения композиция для применения в профилактике или лечении рака желудка в соответствии с изобретением содержит прогастрин-связывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные из поликлональных антител, моноклональных антител, химерных антител, одноцепочечных антител, камелизированных антител, IgA1 антител, IgA2
15 антител, IgD антител, IgE антител, IgG1 антител, IgG2 антител, IgG3 антител, IgG4 антител и IgM антител. Предпочтительно указанные антитела являются такими, как описано выше. Более предпочтительно указанные антитела представляют собой гуманизированные антитела.

В более конкретном воплощении изобретения композиция для применения в
20 профилактике или лечении рака желудка в соответствии с изобретением содержит прогастрин-связывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающий аффинностью к прогастрину, определенной описанным выше способом, составляющей по меньшей мере 5000 нМ, по меньшей мере 500 нМ, 100 нМ, 80 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 7 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1
25 нМ, 0,5 нМ, 0,1 нМ, 50 пМ, 10 пМ, 5 пМ, 1 пМ или по меньшей мере 0,1 пМ.

В даже более предпочтительном воплощении изобретения композиция для применения в профилактике или лечении рака желудка содержит прогастрин-связывающее антитело, где указанная прогастрин-связывающая молекула или ее антигенсвязывающий фрагмент представляет собой нейтрализующее антитело.

30 Выражение «нейтрализующее антитело к PG» обозначает антитело, связывающее PG и блокирующее PG-зависимую передачу сигнала, что приводит в результате к ингибированию PG-индуцированных ответов в опухолевых клетках и, в частности, в опухолевых клетках желудка. Ингибирование PG-индуцированных ответов клеток рака желудка может быть опосредовано подавлением

дифференцировки клеток, подавлением клеточной гибели и/или стимуляцией пролиферации клеток.

В другом конкретном воплощении изобретения композиция для применения в профилактике или лечении рака желудка содержит прогастрин-связывающее антитело, где указанная прогастрин-связывающая молекула или ее антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизованное антитело.

В конкретном воплощении изобретения композиция для применения в профилактике или лечении рака желудка содержит прогастрин-связывающее антитело, где указанная прогастрин-связывающая молекула или ее антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксической молекулой.

В другом конкретном воплощении изобретения композиция для применения в профилактике или лечении рака желудка для пациента содержит прогастрин-связывающее антитело, где у указанного пациента диагностирован рак желудка способом в соответствии с настоящим изобретением, где концентрация прогастрина в биологическом образце от пациента выше, чем в контрольном образце.

В более конкретном аспекте настоящее изобретение относится к композиции для применения в профилактике или лечении рака желудка в соответствии с изобретением, где указанное прогастрин-связывающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из N-концевых антител к прогастрину и C-концевых антител к прогастрину.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей композицию для применения в профилактике или лечении рака желудка в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемый носитель. Более конкретно фармацевтическая композиция для применения в профилактике или лечении рака желудка в соответствии с изобретением содержит антитело, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

В более конкретном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей композицию для применения в профилактике или лечении рака желудка в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемый носитель, где указанное антитело к прогастрину вводят в дозе от 0,001 мг/кг до 250 мг/кг и предпочтительно в дозе по меньшей мере 0,005 мг/кг, по меньшей мере 0,01 мг/кг, по меньшей мере 0,05 мг/кг, по меньшей мере 0,1 мг/кг, по меньшей мере 0,5 мг/кг, по меньшей мере 1 мг/кг, по меньшей мере 5 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, по меньшей мере 50 мг/кг или по меньшей

мере 100 мг/кг. В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору из частей, содержащему композицию для применения в профилактике или лечении рака желудка в соответствии с изобретением и противораковую терапевтическую молекулу.

5 Действительно, лечение моноклональными антителами к PG, как описано в настоящем документе, можно комбинировать с другой терапией или дополнять ею. Неограничивающие примеры другой терапии включают химиотерапевтическое лечение, радиотерапию, хирургическую резекцию и антителотерапию.

10 В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору из частей, содержащему композицию для применения в профилактике или лечении рака желудка в соответствии с изобретением и противораковую терапевтическую молекулу, выбранную из химиотерапевтической молекулы, молекулы таргетной терапии.

15 В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к набору из частей, содержащему для одновременного, последовательного или отдельного введения композицию для лечения рака желудка и химиотерапевтическую молекулу. Полезные химиотерапевтические молекулы для этой цели включают без ограничений антагонисты фолатов, антагонисты пуринов, антагонисты пиримидинов, ДНК-алкилирующие молекулы, ДНК-сшивающие лекарственные
20 препараты, антибиотики, комплексы платины, ингибиторы протеасом, токсические соединения для митотического веретена, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы тирозинкиназы и другое.

25 В другом конкретном воплощении настоящее изобретение относится к набору из частей, содержащему для одновременного, последовательного или отдельного введения композицию в соответствии с настоящим изобретением и другую молекулу таргетной терапии. Такая молекула таргетной терапии включает без ограничений антитела, направленные против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), такие как цетуксимаб или панитумумаб, антитела, направленные против фактора роста эпителия сосудов (VEGF), такие как
30 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 таргетные препараты против EGFR, такие как эрлотиниб, низкомолекулярные таргетные препараты против протоонкогена B-Raf (BRAF), такие как вемурафениб или дабрафениб, рекомбинантный гибридный белок, направленный против VEGF, такой как Афлиберцепт.

5 В другом конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для диагностики рака желудка.

10 В другом конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для профилактики или лечения рака желудка.

15 В другом конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для профилактики или лечения рака желудка для пациента, у которого определена концентрация прогастрина в биологическом образце и повышена по сравнению с концентрацией прогастрина в контрольном биологическом образце.

В более конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для профилактики или лечения рака желудка для пациента, у которого присутствует метастаз.

20 В еще более конкретном аспекте настоящее изобретение относится к применению прогастрин-связывающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для профилактики или лечения рака желудка для пациента, у которого присутствует метастаз и определена концентрация прогастрина в биологическом образце и повышена по сравнению с концентрацией прогастрина в контрольном биологическом образце.

Компоненты, из которых состоит комбинация, можно вводить одновременно, отдельно или последовательно так, чтобы получить максимальную эффективность комбинации; возможно, что продолжительность каждого введения будет различаться по продолжительности от быстрого введения до непрерывной перфузии.

30 При использовании в настоящем документе «одновременное введение» относится к введению двух соединений композиции соответственно в единой и уникальной фармацевтической форме. При использовании в настоящем документе «раздельное введение» относится к введению двух соединений композиции в соответствии с изобретением в одно и то же время в отдельных фармацевтических

формах. При использовании в настоящем документе «последовательное введение» относится к последовательному введению двух соединений композиции в соответствии с изобретением в отдельных фармацевтических формах.

5 «Терапевтически эффективное количество» при использовании в настоящем документе относится к минимальной концентрации или количеству соединения (или соединений), которое является эффективным для предотвращения, ослабления, уменьшения или улучшения течения симптомов заболевания или для продления выживания пациента, получающего лечение.

10 Характеристики воплощений изобретения станут более очевидными на основании приведенного ниже подробного описания примеров.

Подписи к фигурам

15 Фиг. 1: медианная плазматическая концентрация прогастрина у пациентов с раком желудка (n=15) и у контрольных пациентов (n=103) — двухсторонний критерий Манна-Уитни, *** $p < 0,001$

Фиг. 2: Количество сфер AGS, образующихся после обработки контрольным (СТ Hz) или гуманизированным антителом к PG (PG Hz) в условиях сверхнизкого прикрепления – двухсторонний t-критерий, * $p < 0,05$.

20 Примеры

Пример 1: Определение плазматической концентрации прогастрина с использованием поликлональных антител

25 Уровни прогастрина в плазме крови определяли количественно методом ИФА посредством использования двух специфичных антител к прогастрину: антитела захвата наносят в виде покрытия в лунки планшета, при этом проявляющие антитела, используемые для определения прогастрина, опосредуют проявление сигнала.

30 В настоящем примере количественное определение основано на методе ИФА, который позволяет посредством использования субстрата, взаимодействие с которым вызывает испускание света, установить значение, пропорциональное количеству люминесценции антител, связанных с антигеном, удерживаемым антителами захвата.

Материал

Список реактивов и приборов приведен в таблице 7.

Таблица 7

Обозначение	Поставщик	Номер по каталогу
Планшеты MaxiSORP белые Nunc, 96-луночные	Dutscher	# 055221
Карбонат/бикарбонат натрия	Sigma	# 21851
ДФСБ 1х	Lonza	# P04-36500
Tween-20	Biosolve	# 20452335
БСА	Euromedex	# 04-100-810-C
Стрептавидин-HRP	Pierce (Thermo)	# 21130
Субстрат для ИФА максимальной чувствительности SuperSignal Femto	Pierce (Thermo)	# 37074
Поликлональное антитело к прогастрину	Eurogentec	/

Поликлональные антитела получали путем иммунизации кроликов N-концевым прогастрином (SEQ ID NO 2) или C-концевым прогастрином, соответствующим аминокислотам 71–80 hPG и имеющим последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO 40), в соответствии со стандартными протоколами.

Поликлональные антитела к прогастрину, используемые в данной тест-системе, имеют следующие характеристики связывания: отсутствие связывания с G34-Gly, G34, G17-Gly, G17, связывание с полноразмерным прогастрином.

В лунки 96-луночных планшетов вносят в качестве покрытия раствор карбоната-бикарбоната натрия, 50 ммоль/л, pH 9,6, приготовленный путем растворения содержимого одной капсулы в 100 мл воды MilliQ. Раствор антитела захвата (3 мкг/мл), соответствующего поликлональным антителам, полученным путем использования C-концевого участка прогастрина FGRRSAEDEN (SEQ ID NO 40), готовят в карбонатном буфере. В каждую лунку добавляют 100 микролитров раствора антител и инкубируют при 4°C в течение 16 часов (1 ночь). Впоследствии планшеты блокируют путем удаления раствора антител и промывания 3 раза по 300 мкл 1-кратного фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ)/0,1% Tween-20 с последующим добавлением 200 мкл блокирующего буфера (1-кратный ФСБ/0,1% Tween-20/0,1% бычий сывороточный альбумин (БСА)) на лунку и инкубируют 2 часа

при 22°C. Впоследствии блокирующий буфер удаляют, лунки промывают 3 раза 300 мкл 1-кратного ФСБ/0,1% Tween-20.

Разведение плазмы крови выполняют, как описано ниже: Плазму крови используют в чистом виде и в разведенном виде 1/2, 1/5 и 1/10. Разведения готовят из чистой плазмы крови в 1-кратном ФСБ/0,1% Tween-20/0,1% бычий сывороточный альбумин.

Для контрольного теста ИФА в присутствии известной концентрации прогастрина разведение прогастрина готовят, как описано ниже: исходный раствор рекомбинантного PG (полноразмерный человеческий прогастрин, продуцируемый в *E. coli* и очищенный аффинной хроматографией с глутатионсодержащей агарозой/удалением метки (Tev)/очисткой противоточной аффинной хроматографией на иммобилизованных ионах металла (IMAC)/диализом, из Института Пастера, г. Париж, Франция) готовят в концентрации 0,45 мг/мл (45 мкмоль/л) в трех повторностях. Для приготовления растворов прогастрина использовали следующие диапазоны концентраций:

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

Диапазон концентраций рекомбинантного PG является линейным и, следовательно, может быть в большей или в меньшей степени широким в зависимости от используемого антитела.

Для приготовления исследуемых образцов приблизительно 500 мкл каждого образца помещают отдельно и хранят до анализа (и подтверждения при необходимости) результатов. 100 мкл раствора каждой точки диапазона и/или

образцы плазмы крови помещают в анализ в чистом виде, в разведенном виде до 1/2, 1/5 и 1/10 и инкубируют в течение 2 часов при 22°C на планшетах.

Для проявления теста планшеты промывают 3 раза 300 мкл 1-кратного ФСБ/0,1% Tween-20. Раствор поликлональных кроличьих антител к прогастрину, полученных при использовании в качестве иммуногена N-концевого участка прогастрина, связанного с биотином до 0,5 мкг/мл, готовят путем разведения в 1-кратном ФСБ/0,1% Tween-20/0,1% БСА. В каждую лунку добавляют 100 мкл этого раствора. Инкубацию проводят в течение 1 часа при 22°C. Проявление стрептавидином-HRP проводят путем удаления детектирующего антитела и промывания 3 раза по 300 мкл 1-кратного ФСБ/0,1% Tween-20, впоследствии готовят раствор стрептавидина-HRP в концентрации 20 нг/мкл в 1-кратном ФСБ/0,1% Tween-20/0,1% БСА. Добавляют 100 мкл этого раствора в каждую лунку с последующей инкубацией в течение 1 часа при 22°C.

Определение состоит в удалении стрептавидина-HRP и промывании 3 раза 300 мкл 1-кратного ФСБ/0,1% Tween-20 с последующим добавлением 100 мкл раствора хемилюминесцентного субстрата на лунку. Раствор субстрата готовят путем смешивания равных объемов двух растворов набора для ИФА SuperSignal Femto, 20 мл и 20 мл, за 30 мин до использования и хранят при комнатной температуре в темном месте. Люминесценцию регистрируют после инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре в темном месте.

Для каждого вида условий тест проводят в трех повторностях, и результаты диапазонов будут представлены в виде графика, показывающего изменение люминесценции в зависимости от концентрации прогастрина. Для каждого разведения плазмы концентрацию прогастрина определяют с использованием уравнения кривой линейной регрессии соответствующего диапазона (диапазон 1/10-го для образца, разведенного с 1/10-го).

Методы и результаты

Медианная плазматическая концентрация прогастрина составляет 17,9 пмоль/л у пациентов, страдающих раком желудка (n=15), при этом у контрольных пациентов медианная плазматическая концентрация прогастрина составляет 0 пмоль/л (n=103) (Фиг. 1). Эти данные демонстрируют, что пациенты с раком желудка характеризуются повышенными концентрациями прогастрина в плазме крови по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

Эти данные демонстрируют, что пациенты с раком желудка характеризуются повышенными концентрациями прогастрина в плазме крови по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

5 Пример 2: Определение концентрации прогастрина с использованием моноклональных антител к прогастрину

В лунки 96-луночных планшетов Nunc MaxiSorp вносят в виде покрытия первое прогастрин-специфичное антитело, как описано ниже. Моноклональные антитела к прогастрину, специфичные к карбокси-концевому участку прогастрина, 10 разводят до концентрации 3 мкг/мл в буферном растворе 50 ммоль/л, рН 9,6, карбоната/бикарбоната натрия в воде MilliQ.

Впоследствии в каждую лунку 96-луночных планшетов добавляют суммарно 100 мкл раствора антитела и инкубировали в течение ночи при 4°C. После связывания раствор антитела удаляют из лунок, которые впоследствии промывают 15 три раза 100 мкл отмывочного буфера (1-кратный ФСБ/0,1% Tween-20). Впоследствии в каждую лунку добавляют суммарно 100 мкл блокирующего буфера (1-кратный ФСБ/0,1% Tween-20/0,1% БСА) и инкубируют в течение 2 часов при 22°C. Впоследствии блокирующий буфер удаляют, и лунки промывают три раза 20 отмывочным буфером. Впоследствии в лунки добавляют образцы плазмы или сыворотки крови, выделенные у пациентов, в объеме 100 мкл в серийных разведениях, обычно в разведениях 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10, и впоследствии инкубируют в течение 2 часов при 22°C. Образцы плазмы или сыворотки крови анализируют в двух повторностях.

В анализы также включают построение двух стандартных кривых. Первую 25 стандартную кривую строят, используя разведения рекомбинантного прогастрина до конечного количества 1 нг, 0,5 нг, 0,25 нг, 0,1 нг, 0,05 нг, 0,01 нг и 0 нг на лунку. Вторую стандартную кривую, которая служит в качестве отрицательного контроля, строят по результатам прогастрин-отрицательной сыворотки крови человека, разведенной в блокирующем буфере при таких же разведениях, как и для 30 исследуемых образцов, т. е. 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10. Альтернативно в случае анализа образцов плазмы крови вторую стандартную кривую, которая служит в качестве отрицательного контроля, строят по результатам прогастрин-отрицательной плазмы крови человека, разведенной в блокирующем буфере при таких же разведениях, как и для исследуемых образцов, т. е. 1:1, 1:2, 1:5 и 1:10.

После завершения инкубации с образцами плазмы или сыворотки крови содержащее лунок удаляют, и лунки промывают три раза отмывочным буфером по 100 мкл/лунка, после чего обнаружение прогастрина, связанного с первым антителом, выполняют, используя второе антитело, специфичное к прогастрину, как описано ниже.

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

После завершения связывания второго антитела планшеты промывают три раза отмывочным буфером, 100 мкл/лунка, после чего в каждую лунку добавляют 100 мкл раствора стрептавидин-HRP (25 нг/мл в блокирующем буфере) и инкубируют в течение 1 часа при 22°C. После завершения инкубации с раствором стрептавидин-HRP планшеты промывают три раза отмывочным буфером, 100 мкл/лунка. После этого добавляют 100 мкл на лунку 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 темном месте и впоследствии считывают показания на люминометре.

На основании показаний люминометра используют анализ линейной регрессии с получением уравнения кривых, соответствующих данных стандартной кривой. Используя это уравнение, впоследствии рассчитывают концентрацию прогастрина в различных образцах от пациентов.

Медианную плазматическую концентрацию прогастрина рассчитывают у пациентов, страдающих раком желудка, и сравнивают с медианной плазматической концентрацией прогастрина в плазме крови контрольных пациентов. Эти данные демонстрируют, что пациенты с раком желудка характеризуются повышенными уровнями прогастрина в плазме крови по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

Пример 3: Нейтрализующая активность антител к hPG в отношении линий раковых клеток

3.1. Нейтрализующая активность антител к hPG

Для исследования рака желудка чаще всего используют линии клеток KATO-III, AGS, MGC-803, и SNU-1, которые продуцируют и секретируют прогастрин. В этих различных линиях клеток исследуют способность моноклональных антител к PG
 5 ингибировать пролиферацию. Используя различные моноклональные антитела к hPG, исследуют выживание клеток в каждой линии клеток KATO-III, AGS, MGC-803 и SNU-1.

Для каждого эксперимента в 6-луночные планшеты высевают 50 000 клеток в питательной среде, содержащей фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в
 10 течение 8 часов. Клетки подвергают сывороточному голоданию в течение ночи и, начиная с 24 часов после посева (время T0) клетки обрабатывают в шести повторностях один раз в 12 часов в течение 48 часов в отсутствие фетальной телячьей сыворотки моноклональными контрольными антителами в концентрации от 1 до 20 мкг/мл (моноклональное антитело к пуромицину) (CT mAb) или от 1 до 20
 15 мкг/мл mAb к hPG, где указанное mAb представляет собой C-концевое моноклональное антитело к hPG или N-концевое моноклональное антитело к hPG.

Указанное mAb представляет собой C-концевое антитело к hPG, выбранное из:

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

или N-концевое антитело к hPG, выбранное из:

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

- антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 10, 11 и 12, и

легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 13, 14 и 15,

- антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 16, 17 и 18, и

5 легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 19, 20 и 21,

- антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 22, 23 и 24, и

10 легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 25, 26 и 27,

Для каждого эксперимента считают количество клеток в T0 в контрольной лунке.

Конкретно количество живых клеток в лунках, обработанных как контрольным mAb, так и mAb к hPG, считают через 48 часов, после чего рассчитывают разность
15 между каждым количеством клеток и количеством клеток, определенным в T0. Впоследствии полученное в результате количество клеток, обработанных mAb к hPG, выражают в процентах от количества клеток, обработанных контрольным mAb.

Обработка моноклональными антителами к hPG приводит к уменьшению количества клеток по сравнению с обработкой контрольным антителом.

20 Статистическую значимость определяют с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки: * соответствует $p < 0,05$, ** соответствует $p < 0,01$ и *** соответствует $p < 0,001$. Антитела к hPG приводят к снижению выживания клеток в каждой линии клеток.

25 3.2. Нейтрализующая активность гуманизированных антител к hPG в отношении выживания клеток

В линиях клеток KATO-III, AGS, MGC-803 и SNU-1 исследуют способность моноклональных антител к PG ингибировать пролиферацию. Используя различные гуманизированные антитела к hPG, исследуют выживание клеток в каждой линии клеток KATO-III, AGS, MGC-803 и SNU-1.

30 Для каждого эксперимента в 6-луночные планшеты высевает 50 000 клеток в питательной среде, содержащей фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в течение 8 часов. Клетки подвергают сывороточному голоданию в течение ночи и, начиная с 24 часов после посева (время T0) клетки обрабатывают в шести повторностях один раз в 12 часов в течение 48 часов в отсутствие фетальной

телячьей сыворотки гуманизированными контрольными антителами в концентрации от 1 до 20 мкг/мл (антитело к FcG1 человека от компании BioXCell) (CT Hz) или от 1 до 20 мкг/мл Hz к hPG, где указанное Hz представляет собой C-концевое гуманизированное антитело к hPG или N-концевое гуманизированное антитело к hPG. Для каждого эксперимента считают количество клеток в T0 в контрольной лунке.

Конкретно количество живых клеток в лунках, обработанных как контрольным Hz, так и Hz к hPG, считают через 48 часов, после чего рассчитывают разность между каждым количеством клеток и количеством клеток, определенным в T0. Впоследствии полученное в результате количество клеток, обработанных Hz к hPG, выражают в процентах от количества клеток, обработанных контрольным Hz.

Обработка антителами Hz к hPG приводит к уменьшению количества клеток по сравнению с обработкой контрольным антителом. Статистическую значимость определяют с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки: * соответствует $p < 0,05$, ** соответствует $p < 0,01$ и *** соответствует $p < 0,001$. Антитела к hPG приводят к снижению выживания клеток в каждой линии клеток.

3.3. Нейтрализующая активность моноклональных антител к hPG в отношении частоты стволовых раковых клеток

Способность моноклональных антител к PG к снижению частоты раковых стволовых клеток (CSC) в линиях клеток KATO-III, AGS, MGC-803 и SNU-1 исследуют с использованием метода крайних значений предельного разведения (Extreme Limiting Dilution Assay, ELDA). Используя различные моноклональные антитела к hPG, исследуют частоту CSC в каждой линии клеток KATO-III, AGS, MGC-803 и SNU-1.

Для каждого эксперимента клетки высевают в 96-луночные планшеты со сверхнизкой прикрепляющей способностью (ULA) P96 в фиксированных концентрациях клеток в лунке, используя проточный цитометр для сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) Aria и используя диапазон концентраций от одной до 500 клеток на лунку. Клетки выращивают в течение вплоть до 11 дней в планшетах ULA с питательной средой M11 (Macari et al, Oncogene, 2015) и обрабатывают один раз в 3 или 4 дня контрольными моноклональными антителами в концентрации от 1 до 20 мкг/мл (моноклональное антитело к пурамицину) (CT mAb) или mAb к hPG в концентрации от 1 до 20 мкг/мл,

где указанное mAb представляет собой С-концевое моноклональное антитело к hPG или N-концевое моноклональное антитело к hPG.

Конкретно по окончании фазы инкубации планшеты наблюдают в фазово-контрастном микроскопе и проводят оценку количества положительных лунок на одну концентрацию клеток. Наконец, для расчета частоты CSC в каждой экспериментальной группе и определения статистически значимой разности между группами (модифицированный критерий Хи-квадрат) используют авторский инструмент Web ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>).

Обработка моноклональными антителами к hPG приводит к уменьшению частоты CSC по сравнению с обработкой контрольным антителом.

3.4. Нейтрализующая активность гуманизованных антител к hPG в отношении частоты стволовых раковых клеток

- Анализ методом образования сфер

Способность гуманизованных антител к PG к снижению частоты раковых стволовых клеток (CSC) в линиях клеток KATO-III, AGS и SNU-1 исследуют с использованием метода образования сфер.

Для каждого эксперимента высевают 700 клеток в 24-луночные планшеты со сверхнизкой прикрепляющей способностью (ULA). Клетки выращивают в течение вплоть до 7 дней в планшетах ULA с питательной средой M11 (Macari et al, Oncogene, 2015) и обрабатывают один раз в 3 или 4 дня контрольными гуманизованными антителами в концентрации 20 мкг/мл (антитело к FcG1 человека от компании BioXCell) (CT Hz) или Hz к hPG в концентрации от 20 мкг/мл, где указанное Hz представляет собой С-концевое гуманизованное антитело к hPG или N-концевое гуманизованное антитело к hPG.

Конкретно по окончании фазы инкубации лунки фотографируют посредством светлопольной микроскопии, проводят анализ изображений и считают сферы со средним диаметром 25 мкм.

Обработка гуманизованными антителами к hPG приводит к уменьшению частоты CSC по сравнению с обработкой контрольным антителом.

- Метод крайних значений предельного разведения

Способность гуманизованных антител к PG к снижению частоты раковых стволовых клеток (CSC) в линиях клеток KATO-III, AGS и MGC-803 исследуют с использованием метода крайних значений предельного разведения (Extreme

Limiting Dilution Assay, ELDA). Используя различные гуманизированные антитела к hPG, исследуют частоту CSC в каждой линии клеток KATO-III, AGS и MGC-803.

Для каждого эксперимента клетки высевают в 96-луночные планшеты со
 5 сверхнизкой прикрепляющей способностью (ULA) P96 в фиксированных
 концентрациях клеток в лунке, используя проточный цитометр для сортировки
 флуоресцентно-активированных клеток (FACS) Aria и используя диапазон
 концентраций от одной до 500 клеток на лунку. Клетки выращивают в течение
 вплоть до 11 дней в планшетах ULA с питательной средой M11 (Masari et al,
 Oncogene, 2015) и обрабатывают один раз в 3 или 4 дня контрольными
 10 гуманизированными антителами в концентрации от 1 до 20 мкг/мл (антитело к FcG1
 человека от компании BioXCell) (CT Hz) или Hz к hPG в концентрации от 1 до 20
 мкг/мл, где указанное Hz представляет собой C-концевое гуманизированное
 антитело к hPG или N-концевое гуманизированное антитело к hPG.

Конкретно по окончании фазы инкубации планшеты наблюдают в фазово-
 15 контрастном микроскопе и проводят оценку количества положительных лунок на
 одну концентрацию клеток. Наконец, для расчета частоты CSC в каждой
 экспериментальной группе и определения статистически значимой разности между
 группами (модифицированный критерий Хи-квадрат) используют авторский
 инструмент Web ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>).

20 Обработка гуманизированными антителами к hPG приводит к уменьшению
 частоты CSC по сравнению с обработкой контрольным антителом.

3.5. Нейтрализующая активность моноклональных антител к hPG в
 отношении метаболического пути WNT/ β -катенина

Для исследования рака желудка чаще всего используют линии клеток KATO-
 25 III, AGS, MGC-803, и SNU-1, которые продуцируют и секретируют прогастрин.
 Исследовали способность моноклональных антител к PG к ингибированию пути
 WNT/ β -катенина в этих различных линиях клеток, используя в качестве показателя
 экспрессию белка сурвивина, являющегося хорошо известным геном-мишенью пути
 WNT/ β -катенина. Используя различные моноклональные антитела к hPG, исследуют
 30 экспрессию сурвивина в каждой линии клеток KATO-III, AGS, MGC-803 и SNU-1.

Для каждого эксперимента в 6-луночные планшеты высевают 50 000 клеток в
 питательной среде, содержащей фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в
 течение 8 часов. Клетки подвергают сывороточному голоданию в течение ночи и,
 начиная с 24 часов после посева (время T0) клетки обрабатывают в четырех

повторностях один раз в 12 часов в течение 72 часов в отсутствие фетальной телячьей сыворотки моноклональными контрольными антителами в концентрации от 1 до 20 мкг/мл (моноклональное антитело к пурамицину) (CT mAb) или от 1 до 20 мкг/мл mAb к hPG, где указанное mAb представляет собой С-концевое
5 моноклональное антитело к hPG или N-концевое моноклональное антитело к hPG.

В частности, после 72 часов обработки клетки собирают и экстрагируют суммарный белок, используя буфер для анализа радиоиммунопреципитации (РИП). Впоследствии проводят Вестерн-блоттинг равных количеств белка из клеток, обработанных CT mAb или mAb к hPG, используя антитело к сурвивину
10 (моноклональное антитело, #2802 от компании Cell Signaling) и антитело к актину в качестве контроля нанесения (моноклональное антитело, #A4700 от компании SIGMA). Количественное определение выполняют, используя полностью автоматизированную систему гель-документирования GBOX Chemi от компании Syngene.

15 Обработка моноклональными антителами к hPG приводит к уменьшению экспрессии сурвивина по сравнению с обработкой контрольным антителом. Статистическую значимость определяют с использованием непарного Т-критерия Стьюдента: * соответствует $p < 0,05$, ** соответствует $p < 0,01$ и *** соответствует $p < 0,001$.

20 3.6. Нейтрализующая активность гуманизированных антител к hPG в отношении метаболического пути WNT/ β -катенина

Исследовали способность гуманизированных антител к PG к ингибированию пути WNT/ β -катенина в линиях клеток KATO-III, AGS, MGC-803 и SNU-1, используя в качестве показателя экспрессию белка сурвивина, являющегося хорошо известным
25 геном-мишенью пути WNT/ β -катенина. Используя различные гуманизированные антитела к hPG, исследуют экспрессию сурвивина в каждой линии клеток KATO-III, AGS, MGC-803 и SNU-1.

Для каждого эксперимента в 6-луночные планшеты высевают 50 000 клеток в питательной среде, содержащей фетальную телячью сыворотку, и инкубируют в
30 течение 8 часов. Клетки подвергают сывороточному голоданию в течение ночи и, начиная с 24 часов после посева (время T0) клетки обрабатывают в четырех повторностях один раз в 12 часов в течение 72 часов в отсутствие фетальной телячьей сыворотки гуманизированными контрольными антителами в концентрации от 1 до 20 мкг/мл (антитело к FcG1 человека от компании BioXCell) (CT Hz) или от 1

до 20 мкг/мл Hz к hPG, где указанное Hz представляет собой C-концевое гуманизированное антитело к hPG или N-концевое гуманизированное антитело к hPG.

5 В частности, после 72 часов обработки клетки собирают и экстрагируют суммарный белок, используя буфер для анализа радиоиммунопреципитации (РИП). Впоследствии проводят Вестерн-блоттинг равных количеств белка из клеток, обработанных СТ Hz или Hz к hPG, используя антитело к сурвивину (моноклональное антитело, #2802 от компании Cell Signaling) и антитело к актину в качестве контроля нанесения (моноклональное антитело, #A4700 от компании 10 SIGMA). Количественное определение выполняют, используя полностью автоматизированную систему гель-документирования GBOX Chemi от компании Syngene.

Обработка гуманизированными антителами к hPG приводит к уменьшению экспрессии сурвивина по сравнению с обработкой контрольным антителом. 15 Статистическую значимость определяют с использованием непарного Т-критерия Стьюдента: * соответствует $p < 0,05$, ** соответствует $p < 0,01$ и *** соответствует $p < 0,001$.

Библиографические ссылки

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики *in vitro* рака желудка у субъекта, включающий стадии:

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

б) обнаружение связывания указанной прогастрин-связывающей молекулы с прогастрином в образце, где данное связывание указывает на присутствие рака желудка у субъекта.

10

2. Способ по п. 1, где стадия б) дополнительно включает определение концентрации прогастрина, где концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пмоль/л, по меньшей мере 20 пмоль/л, по меньшей мере 30 пмоль/л или по меньшей мере 40 пмоль/л в указанном биологическом образце является

15 показателем присутствия рака желудка у данного субъекта.

3. Способ по любому из п.п. 1 или 2, где указанный рак желудка является метастазированным.

20 4. Способ по любому из п.п. 2-3, включающий дополнительные стадии:

с) определение референсной концентрации прогастрина в контрольном образце,

д) сравнение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце с референсной концентрацией прогастрина,

25 е) определение на основании сравнения стадии д) присутствия рака желудка.

5. Способ по п. 4, где указанный контрольный образец представляет собой биологический образец, полученный от здорового субъекта.

30

6. Способ по п. 4 или 5, в котором рак желудка присутствует, если концентрация прогастрина на стадии б) выше референсной концентрации прогастрина на стадии с).

7. Способ по любому из пп. 1-6, дополнительно включающий второй диагностический тест, включающий обнаружение конкретного биомаркера, выбранного из пепсиногена, грелина, фактора «трилистника» 3 (TFF3) и циркулирующего GC-ассоциированного антигена (MG7-Ag), предпочтительно пепсиногена.

8. Способ мониторинга эффективности лечения рака желудка у пациента, включающий следующие стадии:

а) определение концентрации прогастрина в первом биологическом образце, полученном от указанного пациента до лечения, включающее:

- приведение указанного первого биологического образца в контакт с по меньшей мере одной прогастрин-связывающей молекулой,
- измерение связывания указанной прогастрин-связывающей молекулы с прогастрином в указанном первом образце; и

б) определение концентрации прогастрина во втором биологическом образце, полученном от указанного пациента после лечения, включающее:

- приведение указанного второго биологического образца в контакт с по меньшей мере одной прогастрин-связывающей молекулой,
- измерение связывания указанной прогастрин-связывающей молекулы с прогастрином в указанном втором образце; и

в) сравнение концентрации прогастрина стадии а) с концентрацией прогастрина стадии б),

причем превышение концентрации прогастрина в первом образце над концентрацией прогастрина во втором образце указывает на то, что лечение является эффективным.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где указанная прогастрин-связывающая молекула представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

10. Способ по любому из п.п. 1–9, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из N-концевых моноклональных антител к прогастрину и C-концевых моноклональных антител к прогастрину.

11. Способ по любому из пп 1-10, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, заданным в SEQ ID NO 2 или SEQ ID NO 3.

5 12. Способ по любому из пп. 1–11, где антитело, связывающееся с прогастрином, представляет собой моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из:

- моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка 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, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 7, 8 и 9 соответственно,

- моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка 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, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 13, 14 и 15 соответственно,

- моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка 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, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 19, 20 и 21 соответственно,

- моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка 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, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 25, 26 и 27 соответственно,

- моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка 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, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 31, 32 и 33 соответственно,

- моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере один, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка 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, преимущественно по меньшей мере два, преимущественно три определяющих комплементарность участка CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO 37, 38 и 39 соответственно.

13 Способ по любому из пп. 1-12, где связывание указанной прогастрин-связывающей молекулы с прогастрином обнаруживают и/или измеряют с использованием сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), иммуноферментного анализа (ИФА), радиоиммунологического анализа (РИА), Вестерн-блоттинга или иммуногистохимического анализа (ИГХ).

14. Способ по любому из пп. 1-13, где связывание указанной прогастрин-связывающей молекулы с прогастрином обнаруживают и/или измеряют с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) или радиоиммунологического анализа (РИА).

15. Способ по любому из пп. 1–14, где указанный биологический образец приводят в контакт с первой молекулой, которая связывается с первым участком прогастрина, и со второй молекулой, которая связывается со вторым участком прогастрина.

5

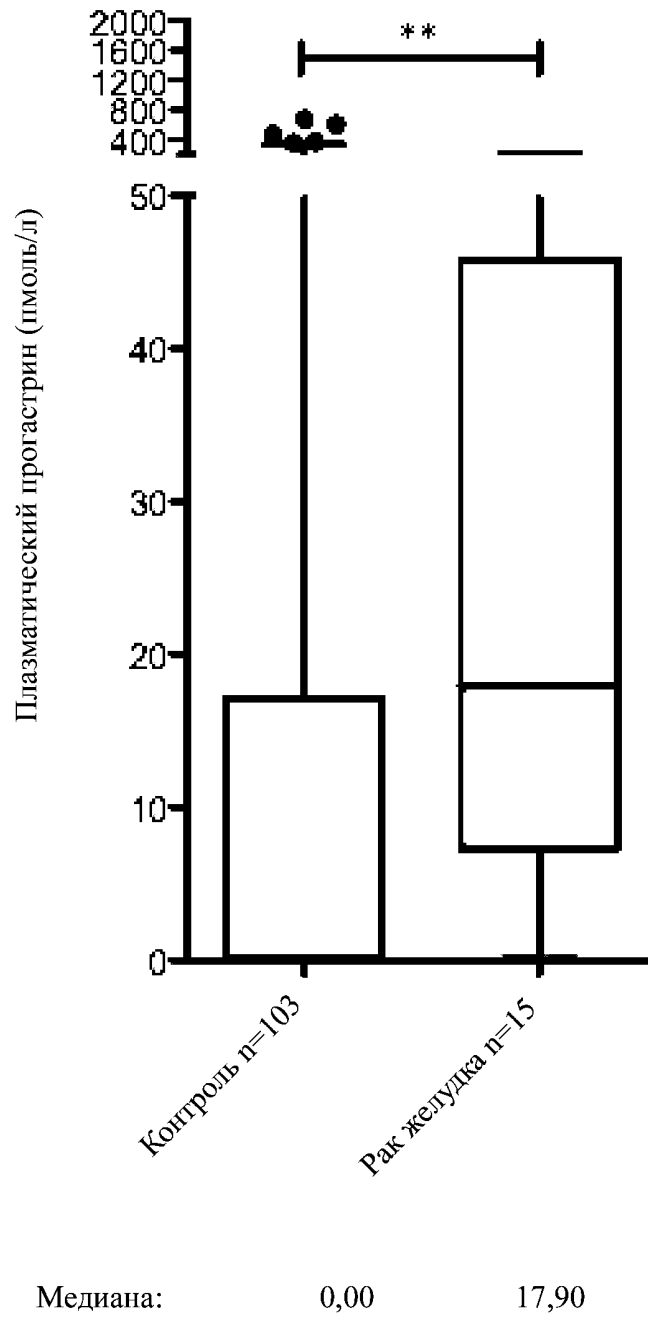
16. Способ по п. 15, где указанная первая молекула связывается с С-концевым участком прогастрина, а указанная вторая молекула связывается с N-концевым участком прогастрина.

10

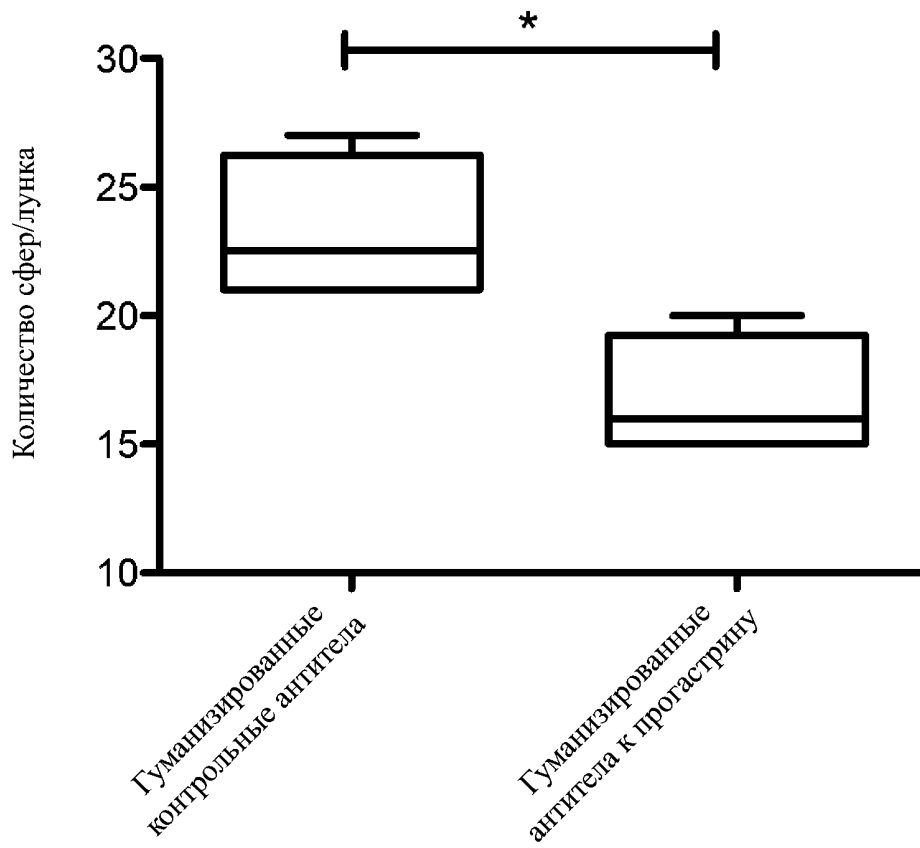
17. Способ по п. 15 или 16, где указанная первая молекула представляет собой моноклональное антитело к прогастрину, а указанная вторая молекула представляет собой поликлональное антитело к прогастрину.

15

18. Способ по любому из пп. 1–17, где биологический образец выбран из крови, сыворотки крови и плазмы крови.



ФИГ. 1



ФИГ. 2

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202092573

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

G01N 33/574 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА: G01N 33/574, C07K 16/26

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
PubMed, EMBL-EBI, Espacenet, EAPATIS

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	WO2011083091 A2 (BIOREALITES S A S et al.), 14.07.2011, [0063],[0076], [0078], [0089], [0090], [0106], примеры, формула.	1-18
Y	QING HE et al., Anti-Gastrins Antiserum Combined with Lowered Dosage Cytotoxic Drugs to Inhibit the Growth of Human Gastric Cancer SGC7901 Cells in Nude Mice, Journal of Cancer 2015, Vol.6, pp.448-456	1-18
Y	US20141227301 A1 (ONCOLOGIX LTD), 14.08.2014, [0003]-[0009], пример 5, фиг.3	1-18

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

«P» - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

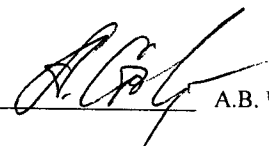
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **12/04/2021**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины


А.В. Чебан