

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041328**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.10.11**

(21) Номер заявки  
**201992316**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.03.30**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**


---

(31) **17305381.0**(32) **2017.03.30**(33) **EP**(43) **2020.03.05**(86) **PCT/EP2018/058330**(87) **WO 2018/178352 2018.10.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭСС-ПРОГАСТРИН СА (CH)**

(72) Изобретатель:  
**Приёр Александр (FR)**

(74) Представитель:  
**Хмара М.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2015075445**  
**WO-A1-2016145139**

**OSAMU NAGAKAWA ET AL.:** "Serum progastrin-releasing peptide (31-98) in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma", *UROLOGY.*, vol. 60, no. 3, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 527-530, XP055391097, US ISSN: 0090-4295, DOI: 10.1016/S0090-4295(02)01774-0, the whole document

**MASAHIRO YASHI ET AL.:** "Elevated serum progastrin-releasing peptide (31-98) level is a predictor of short response duration after hormonal therapy in metastatic prostate cancer", *PROSTATE.*, vol. 56, no. 4, 30 June 2003 (2003-06-30), pages 305-312, XP055391023, US ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/pros.10260, the whole document

**MASAHIRO YASHI ET AL.:** "Elevated serum progastrin-releasing peptide (31-98) in metastatic and androgen-independent prostate cancer patients", *PROSTATE.*, vol. 51, no. 2, 10 April 2002 (2002-04-10), pages 84-97, XP055391027, US ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/pros.10063 the whole document

**D. CORNELIO ET AL.:** "Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy", *ANNALS OF ONCOLOGY.*, vol. 18, no. 9, 13 August 2007 (2007-08-13), pages 1457-1466, XP055391083, NL ISSN: 0923-7534, DOI: 10.1093/annonc/mdm058, the whole document

**JOSEPH ISCHIA ET AL.:** "Gastrin-releasing peptide: Different forms, different functions", *BIOFACTORS.*, vol. 35, no. 1, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 69-75, XP055391092, GB ISSN: 0951-6433, DOI: 10.1002/biof.10, pages 72-73

**YASHI M. ET AL.:** "BIOACTIVE NEUROPEPTIDE PRECURSOR, PROGASTRIN-RELEASING PEPTIDE (PROGRP) IS A DISTINCT PROGNOSTIC MARKER IN METASTATIC AND HORMONE-REFRACTORY PROSTATE CANCER", *EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS, ELSEVIER BV, NL*, vol. 7, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), page 207, XP022610541, ISSN: 1569-9056, DOI: 10.1016/51569-9056(08)60541-2 [retrieved on 2008-03-01], abstract

**WO-A2-2011083088**

**WO-A1-2011083089**

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

**B1****041328****041328 B1**

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

Согласно Международному агентству исследования рака рак предстательной железы (РС) представляет собой второй самый распространенный рак у мужчин и пятую ведущую причину, связанную с раковым заболеванием смерти у мужчин. В 2012 г. он проявился у 1,1 млн мужчин и вызвал 307000 смертей. В Соединенных Штатах он представляет собой самое обычное некожное раковое заболевание у мужчин. Оценочно у одного из шести белых мужчин и одного из пяти чернокожих мужчин будет диагностирован рак предстательной железы за время их жизни, с повышением вероятности с увеличением возраста.

Большинство раковых заболеваний предстательной железы (95%) представляют собой аденокарциному или железистые раковые заболевания, которые начинаются, когда нормальные клетки предстательной железы, секретирующие семенную жидкость, мутируют до раковых клеток. Приблизительно 4% случаев рака предстательной железы имеют переходо-клеточную морфологию, и считается, что они возникают из уротелиальной выстилки предстательной части уретры. Считается, что небольшое число случаев, которые имеют нейроэндокринную морфологию, возникают из нейроэндокринных стволовых клеток, обычно присутствующих в предстательной железе, или из-за нарушенных программ дифференциации во время превращения клеток. Плоскоклеточные карциномы составляют меньше чем 1% от всех карцином предстательной железы. Рак предстательной железы чаще всего метастазирует в кости, лимфатические узлы и может вторгаться в прямую кишку, мочевого пузыря и нижние отделы мочеточников после местного прогрессирования.

Способы лечения обычно включают хирургию, химиотерапию, лучевую терапию и таргетную терапию - одни или в комбинации. Однако результаты часто являются плохими с меньше чем 10% 5-летней выживаемости в глобальном масштабе. Это, главным образом, происходит потому, что у большинства людей выявляется только развившееся заболевание, что имеет прямые последствия для коэффициента выживаемости. В некоторых азиатских странах было показано то, что усилия по скринингу ассоциированы с более высокими коэффициентами выживаемости.

Пятилетняя выживаемость всей популяции с раком предстательной железы является очень высокой (около 99%). Однако данный коэффициент значительно падает при метастазировании данного ракового заболевания (около 28,5%). К счастью, примерно у 80% пациентов диагностируется локализованное заболевание (Surveillance E; End Results Program (SEER). Surveillance, Epidemiology, and Ends Results Program. Fast Stats; 2016 [процитировано 12 сентября 2016]. Доступно на: <http://seer.cancer.gov/faststats/selections.php>). В значительной степени это обусловлено улучшениями способов скрининга. Однако чаще всего используемый биомаркер - специфический антиген простаты (PSA) оказался противоречивым в качестве диагностического анализа из-за его ограничений.

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

Это является целью настоящего изобретения.

#### **Описание изобретения**

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

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

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

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

В первом аспекте настоящее изобретение относится к способу оценки *in vitro* риска присутствия рака предстательной железы, где указанный способ включает стадию выявления прогастрина в биологиче-

ском образце от субъекта. Присутствие прогастрина в образце указывает на то, что есть риск присутствия рака предстательной железы.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

в) определение контрольной концентрации прогастрина в контрольном образце,

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

д) оценка из сравнения стадии г) риска присутствия рака предстательной железы.

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

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

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

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

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

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

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

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

а) определение контрольной концентрации прогастрина в контрольном образце,

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

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

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

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

б) выявление связывания указанной молекулы, связывающей прогастрин, с прогастрином в указан-

ном образце, где указанное связывание указывает на присутствие метастазирующего рака предстательной железы у указанного субъекта.

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

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

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

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

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

а) определение контрольной концентрации прогастрина в контрольном образце,

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

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

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

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

Выражение "оценка риска присутствия рака предстательной железы у субъекта" обозначает определение относительной вероятности для данного субъекта страдания от рака предстательной железы по сравнению с контрольным субъектом или значением. Согласно способу по изобретению представлено средство в оценке указанного риска, в комбинации с другими способами или индикаторами, такими как клиническое обследование, биопсия и определение уровня известного биомаркера рака предстательной железы, такого как, например, специфический антиген простаты (PSA).

Выражение "диагностика *in vitro*" означает определение того, страдает ли субъект от конкретного заболевания. Известно то, что постановка диагноза рака предстательной железы включает по меньшей мере клиническое наблюдение симптомов указанного субъекта и выявление PSA. Осуществление анализа PSA в настоящее время используется в качестве биомаркера. Однако PSA не представляет собой идеальный биомаркер, в значительной мере из-за общей неопределенности относительно его важности, что привело в 2012 г. к рекомендации Американской рабочей группы по профилактическим мероприятиям против применения уровней PSA для скрининга (Gaudreau et al., *Biomark Cancer*. 2016, 8(Suppl 2): 15-33). Хотя некоторые биомаркеры и были идентифицированы в фазе открытия, важным вызовом все еще является их перенос в клиническую практику, главным образом, из-за отсутствия способа систематической оценки (McGrath et al., *Prostate Int*. 2016, 4(4): 130-135; Gaudreau et al, *Biomark Cancer*. 2016, 8(Suppl 2): 15-33; Saini, *Cell Oncol (Dordr)*. 2016, 39(2): 97-106).

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

В более конкретном воплощении настоящее изобретение относится к способу диагностики *in vitro* рака предстательной железы у субъекта, который включает определение концентрации прогастрина в указанном биологическом образце и определение известного биомаркера рака предстательной железы, предпочтительно PSA.

Выражение "рак предстательной железы" относится к любому типу рака, возникающего в предстательной железе. Рак предстательной железы включает, в частности, "аденокарциному предстательной железы", но также саркомы, мелкоклеточные карциномы, нейроэндокринные опухоли, переходноклеточные карциномы, которые также могут развиваться в пределах предстательной железы. Выражение "рак предстательной железы" также включает рак предстательной железы, ассоциированный с метастазом, в частности метастазом в кости, лимфатические узлы, но также в прямую кишку, мочевого пузыря и нижний отдел мочеточников.

Термин "прогастрин" обозначает пептид прогастрина млекопитающего и, в частности, человеческого прогастрина. Во избежание сомнений, без какого-либо точного определения выражение "человеческий

прогастрин" относится к человеческому PG (прогастрин) последовательности SEQ ID NO: 1. А именно, человеческий прогастрин содержит N-концевой и C-концевой домены, которые не присутствуют в упомянутых выше биологически активных формах гормона гастрина. Предпочтительно последовательность указанного N-концевого домена представлена SEQ ID NO: 2. В другом предпочтительном воплощении последовательность указанного C-концевого домена представлена SEQ ID NO: 3.

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

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

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

Указанный способ может, в частности, быть выбран среди следующих: способ, основанный на иммуновыявлении, способ на основе вестерн-блоттинга, способ на основе масс-спектрометрии, способ на основе хроматографии и способ на основе проточной цитометрии. Хотя в пределы данного изобретения и включаются любые подходящие способы для осуществления анализов, особенно полезными для проведения способа по изобретению являются такие способы, как FACS, ELISA, RIA, вестерн-блоттинг и ИНС.

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

"Биологический образец" в том виде, в котором он используется в данном документе, представляет собой образец биологической ткани или жидкости, который содержит нуклеиновые кислоты или полипептиды, например, белок, полинуклеотид или транскрипт рака предстательной железы. Такой образец должен обеспечивать определение уровней экспрессии прогастрина. Известно то, что прогастрин является секретлируемым белком. Предпочтительные биологические образцы для определения уровня белка прогастрина, таким образом, включают биологические жидкости. Термин "биологическая жидкость" в том виде, в котором он используется в данном документе, означает любую жидкость, которая включает вещество биологического происхождения. Предпочтительные биологические жидкости для применения в настоящем изобретении включают жидкости организма животного, например, млекопитающего, предпочтительно человеческого субъекта. Жидкость организма может представлять собой любую жидкость организма, включающую кровь, плазму, сыворотку, лимфу, спинномозговую жидкость (CSF), слюну, пот и мочу, но не ограничивающуюся ими. Предпочтительно указанные предпочтительные жидкие биологические образцы включают такие образцы, как образец крови, образец плазмы или образец сыворотки. Более предпочтительно, биологический образец представляет собой образец крови. В самом деле, такой образец крови может быть получен совершенно безвредным отбором крови у пациента и, таким образом, обеспечивает неинвазивную оценку рисков того, что у субъекта разовьется опухоль.

Термин "биологический образец" в том виде, в котором он используется в данном документе, также включает образец солидного рака пациента, подлежащего анализу, когда раковое заболевание представляет собой солидное раковое заболевание. Такой образец солидного рака обеспечивает проведение спе-

циалистом любого типа измерения уровня биомаркера по изобретению. В некоторых случаях способы по изобретению могут дополнительно включать предварительную стадию отбора образца солидного рака от пациента. "Образцом солидного рака" называется образец опухолевой ткани. Даже у ракового пациента ткань, которая является местом опухоли, все еще содержит неопухолевую здоровую ткань. "Образец рака", таким образом, должен ограничиваться опухолевой тканью, взятой от пациента. Указанный "раковый образец" может представлять собой образец биопсии или образец, отобранный в результате хирургической резекционной терапии.

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

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

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

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

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

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

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

В конкретном воплощении способа по изобретению контрольный образец отбирают от субъектов, не имеющих ракового заболевания и предпочтительно какой-либо патологии. Следует понимать то, что согласно природе биологического образца, отобранного у пациента, контрольный образец будет представлять собой биологический образец той же самой природы, что и указанный биологический образец.

Уровень прогастрина определяется в настоящем способе определением количества прогастрина,

которое связывается молекулой, связывающей прогастрин, предпочтительно антителом, распознающим прогастрин.

"Молекулой, связывающей прогастрин" в данном документе называется любая молекула, которая связывается с прогастрином, но не связывается с гастрином-17 (G17), гастрином-34 (G34), гастрином 17 с глициновым удлинением (G17-Gly) или гастрином 34 с глициновым удлинением (G34-Gly). Молекула, связывающая прогастрин, по настоящему изобретению может представлять собой любую молекулу, связывающую прогастрин, такую как, например, молекула антитела или молекула рецептора. Предпочтительно молекула, связывающая прогастрин, представляет собой антитело против прогастрина или его антигенсвязывающий фрагмент.

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

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

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

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

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

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

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

стандартизированное ограничение каркасных областей (FR1-IMGT: положения 1-26, FR2-IMGT: 39-55, FR3-IMGT: 66-104 и FR4-IMGT: 118-128) и областей, определяющих комплементарность: CDR1-IMGT: 27-38, CDR2-IMGT: 56-65 и CDR3-IMGT: 105-117. Так как пробелы представляют собой незанятые положения, длины CDR-IMGT (показанные между скобками и разделенные точками, например [8.8.13]) становятся ключевой информацией. Уникальная нумерация IMGT используется в 2D (двумерных) графических представлениях, обозначенных как IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas Q. and Lefranc M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], и в 3D (трехмерных) структурах в IMGT/3Dstructure-DB [Kaas Q., Ruiz M. and Lefranc M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

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

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

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

Термин "моноклональное антитело" обозначает антитело, возникающее из почти гомогенной популяции антител, где данная популяция содержит идентичные антитела, за исключением нескольких возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут находиться в минимальных пропорциях. Моноклональное антитело возникает в результате роста одного клона клеток, такого как гибридома, и отличается тяжелыми цепями одного класса и подкласса и легкими цепями одного типа.

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

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

"Антигенсвязывающие фрагменты" могут быть выбраны, без ограничения, в группе, состоящей из фрагментов Fv, scFv (sc обозначает одноцепочечный), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc или диател, или слитых белков с разупорядоченными пептидами, такими как XTEN (удлиненный рекомбинантный полипептид) или мотивы PAS, или любого фрагмента время полужизни которого было бы увеличено химической модификацией, такой как добавление поли(алкилен)гликоля, такого как поли(этилен)гликоль ("ПЕГиление") (пэгилированные фрагменты называются Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG или Fab'-PEG) ("PEG" обозначает полиэтиленгликоль), или посредством включения в липосому, причем указанные фрагменты имеют по меньшей мере одну из характерных CDR антитела по изобретению. Предпочтительно указанные "антигенсвязывающие фрагменты" будут составлены или будут состоять из частичной последовательности вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела, из которого они происходят, причем указанная частичная последовательность является достаточной для сохранения такой же специфичности связывания, что и у антитела, из которого она происходит, и достаточной аффинности, предпочтительно по меньшей мере равной 1/100, более предпочтительно по меньшей мере - 1/10 аффинности антитела, из которого она происходит, в отношении мишени.

В другом конкретном воплощении в способе диагностики рака предстательной железы согласно

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

пептида, аминокислотная последовательность которого содержит или состоит из аминокислотной последовательности полноразмерного прогастрина и, в частности, полноразмерного человеческого прогастрина SEQ ID NO: 1,

пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует части аминокислотной последовательности прогастрина и, в частности, полноразмерного человеческого прогастрина SEQ ID NO: 1,

пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует части или всей аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина и, в частности, пептидам, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 2), и

пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует части или всей аминокислотной последовательности C-концевой части прогастрина и, в частности, пептидам, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 3),

пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует части аминокислотной последовательности C-концевой части прогастрина и, в частности, пептидам, содержащим аминокислотную последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), соответствующую аминокислотам 71-80 прогастрина.

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

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

Таблица 1

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности	SEQ ID NO	
8B5B11C10	mAb3	CDR 1 VH	GYIFTSYW	SEQ ID NO 4
		CDR 2 VH	FYPGNSDS	SEQ ID NO 5
		CDR 3 VH	TRRDSPOY	SEQ ID NO 6
		CDR 1 VL	QSIVHNGNTY	SEQ ID NO 7
		CDR 2 VL	KVS	SEQ ID NO 8
		CDR 3 VL	FQGSHPVPT	SEQ ID NO 9
		mVH 3	EVQLQQSGTFLARPGASVKMSCKASGYIFTSYVHWVKRPGQGLEWIGGFYPGNSDSRYNQKFKGKATLTAVTASTAYMDLSLTNEDSAVYCTRRDSPQYWGGTTLTVSS	SEQ ID NO 41
		mVL 3	DVLMTQTPLSLPVSLGDOASISCRSSQSIHNSGNTYLEWYLPKPGQSPKLLIYKVSNRFSQVDFRFSGSGSDFTLKISRLEAEDLGVIYFCFGSHVPFTFGGGLTKLEIK	SEQ ID NO 42
		hVH 3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYVHWVRAQPGQRLEWMMGGFYPGNSDSRYNSQKFGQGRVITRDTASTAYMELSLRSEDTAVYCTRRDSPQYWGGTTLTVSS	SEQ ID NO 53
	hVL 3	DVVMTQSPSLPLPVTLGQPASISCRSSQSIHNSGNTYLEWYLPKPGQSPRRLIYKVSNRFSQVDFRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVVYFCFGSHVPFTFGGGLTKVEIK	SEQ ID NO 54	

Таблица 2

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности	SEQ ID NO	
20D2C3G2	mAb4	CDR 1 VH	GYTFSSW	SEQ ID NO 10
		CDR 2 VH	FLPGSGST	SEQ ID NO 11
		CDR 3 VH	ATDGNYDWFAY	SEQ ID NO 12
		CDR 1 VL	QSLVHSSGVTY	SEQ ID NO 13
		CDR 2 VL	KVS	SEQ ID NO 14
		CDR 3 VL	SQSTHVPPPT	SEQ ID NO 15
		mVH 4	QVQLQQSGAELMKPGASVKIS CKATGYTFSSSWIEWLKQRPG HGLEWIGFELPGSGSTDYNEK FKGKATFTADTSSDTAYMLLSS LTSEDSAVYYCATDGNVDWFA YWGQGLTVVSA	SEQ ID NO 43
		mVL 4	DLVMTQTPLSLPVSLGDQASIS CRSSQSLVHSSGVTYLHWYLLQ KPGQSPKLLIYKVSNRFGVDP RFGSGSGGTDFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHVPPPTFGSGTK LEIK	SEQ ID NO 44
		hVH 4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFSSSWMHVWRQAP GQGLEWMGIFLPGSGSTDYAQ KFGGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDVAVYYCATDGNVDW	SEQ ID NO 55
			FAYWGQGLTVVSS	
	hVH 4	DIVMTQTPLSLVTPGQPASIS CKSSQSLVHSSGVTYLYWYLLQ KPGQSPQLLIYKVSNRFGVDP DRFSGSGGTDFTLKISRVEAE DVGYYCSQSTHVPPPTFGQGT KLEIK	SEQ ID NO 56	

Таблица 3

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности	SEQ ID NO	
1E9D9B6	mAb16	CDR 1 VH	GYTFTSY	SEQ ID NO 16
		CDR 2 VH	INPSNGGT	SEQ ID NO 17
		CDR 3 VH	TRGGYPPFDY	SEQ ID NO 18
		CDR 1 VL	QSLDSDGKTY	SEQ ID NO 19
		CDR 2 VL	LVS	SEQ ID NO 20
		CDR 3 VL	WQGTHSPYT	SEQ ID NO 21
		mVH 16	QVQLQQSGAELVKPGASVKLS CKASGYTFTSYMYWVKQRP GQGLEWIGEINPSNGGTNFNE KFKSKATLTVDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCTRGGYPPFD YWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO 45
		mVL 16	DVVMQTPLTSLVTVGRPASIS CKSSQSLDSDGKTYLYWLLQ RPGQSPKRLIYLVSELDGSGVDP RITGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYYCWQGTHSPYTFGGGT KLEIK	SEQ ID NO 46
		hVH 16a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYMYWVKQRP GQGLEWMGIINPSNGGTSYAQ KFGGRVTMTRDTSTSTVYMEL	SEQ ID NO 57

			SSLRSEDVAVYYCTRGGYPF DYWGQGTTVTVSS	
		huVH 16b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYFTFSYMHWRQAP GQGLEWMIINPSNGGTSYAAQ KFQGRVTMRDSTSTVYME SSLRSEDVAVYYCTRGGYPF DYWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO 58
		huVH 16c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYFTFSYMYWVRQAP GQGLEWMIINPSNGGTSYAAQ KFQGRVTMRDSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCTRGGYPF FDYWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO 59
		huVL 16a	DVVMTQSPVLPVTLGQPASIS CRSSQSLDSDGKTYLWFQQ RPGQSPRRLLYLVSNRDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCWQGTTHSPYFGQG TKLEIK	SEQ ID NO 60
		huVL 16b	DVVMTQSPVLPVTLGQPASIS CRSSQSLDSDGKTYLWFQQ RPGQSPRRLLYLVSNRDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCWQGTTHSPYFGQG TKLEIK	SEQ ID NO 61
		huVL 16c	DVVMTQSPVLPVTLGQPASIS CRSSQSLDSDGKTYLWFQQ RPGQSPRRLLYLVSNRDSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCWQGTTHSPYFGQG TKLEIK	SEQ ID NO 62

Таблица 4

Депони- рование гибридомы	mAb	Аминокис- лотные последова- тельности		SEQ ID NO
1B3B4F11	mAb19	CDR 1 VH	GYSITSDYA	SEQ ID NO 22
		CDR 2 VH	ISFSGYT	SEQ ID NO 23
		CDR 3 VH	AREVNYGDSYHFDY	SEQ ID NO 24
		CDR 1 VL	SQHRTYT	SEQ ID NO 25
		CDR 2 VL	VKKGDSH	SEQ ID NO 26
		CDR 3 VL	GVGDAIKGQSVFV	SEQ ID NO 27
	mVH 19	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLT CTVTGYSITSDYAWNWRQHP GNKLEWMIINPSNGGTSYAAQ LKSRTISVDTSKNQFSLKLSV VTTEDATYYCAREVNYGDSY HFDYWGQGTIVTVSS	SEQ ID NO 47	
	mVL 19	QLALTQSSASFLGASAKLTC TLSSQHRITYIEWYQQSLKLP PKYVMEVKKDGSHTGHGIPD RFGSSSGADRYLSISNIQPED EAIYICGVGDAIKGQSVFVFGG GTKVTVL	SEQ ID NO 48	
	huVH 19a	QVQLQESGPGLVKPSQSLSLT CTVSGYSITSDYAWNWRQHP GKLEWIGYISFSGYTYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCAREVNYGDSYH FDYWGQGTIVTVSS	SEQ ID NO 63	
	huVH 19b	QVQLQESGPGLVKPSQSLSLT CTVSGYSITSDYAWNWRQHP GKLEWIGYISFSGYTYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCAREVNYGDSYH FDYWGQGTIVTVSS	SEQ ID NO 64	
	huVH 19c	QVQLQESGPGLVKPSQSLSLT CTVSGYSITSDYAWNWRQHP	SEQ ID NO 65	

		GKLEWIGYISFSGYTSYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCAREVNYGDSYH FDYWGGGLTVTVSS	
	huVL 19a	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC TLSSQHRITYTIEWHQQPEKG PRYLMKVKKDGSHKGDGIPD RFGSSSSGAERYLTISLQSED EADYYCGVGDAIKQSVFVFG GGTKVEIK	SEQ ID NO 66
	huVL 19b	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC TLSSQHRITYTIAWHQQQPEKG PRYLMKVKKDGSHKGDGIPD RFGSSSSGAERYLTISLQSED EADYYCGVGDAIKQSVFVFG GGTKVEIK	SEQ ID NO 67
	huVL 19c	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC TLSSQHRITYTIEWHQQPEKG PRYLMEVKKDGSHKGDGIPD RFGSSSSGAERYLTISLQSED EADYYCGVGDAIKQSVFVFG GGTKVEIK	SEQ ID NO 68

Примеры моноклональных антител, которые могут быть получены с использованием иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность "QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN" (С-концевая часть прогастрина), соответствующую аминокислотной последовательности 55-80 человеческого прогастрина, включают антитела, обозначенные в следующих табл. 5 и 6 как mAb8 и mAb13, но не ограничиваются ими. Экспериментальные результаты картирования эпитопов показывают то, что mAb13 действительно специфично связывается с эпитопом в пределах указанной С-концевой аминокислотной последовательности hPG. Другим примером моноклонального антитела, которое может быть получено таким образом, является антитело Mab14, продуцируемое гибридомой 2H9F4B7, описанной в WO 2011/083088. Гибридома 2H9F4B7 была депонирована согласно Будапештскому соглашению в CNCM, Институт Пастера, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Париж CEDEX 15, Франция, 27 декабря 2016 г., согласно ссылке I-5158 (см. WO 2017/114973).

Таблица 5

Депонирование гибридомы	mAb	Аминокислотные последовательности	SEQ ID NO	
1C10D3B9	mAb8	CDR 1 VH	GFTFTTYA	SEQ ID NO 28
		CDR 2 VH	ISSGGTYT	SEQ ID NO 29
		CDR 3 VH	ATQGNYSLDF	SEQ ID NO 30
		CDR 1 VL	KSLRHTKGITF	SEQ ID NO 31
		CDR 2 VL	QMS	SEQ ID NO 32
		CDR 3 VL	AQNLELPLT	SEQ ID NO 33
	mVH 8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWWRQA PGKGLEWATISSGGTYTY ADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGN YSLDFWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO 49	
	mVL 8	DIVMTQSPSLPVTGPASIS SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLAG VPDRFSSSGSGTDFLTKISRV EAEDVGVVYCAQNLELPLTF GGTKVEIK	SEQ ID NO 50	
	VH hz8CV1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWWRQA PGKGLEWSSISSGGTYTY ADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGN YSLDFWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO 69	
	VL hz8CV1	DIVMTQSPSLPVTGPASIS SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNRASG VPDRFSGSGSGTDFLTKISRV	SEQ ID NO 70	

			EAEDVGVVYCAQNLELPLTF GGGTKVEIK	
		VH hz8CV2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWRQA PGKGLEWVATISSGGTYTY ADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDAVYYCATQGN YSLDFWQGTTTVVSS	SEQ ID NO 71
		VL hz8CV2	DIVMTQSPVLPVTPGEPASI SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLASG VPDRFSSSGSDFTLKISRV EAEDVGVVYCAQNLELPLTF GGGTKVEIK	SEQ ID NO 72
		CH hz8CV2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFTTYAMSWRQA PGKGLEWVATISSGGTYTY ADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDAVYYCATQGN YSLDFWQGTTTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKT HTCPPCPAPELGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVHLQDNLNGKEYCKKVS NKALPAIEKTIKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFC	SEQ ID NO 73
			SVMHEALHNYTQKLSLSLSP GK	
		CL hz8CV2	DIVMTQSPVLPVTPGEPASI SCRSSKSLRHTKGITFLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLASG VPDRFSSSGSDFTLKISRV EAEDVGVVYCAQNLELPLTF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKQWVKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYLSLST LTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO 74

Таблица 6

Депони- рование гибридомы	mAb	Аминокис- лотные последова- тельности		SEQ ID NO
2С6С3С7	mAb13	CDR 1 VH	GFIFSSYG	SEQ ID NO 34
		CDR 2 VH	INTFGDRT	SEQ ID NO 35
		CDR 3 VH	ARGTGTY	SEQ ID NO 36
		CDR 1 VL	QSLDSDGKTY	SEQ ID NO 37
		CDR 2 VL	LVS	SEQ ID NO 38
		CDR 3 VL	WQGTTHFPQT	SEQ ID NO 39
	mVH 13		EVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFIFSSYGMSWRQS PDRRLELVASINTFGDRYYYP DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MTSLKSEDTAIYCAARGTGTY WGQGTTLTVSS	SEQ ID NO 51
		mVL 13	DVVLQTPLTSLVTIGQPASIS CKSSQSLDSDGKTYLNWLL QRPQGSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFTGSGSDFTLKISRVE	SEQ ID NO 52

		AEDLVVYCWQGHFPQTF GGGKLEIK	
	huVH 13a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFIFSSYGMSWVRQA PGKGLEWVANINTFGDRYY VDSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGTG TYWGQGLTVVSS	SEQ ID NO 75
	huVH 13b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFIFSSYGMSWVRQA PGKGLEWVASINTFGDRYY VDSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGTG TYWGQGLTVVSS	SEQ ID NO 76
	huVL 13a	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCRSSQSLSDGKTYLNWF QQRPGQSPRRLLYLVSNRDS GVPDRFSGSGGTDFTLKIS RVEAEDVGVYCWQGHFP QTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO 77
	huVL 13b	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCRSSQSLSDGKTYLNWF QQRPGQSPRRLLYLVSKRDS GVPDRFSGSGGTDFTLKIS RVEAEDVGVYCWQGHFP QTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO 78

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

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

Термины "антитела против N-конца hPG" и "антитела против C-конца hPG" обозначают антитела, связывающиеся с эпитопом, содержащим аминокислоты, расположенной в N-концевой части hPG, или с эпитопом, содержащим аминокислоты, расположенной в C-концевой части hPG, соответственно. Предпочтительно термин "антитела против N-конца hPG" относится к антителам, связывающимся с эпитопом, расположенным в домене прогастрина, последовательность которого представлена SEQ ID NO: 2. В другом предпочтительном воплощении термин "антитела против C-конца hPG" относится к антителам, связывающимся с эпитопом, расположенным в домене прогастрина, последовательность которого представлена SEQ ID NO: 3.

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

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

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

легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной

идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 10, 11 и 12, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13, 14 и 15, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно, моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно, моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23 и 24, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 22, 23 и 24, соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно, моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно по меньшей мере три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно, и моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно, и легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно, или последовательностей с по меньшей мере 80%-ной, предпочтительно 85%-ной, 90%-ной, 95%-ной и 98%-ной идентичностью после оптимального выравнивания с последовательностями SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно.

В значении по настоящему изобретению "процентная доля идентичности" или "% идентичности" между двумя последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот означает процентную долю идентичных нуклеотидов или аминокислотных остатков между двумя последовательностями, подлежащими сравнению, полученную после оптимального выравнивания, причем данная процентная доля является чисто статистической и различия между двумя данными последовательностями распределяются по их длине случайным образом.

Сравнение двух последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот традиционно проводится посредством сравнения последовательностей после их оптимального выравнивания, причем указанное сравнение возможно проводить по отрезкам или с использованием "окна выравнивания". Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может проводиться, помимо сравнения вручную, посредством способов, известных специалисту в данной области.

Для аминокислотной последовательности, демонстрирующей по меньшей мере 80%-ную, предпочтительно 85%-ную, 90%-ную, 95%-ную и 98%-ную идентичность с контрольной аминокислотной последовательностью, предпочтительные примеры включают последовательности, содержащие эталонную последовательность, определенные модификации, а именно делецию, присоединение или замену по меньшей мере одной аминокислоты, усечение или удлинение. В случае замены одной или более чем одной последовательной или непоследовательной аминокислоты, предпочтительными являются замены, при которых замененные аминокислоты заменяются "эквивалентными" аминокислотами. Здесь подразумевается то, что выражение "эквивалентные аминокислоты" указывает любые аминокислоты, которые

вероятно подлежат замене одной из структурных аминокислот, однако, без модификации биологических активностей соответствующих антител, и данные конкретные примеры определены ниже.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

В более конкретном воплощении композиция по изобретению содержит антитело, распознающее эпитоп прогастрина, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина, где указанная аминокислотная последовательность может включать остатки 10-14 hPG, остатки 9-14 hPG, остатки 4-10 hPG, остатки 2-10 hPG или остатки 2-14 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO: 1.

В более конкретном воплощении композиция по изобретению содержит антитело, распознающее эпитоп прогастрина, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности С-концевой части прогастрина, где указанная аминокислотная последовательность может включать остатки 71-74 hPG, остатки 69-73 hPG, остатки 71-80 hPG (SEQ ID NO: 40), остатки 76-80 hPG или остатки 67-74 hPG, где аминокислотная последовательность hPG представляет собой SEQ ID NO: 1.

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

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

Согласно предпочтительному воплощению указанное первое антитело связывается с нерастворимым или частично растворимым носителем. Связывание прогастрина указанным первым антителом приводит к захвату прогастрина из указанного биологического образца. Предпочтительно указанное первое антитело представляет собой антитело, связывающееся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности С-концевой части прогастрина, как описано выше. Более предпочтительно указанное первое антитело представляет собой моноклональное антитело Mab14, продуцируемое гибридомой 2H9F4B7, описанное в WO 2011/083088. Гибридома 2H9F4B7 была депонирована согласно Будапештскому соглашению в CNCM, Институт Пастера, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Париж CEDEX 15, Франция, 27 декабря 2016 г., согласно ссылке I-5158 (см. WO 2017/114973).

Согласно другому предпочтительному воплощению указанное второе антитело метится выявляемой группировкой, как описано ниже. Связывание прогастрина вторым антителом обеспечивает выявление молекул прогастрина, которые присутствовали в биологическом образце. Кроме того, связывание прогастрина вторым антителом обеспечивает количественное измерение молекул прогастрина, которые

присутствовали в биологическом образце. Предпочтительно указанное второе антитело представляет собой антитело, связывающееся с эпитопом hPG, где указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина, как описано выше. Более предпочтительно указанное антитело к N-концу представляет собой поликлональное антитело, как описано выше. В качестве альтернативы, также можно применять моноклональное антитело, связывающееся с эпитопом в пределах N-конца прогастрина, такое как, например, моноклональные антитела к N-концу, описанные выше, а именно моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, 20 и 21.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В конкретном воплощении способ по изобретению для диагностики *in vitro* рака предстательной железы включает определение концентрации прогастрина в образце от указанного пациента и второй диагностический анализ рака предстательной железы. В более конкретном воплощении способ по изобретению для диагностики *in vitro* рака предстательной железы включает определение концентрации прогастрина в образце от указанного пациента и второй диагностический анализ рака предстательной железы, где указанный второй диагностический анализ включает выявление конкретного биомаркера, такого как, например, PSA, калликреины, антиген 3 PCa (PCa3), TMPRSS2-ERG, SchLAP1, три экзосомных гена (ERG, PCA3, SPDEF), комбинация двух генов мочевой системы (HOXC6 и DLX1), а также любого другого биомаркера рака предстательной железы, известного специалисту (см., например, McGrath et al., Prostate Int. 2016, 4(4): 130-135).

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

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

#### Описание чертежа

Фиг. 1: Концентрацию прогастрина измеряли в 40 образцах плазмы от пациентов с раком легкого и в 119 образцах плазмы от здоровых доноров с использованием набора ELISA DECODE Lab (захватывающее антитело: Mab14, выявляющее антитело: поликлональное против hPG).

#### Примеры

Пример 1. Определение плазматической концентрации прогастрина с использованием поликлональных антител

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

В настоящем примере количественное измерение основывается на способе ELISA, который обеспечивает посредством применения субстрата, реакция которого испускает свет, приписывание значения, пропорционального люминесценции, количеству антител, связавшихся с антигеном, удерживаемым захватывающими антителами.

#### Материал

Реактивы и прибор перечисляются в табл. 7.

Таблица 7

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

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

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

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

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

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

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

раствор Н: 25 пМ, 200 мкл G плюс 200 мкл разбавителя;

раствор I: 10 пМ, 100 мкл H плюс 150 мкл разбавителя.

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

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

Для обнаружения результатов анализа планшеты 3 раза промывают 300 мкл 1x PBS/0,1% Tween-20. Раствор поликлонального кроличьего антитела против прогастрина, где указанные антитела получали с использованием N-концевой части прогастрина в качестве иммуногена, связанного с биотином, в концентрации 0,5 мкг/мл получали разведением в 1x PBS/0,1% Tween-20/0,1% BSA. 100 мкл данного раствора добавляют в каждую лунку. Инкубация происходит в течение 1 ч при 22°C. Обнаружение стрептавидин-HRP осуществляется удалением выявляющего антитела и промывкой 3 раза 300 мкл 1x PBS/0,1% Tween-20, затем получением раствора стрептавидин-HRP в концентрации 20 нг/мл, разведенного в 1x PBS/0,1% Tween-20/0,1% BSA, где 100 мкл данного раствора добавляют в каждую лунку перед инкубацией в течение 1 ч при 22°C.

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

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

#### Способы и результаты

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

Пример 2. Выявление концентрации прогастрина с использованием моноклональных антител против прогастрина.

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

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

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

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

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

инкубируют в течение 1 ч при 22°C.

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

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

Медианная плазматическая концентрация прогастрина рассчитывается у пациентов, имеющих рак предстательной железы, и сравнивается с медианной плазматической концентрацией прогастрина в плазме контрольных пациентов. Эти данные демонстрируют то, что пациенты с раком предстательной железы имеют повышенные уровни прогастрина в их плазме по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

**Пример 3.** Выявление плазматической концентрации прогастрина с использованием комбинации поликлональных антител и моноклональных антител

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

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

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

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

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

раствор А: предварительное разведение 1/10, 2 мкл маточного раствора плюс 18 мкл буфера;

раствор В: предварительное разведение 1/100, 10 мкл А плюс 90 мкл буфера;

раствор С: предварительное разведение 1/1000, 10 мкл В плюс 90 мкл буфера;

раствор D: 500 пМ, 5,55 мкл С плюс 494,5 мкл разбавителя;

раствор E: 250 пМ, 250 мкл D плюс 250 мкл разбавителя;

раствор F: 100 пМ, 200 мкл E плюс 300 мкл разбавителя;

раствор G: 50 пМ, 250 мкл F плюс 250 мкл разбавителя;

раствор H: 25 пМ, 200 мкл G плюс 200 мкл разбавителя;

раствор I: 10 пМ, 100 мкл H плюс 150 мкл разбавителя.

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

#### **Способы и результаты**

Уровни прогастрина определяются в образцах плазмы от субъектов, для которых позднее стало известно, что у них развился рак предстательной железы. Прогастрин захватывается моноклональным антителом mAb 14 против C-конца, продуцируемым гибридомой 2H9F4B7, описанной в WO 2011/083088 (гибридома 2H9F4B7 депонируется согласно Будапештскому соглашению в CNCM, Институт Пастера, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Париж CEDEX 15, Франция, 27 декабря 2016 г., согласно ссылке I-5158). Выявление осуществляется мечеными поликлональными антителами, специфичными в отношении

N-конца.

Контроль составлен образцами плазмы из общей популяции.

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

Пример 4. Выявление плазматической концентрации прогастрина с использованием набора DECODE Lab

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

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

#### Способы и результаты

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

Вкратце:

1. Приготовить все реагенты, контроли и образцы, как указано в предыдущем разделе, за исключением 1х конъюгата.
2. Удалить избыточную полоску из рамки планшета для микротитрования, вернуть его в упаковку для планшета и хранить при 2-8°C.
3. Образцы и контроли должны анализироваться в двойных повторностях. Приготовить предварительную загрузку контролей и образцов добавлением 65 мкл/повторность в лунки 96-луночных глубоколоночных полипропиленовых микропланшетов.
4. Добавить 50 мкл буфера для разведения образцов во все лунки, которые будут использоваться, из полосок предварительно покрытого 96-луночного планшета, включенного в набор.
5. Перенести 50 мкл контролей и образцов многоканальной пипеткой (8 каналов) из предварительно загруженных 96-луночных глубоколоночных полипропиленовых микропланшетов в полоски предварительно покрытого 96-луночного планшета, включенного в набор. Пример компоновки контролей приводится ниже. Время загрузки не должно превышать 10 мин.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	NC	NC						
B	PC1	PC1						
C	PC2	PC2						
D								
E								
F								
G								
H								

6. Покрыть планшет пластичным парафином и инкубировать в течение 3 ч плюс/минус 5 мин при 37°C (плюс/минус 2°C).
7. Приготовить 1х конъюгат, как описано в разделе 10.2.
8. В конце стадии инкубации отбросить всю жидкость из лунок посредством переворачивания планшета. Перейти к стадии тщательной промывки добавлением 300 мкл на лунку 1х промывочного раствора. Отбросить 1х промывочный раствор посредством переворачивания планшета и тщательно промокнуть рамку планшета для микротитрования на поглощающей бумаге, перевернув его вверх дном. Повторить стадию промывки 6 раз. В конце стадий промывки убедиться в полном удалении жидкости из лунок: вся жидкость была успешно удалена, когда на бумажном полотенце не остается признаков жидкости. Процедура промывки является критически важной. Недостаточная промывка может приводить к плохой точности и ложно повышенным показателям поглощения.
9. Добавить 100 мкл 1х конъюгата в каждую лунку.
10. Покрыть планшет пластичным парафином и инкубировать 30 мин плюс/минус 3 мин при 21°C (плюс/минус 5°C).

11. В конце стадии инкубации отбросить всю жидкость из лунок посредством переворачивания планшета. Перейти к стадии тщательной промывки посредством добавления 300 мкл на лунку 1х промывочного раствора. Отбросить 1х промывочный раствор посредством переворачивания планшета и тщательно промокнуть рамку планшета для микротитрования на поглощающей бумаге, перевернув его вверх дном. Повторить стадию промывки 6 раз. В конце стадий промывки убедиться в полном удалении жидкости из лунок: вся жидкость была успешно удалена, когда на бумажном полотенце не остается признаков жидкости. Процедура промывки является критически важной. Недостаточная промывка будет при-

водить к плохой точности и ложно повышенным показателям поглощения.

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

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

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

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

Как показано на чертеже, медианная плазматическая концентрация прогастрина, измеренная у контрольных пациентов (n равно 119) составляла 0 пМ, тогда как у пациентов, имеющих рак предстательной железы (n равно 40), была выявлена значимая плазматическая концентрация прогастрина. Таким образом, пациенты с раком предстательной железы имеют более высокие уровни прогастрина в их плазме, чем здоровые контрольные индивиды.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики *in vitro* рака предстательной железы у субъекта, включающий следующие стадии:

а) приведение в контакт биологического образца от указанного субъекта с по меньшей мере одним антителом, связывающимся с прогастрином, или его антигенсвязывающим фрагментом, где биологический образец выбран из следующего: кровь, сыворотка и плазма;

б) выявление связывания указанного антитела, связывающегося с прогастрином, или его антигенсвязывающего фрагмента с прогастрином в указанном образце, где связывание указывает на присутствие рака предстательной железы у указанного субъекта.

2. Способ по п.1, в котором стадия б) дополнительно включает определение концентрации прогастрина и где концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пМ в указанном биологическом образце указывает на присутствие рака предстательной железы у указанного субъекта.

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

в) определение контрольной концентрации прогастрина в контрольном образце,

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

д) определение из сравнения стадии г) наличия рака предстательной железы.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбран среди моноклональных антител против N-конца прогастрина и моноклональных антител против C-конца прогастрина.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором указанное антитело, связывающееся с прогастрином, представляет собой моноклональное антитело, выбранное в группе, состоящей из следующих:

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

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

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

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

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

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

моноклональное антитело, продуцируемое гидридомой, депонированной под номером I-5158 в Национальной коллекции культур микроорганизмов (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes,

CNCM), Институт Пастера, 25-28, рю дю Доктор Ру (rue du Docteur Roux), 75724 Париж, "Особое почтовое обслуживание предприятий" (Courtier d'Entreprise a Distribution EXceptionnelle; CEDEX) 15, Франция, 27 декабря 2016 г.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором на стадии (а) указанный биологический образец приводится в контакт с

первым антителом, связывающимся с прогастрином, или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с С-терминальной частью прогастрина, и

вторым антителом, связывающимся с прогастрином, или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с N-терминальной частью прогастрина,

где С-терминальная часть прогастрина определена SEQ ID NO: 3, а N-терминальная часть прогастрина определена SEQ ID NO: 2.

7. Способ по п.6, где первое антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом, который находится в С-концевой части прогастрина, причем эпитоп выбран из группы, состоящей из следующего:

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 71-74 SEQ ID NO: 1,

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 69-73 SEQ ID NO: 1,

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 71-80 SEQ ID NO: 1,

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 76-80 SEQ ID NO: 1, и

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 67-74 SEQ ID NO: 1.

8. Способ по п.6 или 7, где первое антитело, связывающееся с прогастрином, представляет собой моноклональное антитело, продуцируемое гидридомой, депонированной под номером I-5158 в CNCM, Институт Пастера, 25-28, рю дю Доктор Ру (rue du Docteur Roux), 75724 Париж, CEDEX, 15, Франция, 27 декабря 2016 г.

9. Способ по любому из пп.6-8, где второе антитело, связывающееся с прогастрином, или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом, который находится в N-концевой части прогастрина, причем эпитоп выбран из группы, состоящей из следующего:

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 71-74 SEQ ID NO: 1,

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 69-73 SEQ ID NO: 1,

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 71-80 SEQ ID NO: 1,

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 76-80 SEQ ID NO: 1, и

аминокислотная последовательность, соответствующая остаткам 67-74 SEQ ID NO: 1.

10. Способ по любому из пп.6-9, где второе антитело, связывающееся с прогастрином, представляет собой

поликлональное антитело, связывающее эпитоп в N-концевой части прогастрина, или моноклональное антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую следующие три CDR: CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три CDR: CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно.

11. Способ по любому из пп.1-10, где первое антитело связано с нерастворимым или частично растворимым носителем, а второе антитело мечено детектируемой группой.

12. Способ по любому из пп.1-11, в котором указанный биологический образец представляет собой плазму и в котором концентрация прогастрина по меньшей мере 10 пМ указывает на наличие рака предстательной железы у указанного субъекта.

13. Применение антитела, связывающегося с прогастрином, или его антигенсвязывающего фрагмента, таких же, как в любом из пп.1-5 для диагностики рака предстательной железы *in vitro*.

